

**UNIwersYTET MEDYCZNY W POZNANIU  
WYDZIAŁ LEKARSKI II**

**Lek. Magdalena Barlik**

**Klinika Perinatologii i Chorób Kobięcych,  
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu**

**Ocena związku polimorfizmów genu czynnika VII krzepnięcia  
oraz genu tkankowego inhibitora aktywatora plazminogenu z  
poronieniami nawracającymi**

**Rozprawa doktorska**

**Promotor: Prof. dr hab. Krzysztof Drews**

**Kierownik Kliniki Perinatologii i Chorób Kobięcych**

**Uniwersytet Medyczny w Poznaniu**

**POZNAŃ 2014**

*Serdecznie dziękuję Panu Prof. dr hab. Krzysztofowi Drewsowi oraz  
Pani Prof. dr hab. Agnieszce Seremak-Mrozikiewicz za okazaną  
życzliwość i pomoc oraz cenne uwagi udzielone w trakcie  
powstawania niniejszej rozprawy*

# SPIS TREŚCI

<b>WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW</b> .....	<b>6</b>
<b>1. WSTĘP</b> .....	<b>8</b>
1.1. Poronienia nawracające jako istotny problem psychospołeczny.....	8
1.2. Poronienie, poronienia nawracające i nawracające utraty ciąży.....	9
1.3. Częstość występowania poronień nawracających.....	11
1.4. Przyczyny poronień nawracających.....	12
1.4.1. Przyczyny anatomiczne.....	12
1.4.2. Czynniki genetyczne.....	13
1.4.3. Czynniki immunologiczne.....	14
1.4.3.1. Zespół antyfosfolipidowy.....	15
1.4.4. Czynniki hormonalne.....	16
1.4.5. Zakażenia.....	17
1.4.6. Inne przyczyny poronień nawracających.....	18
1.5. Trombofilie wrodzone jako przyczyna poronień nawracających.....	19
1.5.1. Czynniki V Leiden.....	22
1.5.2. Zaburzenia termolabilności reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR).....	23
1.5.3. Wzrost stężenia protrombiny (polimorfizm 20210G>A).....	23
1.5.4. Niedobór antytrombiny III.....	24
1.5.5. Niedobór białka C.....	25
1.5.6. Niedobór białka S.....	25
1.6. Czynniki VII krzepnięcia.....	28
1.6.1. Polimorfizm <i>Arg353Gln</i> ( $R^{353}Q$ ) genu czynnika VII krzepnięcia.....	30
1.6.2. Polimorfizm <i>-323P0/P10</i> genu czynnika VII krzepnięcia.....	31
1.6.3. Polimorfizm <i>-122T&gt;C</i> genu czynnika VII krzepnięcia.....	33
1.7. Inhibitor aktywatora plazminogenu -1.....	34
1.7.1. Polimorfizm <i>-675 4G/5G</i> genu inhibitora aktywatora plazminogenu-1.....	36
1.7.2. Polimorfizm <i>-844G&gt;A</i> genu inhibitora aktywatora plazminogenu-1.....	38
1.7.3. Polimorfizm <i>HindIII C&gt;G</i> genu inhibitora aktywatora plazminogenu-1.....	39
1.8. Wybór analizowanych w rozprawie doktorskiej wariantów genetycznych.....	40

<b>2. CEL PRACY</b> .....	<b>42</b>
<b>3. MATERIAŁ I METODYKA</b> .....	<b>43</b>
3.1. Grupa badana.....	43
3.2. Grupa kontrolna.....	45
3.3. Materiał badawczy.....	46
3.4. Izolacja DNA oraz jakościowa i ilościowa ocena wyizolowanego DNA.....	49
3.4.1. Reakcja łańcuchowej polimerazy i polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych.....	50
3.4.2. Polimorfizm <i>Arg353Gln</i> ( R353Q) genu czynnika VII krzepnięcia.....	52
3.4.3. Polimorfizm <i>-323P0/P10</i> genu czynnika VII krzepnięcia.....	52
3.4.4. Polimorfizm <i>-122T/C</i> genu czynnika VII krzepnięcia.....	52
3.4.5. Polimorfizm <i>-675 4G/5G</i> genu <i>PAI-1</i> .....	52
3.4.6. Polimorfizm <i>-844G&gt;A</i> genu <i>PAI-1</i> .....	53
3.4.7. Polimorfizm <i>HindIII C&gt;G</i> genu <i>PAI-1</i> .....	53
3.5. Analiza statystyczna.....	59
<b>4. WYNIKI</b> .....	<b>60</b>
4.1. Charakterystyka danych klinicznych analizowanych pacjentek.....	60
4.2. Analiza wyników badań genetycznych.....	64
4.2.1. Polimorfizm <i>Arg353Gln</i> genu czynnika VII krzepnięcia.....	64
4.2.2. Polimorfizm <i>-323P0/P10</i> genu czynnika VII krzepnięcia.....	66
4.2.3. Polimorfizm <i>-122T&gt;C</i> genu czynnika VII krzepnięcia.....	69
4.2.4. Polimorfizm <i>-675 4G/5G</i> genu <i>PAI-1</i> .....	71
4.2.5. Polimorfizm <i>HindIII C&gt;G</i> genu <i>PAI-1</i> .....	74
4.2.6. Polimorfizm <i>-844G&gt;A</i> genu <i>PAI-1</i> .....	76
4.3. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów w podgrupach kobiet z dwoma oraz z trzema i więcej poronieniami.....	79
4.3.1. Polimorfizm <i>Arg353Gln</i> genu czynnika VII krzepnięcia.....	79
4.3.2. Polimorfizm <i>-323P0/P10</i> genu czynnika VII krzepnięcia.....	82
4.3.3. Polimorfizm <i>-122T&gt;C</i> genu czynnika VII krzepnięcia.....	84
4.3.4. Polimorfizm <i>-675 4G/5G</i> genu <i>PAI-1</i> .....	86
4.3.5. Polimorfizm <i>HindIII C&gt;G</i> genu <i>PAI-1</i> .....	88
4.3.6. Polimorfizm <i>-844G&gt;A</i> genu <i>PAI-1</i> .....	90

4.4. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów w podgrupach kobiet z poronieniami w I trymestrze oraz w I i II trymestrze ciąży.....	92
4.4.1. Polimorfizm <i>Arg353Gln</i> genu czynnika VII krzepnięcia.....	92
4.4.2. Polimorfizm <i>-323P0/P10</i> genu czynnika VII krzepnięcia .....	94
4.4.3. Polimorfizm <i>-122T&gt;C</i> genu czynnika VII krzepnięcia.....	96
4.4.4. Polimorfizm <i>-675 4G/5G</i> genu <i>PAI-1</i> .....	98
4.4.5. Polimorfizm <i>HindIII C&gt;G</i> genu <i>PAI-1</i> .....	100
4.4.6. Polimorfizm <i>-844G&gt;A</i> genu <i>PAI-1</i> .....	102
4.5. Analiza współwystępowania genotypów badanych w pracy polimorfizmów.....	104
<b>5. DYSKUSJA.....</b>	<b>119</b>
5.1. Warianty genetyczne czynnika VII krzepnięcia a ryzyko występowania powikłań położniczych.....	119
5.1.1. Polimorfizm <i>Arg353Gln</i> genu czynnika VII krzepnięcia a ryzyko występowania poronień nawracających.....	121
5.1.2. Polimorfizm <i>-323P0/P10</i> genu czynnika VII krzepnięcia a ryzyko występowania poronień nawracających.....	123
5.1.3. Polimorfizm <i>-122T&gt;C</i> genu czynnika VII krzepnięcia a ryzyko występowania poronień nawracających.....	124
5.2. Znaczenie polimorfizmów genu czynnika VII krzepnięcia w rozwoju chorób o etiologii zakrzepowej.....	126
5.2.1. Znaczenie polimorfizmu <i>Arg353Gln</i> genu czynnika VII krzepnięcia w etiologii chorób o podłożu zakrzepowym.....	127
5.2.2. Znaczenie polimorfizmu <i>-323P0/P10</i> genu czynnika VII krzepnięcia w rozwoju chorób o etiologii zakrzepowej.....	130
5.2.3. Znaczenie polimorfizmu <i>-122T&gt;C</i> genu czynnika VII krzepnięcia w rozwoju chorób o etiologii zakrzepowej.....	132
5.2.4. Znaczenie innych polimorfizmów genu czynnika VII krzepnięcia w etiologii chorób o podłożu zakrzepowym.....	132
5.3. Warianty genetyczne inhibitora aktywatora plazminogenu-1 ( <i>PAI-1</i> ) a ryzyko występowania powikłań położniczych.....	137
5.3.1. Polimorfizm <i>-675 4G/5G</i> genu <i>PAI-1</i> a ryzyko występowania poronień nawracających.....	138

<b>5.3.2. Polimorfizm -844G&gt;A genu <i>PAI-1</i> a ryzyko występowania poronień nawracających.....</b>	<b>140</b>
<b>5.3.3. Polimorfizm <i>HindIII</i> C&gt;G genu <i>PAI-1</i> a ryzyko występowania poronień nawracających.....</b>	<b>143</b>
<b>5.4. Postępowanie u pacjentek z trombofilią wrodzoną i występowaniem poronień nawracających – przegląd aktualnych doniesień.....</b>	<b>146</b>
<b>5.5. Podsumowanie.....</b>	<b>147</b>
<b>6. WNIOSKI.....</b>	<b>149</b>
<b>7. STRESZCZENIE.....</b>	<b>150</b>
<b>8. SUMMMARY.....</b>	<b>153</b>
<b>9. PIŚMIENNICTWO.....</b>	<b>156</b>
<b>10. SPIS TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII.....</b>	<b>166</b>

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACOG	Amerykańskie Towarzystwo Położników i Ginekologów ( <i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i> )
APC	aktywowane białko C ( <i>activated protein C</i> )
APS	zespół antyfosfolipdowy ( <i>antiphospholipid antibody syndrome</i> )
ASRM	Amerykańskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu ( <i>American Society for Reproductive Medicine</i> )
AT III	antytrombina III ( <i>antithrombin III</i> )
BMI	wskaźnik masy ciała ( <i>body mass index</i> )
CRP	białko C-reaktywne ( <i>C-reactive protein</i> )
DCA	kierunkowa tnąca aterektomia ( <i>directional coronary atherectomy</i> )
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowy ( <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i> )
EGF	nabłonkowy czynnik wzrostu ( <i>epidermal growth factor</i> )
ESHRE	Europejskie Towarzystwo Rozrodu Człowieka i Embriologii ( <i>European Society of Human Reproduction and Embriology</i> )
FVII	czynnik VII ( <i>factor VII</i> )
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i>
HDL	lipoproteina o wysokiej gęstości ( <i>high density lipoprotein</i> )
HELLP	anemia hemolityczna, zwiększone stężenie enzymów wątrobowych, małopłytkowość ( <i>hemolytic anemia, elevated liver enzymes, low platelet count</i> )
HIT	małopłytkowość indukowana heparyną ( <i>heparine-induced thrombocytopenia</i> )
IVF	zapłodnienie pozaustrojowe ( <i>in vitro fertilisation</i> )
LH	lutropina ( <i>luteinizing hormone</i> )
LDL	lipoproteina niskiej gęstości ( <i>low density lipoprotein</i> )
MTHFR	reduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolianu ( <i>5,10-methylenetetrahydrofolate reductase</i> )
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD	gęstość optyczna ( <i>optical density</i> )
PAI-1	inhibitor aktywatora plazminogenu-1 ( <i>plasminogen activator inhibitor-1</i> )
PCOS	zespół policystycznych jajników ( <i>polycystic ovary syndrome</i> )
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PTM	polimorfizm 20210G>A genu protrombiny ( <i>prothrombin mutation</i> )

PTCA	przezskórna śródnaczyniowa angioplastyka wieńcowa ( <i>percutaneous transluminal coronary angioplasty</i> )
PTG	Polskie Towarzystwo Ginekologiczne
PU	przedział ufności ( <i>confidence interval</i> )
pz	pary zasad ( <i>base pairs</i> )
RFLP	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych ( <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
RM	poronienia nawracające ( <i>recurrent miscarriages</i> )
RPL	nawracające utraty ciąży ( <i>repeated pregnancy loss</i> )
SD	odchylenie standardowe ( <i>standard deviation</i> )
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SPCA	akcelerator konwersji protrombiny ( <i>serum prothrombin conversion accelerator</i> )
tc.	tydzień ciąży
TF	czynnik tkankowy ( <i>tissue factor</i> )
TIA	przejściowy atak niedokrwienny ( <i>transient ischaemic attack</i> )
tPA	tkankowy aktywator plasminogenu ( <i>tissue plasminogen activator</i> )
TSH	tyreotropina ( <i>thyroid-stimulating hormone</i> )
uPA	aktywator plazminogenu typu urokinazy ( <i>urokinase plasminogen activator</i> )
UTR	region nie podlegający translacji ( <i>untranslated region</i> )
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia ( <i>World Health Organisation</i> )
WR	współczynnik ryzyka ( <i>odds ratio</i> )
VLDL	lipoproteina o bardzo małej gęstości ( <i>very low density lipoprotein</i> )



# 1. WSTĘP

## 1.1. Poronienia nawracające jako istotny problem psychospołeczny

Poronienia nawracające są traumatycznym doświadczeniem, nawet jeśli mają miejsce w bardzo wczesnym etapie ciąży. Jest to ważny problem medyczny, ale również społeczny. Kobiety dotknięte tą patologią powinny być zawsze objęte opieką psychologiczną. Szacuje się, że około 5% par starających się o ciążę doświadcza dwóch następujących po sobie poronień, a około 1% par – trzech lub więcej. Biorąc więc pod uwagę relatywnie wysoką częstość występowania tego powikłania położniczego, jest to również bardzo ważny problem psychospołeczny [91, 73].

Należy także wspomnieć o aspekcie ekonomicznym poronień nawracających. U pacjentki z obciążonym wywiadem w kierunku występowania co najmniej dwóch następujących po sobie poronień należy przeprowadzić rozszerzoną diagnostykę, co jest związane z dodatkowymi kosztami. Uwzględniając najczęstsze przyczyny poronień, są to badania genetyczne, badania obrazowe mające na celu wykrycie ewentualnej wady anatomicznej macicy, badania hormonalne, a także badania w kierunku zakażeń. Trzeba również rozważyć diagnostykę partnera pacjentki. Tego typu postępowanie, jak najbardziej zasadne z punktu widzenia klinicysty, może wydać się dość uciążliwe dla pacjentki. Wiąże się bowiem z licznymi dodatkowymi hospitalizacjami oraz wizytami u różnych specjalistów. Może to wpływać na dezorganizację życia, skutkować częstą absencją w pracy czy też pogorszeniem relacji między partnerami. Zwykle jest to także znaczne obciążenie finansowe.

Okolo połowa kobiet z wywiadem w kierunku występowania poronień nawracających ma trudności z psychologicznym dostosowaniem się do takiej sytuacji, co może prowadzić do depresji, zaburzeń nerwicowych lub ciągłego uczucia lęku trwającego nawet kilka miesięcy. Jakkolwiek w przypadku poronienia rodzice nie nawiązują więzi uczuciowej z dzieckiem, żal po utracie ciąży porównuje się do tego odczuwanego po śmierci dziecka. Poronienia nawracające mają duży psychologiczny wpływ na rodziców, jak i ich najbliższą rodzinę, przybierając postać zaburzeń o charakterze stresu pourazowego, depresji, uczucia niepokoju lub zaburzeń snu. Należy także zaznaczyć, że występowanie poronień nawracających jest tak silnym bodźcem psychicznym, że może wywoływać nawet odroczone reakcje pierwotnie nie związane z tą konkretną patologią [74].

Psychologiczny efekt poronień nawracających jest silny również dlatego, że jest to zwykle zdarzenie niespodziewane. A nawet jeśli pojawiają się sygnały, które zwiastują wystąpienie kolejnego poronienia, naturalnym jest fakt, że większość kobiet skupia się na

nadziei na prawidłowy przebieg ciąży. Pacjentki doświadczające kilku następujących po sobie niepowodzeń, po każdym niepomyślnym zakończeniu ciąży muszą ponownie konfrontować się z traumatyzującym doświadczeniem. Często skutkuje to obwinianiem za to własnej osoby, co potęguje przykre doznania.

W środowisku lekarskim panuje przekonanie, że negatywny psychologiczny aspekt poronień nawracających jest sprawą oczywistą. W związku z tym często na plan dalszy odsuwa się wagę właściwego wsparcia psychologicznego w takich sytuacjach. Nieudzielenie pomocy może przyczynić się do przekształcenia się adekwatnych w takich sytuacjach reakcji emocjonalnych w zaburzenia o charakterze patologicznym. Należy przy tym podkreślić, że emocjonalne reakcje odczuwane przez pacjentkę mogą mieć długofalowe skutki. Jest to także ważne ze względu na fakt, że długotrwały stres prawdopodobnie jest czynnikiem sprzyjającym występowaniu poronień nawracających [73].

Wizyty kontrolne u lekarza prowadzącego powinny odbywać się stosunkowo szybko po poronieniu, w przeciągu 1-2 tygodni. Podczas rozmowy należy omówić przyczyny poronienia oraz ewentualne opcje postępowania medycznego. Jeśli to możliwe, zaleca się unikania badania przedmiotowego w trakcie pierwszego spotkania po utracie ciąży. Ocena stanu psychicznego pacjentki powinna stać się nieodłącznym elementem każdej kolejnej wizyty [91].

## **1.2. Poronienie, poronienia nawracające i nawracające utraty ciąży**

Poronieniem (*abortion, miscarriage*) określa się wydalenie z jamy macicy zarodka lub płodu przed ukończeniem 22 tygodnia ciąży (tc.). Po skończeniu 22 tc. rozpoznaje się poród przedwczesny, niezależnie od tego czy płód urodził się żywy, czy też martwy. Takie kryterium przyjęto w poniższym opracowaniu. Jednak powyższa definicja nie jest powszechnie respektowana. Według niektórych autorów poronienie to samoistne zakończenie ciąży na etapie, w którym płód nie jest zdolny przeżyć poza jamą macicy. Dane historyczne pochodzące z Wielkiej Brytanii podają, że płód może samodzielnie przeżyć, gdy urodzi się po zakończeniu 28 tygodnia ciąży. W miarę bardzo szybkiego rozwoju opieki perinatalnej i neonatologicznej okres ten przesunięto na 24 tc. Obecnie w Wielkiej Brytanii poronieniem określa się każdą ciążę zakończoną przed 23 tc. [127]. Z uwagi na nie zawsze prawidłowo określony czas trwania ciąży w momencie jej zakończenia, szczególnie w krajach rozwijających się, Światowa Organizacja Zdrowia (WHO - *World Health Organisation*) rekomenduje definiowanie poronienia jako zakończenie ciąży przed osiągnięciem przez płód

wagi 500 g, co odpowiada ciąży do 20 tygodnia jej trwania. Jest to oparte na założeniu, że noworodek ważący co najmniej 500 g jest zdolny do samodzielnego przeżycia [163].

Nadal brak jest również pełnej zgodności co do definicji nawracających poronień (RM – *recurrent miscarriages*) i nawracających utrat ciąż (RPL – *repeated pregnancy loss*). Christiansen sugeruje, aby za poronienia nawracające uznawać co najmniej trzy następujące po sobie poronienia, a nawracające utraty ciąż mają dotyczyć powtarzających się niepowodzeń do 28 tygodnia ciąży [24]. Z kolei definicja *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM) z 2013 roku na pierwszym miejscu podkreśla, że poronienia nawracające są chorobą, a rozpoznanie jest stawiane po wystąpieniu co najmniej dwóch samoistnych poronień [121]. Według WHO poronieniami nawracającymi określa się co najmniej trzy występujące po sobie poronienia w jednym związku partnerskim. Jednak zgodnie z rekomendacjami Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego (PTG) dotyczącymi wybranych patologii wczesnej ciąży oraz postępowania w ciąży po zapłodnieniu pozaustrojowym poszerzenie diagnostyki jest wskazane już po dwóch następujących po sobie poronieniach [130, 131]. *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) zaleca ustalenie przyczyny poronienia w przypadku 2 utrat ciąży powyżej 12 tygodnia lub 3 wczesnych utrat ciąży poniżej 12 tygodnia [45].

Należy także zaznaczyć, iż zgodnie z rekomendacjami ASRM każda ciąża, która zakończyła się poronieniem musi być udokumentowana wcześniejszym badaniem ultrasonograficznym lub badaniem histopatologicznym wydalonego z jamy macicy materiału [121]. Tym samym, z definicji poronień nawracających wykluczono utraty ciąż tzw. biochemicznych, czyli rozpoznawanych wyłącznie na podstawie podwyższonego stężenia beta-hCG w moczu lub surowicy krwi. Biorąc powyższe założenia pod uwagę, rozpoznawanie poronienia w oparciu o wzrost z następującym po nim stopniowym spadkiem stężenia beta-hCG jest błędem. Te przypadki dotyczą między innymi samoistnej absorpcji bardzo wczesnych ciąż ektopowych lub zaburzonego procesu implantacji zarodków z anomaliami genetycznymi. U takich pacjentek stężenie beta-hCG pierwotnie może wskazywać na ciążę, ale nigdy jednak nie rozwinię się ona prawidłowo i nie będzie potwierdzona ultrasonograficznie lub histopatologicznie. Ponadto etiologia nawracających utrat ciąż biochemicznych różni się od etiologii nawracających poronień [23].

### 1.3. Częstość występowania poronień nawracających

Uważa się, że wczesna utrata ciąży jest najczęstszym powikłaniem położniczym, dotyczącym 75% kobiet starających się o dziecko. Duża ich część nie jest w ogóle rozpoznawana, często bowiem krwawienie towarzyszące poronieniu jest mylone przez pacjentki z opóźnionym wystąpieniem miesiączki. Większość danych określa częstość występowania samoistnych poronień na 10-15% wszystkich ciąż. Szacuje się, że poronienie dotyczy około 10% ciąż powyżej 6 tygodnia, a 25% ciąż jest zagrożona poronieniem. Jednak uwidocznienie czynności serca płodu w badaniu ultrasonograficznym zmniejsza ryzyko utraty ciąży do 1,5-3% zależnie od tygodnia [148, 153]. Faktyczna częstość poronień jest jednak znacznie wyższa i może sięgać nawet 50%, co wynika z wysokiego odsetka utrat ciąż, tzw. biochemicznych, czyli w okresie przedimplantacyjnym. Dobrze obrazują to wyniki badania Wilcox i wsp. Autorzy tej pracy do grupy badanej zakwalifikowali 221 zdrowych kobiet, które starały się o ciążę. Codziennie oznaczano u nich stężenie beta-hCG w moczu, a za wartość dodatnią pozwalającą na rozpoznanie ciąży biochemicznej przyjęto 0,025 ng/ml przez trzy kolejne dni. Na tej podstawie rozpoznano 198 ciąż, z których 22% uległo zakończeniu zanim ciążę potwierdzono w badaniu ultrasonograficznym. Całkowity odsetek ciąż, które uległy poronieniu po implantacji, łącznie z klinicznie potwierdzonymi poronieniami samoistnymi wynosił 31% [165].

Szacuje się, że około 5% par starających się o ciążę doświadcza dwóch następujących po sobie poronień, a około 1% par – trzech lub więcej. Na uwagę zasługuje również fakt, że prawdopodobieństwo wystąpienia samoistnego poronienia zwiększa się po każdym niepowodzeniu. Ryzyko wystąpienia kolejnego poronienia u pacjentki z wywiadem obciążonym w kierunku jednego niepowodzenia wynosi około 15%, u pacjentki z dwoma poronieniami w wywiadzie ryzyko kolejnej utraty ciąży wzrasta do 30%, natomiast u pacjentki po trzech przebytych poronieniach – aż do 30-45%. Ryzyko to jest zwielokrotnione u pacjentek, które nigdy nie urodziły żywego noworodka. Szacuje się, że szansa na urodzenie zdrowego, donoszonego noworodka u pacjentek z 3, 4 i 5 lub więcej poronieniami w wywiadzie wynosi odpowiednio – 42-86%, 41-72% i 23-51% [24].

Większość dotychczasowych badań dotyczących częstości występowania tej patologii położniczej traktuje temat szerzej, włączając do analizowanych grup pacjentki z wywiadem obciążonym w kierunku nawracających utrat ciąż, czyli ciąż zakończonych przed 28 tygodniem. Jednak należy mieć na uwadze fakt, że częstość występowania poronień nawracających bardzo silnie zależy od doboru grupy badanej. Jeśli analizowaną grupę będą

stanowiły pacjentki, u których wystąpiło spóźnienie miesiączki o 2 lub 3 dni, a wynik testu ciążowego był dodatni, to w efekcie stwierdzi się u nich wysoki odsetek utraty ciąży, a niski braku ciąży. Jeśli natomiast do badania włączone zostaną kobiety w 6-7 tygodniu ciąży, potwierdzonej w badaniu ultrasonograficznym, to większość przedklinicznych poronień nie będzie rozpoznana i odnotuje się wyższy procent kobiet bez ciąży, a niższy poronień [24].

#### 1.4. Przyczyny poronień nawracających



**Rycina 1.** Przyczyny poronień nawracających.

##### 1.4.1. Przyczyny anatomiczne

Szacuje się, że anomalie budowy macicy są obecne u 3% kobiet z wywiadem obciążonym w kierunku nawracających utrat ciąży [26]. Wśród przyczyn anatomicznych, które mogą być bezpośrednią przyczyną poronień nawracających należy wyróżnić wady wrodzone i nabyte macicy.

Częstość występowania wrodzonych wad macicy szacuje się na 0,2 – 10% populacji ogólnej kobiet. Tak duża rozbieżność wynika z najczęściej bezobjawowego występowania anomalii i rozpoznania jej dopiero w trakcie prowadzenia poszerzonej diagnostyki w przypadku niepowodzeń rozrodu. Do wad wrodzonych należą m.in. przegroda macicy,

macica jednoróżna, macica dwurożna, macica podwójna oraz macica łukowata. Szacuje się, że ryzyko poronienia w odniesieniu do wszystkich wad macicy będących konsekwencją nieprawidłowego rozwoju przewodów Müllera jest największe w przypadku przegrody macicy. Najprawdopodobniej wynika to z dużej szansy implantacji zarodka w słabo unaczynionej przegrodzie tkankowej [26, 89].

Wady nabyte natomiast, obejmują mięśniaki macicy, polipy endometrialne, zrosty wewnątrzmaciczne czy zespół Ashermana. Do anatomicznych przyczyn nawracających niepowodzeń ciąży zaliczyć można również niewydolność cieśniowo-szyjkową oraz wady powstałe wskutek wewnątrzmacicznej ekspozycji na dietylstilbestrol.

Patofizjologia udziału wad macicy w etiogenezie poronień nawracających prawdopodobnie polega na nieprawidłowym rozwoju i funkcjonowaniu jednostki maciczno-łożyskowej oraz ograniczeniu wzrastania płodu. Rozważa się również zmniejszoną objętość macicy będącą skutkiem jej nieprawidłowego kształtu jako czynnika zwiększającego ryzyko utraty ciąży [26]. Anatomiczne defekty macicy odpowiadają także za wiele innych powikłań położniczych, w tym poród przedwczesny czy nieprawidłowe położenie i ułożenie płodu. Jednak nie jest wykluczone, że pacjentka z wadą strukturalną macicy urodzi zdrowego, donoszonego noworodka [122, 161, 168].

#### **1.4.2. Czynniki genetyczne**

Uważa się, że 60% samoistnych poronień jest spowodowana aberracjami chromosomowymi płodu. Wynika to z faktu, że duża ilość komórek rozrodczych człowieka zawiera wadliwy materiał genetyczny. W 20-30% oocytów i w 6-8% plemników młodych, zdrowych osób obserwuje się obecność aberracji chromosomowej. Istotne jest, że odsetek ten rośnie wraz z wiekiem kobiety [86]. Uważa się, że trisomia chromosomów autosomalnych stanowi ok. 22% wszystkich aberracji chromosomów będących przyczyną poronienia na wczesnym etapie ciąży. Zwykle jest to mutacja powstająca *de novo* jako skutek nondysjunkcji chromosomów w czasie pierwszego podziału mejotycznego w gametach, przy prawidłowym kariotypie rodziców. Jednak u 3-6% par z wywiadem obciążonym w kierunku występowania poronień nawracających stwierdza się nosicielstwo aberracji chromosomowej, zwykle translokacji lub inwersji. Ponadto u jednego z rodziców może być obecny kariotyp mozaikowy z aneuploidią w części komórek. Najczęściej występującą aberracją jest trisomia chromosomu 16, stanowiąc ok. 30% wszystkich trisomii. Spośród aberracji chromosomów płciowych za najczęstszą przyczynę poronień w I trymestrze ciąży uważa się monosomie chromosomu X, czyli zespół Turnera. Mutacja ta stanowi ok. 19% aberracji będących

przyczyną wczesnych utrat ciąży. U poronionych zarodków i płodów z aberracją chromosomową prawie zawsze stwierdza się znaczne wady rozwojowe. Większość zarodków, u których obecna jest aberracja chromosomowa ulega poronieniu w pierwszym trymestrze ciąży. 60% zarodków, które uległy poronieniu w pierwszym trymestrze ciąży ma aberrację chromosomową, w drugim trymestrze – 15% płodów, a w trzecim – 5% [86].

W aspekcie genetycznym przyczyną poronień nawracających są również submikroskopowe rearanżacje genomowe, ponieważ mogą one wynikać z ich nosicielstwa u rodziców. Tego typu nieprawidłowości genetyczne stwierdza się u około 2% par z wywiadem obciążonym w kierunku występowania poronień nawracających. Ponadto wśród przyczyn genetycznych wymienia się choroby jednogenowe oraz zaburzenia uwarunkowane wieloczynnikowo.

### **1.4.3. Czynniki immunologiczne**

Związane z układem odpornościowym przyczyny nawracających utrat ciąży można podzielić na autoimmunologiczne i alloimmunologiczne. Czynniki alloimmunologiczne są rezultatem różnic w budowie antygenów u konkretnych osób. W ujęciu immunologicznym można przyjąć, że płód jest allogenicznym przeszczepem do organizmu matki z całkiem innym składem antygenów. Poronienie może być wynikiem odrzucenia przeszczepu, czyli płodu. W ostatnich latach wysunięto hipotezę, że w organizmie matki obecne są krążące przeciwciała zwane blokującymi, które w prawidłowych warunkach nie dopuszczają do rozwoju reakcji biorca przeciw dawcy, prawdopodobnie poprzez ukrywanie antygenów obecnych w trofoblastie. Sugeruje się, że u pacjentek z poronieniami nawracającymi może dochodzić do nieprawidłowego funkcjonowania tego typu mechanizmów [41].

Ponadto do zaburzenia procesów odpowiedzialnych za prawidłowy przebieg implantacji i całej ciąży może dochodzić na etapie wzmożonej antygenowości trofoblastu, immunomodulującej roli cytokin prozapalnych i progesteronu oraz immunoregulacji na poziomie doczesnej [93].

Zagrożenie wczesną utratą ciąży jest również istotnie zwiększone w innych, poza zespołem antyfosfolipidowym, jednostkach chorobowych o podłożu autoimmunologicznym, takich jak toczeń rumieniowaty układowy, reumatoidalne zapalenie stawów, choroby autoimmunologiczne tarczycy, zapalenie skórno-mięśniowe czy zapalenie wielomięśniowe [157].

Za immunologicznym podłożem poronień przemawia także częstsze występowanie tego powikłania u kobiet z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy. Częstość

występowania poronień nawracających w tej grupie pacjentek jest 2-3-krotnie wyższa niż w populacji ogólnej. Tłumaczy się to istnieniem uogólnionych zaburzeń immunologicznych towarzyszących autoimmunologicznym chorobom tarczycy, zbyt małym stężeniem hormonów tarczycy dla odpowiedniego etapu ciąży oraz starszym wiekiem pacjentek z rozpoznaniem tego typu zaburzeń czynności gruczołu tarczowego [52, 162].

#### **1.4.3.1. Zespół antyfosfolipidowy**

Wśród chorób o podłożu autoimmunologicznym za bardzo ważną przyczynę poronień nawracających uważa się przede wszystkim zespół antyfosfolipidowy (APS – *antiphospholipid antibody syndrome*), gdzie ryzyko poronienia we wczesnej ciąży sięga nawet 50-70% [85, 157]. Zespół antyfosfolipidowy jest złożoną jednostką chorobową wywołaną przez obecność przeciwciał przeciw proteinom tworzącym kompleksy z fosfolipidami i fosfolipidom zaangażowanym w krzepnięcie. Klinicznie APS manifestuje się występowaniem zakrzepicy żyłnej i tętniczej, nawykowymi poronieniami, trombocytopenią oraz zmianami w układzie krążenia i układzie nerwowym. Należy podkreślić, że co najmniej jedno obumarcie prawidłowego morfologicznie płodu po 10 tc. lub co najmniej trzy następujące po sobie poronienia samoistne przed 10 tc. są jednymi z kryteriów klinicznych rozpoznania zespołu antyfosfolipidowego [102, 141].

Mechanizmy utrat cięż w APS można podzielić na związane z zakrzepicą oraz niezależne od niej. Prokoagulacyjne działanie przeciwciał antyfosfolipidowych prawdopodobnie prowadzi do powstawania ognisk zakrzepicy w doczesnej i kosmówce. Ponadto dochodzi do aktywacji komórek śródbłonna, monocytów oraz płytek krwi. Wskutek aktywacji komórek śródbłonna dochodzi m.in. do nasilonej ekspresji czynnika tkankowego, który generuje wzmożoną ilość trombiny. Obserwuje się ponadto spadek stężenia prostacykliny oraz towarzyszący wzrost stężenia tromboksanu, inhibitora aktywatora plazminogenu oraz antygenów tkankowego aktywatora plazminogenu. Zaburzenie równowagi między prostacykliną a tromboksanem na korzyść tromboksanu skutkuje zwężeniem naczyń krwionośnych i nieprawidłowym krążeniem w obrębie jednostki maczyno-płodowej. Przeciwciała antyfosfolipidowe mogą również hamować zależną od fosfolipidów aktywację białek C i S [39].

Do mechanizmów utrat cięż w APS niezwiązanych z zakrzepicą można zaliczyć obniżone stężenie interleukiny-3, która pełni istotną rolę w prawidłowym rozwoju trofoblastu, m.in. poprzez wspomaganie zagnieżdżenia i inwazji trofoblastu. Ponadto w badaniu histologicznym popłodów wskazuje się na rolę zawałów łożyska jako na ewentualną



przyczynę poronień w APS. Należy również wspomnieć o aktywującym działaniu przeciwciał antyfosfolipidowych w stosunku do układu dopełniacza, co prowadzi do powstania czynników pośredniczących w uszkodzeniu łożyska i jego nieprawidłowym unaczynieniu. Przeciwciała przeciw beta-2-glikoproteinie-1 ograniczają inwazję trofoblastu, a ponadto mają zdolność indukowania apoptozy jego komórek. W mniejszym stężeniu natomiast, nasilają syntezę cytokin i chemokin, co powoduje napływ makrofagów i neutrofilów do doczesnej. Uważa się, że wczesne poronienie u kobiet z APS jest raczej związane z reakcją zapalną niż z zakrzepicą. Powikłania występujące w późniejszych etapach ciąży są natomiast pochodną działania mechanizmów zapalnych i aktywacji krzepnięcia [149].

#### **1.4.4. Czynniki hormonalne**

Owulacja, prawidłowy przebieg implantacji, a także wczesne etapy ciąży są zależne od niezaburzonego funkcjonowania układu wewnątrzwydzielniczego matki. Najwięcej uwagi skupia się na ogólnoustrojowych chorobach endokrynologicznych, w tym cukrzycy i zaburzeniach dotyczących tarczycy, a także na niewydolności lutealnej [151].

Uważa się, że kobiety z prawidłowo kontrolowaną cukrzycą nie są narażone na większe prawdopodobieństwo wystąpienia poronienia. Jednak pacjentki nieskutecznie, bądź nieprawidłowo leczone, co może być udokumentowane zbyt wysokim odsetkiem hemoglobiny glikowanej w pierwszym tryestrze ciąży, należą do grupy podwyższonego ryzyka poronień, jak również wad rozwojowych płodu. Szacuje się, że ryzyko wystąpienia poronień nawracających w tej grupie pacjentek jest 2-3 krotnie większe niż w populacji ogólnej. Ponadto niewyrównana metabolicznie cukrzyca wiąże się z 4-krotnie większym ryzykiem poronienia w porównaniu do cukrzycy metabolicznie wyrównanej [96, 124].

Zarówno nadczynność, jak i niedoczynność tarczycy może być czynnikiem sprawczym występowania poronień nawracających [71]. Jakkolwiek nie ma jednoznacznych dowodów potwierdzających wpływ dysfunkcji tarczycy na ryzyko poronień nawracających, to badanie hormonów gruczołu tarczowego u tego typu pacjentek jest jak najbardziej zasadne. Jednym z prawdopodobnych mechanizmów mogących wyjaśniać związek niedoczynności tarczycy z ryzykiem utraty ciąży jest zwiększenie stężenia prolaktyny poprzez stymulację TSH (tyreotropina, *thyroid-stimulating hormone*), co skutkuje niewydolnością ciała żółtego.

Dla procesu implanacji i rozwoju wczesnej ciąży niezbędna jest prawidłowa funkcja ciała żółtego związana głównie z produkcją progesteronu, który warunkuje przemianę doczesnową i zagnieżdżenie. Szacuje się, że niewydolność lutealna, czyli zaburzenia endokrynnej aktywności ciała żółtego mogą być czynnikiem sprawczym od 3,5% do nawet

20% poronień [157]. Ciało żółte jest źródłem progesteronu, który przygotowuje endometrium do zagnieżdżenia blastocysty i warunkuje rozwój płodu do 8 tc. W kolejnych etapach ciąży za produkcję progesteronu odpowiada trofoblast, a po 16 tc. łożysko. Zbyt małe stężenie progesteronu wynikające z zaburzonej funkcji ciała żółtego może skutkować niepłodnością lub wczesnymi utratami ciąży. Wśród przyczyn niewydolności lutealnej wymienia się zaburzoną folikulogenezę związaną m.in. z nieprawidłową sekrecją gonadotropin, zbyt małą syntezę LDL (lipoproteina niskiej gęstości - *low density lipoprotein*), brak receptorów dla progesteronu, choroby przewlekłe i zaburzenia metaboliczne, w tym niedoczynność tarczycy. Należy również podkreślić, że czynnikiem luteolitycznym niekorzystnie wpływającym na funkcję ciała żółtego jest prolaktyna, która negatywnie oddziałuje na steroidogenezę w ciału żółtym. Ponadto uważa się, że prolaktyna zmniejsza liczbę receptorów dla LH (lutropina, *luteinizing hormone*) w jajniku. W praktyce, w związku z niełatwym ustaleniem przyczyny zaburzonej funkcji ciała żółtego, leczeniem z wyboru jest substytucyjne podawanie progesteronu [63, 150].

Wiele badań sugeruje związek zespołu policystycznych jajników (PCOS - *polycystic ovary syndrome*) ze zwiększoną częstością wczesnych utrat ciąży [66, 76, 125]. Wśród czynników odpowiadających za występowanie poronień w PCOS wymienia się hipersekrecję LH, hiperinsulinemię, hiperandrogenemię, otyłość oraz zaburzenia w przygotowaniu błony śluzowej macicy do rozwoju ciąży.

#### **1.4.5. Zakażenia**

Istnienie wspólnej mikrobiologicznej przyczyny poronień nawracających nie zostało dotychczas potwierdzone. Co więcej, zakażenie jest postrzegane jako rzadki czynnik ryzyka występowania tego powikłania położniczego. Ponadto pacjentki z wywiadem obciążonym występowaniem poronień nawracających nie odnoszą korzyści z badań w kierunku zakażenia.

Zakażenia wewnątrzmaciczne i uogólnione są zwykle związane z poronieniem jednorazowym. W przypadku poronień nawracających czynnikiem etiologicznym mogą być przewlekłe stany zapalne błony śluzowej macicy. W tym aspekcie najczęściej rozpatruje się infekcje *Ureaplasma urealyticum* oraz *Mycoplasma hominis*.

Wśród uogólnionych infekcji istotny wpływ na prawidłowy przebieg ciąży mają wirus różyczki, opryszczki, cytomegalii, odry oraz wirusowe zapalenie ślinianek. Należy również podkreślić rolę bakteriemii i toksemii jako czynników zagrażających ciąży. Ponadto podwyższona temperatura ciała towarzysząca infekcjom może prowadzić do wyzwolenia czynności skurczowej macicy i oddzielenia się jaja płodowego. Istotne jest także znaczenie

toksoplazmozy oraz listeriozy, które mogą być przyczyną poronień w przypadku wczesnej wewnątrzmacicznej infekcji płodu lub mogą prowadzić do rozwoju embriopatii oraz fetopatii [150].

Szacuje się, że zakażenia mogą być przyczyną poronień w mniej niż 4% przypadków. Możliwy patomechanizm dotyczy wytwarzania toksycznych produktów przemiany materii przez drobnoustroje, zakażenie zarodka lub łożyska, przewlekłą infekcję endometrium oraz zakażenie wewnątrzmaciczne. Wydaje się, że wirusy stanowią najczęstszy rodzaj patogenu. Szczególnie wirus cytomegalii, który może zainfekować łożysko poprzez uogólnioną wiremę lub drogą wstępującą. Herpeswirusy powodują nawracające zakażenia dróg rodnych, które mogą dotyczyć także jednostki łożyskowo-płodowej. Jako czynnik sprawczy utrat ciąży w aspekcie zakażeń rozpatruje się również infekcje parwowirusem. Co więcej, wykazano zwiększone ryzyko poronienia u kobiet z bakteryjną waginozą w trakcie wczesnej ciąży [20, 110].

#### **1.4.6. Inne przyczyny poronień nawracających**

Innymi udowodnionymi przyczynami poronień nawracających są czynniki toksyczne (alkohol, palenie papierosów, gazy anestetyczne, pestycydy, zanieczyszczenia chemiczne, ksenobiotyki, w tym rtęć, ołów, arsen, formaldehyd, toluen, selen, formalina), praca w zasięgu pola elektromagnetycznego, zaburzenia metaboliczne (uszkodzenie wątroby, uszkodzenie nerek, cukrzyca, dysfunkcje tarczycy), hiperspermia (>250 plemników / 1 mL nasienia), oligospermia, zaawansowany wiek matki, niedowaga przed ciążą czy też wczesne wystąpienie pierwszej miesiączki (przed 11 r.ż.). Ryzyko utraty kolejnej ciąży zwiększa także obciążony wywiad w kierunku wcześniejszych poronień oraz otyłość pacjentki [157].

Związek występowania poronień nawracających z wiekiem matki jest uzasadniany hipotezą, że w późniejszym okresie życia kobiety dużą część oocytów stanowią oocyty nieprawidłowe, które były dotychczas pominięte w procesie rekrutacji pęcherzyków. W związku z tym wzrasta liczba letalnych wad genetycznych płodów, co jest przyczyną poronienia. Potwierdzają to obserwacje prowadzone w grupie biorczyń oocytów, gdzie nie zaobserwowano korelacji wieku z odsetkiem poronień. W określaniu ryzyka wystąpienia kolejnego poronienia nie bez znaczenia pozostaje również zaawansowany wiek ojca.

Ekspozycja na dym tytoniowy i jego wpływ na reprodukcję jest przedmiotem licznych badań. Dym tytoniowy zawiera znaczne ilości związków toksycznych. Nikotyna odpowiada za redukcję krążenia w jednostce maczyno-płodowej poprzez działanie wazoaktywne. Tlenek węgla upośledza utlenowanie krwi, a ołów jest powszechnie znaną neurotoksyną. Jednak

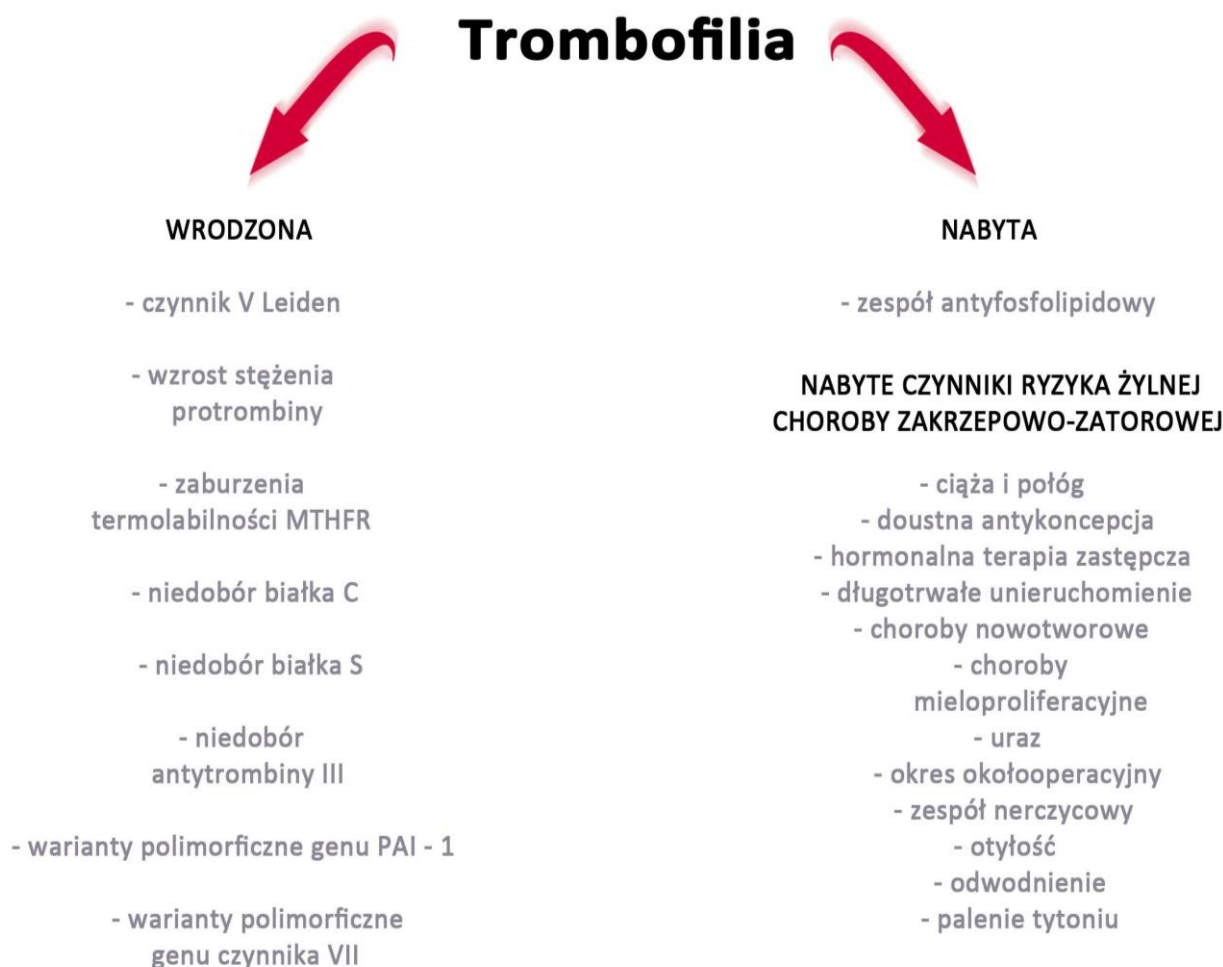
mimo szeroko pojętego negatywnego działania, palenie tytoniu wydaje się jedynie nieznacznie zwiększać ryzyko poronień nawracających.

Spożycie kawy również jest rozpatrywane jako możliwy czynnik wpływający na niepomyślny przebieg ciąży, w tym występowanie poronień. W 2008 roku Weng i wsp. przeprowadzili badanie kohortowe, z bardzo dużą liczebnie grupą 1063 osób. Wykazano, że spożycie kofeiny miało zależny od dawki wpływ na ryzyko poronień na wszystkich poziomach konsumpcji. U kobiet spożywających mniej niż 200 mg kofeiny na dobę odnotowano 1,42 razy większe ryzyko poronień wczesnych, natomiast u pacjentek spożywających 200 mg lub więcej kofeiny na dobę 2,23 razy większe ryzyko w porównaniu do osób w ogóle nie pijących kawy. Ponadto taka korelacja była silniejsza w przypadku kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym w porównaniu do tych, u których wystąpiło już poronienie [164].

## **1.5. Trombofilie wrodzone jako przyczyna poronień nawracających**

Termin „trombofilia” został wprowadzony do nomenklatury medycznej w 1965 roku przez Egeberga dla opisanego stanu wzmożonej skłonności prozakrzepowej u chorego z niedoborem antytrombiny III [42]. Współcześnie mianem trombofilii określa się wrodzoną (uwarunkowaną genetycznie) lub nabytą skłonność do występowania zaburzeń zakrzepowozatorowych. Szacuje się, że u około 10% osób z populacji ogólnej rozpoznawana jest obecność co najmniej jednej mutacji warunkującej trombofilie wrodzoną. Mutacje te odpowiadają za 1/3 przypadków żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej [8]. Częstość występowania trombofilii wrodzonych u pacjentek z wywiadem obciążonym w kierunku występowania poronień nawracających określa się na 3-42%. Tak znaczna rozbieżność jest prawdopodobnie podyktowana różnorodnością kryteriów stosowanych przy doborze grupy badanej, w jednych badaniach włączane są tylko poronienia na wczesnych etapach ciąży, w innych utraty ciąży w pierwszym i drugim trymestrze.

Nabytą trombofilie obserwuje się w zespole antyfosfolipidowym. Występowaniu trombofilii sprzyja małopłytkowość spowodowana heparyną (HIT - *heparine-induced thrombocytopenia*), choroby mieloproliferacyjne, choroby nowotworowe, zespół nerczycowy, stosowanie doustnych leków antykoncepcyjnych lub hormonalnej terapii zastępczej, długotrwałe okresy unieruchomienia, palenie tytoniu, okres okołoperacyjny, otyłość, podeszły wiek, odwodnienie. Podział trombofilii na wrodzoną i nabytą oraz jej najczęstsze przyczyny przedstawia rycina 2.



**Rycina 2.** Podział trombofilii na wrodzoną i nabytą oraz jej najczęstsze przyczyny.

W przebiegu prawidłowej ciąży rozwija się stan hiperkoagulacji spowodowany wzrostem stężenia czynników prozakrzepowych, spadkiem stężenia białka S, nabytą opornością na białko C oraz zmniejszoną fibrynolizą. Nasilenie krzepnięcia w obrębie krążenia maciczno-łożyskowego powoduje zwiększenie stężenia produktów aktywacji protrombiny i D-dimerów [46]. Obserwowany wzrost potencjału prozakrzepowego z jednej strony zabezpiecza przed krwotokiem w przebiegu porodu i połogu, z drugiej jednak może przyczynić się do rozwoju zakrzepicy i zaburzeń w obrębie krążenia w jednostce maciczno-łożyskowej. Szacuje się, że u kobiety w ciąży ryzyko rozwoju zakrzepicy żyłnej jest 5-6-krotnie wyższe niż u nieciążarnej. Należy zaznaczyć, że odsetek występowania powikłań zakrzepowo-zatorowych jest podobny we wszystkich trymestrach ciąży, jednak znacznie

wzrasta w okresie połogu [80]. Efekty fizjologicznych zmian w układzie hemostazy w przebiegu prawidłowej ciąży mogą być zwielokrotnione poprzez obecność mutacji warunkujących wrodzone trombofilie i skutkować występowaniem poronień nawracających. Dowodem na to jest obserwowana w takich przypadkach rozsiana zakrzepica w obrębie trofoblastu, naczyniach spiralnych i przestrzeniach międzykosmkowych [115, 126, 170].

Uważa się, że dla procesu implantacji kluczowym jest prawidłowa inwazja cytotrofoblastu w ścianę macicy. Zapewnia to zagnieżdzenie zarodka i umożliwia niepowikłany rozwój krążenia maciczo-łożyskowego. Aktywator plazminogenu typu urokinazy, jego receptor oraz inhibitor aktywatora plazminogenu-1 (PAI-1 - *plasminogen activator inhibitor-1*) biorą udział w kontroli procesów proteolitycznych i przebudowy w obrębie tkanek macicznych w czasie inwazji trofoblastu. Formowanie macierzy płyty podstawnej łożyska wymaga odkładania złogów fibryny w ścianie naczyń żylnych doczesnej w miejscach inwazji trofoblastu poprzez aktywację kaskady krzepnięcia matki. Częstym zjawiskiem morfologicznym w przypadku poronienia są zakrzepy żyłne oraz nadmierne odkładanie się złogów fibryny w przestrzeniach międzykosmkowych, co wskazuje na dysfunkcję hemostazy [37].

Dla prawidłowego przebiegu ciąży niezbędne jest zachowanie pewnej równowagi między koagulacją a fibrynolizą, co z jednej strony zapobiega nadmiernej kumulacji fibryny w naczyniach łożyska i przestrzeniach międzykosmkowych, z drugiej natomiast pozwala na właściwą polimeryzację i stabilizację fibryny w procesie formowania płyty podstawnej łożyska. Odpowiednia regulacja procesów fibrynolizy zapobiega ponadto krwotokom. Minimalne nawet zmiany w kaskadzie krzepnięcia lub fibrynolizy prowadzące do hipo- lub hiperfibrynolizy zaburzają prawidłowy proces implantacji i wczesny rozwój ciąży. Wykazano, że kilka czynników zaangażowanych w fibrynolizę, w tym inhibitor aktywatora plazminogenu modyfikuje migrację i inwazję komórek trofoblastu, przy czym zapobiega dodatkowemu krwawieniu podczas placentacji.

U kobiet z poronieniami nawracającymi obserwuje się ponadto zwiększoną gotowość prozakrzepową nawet poza okresem ciąży. U takich pacjentek stwierdza się wzmożoną produkcję tromboksanu pomiędzy 4 a 7 tc., oraz niedobór prostacykliny między 8 a 11 tc. w porównaniu do kobiet, których ciąży kończyły się urodzeniem zdrowych donoszonych noworodków. Zmiana równowagi tromboksan-prostacyklina na korzyść prozakrzepowego tromboksanu może prowadzić do wazokonstrykcji i agregacji płytek krwi w obrębie trofoblastu i skutkować mikrozatorami oraz martwicą w obrębie łożyska [82, 128].

Do najczęstszych i najlepiej udokumentowanych trombofilli wrodzonych, mających związek z występowaniem niepowodzeń położniczych, w tym poronień nawracających należą przedłużona aktywność czynnika V Leiden (uwarunkowana obecnością polimorfizmu *1691G>A* genu czynnika V krzepnięcia), wzrost stężenia protrombiny (najczęściej uwarunkowany obecnością polimorfizmu *20210G>A* genu protrombiny) oraz zaburzenia termolabilności reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR-*methylenetetrahydrofolate reductase*) prowadzące do rozwoju hiperhomocysteinemii (polimorfizm *677C>T* genu *MTHFR*). Stosunkowo rzadziej obserwuje się genetycznie uwarunkowany niedobór białka C lub S oraz antytrombiny III [11, 27, 48, 59, 83, 84, 95, 99, 105, 119, 152].

### 1.5.1. Czynniki V Leiden

Mutacja czynnika V Leiden polega na substytucji guaniny na adeninę w pozycji 1691, w eksonie 10 genu czynnika V krzepnięcia, co skutkuje wymianą glutaminy na argininę w pozycji 506 łańcucha białkowego. Ta punktowa mutacja została zidentyfikowana w 1994 roku przez Bertina i wsp. [11]. Nazwa mutacji pochodzi od miasta w Holandii, w którym po raz pierwszy zidentyfikowano czynnik V Leiden. Częstość występowania tego wariantu genetycznego w populacji ogólnej wynosi około 3-7% [138].

Aby w pełni zrozumieć znaczenie tej mutacji, należy podkreślić podwójną rolę czynnika V (proakceleryny) w hemostazie, który pełni ważne funkcje zarówno w szlaku prozakrzepowym, jak i antykoagulacyjnym. W aktywnej formie (czynnik Va) współdziała z czynnikiem Xa w procesie przekształcania protrombiny w trombinę. Nieaktywna postać czynnika V wspólnie z białkiem S jest kofaktorem aktywowanego białka C (APC - *activated protein C*) w unieczynnianiu czynnika VIIIa [109].

W prawidłowych warunkach łańcuch białkowy czynnika Va jest inaktywowany przez APC poprzez sukcesywne rozszczepianie w miejscach Arg506, Arg306 oraz Arg679. Dla najszybszej inaktywacji cząsteczki czynnika Va pierwsze przecięcie musi odbywać się w pozycji 506, co znacznie ułatwia lizę łańcucha białkowego poprzez lepszą ekspozycję miejsc rozszczepiania w pozycjach 306 oraz 679. W przypadku mutacji Leiden w pozycji 506 zamiast argininy znajduje się glutamina, co uniemożliwia przecięcie łańcucha białkowego przez APC w tym właśnie miejscu. Inaktywacja odbywa się nadal poprzez rozszczepianie w miejscach Arg306 i Arg679, ale przebiega zdecydowanie wolniej. Prowadzi to do nasilonego tworzenia trombiny. Ponadto, aby czynnik V działał wspólnie z białkiem S jako kofaktor

zaktywowanego białka C w dezaktywacji czynnika VIIIa również niezbędne jest przecięcie łańcucha białkowego w pozycji 506.

Prowadzi to do powstania stanu prozakrzepowego, głównie poprzez zaburzenie szlaku antykoagulacyjnego i nasiloną generację trombiny. Uważa się, że homozygotyczni nosiciele mutacji są obciążeni większym ryzykiem rozwoju zakrzepicy niż heterozygoty. W literaturze znajdują się liczne doniesienia potwierdzające znaczenie czynnika V Leiden w rozwoju zakrzepicy żył głębokich, głównie u osób należących do rasy kaukaskiej. Są również dowody na związek czynnika V Leiden z występowaniem poronień nawracających [112, 114, 138].

### **1.5.2. Zaburzenia termolabilności reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR)**

Reduktaza metylenotetrahydrofolianowa jest jednym z kluczowych enzymów biorących udział w szlaku metabolizmu folianów, przez co ma wpływ na regulację przemiany homocysteiny, produkcję puryn i pirymydyn, a także metylację białek i kwasów nukleinowych.

Polimorfizm  $677C>T$  genu *MTHFR* polega na zamianie cytozyny na tyminę, co skutkuje substytucją alaniny na walinę w pozycji 222 łańcucha białkowego. W wyniku tego dochodzi do zmiany termolabilności MTHFR i znacznej redukcji aktywności enzymu. Prowadzi to do kumulacji homocysteiny i rozwoju hiperhomocysteinemii oraz redukcji stężenia folianów w surowicy i erytrocytach badanych pacjentów.

Hiperhomocysteinemia jest niezależnym czynnikiem zwiększającym ryzyko wystąpienia zakrzepicy. Uważa się, że jest jedną z przyczyn chorób układu sercowo-naczyniowego, w tym także powikłań zakrzepowo-zatorowych. U kobiet ciężarnych poza istotnym zwiększeniem ryzyka występowania poronień nawracających, może również prowadzić do rozwoju stanu przedrzucawkowego, hipotrofii płodu, przedwczesnego oddzielenia łożyska, porodu przedwczesnego, zgonu wewnątrzmacicznego, a ponadto wad cewy nerwowej oraz rozszczepu wargi i podniebienia u płodu [142, 143].

### **1.5.3. Wzrost stężenia protrombiny (polimorfizm $20210G>A$ )**

Protrombina (czynnik II) jest prekursorem trombiny, końcowego produktu kaskady krzepnięcia. Protrombina wykazuje właściwości prozakrzepowe, antykoagulacyjne i antyfibrynolityczne, w związku z czym każda zmiana jej aktywności czy stężenia istotnie zaburza równowagę hemostazy.

Polimorfizm  $20210G>A$  genu protrombiny dotyczy tranzycji guaniny na adeninę w pozycji 20210 regionu niekodującego, mutacja ta jest opisywana skrótem *PTM* (*prothrombin*



*mutation*). Obecność powyższego wariantu genetycznego skutkuje wzrostem stężenia protrombiny w osoczu krwi nawet o 20%, co klinicznie powoduje nasiloną aktywność układu krzepnięcia i zwiększenie ryzyka występowania powikłań zakrzepowych. Ponadto *PTM* ma wpływ na nasilenie aktywności czynnika II w osoczu. Ryzyko zakrzepicy przy obecności polimorfizmu *20210G>A* jest istotnie zwiększone, jednak nie do takiego stopnia jak w przypadku czynnika V Leiden [18].

Wzrost stężenia protrombiny poprzez wpływ na adhezję komórek, proliferację mięśni gładkich i powstawanie naczyń krwionośnych może negatywnie wpływać na funkcjonowanie łożyska i być przyczyną nawracających utrat ciąży. Szacuje się, że u nosicielek genotypu *20210GA* ryzyko poronienia jest zwiększone ponad dwukrotnie. W związku z tym jednym z najczęściej rekomendowanych badań genetycznych w przypadku poronień nawracających jest oznaczanie tego właśnie polimorfizmu [5, 50].

Znaczenia polimorfizmu *20210G>A* genu protrombiny w patogenezie poronień dowodzi m.in. badanie przeprowadzone przez Reznikoff-Etievant i wsp. Analiza dotyczyła dużej grupy 260 pacjentek, u których wystąpiło poronienie przed 10 tc. Spośród całej grupy badanej u 7,6% kobiet zaobserwowano występowanie powyższego wariantu genetycznego. Był to wynik istotnie wyższy niż w grupie kontrolnej (2,9%) [132].

#### **1.5.4. Niedobór antytrombiny III**

Antytrombina III (AT III, *antithrombine III*) wykazuje działanie inhibicyjne w stosunku do trombiny, ale również inaktywuje czynniki IXa, Xa, XIa, XIIa, VIIa oraz białka C i S. Aktywność antytrombiny III jest zwiększona około 4000 razy w obecności heparyny.

Niedobór AT III jest pierwszą opisaną formą trombofilii wrodzonej [42]. Jest to zaburzenie o heterogennej etiologii, jednak najczęściej jest dziedziczone w sposób autosomalny dominujący, przy czym wyróżnia się trzy typy niedoboru antytrombiny III. Typ I dotyczy redukcji syntezy prawidłowej formy AT III. Dochodzi do zmniejszenia stężenia i aktywności AT III w osoczu o 50% u nosicieli genotypu heterozygotycznego. Szacuje się, że za wystąpienie typu I niedoboru AT III odpowiada około 80 różnych mutacji, najczęściej są to małe delecje lub insercje oraz delecje dużego fragmentu genu. Typ II niedoboru AT III jest uwarunkowany syntezą nieprawidłowego białka. Skutkuje to znaczą redukcją aktywności AT III w osoczu. Typ III charakteryzuje się prawidłową aktywnością i stężeniem AT III w osoczu, obserwuje się jednak zaburzenia interakcji AT III z heparyną [138].

Częstość występowania tej genetycznie uwarunkowanej formy zaburzeń hemostazy w populacji ogólnej jest niska, jednak odsetek jej występowania jest istotnie większy u

pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową (0,5–7,5%). Uważa się, że epizod zakrzepicy przed 60 rokiem życia pojawi się u 50-60% pacjentów z wrodzonym niedoborem antytrombiny III [117].

#### **1.5.5. Niedobór białka C**

Białko C jest glikoproteiną zależną od witaminy K. Jego główna funkcja polega na regulacji syntezy trombiny poprzez inaktywację czynników Va i VIIIa. Wyróżnia się dwa typy niedoboru białka C. W typie I dochodzi do zmniejszonej syntezy białka C, natomiast w typie II obserwuje się defekt jakościowy, co skutkuje zaburzeniem interakcji białka C z trombomoduliną, fosfolipidami oraz czynnikami V i VIII. U nosicieli genotypów heterozygotycznych chorujących na typ I niedoboru białka C obserwuje się bardzo dużą różnorodność fenotypową. Oba typy są dziedziczone w sposób autosomalny dominujący i znacznie zwiększają ryzyko rozwoju zakrzepicy. Za występowanie tego defektu odpowiada 160 różnych mutacji genetycznych. Nosicielstwo genotypu homozygotycznego jest bardzo rzadkie, powoduje wystąpienie śmiertelnych zaburzeń zakrzepowych u noworodków [140].

Wykazano związek obecności niedoboru białka C z nieprawidłowym przebiegiem ciąży, w tym z występowaniem poronień nawracających, a także ograniczeniem wzrastania płodu, stanem przedrzucawkowym czy żylną chorobą zakrzepowo-zatorową [56]. Częstość występowania niedoboru białka C szacuje się w populacji ogólnej na 0,2%, natomiast w populacji pacjentów z zakrzepicą żylną na 2,5-6% [117].

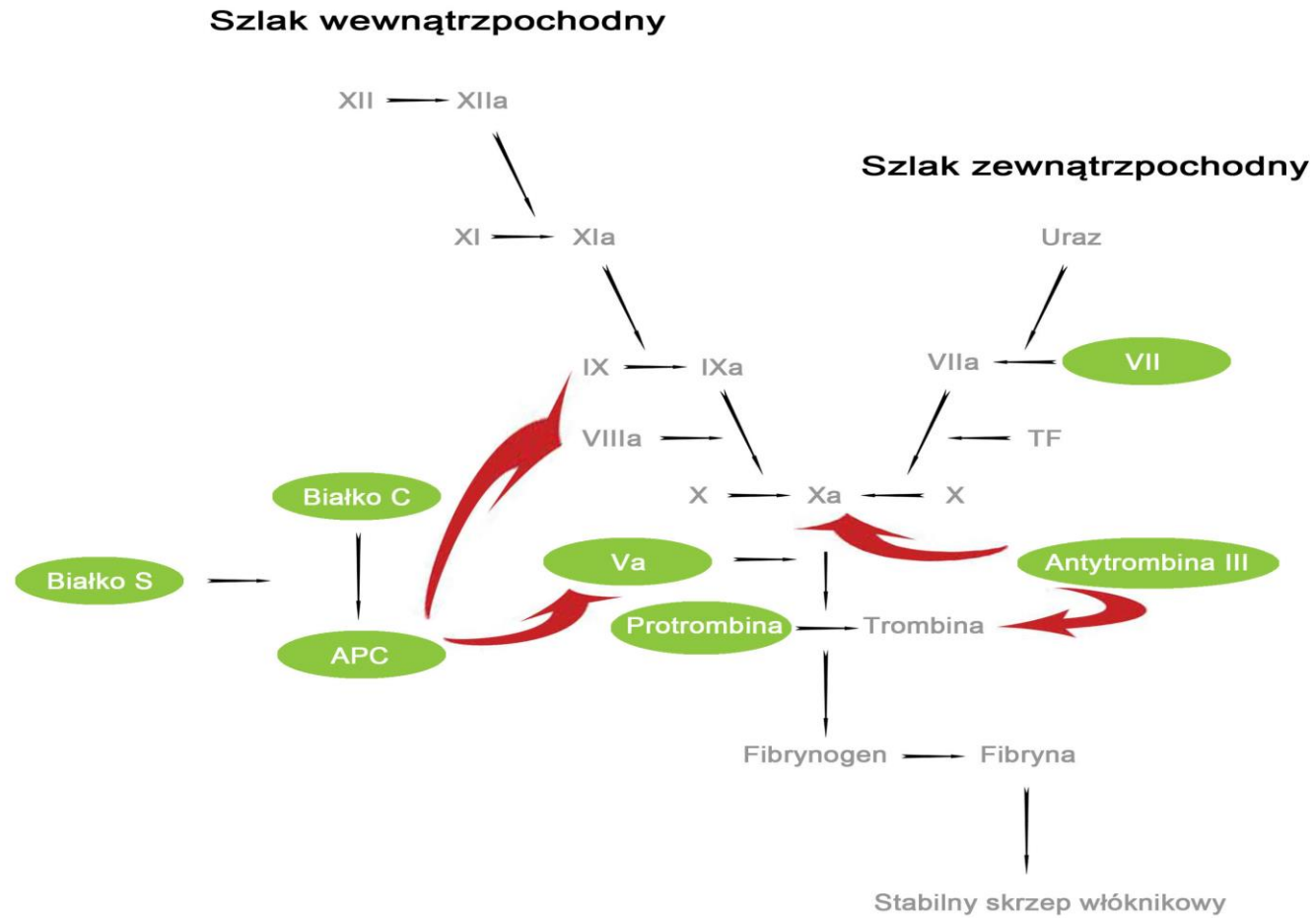
#### **1.5.6. Niedobór białka S**

Białko S jest zależnym od witaminy K kofaktorem aktywowanego białka C. Proteina ta została po raz pierwszy wyizolowana i opisana w Seattle, stąd pochodzi oznaczenie literą „S”. Wyróżnia się trzy fenotypy niedoboru białka S w oparciu o całkowite stężenie białka S, stężenie wolnego białka S oraz aktywność białka S. Typ I dotyczy zmniejszonego (o ok. 50%) całkowitego stężenia białka S oraz istotnej redukcji stężenia wolnego białka S i jego aktywności. W typie II obserwuje się prawidłowe stężenie białka S, zarówno całkowitego, jak i formy wolnej, dochodzi jednak do zmniejszenia jego aktywności. Jak dotąd opisano 5 mutacji odpowiadających za typ II niedoboru białka S. Wszystkie z nich są mutacjami zmiany sensu i są zlokalizowane w N-końcowym odcinku łańcucha białkowego, który zawiera domeny odpowiedzialne za interakcję z APC. Typ III charakteryzuje się zmniejszonym stężeniem wolnego białka S przy prawidłowym całkowitym stężeniu oraz redukcją

aktywności białka S o co najmniej 60%. Uważa się, że typ I oraz III są fenotypowymi odmianami tego samego wariantu genetycznego [138].

Niedobór białka S obserwuje się u około 1,35% pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową [117]. Dziedziczenie tego defektu jest autosomalne dominujące.

Na rycinie 3 przedstawiono schemat kaskady krzepnięcia z uwzględnieniem opisanych powyżej przyczyn trombofilii wrodzonej.



**Rycina 3.** Schemat kaskady krzepnięcia z uwzględnieniem przyczyn trombofilii wrodzonej (zielone pola) (TF – czynnik tkankowy, APC – aktywowane białko C).

**Tabela 1.** Częstość występowania w populacji ogólnej rasy kaukaskiej genetycznie uwarunkowanych zaburzeń hemostazy mogących być przyczyną poronień nawracających [wg Salwa 2006].

<b>Czynnik</b>	<b>Przybliżona częstość występowania w populacji ogólnej rasy kaukaskiej (%)</b>
Czynnik V Leiden	3 - 7
Polimorfizm 20210G>A genu protrombiny	1 - 3
Polimorfizm 677C>T genu <i>MTHFR</i>	5 - 14
Niedobór antytrombiny III	0,02 - 0,04
Niedobór białka C	0,2 – 0,5
Niedobór białka S	0,1 - 1

W ostatnich latach zwrócono również uwagę na możliwy związek wariantów genetycznych czynnika VII krzepnięcia oraz inhibitora aktywatora plazminogenu – 1 ze zwiększonym ryzykiem występowania poronień nawracających, co omówiono w dalszej części pracy.

## 1.6. Czynnik VII krzepnięcia

Pierwsze odkrycia wyjaśniające mechanizmy kaskady krzepnięcia pochodzą z lat 40-tych XX wieku. W 1949 roku Alexander i wsp. opisali osoczowy czynnik, który wzmacniał przemianę protrombiny w trombinę, nazwany początkowo akcelerorem konwersji protrombiny (SPCA – *serum prothrombin conversion accelerator*). Dwa lata później Koller i wsp. opublikowali pracę przedstawiającą czynnik VII jako nowy osoczowy czynnik krzepnięcia [79]. Dopiero wtedy zidentyfikowano SPCA jako czynnik VII.

Czynnik VII (FVII – *factor VII*) (406 aminokwasów, ciężar molekularny 50 kDa), zwany inaczej prokonwertyną odgrywa zasadniczą rolę w kaskadzie krzepnięcia i właściwie ją zapoczątkowuje. Jest to zależna od witaminy K glikoproteina produkowana w wątrobie. Struktura czynnika VII wykazuje homologię z innymi zależnymi od witaminy K białkami osocza, w tym z czynnikiem IX, czynnikiem X, białkiem C i S oraz protrombiną, co sugeruje wspólne pochodzenie tych protein i następczą duplikację genów. Do krążenia jest wydzielany w formie jednołańcuchowego, nieaktywnego zymogenu. W formie aktywnej, zwanej czynnikiem VIIa uczestniczy w zewnątrzpochodnej drodze aktywacji krzepnięcia. Czynnik VIIa jest proteazą serynową składającą się z łańcucha ciężkiego (254 aminokwasy) i lekkiego

(152 aminokwasy) połączonych ze sobą wiązaniem dwusiarczkowym. W strukturze FVII można wyróżnić domenę N-kończącą, dwie domeny wykazujące homologię z nabłonkowym czynnikiem wzrostu (EGF – *epidermal growth factor*) oraz domenę C-kończącą. Konwersja czynnika VII w czynnik VIIa odbywa się przy współdziałaniu czynnika IXa, Xa, XIIa, trombiny oraz plazminy i polega na cięciu pojedynczego wiązania Arg152-Ile153. Rolę kofaktora procesu aktywacji czynnika VII przy współdziałaniu jonów wapnia spełnia czynnik tkankowy (TF- *tissue factor*), inaczej zwany tromboplastyną tkankową, który jest uwalniany z uszkodzonych komórek śródbłonna. Kompleks TF-VIIa aktywuje czynnik IX i X (IXa i Xa), zwrotnie amplifikując tym samym kaskadę krzepnięcia [7, 144].

Tworzenie kompleksu TF-VIIa w miejscu uszkodzenia ściany inicjuje proces hemostazy poprzez tworzenie złożeń fibryny w wyniku przekształcenia protrombiny w trombinę i fibrynogenu w fibrynę. Trombina odpowiada za aktywację czynnika V, VIII, XI oraz płytek krwi, ponadto aktywuje inhibitory fibrynolizy zabezpieczające złoże fibryny przed lizą. Jakkolwiek czynniki VIII i IX są uważane za część wewnątrzpochodnej drogi krzepnięcia, to właśnie pośredni i bezpośredni skutek działania kompleksu TF-VIIa przemawia za hipotezą, że niedobory czynników VIII i IX (hemofilia A i B) są właściwie defektem działania tego kompleksu. Wskutek ograniczonego formowania kompleksu TF-VIIa zmniejsza się również ilość formowanych złożeń fibryny, co klinicznie objawia się nadmiernym krwawieniem obserwowanym w hemofiliach i innych zaburzeniach krzepnięcia [7].

Gen czynnika VII znajduje się na krótkim ramieniu 13 chromosomu (13q34, długość 12,8 kpz) i zawiera 8, a według niektórych autorów 9 eksonów (NM\_000131) [12, 111]. Region kodujący czynnik VII zbudowany jest z 1398 par zasad (pz) i koduje odcinek kierujący zbudowany z 38 aminokwasów oraz odcinek właściwy zbudowany z 406 aminokwasów. Cechą charakterystyczną genu czynnika VII krzepnięcia jest duża polimorficzność. Stężenie czynnika VII jest bardzo dobrym przykładem związku między fenotypem a genotypem oraz czynnikami środowiskowymi. Szacuje się, że udział czynników genetycznych w regulacji tego stężenia wynosi aż 53%. Należy zaznaczyć, że większość z opisywanych polimorfizmów warunkuje niedobór czynnika VII i klinicznie wiąże się z występowaniem nadmiernych krwawień. W literaturze opisano jednak kilka wariantów genu czynnika VII, które poprzez wpływ na zmiany w aktywności i stężeniu czynnika VII w osoczu mogą zwiększać ryzyko występowania powikłań zakrzepowych [144].

Polimorfizmy genu czynnika VII mogą tłumaczyć różnice w stężeniu tego białka u poszczególnych osobników, w związku z tym stężenie to, poza wpływem czynników takich

jak wiek, płeć, masa ciała, stężenie lipidów w osoczu, dieta, stosowanie doustnej antykoncepcji czy okres okołomenopauzalny, jest w dużym stopniu regulowane przez determinantę genetyczną [65]. Związek lipidów dostarczanych z pożywieniem z aktywnością czynnika VII jest prawdopodobnie zależny od aktywacji wewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia przez duże lipoproteiny, takie jak cząsteczki cholesterolu frakcji lipoprotein o bardzo małej gęstości (VLDL - *very low density lipoprotein*) oraz chylomikrony [55]. W obrębie odcinka promotorowego genu czynnika VII opisano występowanie miejsc wiążących czynniki transkrypcyjne dla receptorów estrogenowych i kilku innych receptorów hormonów jądrowych [129]. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że jak dotąd żadne z prowadzonych badań nie potwierdziło jednoznacznie związku wariantów genu czynnika VII ze zmianami w jego metabolizmie. Jest natomiast prawdopodobne, że część z polimorfizmów genu *FVII* pozostaje w nierównowadze sprzężeń z innymi wariantami genetycznymi, które mają fizjologiczne znaczenie dla metabolizmu czynnika VII.

#### **1.6.1. Polimorfizm *Arg353Gln* ( $R^{353}Q$ , $11496G>A$ ) genu czynnika VII krzepnięcia**

Funkcjonalny polimorfizm *Arg353Gln* ( $R^{353}Q$ ) genu czynnika VII krzepnięcia dotyczy substytucji guaniny na adeninę w pozycji 11496 łańcucha nukleotydowego ( $11496G>A$ ), eksonu 7, co skutkuje zamianą aminokwasu argininy na glutaminę w pozycji 353 łańcucha białkowego [49]. W efekcie dochodzi do obniżenia aktywności VIIc (*coagulant activity*) o 20% do 30% oraz redukcji stężenia VIIag (*antigen concentration*). Wyniki prowadzonych w tym zakresie badań sugerują, że obecność allele *Gln353* wiąże się ze zmniejszeniem ryzyka wystąpienia chorób układu sercowo-naczyniowego. W związku z tym pojawiły się sugestie, że allele *Gln353* może pełnić protekcyjną rolę także w stosunku do rozwoju innych chorób, których podłożem są powikłania zakrzepowe, w tym do poronień nawracających.

Należy zaznaczyć, że obniżenie stężenia czynnika VII uwarunkowane obecnością polimorfizmu *Arg353Gln* nie wiąże się z ryzykiem wystąpienia groźnych krwotoków. W przypadku innych wariantów genetycznych czynnika VII krzepnięcia skutkujących jego niedoborem aktywność czynnika VII obniża się o 20-50% normy, a u nosicieli tych mutacji pojawiają się jedynie krwotoki z nosa lub charakteryzuje ich skłonność do występowania podbiegnięć krwawych na skórze. W związku z tym nosicielstwo allele *Gln353* nie stwarza zagrożenia dla życia wynikającego z zaburzeń krzepnięcia (u nosicieli genotypu homozygotycznego *Gln353/Gln353* obserwuje się obniżenie aktywności czynnika VII o 20-30% normy).

Jednym z pierwszych badań dowodzących związku polimorfizmu *Arg353Gln* ze zmianami w stężeniu i aktywności czynnika VII w surowicy jest analiza Green i wsp. Do grupy badanej włączono 284 zdrowych mężczyzn w wieku 45-69 lat z populacji brytyjskiej. Częstość występowania allelela *Gln353* wynosiła 0,1. U nosicieli genotypu heterozygotycznego *Arg353/Gln353* aktywność czynnika VII w surowicy była o 22% niższa od normy ( $p < 0,0001$ ). U nosicieli genotypu homozygotycznego *Gln353/Gln353* odnotowano obniżenie zarówno aktywności, jak i stężenia czynnika VII. Autorzy powyższej publikacji uważają, że substytucja argininy na glutaminę w pozycji 353 łańcucha białkowego może mieć wpływ na konformację cząsteczki, zmieniając tym samym sposób jej sekrecji, obrotu w osoczu oraz aktywność [55].

W badaniu Mrozikiewicz i wsp. dowiedziono, że allel *Gln353* ma znaczenie funkcjonalne, przy czym obserwuje się tu tzw. *gene-dose effect*. Efekt ten polega na zmniejszeniu aktywności czynnika VII o 21% u nosicieli jednego zmutowanego allelela (heterozygoty), natomiast u nosicieli dwóch zmutowanych alleleli (homozygoty) – o 36%. Podobną zależność odnotowano w przypadku stężenia czynnika VII, jednak nie był to wynik istotny pod względem statystycznym [107]. Redukcja VIIag oraz VIIc powoduje spadek nasilenia kaskady krzepnięcia i przez to może redukować ryzyko wystąpienia powikłań zakrzepowych. Należy zaznaczyć, że u nosicieli genotypu homozygotycznego *Arg353/Arg353* obserwuje się prawidłową aktywność i stężenie czynnika VII. Biorąc pod uwagę fakt, że w trakcie ciąży obserwuje się fizjologiczny wzrost stężenia czynnika VII, obecność protekcyjnego w stosunku do rozwoju powikłań zakrzepowych allelela *Gln353* może uchronić przed niepomyślnym przebiegiem ciąży, w tym przed występowaniem poronień nawracających [144]. Częstość zmutowanego allelela *Gln353* szacuje się na 0,12 u osobników rasy białej, 0,25-0,29 u osobników rasy żółtej i 0,11 u Afroamerykanów [3, 62, 75].

### **1.6.2. Polimorfizm -323P0/P10 genu czynnika VII krzepnięcia**

Polimorfizm -323P0/P10 genu czynnika VII krzepnięcia dotyczy insercji 10 pz (CCTATATCCT) w odcinku promotorowym genu *FVII* w pozycji -323. Jest to polimorfizm funkcjonalny, wykazano, że obecność allelela -323P10 obniża aktywność czynnika VII w osoczu. Uważa się, że ten polimorfizm nie wpływa na interakcję czynników transkrypcyjnych z odcinkiem promotorowym genu *FVII*, pozostaje natomiast w nierównowadze sprzężeń z innymi polimorfizmami bezpośrednio wpływającymi na stężenie VIIag w osoczu.



W badaniu przeprowadzonym z użyciem komórek HepG2 (linia komórek raka wątrobowokomórkowego) wykazano, że obecność allelicznej sekwencji zawierającej 10-nukleotydową insercję powodowała obniżenie aktywności czynnika VII o 33% [118].

W pracy Sacchi i wsp. analizowano wpływ obecności polimorfizmu *-323P0/10* na stężenie (FVII:Ag) i aktywność czynnika (FVII:C) VII krzepnięcia u 100 zdrowych osób oraz u 19 pacjentów z hipertriglicerydemią. W grupie osób zdrowych stężenie i aktywność czynnika VII były istotnie statystycznie wyższe ( $p < 0,001$ ) u nosicieli genotypu homozygotycznego *-323P0/-323P0* (FVII:Ag 112%, FVII:C 109%) w porównaniu do nosicieli genotypu heterozygotycznego *-323P0/-323P10* (FVII:Ag 80%, FVII:C 90%). Podobne różnice odnotowano w grupie pacjentów z hipertriglicerydemią powyżej 250 mg/dL ( $p < 0,05$ ). Ponadto zaobserwowano, że stężenie i aktywność czynnika VII pozostawały w pozytywnej korelacji z poziomem triglicerydów tylko u osób nie będących nosicielami zmutowanego allele *-323P10* [135].

Wyniki analizy Humphries i wsp. sugerują, że wpływ polimorfizmu *-323P0/P10* na aktywność i stężenie czynnika VII w surowicy jest większy niż polimorfizmu *Arg353Gln*. Autorzy tej publikacji ocenili związek powyższych wariantów genetycznych ze stężeniem i aktywnością czynnika VII w surowicy u 705 mężczyzn w średnim wieku. Częstość występowania zmutowanego allele *Gln353* wynosiła 0,105, natomiast zmutowanego allele *-323P10* 0,117. W obydwu przypadkach stężenie oraz aktywność czynnika VII były obniżone o około 20%. Pięciuset czterdziestu siedmiu mężczyzn było nosicielami niezmutowanego genotypu homozygotycznego pod względem obydwu polimorfizmów (*Arg353/Arg353* i *-323P0/-323P0*), a średnia aktywność czynnika VII wynosiła 101. Natomiast u 20 osobników będących jednocześnie nosicielami genotypu homozygotycznego *Arg353/Arg353* i heterozygotycznego *-323P0/-323P10* średnia aktywność wynosiła 85. Z kolei u 126 mężczyzn z genotypem *Arg353/Gln353* oraz *-323P0/-323P10* średnia aktywność czynnika VII w surowicy była równa 81. Sugeruje to większy wpływ allele *-323P10* na obniżenie aktywności czynnika VII. Stężenie czynnika VII w surowicy pozostawało w pozytywnej korelacji ze stężeniem triglicerydów. Przy czym zależność ta była najbardziej wyraźna u osób będących nosicielami niezmutowanego homozygotycznego genotypu *Arg353/Arg353* [68].

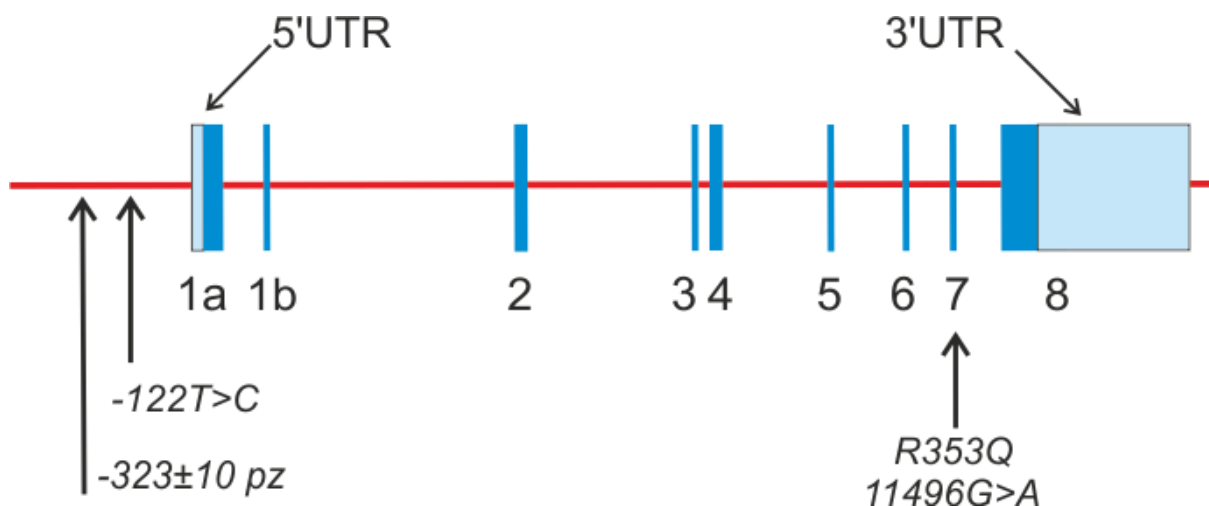
Liu i wsp. ocenili częstość występowania zmutowanych alleli polimorfizmów *Arg353Gln* oraz *-323P0/P10* u 209 zdrowych mężczyzn i 214 zdrowych kobiet z populacji chińskiej. Frekwencja allele *-323P10* wynosiła 0,036, natomiast allele *Gln353* – 0,045. Zaobserwowano istnienie silnej nierównowagi sprzężeń pomiędzy tymi dwoma wariantami genetycznymi. Co więcej, odnotowano istotny statystycznie związek obydwu polimorfizmów

ze stężeniem i aktywnością czynnika VII w surowicy. U nosicieli genotypów heterozygotycznych stężenie i aktywność czynnika VII były niższe niż u nosicieli genotypów homozygotycznych. Związek powyższych wariantów genetycznych z aktywnością czynnika VII był silniej zaznaczony u kobiet. Ponadto zaobserwowano, że wpływ polimorfizmu -323P0/P10 na regulację ekspresji genu jest większy niż w przypadku polimorfizmu *Arg353Gln*. Autorzy wnioskują, że zmutowany allel insercyjny -323P10 odpowiada za redukcję transkrypcji genu czynnika VII, prowadząc do zmniejszonej syntezy i stężenia tego białka w osoczu [90].

### **1.6.3. Polimorfizm -122T>C genu czynnika VII krzepnięcia**

Kolejnym funkcjonalnym polimorfizmem zlokalizowanym w odcinku promotorowym genu czynnika VII krzepnięcia jest substytucja tyminy na cytozynę w pozycji -122 łańcucha nukleotydowego. Według Sabater-Lleal polimorfizmy genu czynnika VII zgrupowane są w trzy główne haplotypy, które wykazują równowagę sprzężeń w większości badanych populacji. Najpowszechniejszy haplotyp (typu dzikiego) zawiera allele 670A/-630A/-402G/-323P0/-401G/-122T. Haplotyp zawierający allele 670C/-630G/-420A/-323P0/-401G/-122T jest związany z istotnym wzrostem stężenia czynnika VII w surowicy. Natomiast haplotyp 670A/-630A/-402G/-323P10/-401T/-122C koreluje z jego redukcją. Pośrednio dowodzi to roli polimorfizmu -122T>C w regulacji ekspresji genu czynnika VII [134]. Do podobnych wniosków prowadzą wyniki analizy Reiner i wsp., którzy swoje obserwacje oparli o duże badania populacyjne. Również w tym doniesieniu pośrednio dowiedziono roli powyższego wariantu genetycznego w regulacji stężenia czynnika VII krzepnięcia i modulacji podatności na choroby o etiologii zakrzepowej. Jeden z haplotypów zawierający zmutowany allel -122C zakłóca prawidłowe funkcjonowanie miejsca wiązania dla SREBP1, motywu regulatorowego odgrywającego rolę m.in. w biosyntezie kwasów tłuszczowych w wątrobie. Wynika z tego, że transkrypcyjna koregulacja jest jednym z mechanizmów, poprzez które wzajemnie oddziałują czynniki środowiskowe, genetyczne oraz równowaga energetyczna organizmu, czego efektem może być rozwój miażdżycy i zakrzepicy [129].

Rycina 4 przedstawia schematyczną lokalizację powyższych wariantów genetycznych.



**Rycina 4.** Schemat przedstawiający analizowane w pracy polimorfizmy genu czynnika VII krzepnięcia.

### 1.7. Inhibitor aktywatora plazminogenu -1

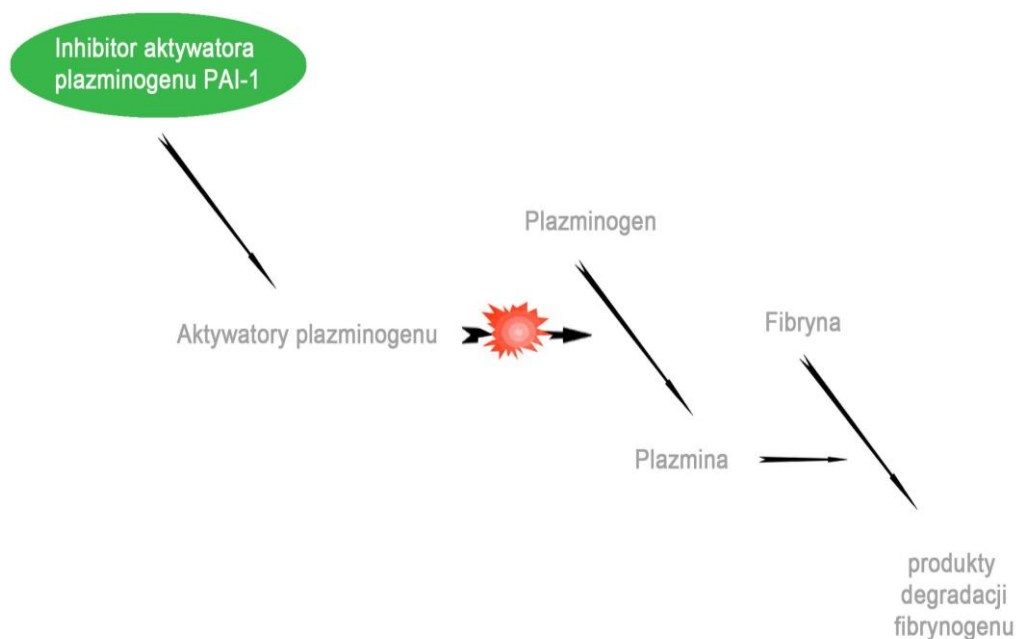
Inhibitor aktywatora plazminogenu - 1 (PAI-1 – *plasminogen activator inhibitor-1*) zwany inaczej tkankowym inhibitorem aktywatora plazminogenu lub serpiną E1 jest glikoproteina należącą do rodziny inhibitorów proteaz serynowych nazywanych wspólnie serpinami (*serpins - SERine Proteinase INhibitors*). PAI-1 jest głównym fizjologicznym inhibitorem tkankowego aktywatora plasminogenu (tPA - *tissue plasminogen activator*) i aktywatora plazminogenu typu urokinazy (uPA - *urokinase plasminogen activator*), z którymi tworzy stabilne, nieaktywne kompleksy. W związku z tym pełni kluczową rolę w procesie fibrylizacji.

PAI-1 jest syntetyzowany głównie w komórkach śródbłonna, megakariocytach, hepatocytach, komórkach mięśni gładkich naczyń krwionośnych. We krwi występuje jako postać aktywna, utajona, nieaktywna oraz w kompleksie z tPA. Aktywna forma wiąże się z białkiem zewnątrzkomórkowym witronektyną, która odgrywa rolę w hemostazie właśnie poprzez stabilizację PAI-1. PAI-1 wiąże się również z fibryną, plazminą, trombiną i heparyną lub przechodzi w formę utajoną. Średnie stężenie PAI-1 w osoczu wynosi około 5-20 ng/mL, przy czym najwyższe wartości osiąga w godzinach rannych, gdzie obserwuje się obniżoną aktywność fibrynolityczną [103].

Zwiększone stężenie PAI-1 w osoczu może skutkować rozwojem trombofilii. Ponadto nasiloną ekspresja genu kodującego PAI-1 wpływa na przedłużone przeżycie komórek i

oporność na apoptozę. Prawdopodobnie odbywa się to poprzez redukcję adhezji komórek, jak również poprzez wpływ na sygnalizację wewnątrzkomórkową. U pacjentów z otyłością obserwuje się zwiększoną ekspresję PAI-1, który jest zaangażowany w rozwój tkanki tłuszczowej oraz kontrolę działania insuliny w adipocytach. Wykazano dodatnią korelację aktywności PAI-1 ze wskaźnikiem masy ciała (BMI - *body mass index*), ilością wisceralnej tkanki tłuszczowej, stężeniem insuliny, glukozy i triglicerydów w surowicy krwi. Należy zaznaczyć, że w przypadku redukcji masy ciała, a także po zastosowaniu leków hipolipemizujących lub doustnych leków przeciwcukrzycowych zwiększających wrażliwość na insulinę obserwuje się spadek stężenia PAI-1, a tym samym wzrost aktywności fibrynolitycznej osocza [103].

Udział PAI-1 w układzie fibrynolizy przedstawiono na rycinie 5.



**Rycina 5.** Udział inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1) w układzie fibrynolizy [wg Młynarska i wsp., 2000 w modyfikacji własnej].

Gen kodujący PAI-1 (gen *SERPINE1*) zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 7 (7q21,3-22, długość 12,5 kpz), zbudowany jest z 9 eksonów oraz 8 intronów, eksony mają długość od 84 do 1871 pz (NM\_000602). W regionie promotorowym genu obserwuje się występowanie wysokiej homologii z fragmentem genu kodującego tPA. Na tej podstawie można wnioskować o wzajemnej regulacji ekspresji tych genów, co prawdopodobnie ma duże znaczenie dla prawidłowego utrzymania hemostazy. Ekspresja genu *PAI-1* jest wzmagana przez śródbłonkowy czynnik wzrostu, glikokortykosteroidy, estrogeny, insulinę, cytokiny (TGF-beta, TNF-alfa, interleukiny), endotoksyny bakteryjne, trombinę, cholesterol frakcji LDL, prostaglandyny oraz nienasycone kwasy tłuszczowe [22]. W trakcie infekcji bakteryjnej w wyniku stymulacji przez cytokiny i endotoksyny dochodzi do wzrostu stężenia PAI-1 w surowicy, co może prowadzić do uszkodzenia narządów w wyniku powstawania mikrozakrzepów [103].

#### **1.7.1. Polimorfizm -675 4G/5G genu inhibitora aktywatora plazminogenu-1**

Polimorfizm -675 4G/5G genu inhibitora aktywatora plazminogenu-1 jest polimorfizmem typu insercja/delecja nukleotydu guaninowego (G) w odcinku promotorowym genu. Homozygotyczność pod względem genotypu delecyjnego (-675 4G/-675 4G) wiąże się ze zwiększonym stężeniem PAI-1 w surowicy i w związku z tym z redukcją nasilenia fibrynolizy w porównaniu do nosicieli genotypu insercyjnego (-675 5G/-675 5G). U nosicieli genotypu heterozygotycznego (-675 4G/-675 5G) obserwuje się pośrednią wartość stężenia PAI-1. Sugeruje się bezpośredni wpływ tego polimorfizmu na kontrolę ekspresji genu *PAI-1*.

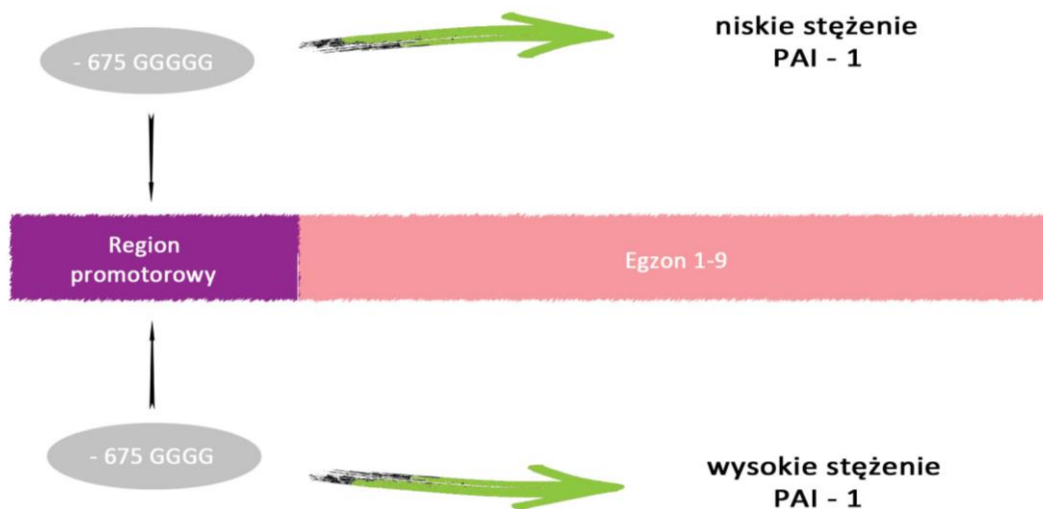
Obecność powyższego wariantu genetycznego analizuje się pod kątem zwiększonego ryzyka występowania chorób układu sercowo-naczyniowego, takich jak zawał serca czy żylna choroba zakrzepowo-zatorowa. Ponadto rozpatruje się jego udział w etiologii powikłań położniczych, w tym ciężkiego stanu przedrzucawkowego, nadciśnienia ciążowego, wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu, obumarcia wewnątrzmacicznego czy poronień nawracających.

Glueck i wsp. analizowali wpływ hypofibrynolitycznego genotypu -675 4G/-675 4G na ryzyko występowania ciężkiego stanu przedrzucawkowego, przedwczesnego oddzielenia łożyska, ograniczenia wzrastania płodu oraz wewnątrzmacicznego obumarcia płodu. Do grupy badanej zakwalifikowano 94 pacjentki z wywiadem obciążonym występowaniem powyższych powikłań położniczych, grupę kontrolną stanowiło 95 kobiet, u których przebieg ciąży był prawidłowy. W grupie badanej odnotowano większą częstość występowania genotypu -675 4G/-675 4G w porównaniu do zdrowych kobiet (32% vs. 19%). Wykazano

niezależny wpływ polimorfizmu *-675 4G/5G* genu *PAI-1* na ryzyko wystąpienia powikłań położniczych [53].

Do podobnych wniosków doszli autorzy badania Yamada i wsp., w którym grupę badaną stanowiło 115 pacjentek ze stanem przedrzucawkowym, natomiast grupę kontrolną 210 kobiet z niepowikłanym przebiegiem ciąży. Ponadto przeanalizowano również pod kątem polimorfizmu *-675 4G/5G* genu *PAI-1* grupę 298 zdrowych ochotników. Częstość występowania genotypu homozygotycznego *-675 4G/-675 4G* była istotnie wyższa w grupie badanej w porównaniu do obydwu grup kontrolnych. Allel *-675 4G* również był obserwowany znacznie częściej u pacjentek ze stanem przedrzucawkowym [172].

W związku z licznymi doniesieniami na temat związku powyższego wariantu genetycznego z występowaniem stanu przedrzucawkowego Morgan i wsp. przeprowadzili metaanalizę 12 badań z tego zakresu. Ostatecznie przeanalizowano dane dotyczące 1511 pacjentek ze stanem przedrzucawkowym, rzucawką lub zespołem HELLP (*hemolytic anemia, elevated liver enzymes, low platelet count* – anemia hemolityczna, zwiększone stężenie enzymów wątrobowych, małopłytkowość) oraz 3492 zdrowych kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym stanowiących grupę kontrolną. Uzyskane wyniki wskazywały na prawdopodobny udział zaburzeń układu fibrynolitycznego regulowanego przez PAI-1 w patogenezie stanu przedrzucawkowego i pokrewnych patologii. Na poziomie populacyjnym genotyp homozygotyczny *-675 4G/-675 4G* odpowiadał za około 7% przypadków stanu przedrzucawkowego. Autorzy zaznaczyli jednak, że nie może się to równać z istotnym zwiększeniem ryzyka rozwoju stanu przedrzucawkowego na poziomie jednego konkretnego przypadku. Wynika z tego, że u większości kobiet nosicielek genotypu *-675 4G/-675 4G* nie rozwinię się stan przedrzucawkowy, a większość pacjentek z rozpoznaniem stanu przedrzucawkowym nie jest nosicielkami tego właśnie wariantu genetycznego. Pozostaje do wyjaśnienia jak silna jest interakcja pomiędzy genetycznie uwarunkowanymi przyczynami trombofilii a udokumentowanymi już czynnikami ryzyka rozwoju stanu przedrzucawkowego, takimi jak palenie papierosów, otyłość czy występowanie tego powikłania położniczego w poprzednich ciążach [106].



**Rycina 6.** Polimorfizm -675 4G/5G genu *PAI-1*.

### 1.7.2. Polimorfizm -844G>A genu inhibitora aktywatora plazminogenu-1

Polimorfizm -844G>A jest zlokalizowany w odcinku promotorowym genu inhibitora aktywatora plazminogenu-1 i polega na substytucji guaniny na adeninę. Ten wariant genetyczny jest analizowany w aspekcie etiologii żylnych chorób zakrzepowo-zatorowych, choroby wieńcowej serca, stanu przedzrzucawkowego, reumatoidalnego zapalenia stawów, toczenia rumieniowatego oraz zespołu metabolicznego. Ponadto genotypy -844GA oraz -844AA mają związek ze zwiększeniem stężenia triglicerydów oraz zmniejszeniem stężenia cholesterolu frakcji lipoprotein o wysokiej gęstości (HDL - *high density lipoprotein*). Uważa się, że allel -844A jest związany ze wzrostem stężeniem PAI-1 w surowicy, co skutkuje hipofibrinolizą i zwiększonym ryzykiem rozwoju chorób o etiologii zakrzepowej. Ponadto sugeruje się udział tego wariantu genetycznego w regulacji stężenia glukozy we krwi, rozwoju insulinooporności, zwiększeniu stężenia triglicerydów i zmniejszeniu stężenia cholesterolu frakcji HDL w surowicy [35, 159]. De la Cruz-Mosso zaobserwowali, że polimorfizm -844G>A ma wpływ na wzrost grubości podskórnej warstwy tkanki tłuszczowej, co podnosi ryzyko otyłości u nosicieli genotypów -844GA oraz -844AA [35].

Fabbro i wsp. analizowali związek polimorfizmów -844G>A oraz -675 4G/5G u pacjentek ze stanem przedzrzucawkowym o łagodnym przebiegu. Do grupy badanej włączono 52 pacjentki z rozpoznaniem stanu przedzrzucawkowego, grupę kontrolną natomiast stanowiło

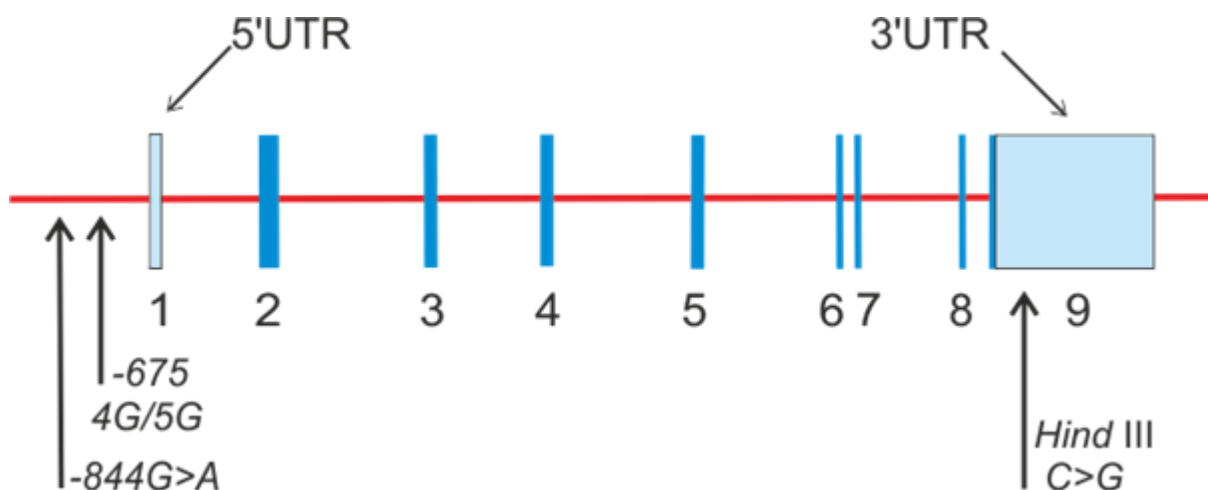
80 zdrowych ciężarnych. Należy zaznaczyć, że u wszystkich kobiet przeprowadzono również badania w kierunku czynnika V Leiden, polimorfizmu *20210G>A* genu protrombiny oraz polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR*, przy czym nie wykazano istotnego statystycznie związku tych wariantów genetycznych z ryzykiem stanu przedrzucawkowego. Natomiast genotyp *-844AA* występował częściej u kobiet z grupy badanej, a genotyp *-844GG* u kobiet z grupy kontrolnej. Hipofibrynolityczny genotyp *-844AA* jest prawdopodobnie związany ze zwiększonym ryzykiem rozwoju stanu przedrzucawkowego o łagodnym przebiegu niezależnie od ewentualnie współistniejących mutacji prozakrzepowych w genach czynnika V krzepnięcia, protrombiny oraz *MTHFR* [44].

### **1.7.3. Polimorfizm *HindIII C>G* genu inhibitora aktywatora plazminogenu-1**

Polimorfizm *HindIII C>G* jest zlokalizowany w odcinku 3' UTR (*untranslated region*, region nie podlegający translacji; odcinek mRNA nieulegający translacji, wykazujący właściwości funkcjonalne) genu *PAI-1*. Polimorfizm ten polega na substytucji cytozyny na guaninę. Uważa się, że obecność allele *HindIII G* zakłóca prawidłową regulację translacji genu *PAI-1*, co prawdopodobnie skutkuje wzrostem stężenia PAI-1 w surowicy krwi [35].

Obecność tego wariantu genu *PAI-1* jest związana z ryzykiem rozwoju żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej, choroby wieńcowej serca, stanu przedrzucawkowego czy idiopatycznego nadciśnienia płucnego. Istnieje korelacja między stężeniem PAI-1 w osoczu a stężeniem cholesterolu frakcji LDL oraz insuliny. Wyniki badania Dawson i wsp. sugerują, że ta regulacja pozostaje właśnie pod wpływem polimorfizmu *HindIII C>G* [32]. W badaniu De la Cruz –Mosso i wsp. wykazano, że genotypy *HindIII CG* oraz *HindIII GG* mają wpływ na zwiększenie całkowitego stężenia cholesterolu we krwi [35]. Rozważa się również udział powyższego wariantu genetycznego w zmiennej podatności na zachorowanie na toczenia układowego czy wzroście stężenia PAI-1 u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów [113, 160].





**Rycina 7.** Schemat przedstawiający analizowane w pracy polimorfizmy genu *PAI-1*.

### 1.8. Wybór analizowanych w rozprawie doktorskiej wariantów genetycznych

Przy wyborze badanych w pracy wariantów genetycznych czynnika VII oraz PAI-1 kierowano się założeniem, że polimorfizmy te mogą warunkować trombofilię wrodzoną, a tym samym być czynnikiem ryzyka występowania poronień nawracających. Hipotezę tę oparto na licznych doniesieniach, głównie z zakresu kardiologii, dowodzących związku badanych polimorfizmów z rozwojem chorób o etiologii zakrzepowej. Należy przede wszystkim podkreślić, że większość z przedstawianych wariantów genetycznych została po raz pierwszy oceniona w kontekście związku z występowaniem poronień nawracających w prezentowanej rozprawie doktorskiej.

Co najmniej w jednej trzeciej przypadków przyczyna występowania poronień nawracających pozostaje nieznana. Jedynie u 30-50% pacjentek udaje się zidentyfikować podłoże tej patologii [25, 120]. Trombofilię jako czynnik sprawczy tego powikłania położniczego potwierdzono w licznych badaniach [13, 33, 38, 40, 139, 145]. Udział genetycznie uwarunkowanej nadkrzepliwości w poronieniach nawracających oparty jest na trzech głównych przesłankach: wyższy odsetek występowania trombofili wśród pacjentek z poronieniami nawracającymi niż w populacji ogólnej, zwiększone ryzyko utraty ciąży u kobiet z rozpoznaną trombofilią oraz obecność zakrzepów w naczyniach łożyska w badaniu histopatologicznym przeprowadzanym po utracie ciąży. Standardowo u pacjentek dotkniętych

powyższym powikłaniem położniczym diagnostyka trombofilii oparta jest na badaniach w kierunku mutacji Leiden, polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR*, polimorfizmu 20210G>A genu protrombiny, niedoboru antytrombiny III, niedoboru białka C i S. Zdarza się jednak, że mimo braku obecności powyższych nieprawidłowości genetycznych terapia przeciwkrzepliwa oparta na podawaniu heparyny drobnocząsteczkowej i kwasu acetylosalicylowego przynosi oczekiwane rezultaty w postaci donoszenia ciąży. Nasuwa to podejrzenie istnienia innych, nie ujętych w podstawowym algorytmie diagnostycznym wariantów genetycznych mogących warunkować trombofilie wrodzone, a tym samym być czynnikiem ryzyka poronień. Stąd prezentowana rozprawa doktorska jest próbą poszukiwania nowych, dotąd nie zidentyfikowanych mutacji mogących przyczyniać się do występowania nawracających utrat ciąży.

## 2. CEL PRACY

Celem pracy jest określenie znaczenia wybranych polimorfizmów genów czynnika VII krzepnięcia oraz tkankowego inhibitora aktywatora plazminogenu w etiologii poronień nawracających.

Cel ten realizowano poprzez:

1. Ocenę i porównanie częstości występowania w grupie badanej (kobiety z obciążonym wywiadem w kierunku występowania co najmniej dwóch poronień w I i II trymestrze ciąży) oraz w grupie kontrolnej (kobiety, u których w wywiadzie potwierdzono co najmniej jedną ciążę o niepowikłanym przebiegu, zakończoną urodzeniem zdrowego, donoszonego noworodka oraz u których wykluczono występowanie poronień) genotypów i alleli następujących polimorfizmów:

a. gen czynnika VII:

- polimorfizm *Arg353Gln (R353Q)*
- polimorfizm *-323P0/P10*
- polimorfizm *-122T>C*

b. gen PAI-1:

- polimorfizm *-675 4G/5G*
- polimorfizm *-844G>A*
- polimorfizm *HindIII C>G*

2. Ocenę zależności występowania genotypów i alleli powyższych polimorfizmów z trymestrem ciąży, w którym doszło do poronienia oraz ilością poronień.

3. Ocenę współwystępowania genotypów analizowanych polimorfizmów w grupie badanej oraz kontrolnej.

### **3. MATERIAŁ I METODYKA**

Pacjentki do obu grup kwalifikowane były przy zastosowaniu kryteriów włączenia i wykluczenia w Klinice Perinatologii i Chorób Kobiecych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu w latach 2011-2013 po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu nr 422/11 w dniu 16.06.2011. Wszystkie kobiety zostały szczegółowo poinformowane o zakresie i celu prowadzonej analizy i wyraziły pisemną zgodę na udział w badaniach.

Do analizy włączono dwie grupy pacjentek:

1. 152 kobiety z obciążonym wywiadem w kierunku występowania poronień (dwóch lub więcej) w I i II trymestrze ciąży
2. 180 kobiet, u których potwierdzono w wywiadzie co najmniej jedną ciążę o niepowikłanym przebiegu zakończoną urodzeniem zdrowego, donoszonego noworodka oraz wykluczono wystąpienie poronień.

Od każdej pacjentki został zebrany dokładny wywiad położniczy celem analizy danych klinicznych – tydzień ciąży, w którym wystąpiły poronienia, wiek ciężarnej, masa ciała, ciśnienie tętnicze. Ponadto w grupie kontrolnej analizowano dane noworodka (masa, ocena w skali Apgar, tydzień oraz sposób ukończenia ciąży).

#### **3.1. Grupa badana**

Grupę badaną stanowią 152 kobiety (średnia wieku  $30,16 \pm 3,82$  lat, zakres 21-45 lat, mediana 30 lat) rasy kaukaskiej z dwoma i więcej poronieniami w wywiadzie. Wiek ciążowy, w którym doszło do poronienia określany był na podstawie daty wystąpienia ostatniej miesiączki, analizy regularności cykli miesięczkowych oraz oceny przeprowadzonych u pacjentki badań ultrasonograficznych. Poronienie określano jako wydalenie z macicy jaja płodowego przed zakończeniem 22 tygodnia ciąży. W przypadku każdej ciąży zakończonej poronieniem potwierdzano obecność echa zarodka w jamie macicy we wcześniejszych badaniach ultrasonograficznych. U pacjentek została wykluczona obecność przeciwciał antyfosfolipidowych oraz występowanie innych patologii mogących mieć związek z występowaniem powikłań zakrzepowych i poronień.

**Kryteria włączenia do analizy – grupa badana:**

- obciążony wywiad w kierunku wystąpienia co najmniej dwóch poronień
- rasa kaukaska, narodowość polska
- obecność echa zarodka w jamie macicy w badaniach ultrasonograficznych poprzedzających poronienie.

**Kryteria wyłączenia z analizy – grupa badana:**

- obecność znanych przyczyn poronień (wady macicy, zaburzenia chromosomalne, przewlekłe choroby ogólnoustrojowe matki, zakażenia, zaburzenia hormonalne)
- występowanie niewydolności cieśniowo-szyjkowej
- obecność innych powikłań mogących być przyczyną zmian zakrzepowo-zatorowych (m.in. nadciśnienie tętnicze przewlekłe, obecność przeciwciał antyfosfolipidowych, żylna choroba zakrzepowo-zatorowa w momencie włączenia do badania lub w wywiadzie)

Podczas analizy dwukrotnie dokonano podziału grupy badanej na podgrupy. Pierwszy podział dotyczący ilości poronień wyłonił dwie podgrupy pacjentek:

- kobiety z dwoma poronieniami w wywiadzie (n = 114),
- kobiety z trzema i więcej poronieniami w wywiadzie (n = 38).

Drugi podział dotyczył natomiast trymestru ciąży, w którym wystąpiło poronienie:

- pacjentki, u których poronienia występowały tylko w I trymestrze ciąży, poniżej 13 tygodnia ciąży (n = 123),
- kobiety, u których poronienia miały miejsce zarówno w I, jak i w II trymestrze ciąży, poniżej 21 tygodnia ciąży (n = 29).

### **3.2. Grupa kontrolna**

Grupę kontrolną stanowiło 180 zdrowych kobiet (średnia wieku  $29,46 \pm 4,26$  lat, zakres 19-42 lata, mediana 29 lat), u których w wywiadzie potwierdzono co najmniej jedną ciążę o niepowikłanym przebiegu, zakończoną urodzeniem zdrowego, donoszonego noworodka. Z grupy tej zostały wykluczone kobiety z obciążonym wywiadem w kierunku wystąpienia poronień oraz innych patologii położniczych, które mogą być związane z występowaniem zmian zakrzepowych (stan przedrzucawkowy, hipotrofia płodu, porody przedwczesne, przedwczesne oddzielenie łożyska, obumarcie wewnątrzmaciczne). Tydzień zakończenia ciąży ustalano na podstawie daty ostatniej miesiączki, regularności cykli miesięczkowych oraz badań ultrasonograficznych wykonywanych w trakcie trwania ciąży (średni tydzień zakończenia ciąży  $39,07 \pm 1,20$ , mediana 39 tc., zakres 37-42 tc.). U pacjentek z grupy kontrolnej odnotowywano tydzień oraz sposób zakończenia ciąży oraz parametry urodzeniowe noworodka (masa, punktacja w skali Apgar w 1 i 5 minucie życia).

#### **Kryteria włączenia/wyłączenia z analizy – grupa kontrolna:**

- w wywiadzie co najmniej jedna ciąża o niepowikłanym przebiegu zakończona urodzeniem zdrowego, donoszonego noworodka
- brak poronień w wywiadzie
- nieobciążony wywiad w kierunku powikłań położniczych które mogą być związane z występowaniem zmian zakrzepowych (stan przedrzucawkowy/rzucawka, hipotrofia płodu, porody przedwczesne, przedwczesne oddzielenie łożyska, obumarcie wewnątrzmaciczne)
- wykluczenie przewlekłych chorób ogólnoustrojowych
- wykluczenie żylnych chorób zakrzepowo-zatorowej w momencie włączania do badania lub w wywiadzie
- rasa kaukaska, narodowość polska.

Charakterystyka pacjentek z grupy badanej i kontrolnej została przedstawiona w tabeli 2.

**Tabela 2.** Charakterystyka porównawcza kobiet z grupy badanej i kontrolnej.

<i>Dane kliniczne</i>	<i>Grupa badana (n=152)</i>	<i>Grupa kontrolna (n=180)</i>
<i>wiek (lata)</i> średnia ± SD mediana minimum/maksimum	30,16 ± 3,82 30 21-45	29,46 ± 4,26 29 19-42
<i>ilość poronień w wywiadzie</i> 2 poronienia 3 i więcej poronień	114 38	- -
<i>wystąpienie poronienia</i> I trymestr ciąży (<13 tc.) I i II trymestr ciąży (<21 tc.)	123 29	- -
<i>pierwiastki wieloródki</i>	- -	109 71

### 3.3. Materiał badawczy

Od wszystkich badanych pacjentek została pobrana jednorazowo w trakcie rutynowych badań próbka krwi żyłnej w ilości około 5 ml do probówek S-Monovette (Sarstedt, Niemcy) z żelom K2E. Żel ten zawiera kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA, *ethylene diamine tetraacetic acid*) w postaci soli dwupotasowej w stężeniu 1,6 mg EDTA/ml krwi. Probówki przechowywano do czasu izolacji DNA w temperaturze -20°C.

W grupie badanej i kontrolnej oznaczono częstość występowania genotypów i alleli następujących polimorfizmów (tab. 3):

gen czynnika VII:

*Arg353Gln (R353Q)*

-323P0/P10

-122T>C

gen PAI-1 (SERPINE 1):

-675 4G/5G

-844G>A

*HindIII C>G*

Z pobranej krwi żyłnej wyizolowano DNA celem przeprowadzenia dalszych analiz genetycznych za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR - *polymerase chain reaction*) oraz metody polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP – *restriction fragment length polymorphism*). Oznaczenia polimorfizmów genetycznych przeprowadzane były w Pracowni Biologii Molekularnej w Klinice Perinatologii i Chorób Kobietych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Materiał genetyczny – wyizolowane DNA przechowywany jest w  $-80^{\circ}\text{C}$  w wyżej wymienionej Pracowni.



**Tabela 3.** Charakterystyka badanych w pracy polimorfizmów.

<b>Gen</b>	<b>Pozycja genu na chromosomie</b>	<b>Nazwa zwyczajowa</b>	<b>Nazwa wg HGVS (<i>Human Genome Variation Society</i>)</b>	<b>Nr w bazie danych NCBI (dbSNP)</b>
<b><i>CZYNNIK VII</i></b>	13q34	<i>-323P0/P10</i>	NC_000013.10:g.113759831_113759832insCCTATATCCT	rs5742910
		<i>-122T&gt;C</i>	NC_000013.10:g.113760034T>C	rs561241
		<i>Arg353Gln</i>	NC_000013.10:g.113773159G>A	rs6046
<b><i>PAI-1</i></b>	7q22.1	<i>-844G&gt;A</i>	NC_000007.13:g.100769538A>G	rs2227631
		<i>-675 4G/5G</i>	NC_000007.13:g.100769705_100769706insG	rs1799768
		<i>HindIII C&gt;G</i>	NC_000007.13:g.100785122C>G	rs11560324

### 3.4. Izolacja DNA oraz jakościowa i ilościowa ocena wyizolowanego DNA

Izolację DNA z leukocytów krwi obwodowej przeprowadzano za pomocą komercyjnego zestawu do izolacji QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Niemcy). Zawarte w nim złożo krzemionkowe w obecności wysokich stężeń soli chaotropowych pełni rolę nośnika wiążącego DNA. Do próbki odpipetowano 20  $\mu\text{l}$  proteiny K (enzym proteolityczny o szerokiej specyficzności substratowej), w dalszej kolejności dodawano 200  $\mu\text{l}$  krwi pobranej na EDTA oraz 200  $\mu\text{l}$  detergentu zawartego w buforze (AL – oznaczenie nadane przez firmę). Detergent był odpowiedzialny za degradację błon komórkowych. Tak przygotowaną próbkę mocno wstrząsano oraz następnie ogrzewano przez 10 minut w temperaturze 56° C. Mieszaninę przenoszono do kolumnki ze złożem krzemionkowym i wirowano przez 1 minutę (obroty 8000 rpm; wirówka Eppendorf 5804R, Niemcy). W dalszej kolejności kolumna była przenoszona do nowej próbki, a przesącz był odrzucany. Przy użyciu 500  $\mu\text{l}$  buforów oznaczonych przez firmę A1 i A2 kolumnę dwukrotnie przemywano, po czym przez 1 minutę 8000 rpm i 3 minuty 14000 rpm. Miało to na celu oczyszczenie DNA. W dalszym etapie nakładano na kolumnę 200  $\mu\text{l}$  buforu do elucji (bufor AE), po upływie 5 minut wirowano przez 1 minutę 8000 rpm. W ten sposób otrzymywano oczyszczone DNA wykorzystywane do dalszej analizy genetycznej.

Celem jakościowej analizy wyizolowanego DNA zastosowano pomiar metodą spektrofotometryczną, używając spektrofotometru BioPhotometr firmy Eppendorf. Stężenie otrzymanego kwasu nukleinowego szacowano przy pomocy oceny absorpcji przy długości fali 260 nm określanej jako gęstość optyczna (OD - *optical density*). Jest to najwyższy stopień absorpcji promieniowania ultrafioletowego przez DNA. Stężenie DNA oceniano przy zastosowaniu poniższego wzoru:

$$\text{Stężenie DNA } [\mu\text{g/ml}] = \text{absorbancja przy 260 nm} \times \text{rozcieńczenie} \times 50$$

Podstawą do zastosowania tego wzoru jest założenie, że gdy A260 równa się 1 to stężenie dwuniciowego DNA (dsDNA) wynosi około 50  $\mu\text{g/ml}$ , natomiast stężenie jednoniciowego DNA (ssDNA) – w przybliżeniu 33  $\mu\text{g/ml}$ .

Jakościowej analizy otrzymanego izolatu DNA dokonano przy pomocy powszechnie stosowanej oceny czystości roztworu DNA, jaką jest stosunek A260/A280. Zakłada się, że preparat jest czysty, jeśli A260/A280 wynosi 1,8-2,0. Ponadto dokonywano kontroli otrzymanego DNA poprzez przeprowadzenie elektroforezy na 0,8% żelach agarozowych, gdzie DNA powinno być widoczne jako pojedynczy prążek.

### 3.4.1. Reakcja łańcuchowej polimerazy i polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

Badania ostatnich lat zwracają uwagę na udział polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP – *single nucleotide polymorphism*), czyli mutacji punktowych w patogenezie chorób, których etiologia jest wieloczynnikowa. SNP są wynikiem zmiany pary zasad w specyficznym *locus*. Jedną z prostszych metod ich oznaczania jest reakcja łańcuchowej polimerazy oraz polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (PCR/RFLP). Podstawą użycia metody PCR/RFLP do wykrywania mutacji punktowych jest pojawienie się lub zanik miejsca rozpoznawanego przez określony enzym restrykcyjny [4].

PCR jest współcześnie podstawowym narzędziem w dziedzinie biologii molekularnej i genetyki. Została opracowana w 1983 roku przez Kary Mullis, który w 1993 roku został uhonorowany Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii [6]. Służy ona uzyskaniu dużej liczby kopi określonego odcinka łańcucha DNA poprzez amplifikację (powielenie) tego fragmentu. Amplifikacji ulegają fragmenty łańcucha DNA o nieznannej sekwencji otoczone fragmentami o sekwencji znanej. Większość stosowanych metod PCR pozwala na powielanie fragmentów DNA o wielkości 0,1 do 10 kpz, ale istnieją metody pozwalające na amplifikacje fragmentów o wielkości do 40 kpz. Ilość otrzymywanych kopi DNA zależna jest od dostępności substratów niezbędnych w przeprowadzeniu reakcji, które zostają sukcesywnie zużywane w trakcie trwania procesu. Do przeprowadzenia reakcji PCR niezbędne są następujące składniki:

- matryca DNA, czyli fragment, który poddany będzie amplifikacji
- primery (tzw. startery), czyli fragmenty jednoniciowego DNA będące komplementarne do końcowych odcinków powielanego fragmentu DNA
- termostabilna polimeraza (enzym odpowiedzialny za syntezę łańcucha DNA komplementarnego do matrycy)
- substraty dla polimerazy, czyli trójfosforany wszystkich czterech deoksyrybonukleozydów
- bufor zapewniający optymalne warunki do przeprowadzenia reakcji
- $MgCl_2$  – jony magnezu ( $Mg^{++}$ ) pełnią funkcję kofaktora polimerazy, którego stężenie silnie wpływa na wydajność i specyficzność PCR

PCR przeprowadza się w 20-40 powtarzających się cyklach, w termocyklerze, który pozwala na kontrolowaną zmianę temperatury. Każdy cykl reakcji PCR składa się z:

- denaturacji, która przebiega w temperaturze 94-98°C i trwa ok. 20-30 s; w takich warunkach dochodzi poprzez przerwanie wiązań wodorowych do rozdzielenia dwuniciowej matrycy DNA mającej ulec amplifikacji na dwie pojedyncze nici;

- przyłączania starterów (hybrydyzacja) – przebiega w temperaturze 50-65°C i trwa ok. 20-40 s; dochodzi do przyłączenia starterów do komplementarnych odcinków jednoniciowych łańcuchów matrycy DNA;
- wydłużania starterów (elongacja) – temperatura tego etapu jest zależna od użytej polimerazy DNA, dobiera się takie warunki, w których enzym ten wykazuje największą aktywność (zwykle ok. 72°C); dochodzi do syntezy nowej nici DNA komplementarnej do matrycy.

PCR jest metodą charakteryzującą się wysoką czułością i swoistością. Ponadto amplifikowana sekwencja DNA nie musi być dokładnie znana, znane muszą być tylko sekwencje otaczające powielany fragment [16, 87, 116, 133, 154]. W prezentowanej pracy wszystkie reakcje PCR przeprowadzono używając termocyklera Dyad DNA Engine (BioRad, Stany Zjednoczone).

Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych jest metodą wykorzystującą różnice w sekwencji homologicznych odcinków DNA oraz duże powinowactwo endonukleaz do rozpoznawania poszczególnych miejsc restrykcyjnych. Różnice te wynikają z odmiennych miejsc działania enzymów restrykcyjnych, które przecinają łańcuch DNA w swoistym dla siebie *locus*, rozpoznając konkretną sekwencję nukleotydów. Łańcuch DNA, produkt reakcji PCR poddany trawieniu danym enzymem restrykcyjnym rozpada się na tzw. fragmenty restrykcyjne, które następnie są rozdzielane za pomocą elektroforezy na żelu agarozowym. Hybrydyzacja otrzymanych fragmentów restrykcyjnych z sondami DNA pozwala ocenić czy długość otrzymanych odcinków jest taka sama jak sond. Jeśli nie – mówi się o polimorfizmie otrzymanych fragmentów. Zmiana nawet pojedynczego nukleotydu w sekwencji DNA spowoduje, że dany enzym restrykcyjny nie dokona trawienia w swoistym dla siebie miejscu i w dwóch porównywanych próbkach DNA powstaną odcinki o różnej długości.

W tabelach 4, 5, 6, 7 i 8 zbiorczo przedstawiono startery użyte do reakcji PCR, skład mieszaniny oraz warunki reakcji PCR, skład mieszaniny do hydrolizy produktu PCR enzymem restrykcyjnym, wielkości fragmentów po reakcji hydrolizy oraz zastosowane enzymy restrykcyjne dla wszystkich badanych w pracy polimorfizmów. Po przeprowadzeniu hydrolizy restrykcyjnej identyfikacji poszczególnych genotypów dokonywano za pomocą elektroforezy. Po dodaniu buforu obciążającego nakładano próbki na 2% (w przypadku polimorfizmów *Arg353Gln*, *-323P0/10*, *-122T>C* genu czynnika VII) lub 2,5% (dla polimorfizmów *-675 4G/5G*, *HindIII C>G*, *-844G/A* genu *PAI-1*) żel agarozowy (TiBMolBiol, Polska). Elektroforezę prowadzono w buforze 1 x TBE przy napięciu 200V przez 2 godziny. Żele barwiono bromkiem

etydyny, a uzyskane wyniki dokumentowano za pomocą systemu UVI – KS4000/Image PC (Syngen Biotech, USA).

### **3.4.2. Polimorfizm *Arg353Gln* (*R353Q*) genu czynnika VII krzepnięcia**

Polimorfizm *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia amplifikowano używając starterów o następujących sekwencjach: F 5' – GGG AGA CTC CCC AAA TAT CAC-3' oraz R 5' – ACG CAG CCT TGG CTT TCT CTC-3' [55]. Uzyskany produkt PCR wielkości 312 pz poddawano trawieniu enzymem restrykcyjnym *MspI* (C<sup>^</sup>CGG). Po inaktywacji enzymu, próbki nakładano na żel agarozowy i uzyskiwano następujące genotypy: homozygota *Arg353/Arg353* 206, 67, 39 pz, heterozygota *Arg353/Gln353* 273, 206, 67, 39 pz, homozygota *Gln353/Gln353* 273, 39 pz.

### **3.4.3. Polimorfizm *-323P0/P10* genu czynnika VII krzepnięcia**

Fragment zawierający miejsce polimorfizmu *-323P0/P10* w promotorze genu czynnika VII krzepnięcia amplifikowano przy użyciu następujących starterów: F 5' – TCG CAT GAT TGC TAT GGG AC-3', R 5'-GTT GAC ATT CCC CAT GGG AC– 3' [169]. Uzyskane produkty PCR wielkości 356 pz (*-323P0/-323P0*), 366, 356 pz (*-323P0/-323P10*) oraz 366 pz (*-323P10/-323P10*) poddawano trawieniu enzymem restrykcyjnym *Eco130I* (C<sup>^</sup>CWWGG). Po hydrolizie uzyskiwano następujące fragmenty dla poszczególnych genotypów: *-323P0/-323P0* – 309, 31, 16 pz, *-323P0/-323P10* – 309, 249, 70, 31, 16 pz, *-323P10/-323P10* – 249, 70, 31, 16 pz.

### **3.4.4. Polimorfizm *-122T>C* genu czynnika VII krzepnięcia**

W celu wykrycia punktowej mutacji *-122T>C* zlokalizowanej w promotorze genu czynnika VII krzepnięcia użyto następujących starterów: F 5' – TCG CAT GAT TGC TAT GGG AC-3', R 5'-GTT GAC ATT CCC CAT GGG AC– 3'[169]. Otrzymywano produkt PCR o wielkości 356 (366) pz, który poddano hydrolizie restrykcyjnej przy użyciu enzymu *SduI* (*Bsp1286I*) (GDGCH<sup>^</sup>C). W zależności od genotypu uzyskiwano następujące fragmenty: *-122TT* – 200 (210),156 pz, *-122TC* – 200 (210),156, 90, 66 pz, *-122CC* – 200 (210), 90, 66 pz.

### **3.4.5. Polimorfizm *-675 4G/5G* genu *PAI-1***

Polimorfizm *-675 4G/5G* genu *PAI-1* wykrywano przy zastosowaniu następujących starterów: 5' – GCC CTC AGG GGC ACA GAG AGA GTC TGG CCA-3' oraz 5'- GCA ATG CAG CCA GCC ACG TG – 3' [36]. Otrzymany produkt PCR o wielkości 163 pz poddawano

trawieniu enzymem restrykcyjnym *BsII* (CCNNNNN<sup>^</sup>NNGG). Po hydrolizie restrykcyjnej uzyskiwano następujące fragmenty dla poszczególnych alleli: -675 4G 107, 56 pz, -675 5G 74, 56, 34 pz.

#### **3.4.6. Polimorfizm -844G>A genu *PAI-1***

Sekwencje użytych starterów były następujące: F: 5' – CAg gCT CCC ACT gAT TCT AC-3', R: 5'- gAg ggC TCT CTT gTg TCA AC-3' [64]. Uzyskany produkt PCR o wielkości 510 pz poddawano hydrolizie enzymem restrykcyjnym *XhoI* (C<sup>^</sup>TCGAG). Po dodaniu buforu obciążającego nakładano próbki na 2,5% żel agarozowy. Elektroforezę prowadzono w buforze 1 x TBE przy napięciu 200V przez 2 godziny i 30 minut. Uzyskane wyniki dokumentowano za pomocą systemu UVI – KS4000/Image PC (Syngen Biotech, USA). Po hydrolizie uzyskiwano następujące fragmenty dla poszczególnych genotypów: -844GG – 364, 146 pz, -844GA – 510, 364, 146 pz, -844AA – 510 pz.

#### **3.4.7. Polimorfizm *HindIII* C>G genu *PAI-1***

Do amplifikacji fragmentu genu *PAI-1* zawierającego mutację punktową *HindIII* C>G wykorzystano startery o następujących sekwencjach: F 5' -gCC TCC AgC TAC CgT TAT TgT ACA -3', R 5'- CAg CCT AAA CAA CAg AgA CCC C -3' [57]. Uzyskany produkt PCR o wielkości 754 pz poddawano hydrolizie enzymem restrykcyjnym *HindIII* (A<sup>^</sup>AGCTT). Po hydrolizie uzyskiwano następujące fragmenty dla poszczególnych genotypów: *Hind III* CC – 566, 188 pz, *HindIII* CG – 754, 566, 188 pz, *HindIII* GG – 754 pz.

**Tabela 4.** Startery użyte do reakcji PCR.

<b>Polimorfizm</b>	<b>Sekwencja starterów</b>	<b>Literatura</b>
<i>Arg353Gln</i>	F 5' – GGG AGA CTC CCC AAA TAT CAC-3' R 5' – ACG CAG CCT TGG CTT TCT CTC-3'	Green i wsp., 1991
<i>-323P0/P10</i>	F 5' – TCG CAT GAT TGC TAT GGG AC-3' R 5'-GTT GAC ATT CCC CAT GGG AC– 3'	van't Hoof i wsp., 1999
<i>-122T&gt;C</i>	F 5' – TCG CAT GAT TGC TAT GGG AC-3' R 5'-GTT GAC ATT CCC CAT GGG AC– 3'	van't Hoof i wsp., 1999
<i>-675 4G/5G</i>	5' – GCC CTC AGG GGC ACA GAG AGA GTC TGG CCA-3' 5'- GCA ATG CAG CCA GCC ACG TG – 3'.	Doggen i wsp., 1999
<i>-844G&gt;A</i>	F: 5' – CAg gCT CCC ACT gAT TCT AC-3' R: 5'- gAg ggC TCT CTT gTg TCA AC-3'	Henry i wsp., 1997
<i>HindIII C&gt;G</i>	F: 5' -gCC TCC AgC TAC CgT TAT TgT ACA -3' R: 5'- CAg CCT AAA CAA CAg AgA CCC C -3'	Grenett i wsp., 2000

**Tabela 5.** Skład mieszaniny do reakcji PCR (podano stężenie wyjściowe na 1 próbkę w  $\mu\text{L}$ ).

<b>Polimorfizm</b>	<b>DNA [<math>\mu\text{L}</math>]</b>	<b>Woda sterylna [<math>\mu\text{L}</math>]</b>	<b>Bufor 10 x stężony</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> 25mM</b>	<b>dNTP 2,5 mM</b>	<b>Starter F 50 pmoli/ <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Starter R 50 pmoli/<math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Polimeraza DNA 5U/<math>\mu\text{L}</math></b>	<b>Suma</b>
<i>Arg353Gln</i>	2	16,4	2,5	1,5	2	0,2	0,2	0,2	25
<i>-323P0/P10</i>	2	16,4	2,5	1,5	2	0,2	0,2	0,2	25
<i>-122T&gt;C</i>	2	16,4	2,5	1,5	2	0,2	0,2	0,2	25
<i>-675 4G/5G</i>	2	16,4	2,5	1,5	2	0,2	0,2	0,2	25
<i>-844G&gt;A</i>	2	16,4	2,5	1,5	2	0,2	0,2	0,2	25
<i>HindIII C&gt;G</i>	2	16,4	2,5	1,5	2	0,2	0,2	0,2	25



**Tabela 6.** Warunki reakcji PCR.

Polimorfizm	Denaturacja wstępna		Denaturacja właściwa		Wiązanie starterów		Synteza		Synteza końcowa		Przechowywanie		Ilość cykli
	<sup>0</sup> C	min	<sup>0</sup> C	min	<sup>0</sup> C	min	<sup>0</sup> C	min	<sup>0</sup> C	min	<sup>0</sup> C	min	
<i>Arg353Gln</i>	95	3	94	0,5	62	0,5	72	0,5	72	10	4	5	30
<i>-323P0/P10</i>	95	4	95	0,5	55	0,5	72	1	72	10	4	5	30
<i>-122T&gt;C</i>	95	4	95	0,5	55	0,5	72	1	72	10	4	5	30
<i>-675 4G/5G</i>	95	4	95	0,5	67	0,5	72	1	72	10	4	5	35
<i>-844G&gt;A</i>	95	4	95	0,5	56	0,5	72	1	72	10	4	5	30
<i>HindIII C&gt;G</i>	95	4	95	0,5	65	0,5	72	1	72	10	4	5	30

*Wszystkie reakcje PCR przeprowadzono używając termocyklera Dyad DNA Engine (BioRad, Stany Zjednoczone)*

**Tabela 7.** Skład mieszaniny do hydrolizy produktu PCR enzymem restrykcyjnym (podano stężenie wyjściowe na 1 próbkę w  $\mu\text{l}$ ).

Polimorfizm	Woda sterylna	Bufor 10x	Enzym restrykcyjny		Produkt PCR	Suma	Czas i temperatura hydrolizy	Inaktywacja enzymu
			Stężenie wyjściowe	Objętość na 1 próbkę				
<i>Arg353Gln</i>	2,5	2,5	20u/ $\mu\text{l}$	1	19	25	37° C-16 godzin	65° C
<i>-323P0/P10</i>	2,5	2,5	10u/ $\mu\text{l}$	1	19	25	37° C-16 godzin	65° C
<i>-122T&gt;C</i>	2,5	2,5	10u/ $\mu\text{l}$	1	19	25	37° C-16 godzin	65° C
<i>-675 4G/5G</i>	2,5	2,5	10u/ $\mu\text{l}$	1	19	25	55° C-16 godzin	80° C
<i>-844G&gt;A</i>	2,5	2,5	10u/ $\mu\text{l}$	1	19	25	37° C-16 godzin	65° C
<i>HindIII C&gt;G</i>	2,5	2,5	10u/ $\mu\text{l}$	1	19	25	37° C-16 godzin	65° C

*Mieszaniny inkubowano w cieplarni (Mammert, Niemcy).*

**Tabela 8.** Wielkości fragmentów po reakcji hydrolizy oraz zastosowane enzymy restrykcyjne.

<b>Polimorfizm</b>	<b>Enzym restrykcyjny (producent)</b>	<b>Rozpoznawana sekwencja</b>	<b>Wielkość produktu PCR</b>	<b>Wielkość fragmentów po hydrolizie</b>
<i>Arg353Gln</i>	<i>MspI</i> (EURx)	C <sup>^</sup> CGG	312 pz	<i>Arg353/Arg353</i> – 206, 67, 39 pz <i>Arg353/Gln353</i> – 273, 206, 67, 39 pz <i>Gln353/Gln353</i> – 273, 39 pz
<b>-323P0/P10</b>	<i>Eco130I</i> (Thermo Scientific)	C <sup>^</sup> CWWGG	-323P0/-323P0 356 pz -323P0/-323P10 366, 356 pz -323P10-323/P10 366 pz	-323P0/-323P0 – 309, 31, 16 pz, -323P0/-323P10 – 309, 249, 70, 31, 16 p -323P10/-323P10 – 249, 70, 31, 16 pz
<b>-122T&gt;C</b>	<i>SduI (Bsp1286I)</i> (Thermo Scientific)	GDGCH <sup>^</sup> C	356 (366) pz	-122TT – 200 (210),156 pz -122TC – 200 (210),156, 90, 66 pz -122CC – 200 (210), 90, 66 pz
<b>-675 4G/5G</b>	<i>BsII</i> (Thermo Scientific)	CCNNNNN <sup>^</sup> NNGG	163 pz	-675 4G 107, 56 pz, -675 5G 74, 56, 34 pz
<b>-844G&gt;A</b>	<i>XhoI</i> (Thermo Scientific)	C <sup>^</sup> TCGAG	510 pz	-844GG – 364, 146 pz, -844GA – 510, 364, 146 pz, -844AA – 510 pz
<b>HindIII C&gt;G</b>	<i>HindIII</i> (Thermo Scientific)	A <sup>^</sup> AGCTT	754 pz	<i>HindIII CC</i> – 566, 188 pz, <i>HindIII CG</i> – 754, 566, 188 pz, <i>HindIII GG</i> – 754 pz

### 3.5. Analiza statystyczna

Uzyskane w prezentowanej rozprawie doktorskiej wyniki dotyczące częstości występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów poddano analizie statystycznej przy zastosowaniu programu statystycznego SPSS 17.0 PL dla Windows. Dane kliniczne kobiet z grupy badanej i kontrolnej oraz otrzymane frekwencje genotypów i alleli poszczególnych polimorfizmów dla wszystkich pacjentek zgromadzone zostały w postaci bazy danych w Edytorze Danych SPSS 12.5 PL.

Na wykonanie pełnej analizy statystycznej pozwoliło wykorzystanie obliczeń opartych na średnich arytmetycznych (suma wszystkich wartości podzielonych przez ich całkowitą liczbę), odchyleniu standardowym ( $\pm SD$  - *standard deviation*, miara rozproszenia wartości indywidualnych wokół średniej próby), medianie (miara tendencji centralnych i obrazu rozkładu zmiennych porządkowych), wskazaniu wartości maksymalnej oraz minimalnej. Porównanie wartości średnich pomiędzy analizowanymi grupami przeprowadzono w oparciu o t-test.

Otrzymane w powyższej rozprawie doktorskiej wyniki dotyczące częstości występowania genotypów i alleli prezentowano z 95% przedziałem ufności (PU, *confidence interval*). Obliczano również współczynnik ryzyka (WR) przy porównywaniu frekwencji genotypów i alleli we wszystkich analizowanych grupach kobiet. Rozkład genotypów porównano testem chi-kwadrat z poprawką Fishera (jednostronny test Fishera). Wartość  $p < 0,05$  przyjęto za statystycznie istotną. Po oznaczeniu wszystkich badanych w pracy wariantów genetycznych oznaczono ich wzajemną korelację przy pomocy Fisher Exact Probability Test.

Analizę genetyczną rozpoczynano od arytmetycznego wyznaczenia procentowej frekwencji występowania poszczególnych genotypów i alleli badanych polimorfizmów, otrzymując wartości obserwowane. W kolejnym etapie wartości obserwowane porównano z wartościami oczekiwanymi, które zostały obliczone na podstawie prawa Hardy-Weinberga. Prawo to opisywane jest niżej przedstawionym równaniem [166].

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Litery „p” i „q” to częstość występowania poszczególnych alleli danego genu ( $p = nA/2N = 2nAA + nAa/2N$ ,  $q = na/2N = 2naa + nAa/2N$ ; „A” i „a” oznaczają allele konkretnego genu).

## 4. WYNIKI

### 4.1. Charakterystyka danych klinicznych analizowanych pacjentek

Do badania włączono 332 pacjentki rasy kaukaskiej, narodowości polskiej, które zostały zakwalifikowane do dwóch grup: 152 kobiety z obciążonym wywiadem w kierunku występowania co najmniej dwóch poronień (grupa badana) oraz 180 kobiet, u których w wywiadzie potwierdzono występowanie co najmniej jednej ciąży o niepowikłanym przebiegu, zakończonej urodzeniem zdrowego, donoszonego noworodka oraz wykluczono występowanie poronień (grupa kontrolna). Szczegółowe dane dotyczące pacjentek oraz kryteriów przyporządkowania do określonych grup przedstawiono w rozdziale 3 rozprawy doktorskiej.

Wiek pacjentek był porównywalny w obydwu grupach. Średnia wieku w grupie badanej wynosiła  $31,48 \pm 4,17$  lat, natomiast w grupie kontrolnej  $30,67 \pm 3,98$  lat,  $p=0,0716$ . Nie zaobserwowano istotnych różnic w wartościach ciśnienia tętniczego pomiędzy pacjentkami z obciążonym wywiadem położniczym a grupą zdrowych kobiet. Średnie skurczowe ciśnienie tętnicze w grupie badanej wynosiło  $108,52 \pm 14,73$  mmHg, natomiast w grupie kontrolnej  $110,86 \pm 11,25$  mmHg,  $p=0,1021$ . Średnie rozkurczowe ciśnienie tętnicze w grupie badanej miało wartość  $68,55 \pm 11,65$  mmHg, a w grupie kontrolnej  $70,25 \pm 9,83$  mmHg,  $p=0,1502$ . Porównywalne były także średnie wartości wzrostu ( $166,26 \pm 5,49$  cm vs.  $166,57 \pm 5,90$  cm,  $p=0,6228$ ), masy ciała ( $62,97 \pm 11,63$  kg vs.  $61,06 \pm 89,36$  kg,  $p=0,0983$ ) oraz wskaźnika BMI ( $22,78 \pm 4,08$  kg/m<sup>2</sup> vs.  $22,00 \pm 3,18$  kg/m<sup>2</sup>,  $p=0,0484$ ) odpowiednio w grupie badanej i kontrolnej (tab. 9).

Wśród pacjentek z grupy z nieobciążonym wywiadem położniczym analizowano ponadto dane dotyczące ostatniej ciąży. 109 kobiet stanowiły pierwsiastki, natomiast 71 pacjentek było wieloródkami. Średni czas trwania ciąży w całej grupie kontrolnej wynosił  $39,08 \pm 1,20$  tygodnia, średnia masa noworodka wynosiła  $3472,18 \pm 411,97$  g, średnia punktacja w skali Apgar w 1 minucie życia -  $9,50 \pm 1,18$ , natomiast w 5 minucie życia -  $9,93 \pm 0,45$ . U 133 kobiet ciąża zakończyła się porodem siłami natury, poród operacyjny (cięcie cesarskie lub wyciągacz próżniowy) dotyczył 47 pacjentek (tab. 9).

**Tabela 9.** Charakterystyka porównawcza kobiet z grupy badanej i kontrolnej.

Dane kliniczne	Grupa badana (n=152)	Grupa kontrolna (n=180)	<i>p</i>
<b>wiek (lata)</b> średnia (odchylenie standardowe) mediana minimum/maksimum	31,48 ± 4,17 31 21-45	30,67 ± 3,98 30 19-42	0,0716
<b>ciśnienie tętnicze skurczowe (mmHg)</b> średnia (odchylenie standardowe) mediana minimum/maksimum	108,52 ± 14,73 110 80-190	110,86 ± 11,25 110 90-150	0,1021
<b>ciśnienie tętnicze rozkurczowe (mmHg)</b> średnia (odchylenie standardowe) mediana minimum/maksimum	68,55 ± 11,65 70 50-120	70,25 ± 9,83 70 50-95	0,1502
<b>Wzrost (cm)</b> średnia (odchylenie standardowe) mediana minimum/maksimum	166,26 ± 5,49 167 150-180	166,57 ± 5,90 166 153-180	0,6228
<b>Masa (kg)</b> średnia (odchylenie standardowe) mediana minimum/maksimum	62,97 ± 11,63 62 43-135	61,06 ± 9,36 60 43-105	0,0983
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b> średnia (odchylenie standardowe) mediana minimum/maksimum	22,78 ± 4,08 22,22 16,26-47,83	22,00 ± 3,18 21,23 16,73 – 38,57	0,0484
<b>ilość poronień w wywiadzie</b> 2 poroniecia 3 i więcej poronień	114 38	–	–
<b>wystąpienie poronienia</b> I trymestr ciąży (<13 tc.) I i II trymestr ciąży (<21 tc.)	123 29	–	–
<b>pierwiastki wieloródki</b>	–	109 71	–
<b>tydzień zakończenia ciąży</b> średnia (odchylenie standardowe) mediana minimum/maksimum	–	39,08 ± 1,20 39 37- 42	–
<b>noworodek – masa (g)</b> średnia (odchylenie standardowe) mediana minimum/maksimum	–	3472,18 ± 411,97 3470 2350-4610	–
<b>Ap 1'</b> średnia (odchylenie standardowe) mediana minimum/maksimum	–	9,50 ± 1,18 10 2-10	–
<b>Ap 5'</b> średnia (odchylenie standardowe) mediana minimum/maksimum	–	9,93 ± 0,45 10 5-10	–
<b>sposób zakończenia ciąży</b> poród samoistny drogami natury poród operacyjny	–	133 47	–

W toku dalszej analizy dwukrotnie dokonano podziału grupy badanej na podgrupy. Pierwszy podział dotyczący ilości poronień wyłonił dwie podgrupy pacjentek: 1). kobiety z dwoma poronieniami w wywiadzie (n = 114) oraz 2). kobiety z trzema i więcej poronieniami w wywiadzie (n = 38). Drugi podział dotyczył natomiast trymestru ciąży, w którym wystąpiło poronienie: a). poronienia w I trymestrze ciąży, poniżej 13 tygodnia ciąży (n = 123) oraz b). kobiety, u których poronienia miały miejsce zarówno w I, jak i w II trymestrze ciąży, poniżej 21 tygodnia ciąży (n = 29) (tab. 10 i 11).

**Tabela 10.** Charakterystyka porównawcza kobiet z podgrupy z dwoma poronieniami oraz z podgrupy z trzema i więcej poronieniami.

Dane kliniczne	Grupa badana				Grupa kontrolna (n=180)
	2 poronienia (n=114)		3 lub więcej poronień (n=38)		
		<i>p</i>		<i>p</i>	
<b>wiek (lata)</b> średnia ± SD mediana minimum/maksimum	31,15 ± 4,16 31 21 - 45	0,3165	32,47 ± 4,08 32 23-41	0,0108	30,67 ± 3,98 30 19-42
<b>ciśnienie tętnicze skurczowe (mmHg)</b> średnia ± SD mediana minimum/maksimum	109,04 ± 15,34 110 80 - 190	0,2426	106,97 ± 12,76 102,5 90-130	0,0600	110,86 ± 11,25 110 90-150
<b>ciśnienie tętnicze rozkurczowe (mmHg)</b> średnia ± SD mediana minimum/maksimum	69,04 ± 12,10 70 50 - 120	0,3485	67,11 ± 10,18 62,5 50-90	0,0768	70,25 ± 9,83 70 50-95
<b>Wzrost (cm)</b> średnia ± SD mediana minimum/maksimum	166,04 ± 5,74 167 150 - 180	0,4488	166,89 ± 4,68 168 158 - 178	0,7539	166,57 ± 5,90 166 153-180
<b>Masa (kg)</b> średnia ± SD mediana minimum/maksimum	62,32 ± 11,94 61 45-135	0,3139	64,95 ± 10,54 64 43 - 88	0,0238	61,06 ± 9,36 60 43-105
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b> średnia ± SD mediana minimum/maksimum	22,60 ± 4,21 21,80 17,72 – 47,83	0,1664	23,31 ± 3,66 23,11 16,26 – 31,57	0,0257	22,00 ± 3,18 21,23 16,73 – 38,57

\*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej

**Tabela 11.** Charakterystyka porównawcza kobiet z podgrupy z występowaniem poronień w I trymestrze oraz z podgrupy z występowaniem poronień w I i II trymestrze ciąży.

Dane kliniczne	Grupa badana				Grupa kontrolna (n=180)
	I trymestr (n=123)		I i II trymestr (n=29)		
		<i>p</i>		<i>p</i>	
<b>wiek (lata)</b> średnia ± SD mediana minimum/maksimum	31,64 ± 4,13 31 21 - 45	0,0411	30,79 ± 4,35 31 22-39	0,8819	30,67 ± 3,98 30 19-42
<b>ciśnienie tętnicze skurczowe (mmHg)</b> średnia ± SD mediana minimum/maksimum	107,93 ± 15,27 105 80-190	0,0555	111,03 ± 12,05 110 90-130	0,9405	110,86 ± 11,25 110 90-150
<b>ciśnienie tętnicze rozkurczowe (mmHg)</b> średnia ± SD mediana minimum/maksimum	68,33 ± 11,82 70 50-120	0,1255	69,48 ± 11,05 70 50-90	0,7009	70,25 ± 9,83 70 50-95
<b>Wzrost (cm)</b> średnia ± SD mediana minimum/maksimum	166,20 ± 5,22 167 154-180	0,5750	166,52 ± 6,60 168 150-177	0,9668	166,57 ± 5,90 166 153-180
<b>Masa (kg)</b> średnia ± SD mediana minimum/maksimum	63,27 ± 12,23 62 43-135	0,0762	61,72 ± 8,73 60 45-80	0,7225	61,06 ± 9,36 60 43-105
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b> średnia ± SD mediana minimum/maksimum	22,90 ± 4,29 22,31 16,26 – 47,83	0,0369	22,27 ± 3,03 21,26 18,03 – 28,69	0,6698	22,00 ± 3,18 21,23 16,73 – 38,57

\*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej

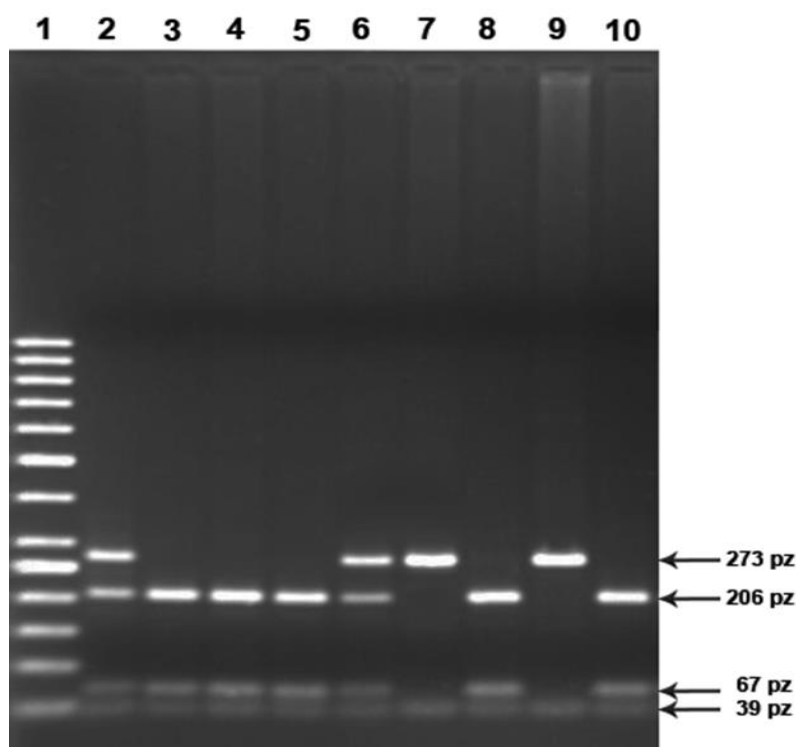


## 4.2. Analiza wyników badań genetycznych

W tej części pracy analizowano częstość występowania badanych wariantów genetycznych genu czynnika VII krzepnięcia i genu *PAI-1* w grupie 152 pacjentek z obciążonym wywiadem w kierunku występowania co najmniej dwóch poronień oraz w grupie kontrolnej 180 zdrowych kobiet.

### 4.2.1. Polimorfizm *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia

Poniższa fotografia przedstawia przykładowy rozkład genotypów polimorfizmu *Arg353Gln* po procesie hydrolizy z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego *MspI*. Wyniki zostały uwidocznione na 2% żelu agarozowym. Dla genotypu homozygotycznego niezmutowanego *Arg353/Arg353* otrzymywano trzy prążki o wielkości 206 pz, 67 pz oraz 39 pz. W przypadku genotypu heterozygotycznego *Arg353/Gln353* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym uwidaczniano wszystkie cztery prążki o wielkości 273 pz, 206 pz, 67 pz oraz 39 pz. Natomiast obecność prążków o wielkości 273 pz oraz 39 pz odczytywano jako obecność zmutowanego genotypu homozygotycznego *Gln353/Gln353* (fot. 1).



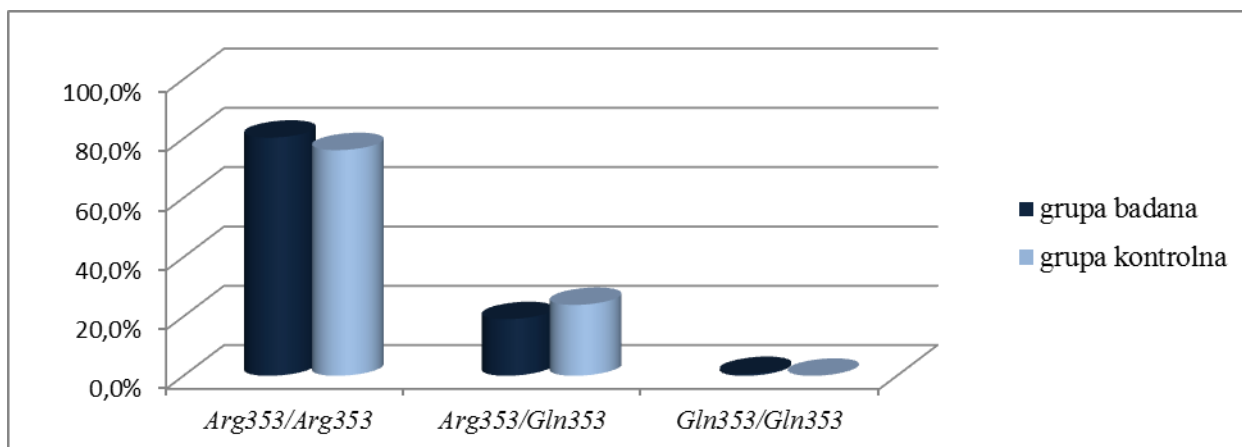
**Fotografia 1.** Analiza genotypów polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *MspI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 3, 4, 5, 8, 10 homozygoty niezmutowane *Arg353/Arg353*, tory 2, 6, heterozygoty *Arg353/Gln353*, tory 7, 9 homozygota zmutowana *Gln353/Gln353*.

W kolejnym etapie pracy porównano częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Arg353Gln* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej. Odnotowano częstsze występowanie niezmutowanego genotypu homozygotycznego *Arg353/Arg353* w grupie kobiet z poronieniami w porównaniu do grupy kontrolnej (80,3% vs. 76,1% w grupie kontrolnej,  $p=0,22$ ). Genotyp heterozygotyczny *Arg353/Gln353* częściej występował w grupie kontrolnej zdrowych kobiet w porównaniu do grupy badanej (23,9% w grupie kontrolnej vs. 19,1%,  $p=0,18$ ). Nie zaobserwowano występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego *Gln353/Gln353* w grupie kontrolnej, natomiast był obecny tylko u jednej z pacjentek z poronieniami w wywiadzie (0,6% vs. 0,0% w grupie kontrolnej,  $p=0,46$ ). Powyższe różnice nie były istotne pod względem statystycznym (tab. 12, ryc. 8). Wartości genotypów obserwowanych były zgodne z wartościami genotypów oczekiwanych obliczanymi na podstawie prawa Hardy'ego – Weinberga.

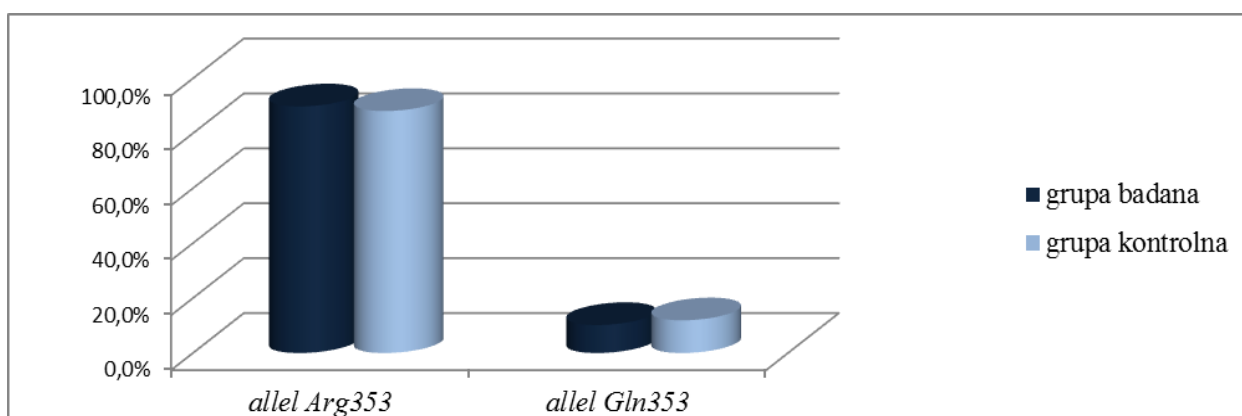
W odniesieniu do alleli polimorfizmu *Arg353Gln* częstość występowania niezmutowanego allela *Arg353* była porównywalna w grupie badanej oraz kontrolnej (89,8% vs. 88,1% w grupie kontrolnej,  $p=0,28$ ). Podobnie nie odnotowano istotnych różnic co do częstości występowania zmutowanego allela *Gln353* (10,2% vs. 11,9% w grupie kontrolnej,  $p=0,28$ ) (tab. 12, ryc. 9).

**Tabela 12.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

<i>Arg353Gln</i>	<i>Grupa badana</i> ( <i>n</i> =152)		<i>Grupa kontrolna</i> ( <i>n</i> =180)		WR	95%PU	<i>p</i>
	wartość obserwowana <i>n</i> (%)	wartość oczekiwana (%)	wartość obserwowana <i>n</i> (%)	wartość oczekiwana (%)			
<i>Arg353/Arg353</i>	122 (80,3)	80,7	137 (76,1)	77,5	1,28	0,75-2,16	0,22
<i>Arg353/Gln353</i>	29 (19,1)	18,3	43 (23,9)	21,1	0,75	0,44-1,28	0,18
<i>Gln353/Gln353</i>	1 (0,6)	1,0	0 (0,0)	1,4	—	—	0,46
<i>Suma</i>	152 (100,0)	100	180 (100,0)	100			
<i>Allele</i>							
<i>Arg353</i>	273 (89,8)	—	317 (88,1)	—	1,19	0,73-1,95	0,28
<i>Gln353</i>	31 (10,2)	—	43 (11,9)	—	0,84	0,51-1,37	0,28
<i>Suma</i>	304 (100,0)	—	360 (100,0)	—			



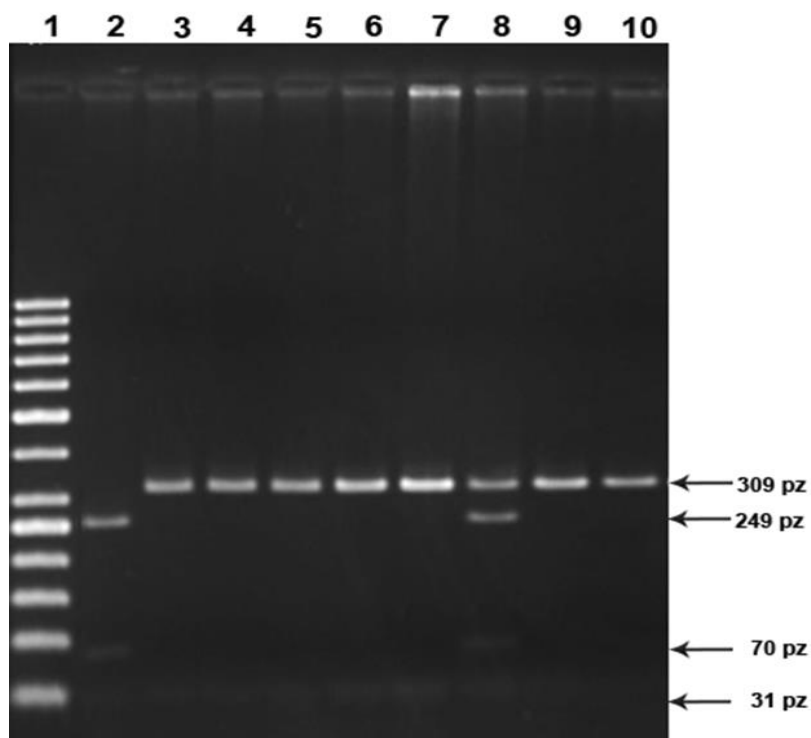
**Rycina 8.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia w grupie badanej i kontrolnej.



**Rycina 9.** Częstość występowania alleli polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia w grupie badanej i kontrolnej.

#### 4.2.2. Polimorfizm -323P0/P10 genu czynnika VII krzepnięcia

Na zamieszczonej poniżej fotografii zaprezentowano przykładowy rozkład genotypów polimorfizmu -323P0/P10 po trawieniu enzymem restrykcyjnym *Eco130I*. Obecność prążków o wielkości 309, 31 oraz 16 pz odczytywano jako obecność niezmutowanego genotypu homozygotycznego -323P0/-323P0. W przypadku genotypu heterozygotycznego -323P0/-323P10 uwidaczniano pięć prążków o wielkości 309, 249, 70, 31, 16 pz, natomiast zmutowanemu genotypowi homozygotycznemu -323P10/-323P10 odpowiadała obecność prążków o wielkości 249, 70, 31, 16 pz (fot. 2).



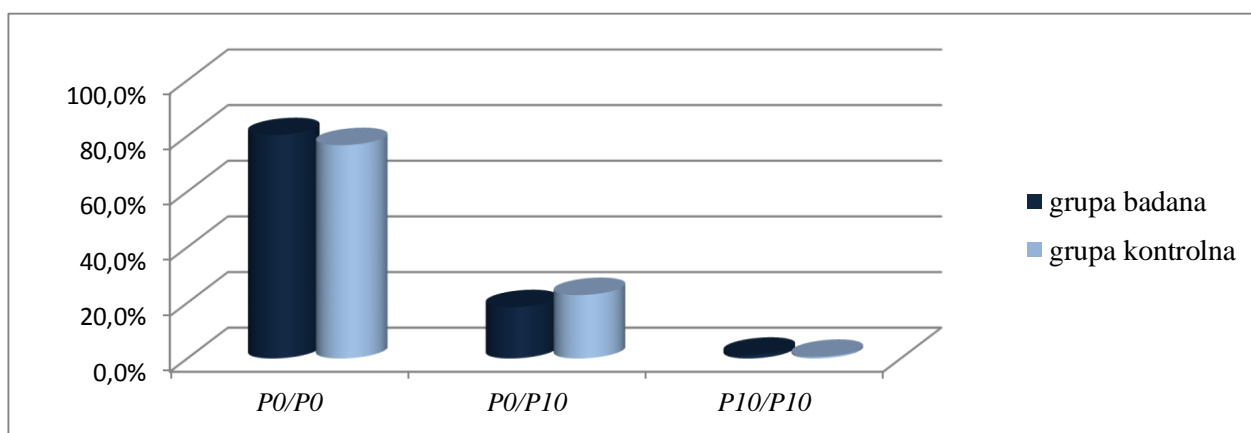
**Fotografia 2.** Analiza genotypów polimorfizmu  $-323P0/P10$  genu czynnika VII po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Eco130I*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 homozygoty niezmutowane  $-323P0/-323P0$ , tor 8 heterozygota  $-323P0/-323P10$ , tor 2 homozygota zmutowana  $-323P10/-323P10$ .

Następnie porównano częstość występowania genotypów i alleli powyższego wariantu genetycznego w grupie badanej kobiet z występowaniem poronień oraz w grupie kontrolnej. Odnotowano częstsze występowanie niezmutowanego genotypu homozygotycznego  $-323P0/-323P0$  w grupie badanej (80,26% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,25$ ). Genotyp heterozygotyczny  $-323P0/-323P10$  obserwowany był nieco częściej w grupie kobiet z nieobciążonym w wywiadem położniczym w porównaniu do grupy badanej (22,78% w grupie kontrolnej vs. 18,42%,  $p=0,20$ ). Zmutowany genotyp homozygotyczny  $-323P10/-323P10$  był obecny tylko u 2 kobiet spośród pacjentek z występowaniem poronień oraz u 1 kobiety z grupy kontrolnej (1,32% vs. 0,55% w grupie kontrolnej,  $p=0,44$ ). Wartości genotypów obserwowanych były zgodne z wartościami genotypów oczekiwanych obliczanymi na podstawie prawa Hardy'ego – Weinberga (tab. 13, ryc. 10).

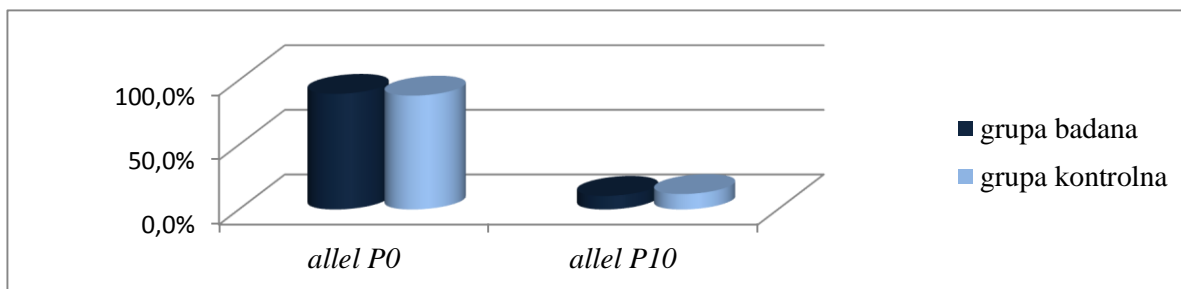
Również analiza częstości występowania alleli nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami. Częstość niezmutowanego allela  $-323P0$  była porównywalna w grupie kobiet z obciążonym wywiadem położniczym oraz w grupie kontrolnej (89,47% vs. 88,06% w grupie kontrolnej,  $p=0,33$ ). Podobną sytuację odnotowano dla zmutowanego allela  $-323P10$  (10,53% vs. 11,94% w grupie kontrolnej,  $p=0,33$ ) (tab. 13, ryc. 11).

**Tabela 13.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -323P0/P10 genu czynnika VII krzepnięcia w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

-323P0/10  Genotypy	Grupa badana (n=152)		Grupa kontrolna (n=180)		WR	95%PU	p
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)			
<b>P0/P0</b>	122 (80,26)	80,05	138 (76,67 )	77,54	1,24	0,73-2,10	0,25
<b>P0/P10</b>	28 (18,42)	18,84	41 ( 22,78)	21,03	0,77	0,45-1,31	0,20
<b>P10/P10</b>	2 (1,32)	1,11	1 ( 0,55)	1,43	2,39	0,21-26,58	0,44
<b>Suma</b>	152 (100,00)	100	180 ( 100,00)	100			
<b>Allele</b>							
<b>P0</b>	272 (89,47)	—	317 (88,06)	—	1,15	0,71-1,87	0,33
<b>P10</b>	32 (10,53)	—	43 (11,94)	—	0,87	0,53-1,41	0,33
<b>Suma</b>	304 (100,0)	—	360 (100,0)	—			



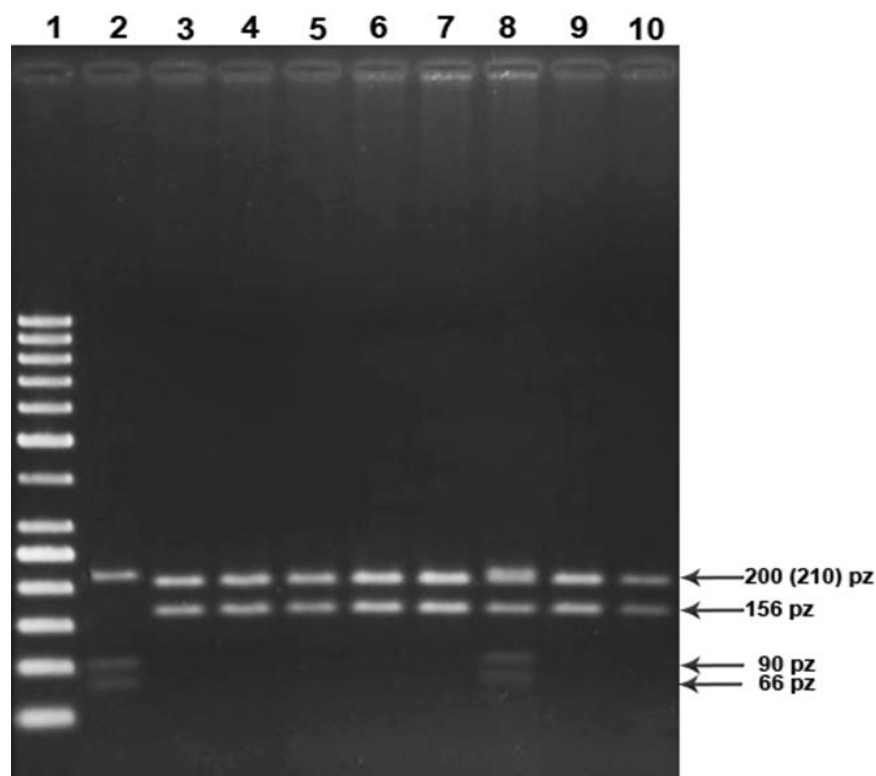
**Rycina 10.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu -323P0/P10 genu czynnika VII krzepnięcia w grupie badanej i kontrolnej.



**Rycina 11.** Częstość występowania alleli polimorfizmu  $-323P0/P10$  genu czynnika VII krzepnięcia w grupie badanej i kontrolnej.

#### 4.2.3. Polimorfizm $-122T>C$ genu czynnika VII krzepnięcia

Poniższa fotografia prezentuje przykładowy rozkład genotypów polimorfizmu  $-122T>C$  genu czynnika VII krzepnięcia na 2% żelu agarozowym po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *SduI*. Dla genotypu homozygotycznego typu dzikiego  $-122TT$  otrzymywano prążki o wielkości 200 (210),156 pz, dla genotypu heterozygotycznego  $-122TC$  - 200 (210),156, 90, 66 pz. Natomiast dla zmutowanego genotypu homozygotycznego  $-122CC$  charakterystyczna była obecność prążków 200 (210), 90, 66 pz (fot. 3).



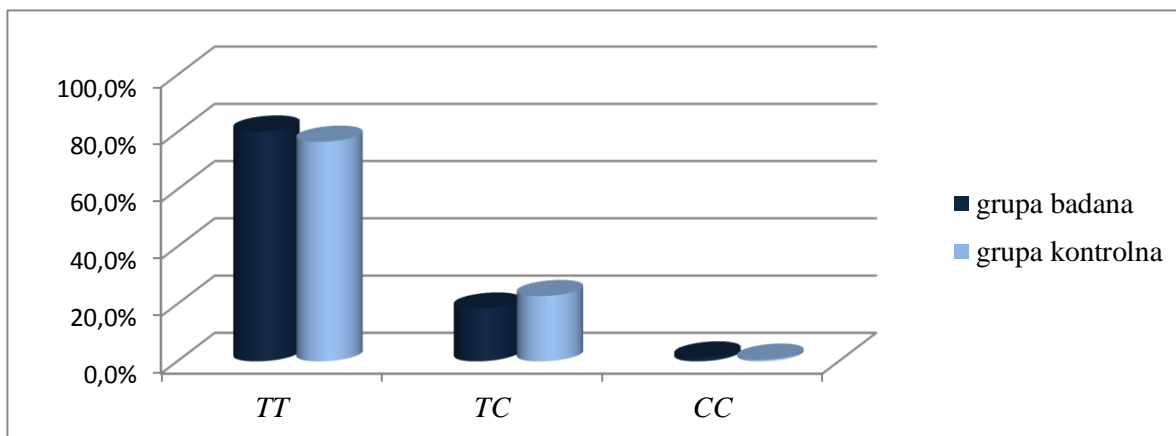
**Fotografia 3.** Analiza genotypów polimorfizmu  $-122T>C$  genu czynnika VII po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *SduI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 homozygoty niezmutowane  $-122TT$ , tor 8 heterozygota  $-122TC$ , tor 2 homozygota zmutowana  $-122CC$ .

W trakcie analizy częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu  $-122T>C$  odnotowano wyższą częstość występowania niezmutowanego genotypu homozygotycznego  $-122TT$  w grupie kobiet z występowaniem poronień w porównaniu do grupy kontrolnej (80,26% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,25$ ). Odwrotną sytuację zaobserwowano w przypadku genotypu heterozygotycznego  $-122TC$ , który częściej występował w grupie kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (18,42% vs. 22,78% w grupie kontrolnej,  $p=0,20$ ). Zmutowany genotyp homozygotyczny  $-122CC$  występował tylko u 2 kobiet z grupy badanej oraz 1 z grupy kontrolnej (1,32% vs. 0,55% w grupie kontrolnej,  $p=0,44$ ) (tab. 14, ryc. 12).

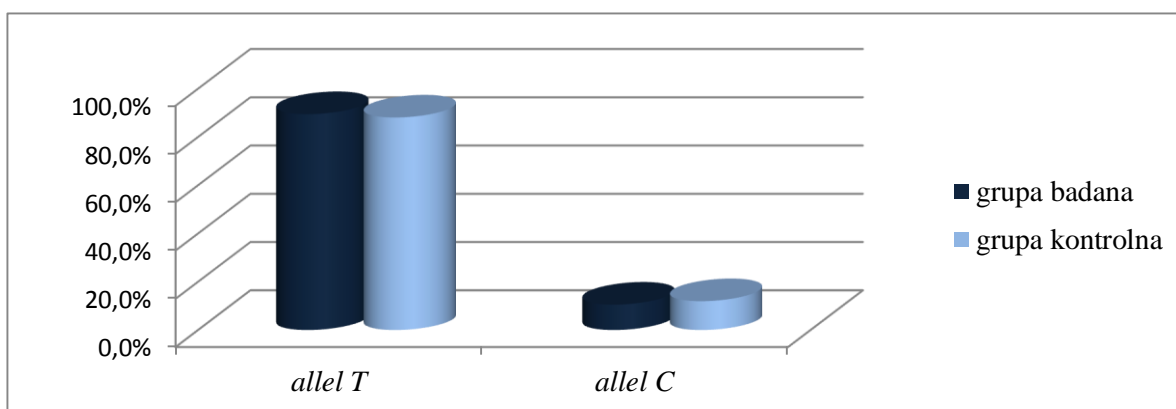
Częstość występowania alleli powyższego polimorfizmu była porównywalna w obydwu analizowanych grupach kobiet (allel dziki  $-122T$ : 89,47% vs. 88,06% w grupie kontrolnej,  $p=0,33$ ; allel zmutowany  $-122C$ : 10,53% vs. 11,94% w grupie kontrolnej,  $p=0,33$ ) (tab. 14, ryc. 13).

**Tabela 14.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu  $-122T>C$  genu czynnika VII krzepnięcia w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

$-122T>C$	<i>Grupa badana</i> ( <i>n=152</i> )		<i>Grupa kontrolna</i> ( <i>n=180</i> )		<i>WR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> (%)	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> (%)			
<i>TT</i>	122 (80,26)	80,05	138 (76,67)	77,54	1,24	0,73-2,10	0,25
<i>TC</i>	28 (18,42)	18,84	41 (22,78)	21,03	0,77	0,45-1,31	0,20
<i>CC</i>	2 (1,32)	1,11	1 (0,55)	1,43	2,39	0,21-26,58	0,44
<i>Suma</i>	152 (100,00)	100	180 (100,00)	100			
<i>Allele</i>							
<i>T</i>	272 (89,47)	—	317 (88,06)	—	1,15	0,71-1,87	0,33
<i>C</i>	32 (10,53)	—	43 (11,94)	—	0,87	0,53-1,41	0,33
<i>Suma</i>	304 (100,0)	—	360 (100,0)	—			



**Rycina 12.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu  $-122T>C$  genu czynnika VII krzepnięcia w grupie badanej i kontrolnej.

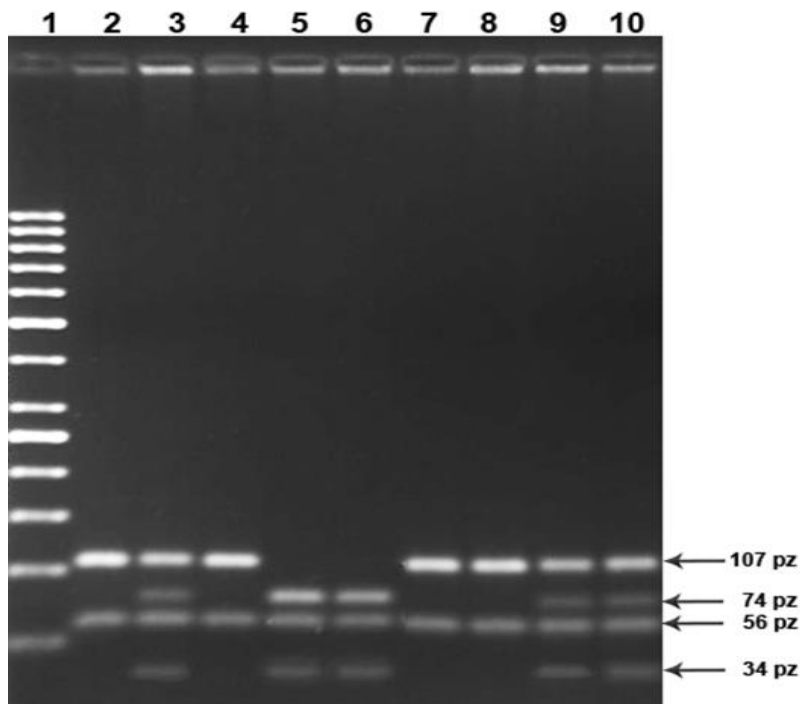


**Rycina 13.** Częstość występowania alleli polimorfizmu  $-122T>C$  genu czynnika VII krzepnięcia w grupie badanej i kontrolnej.

#### 4.2.4. Polimorfizm $-675 4G/5G$ genu *PAI-1*

Poniższa fotografia prezentuje przykładowy rozkład na 2,5% żelu agarozowym alleli polimorfizmu  $-675 4G/5G$  genu *PAI-1* po hydrolizie restrykcyjnej przeprowadzonej z zastosowaniem enzymu *BsII*. Dla allela  $-675 4G$  uzyskiwano prążki o wielkości 107 pz oraz 56 pz. Natomiast w przypadku allela  $-675 5G$  – 74 pz, 56 pz i 34 pz (fot. 4).





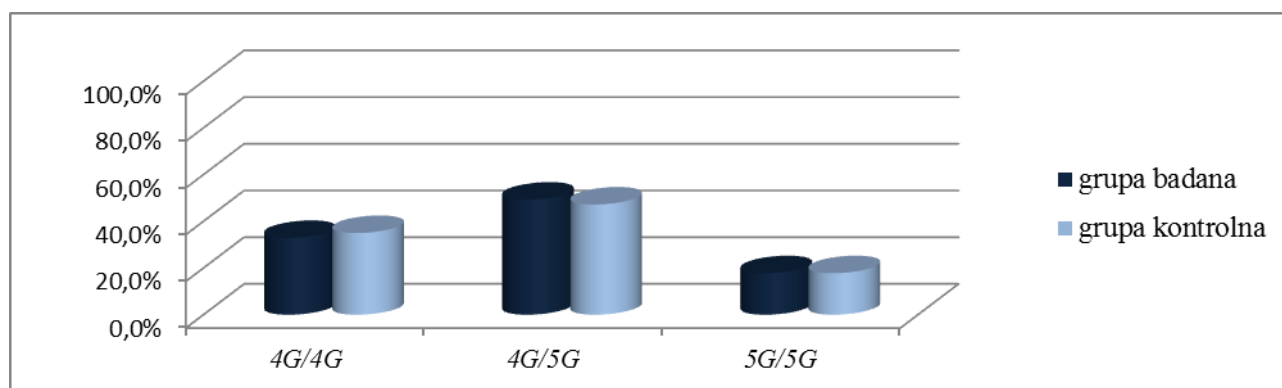
**Fotografia 4.** Analiza genotypów polimorfizmu  $-6754G/5G$  genu *PAI-1* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Bs**NI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 5, 6 homozygoty niezmutowane  $-675 4G/-675 4G$ , tory 3, 9, 10 heterozygoty  $-675 4G/-675 5G$ , tory 2, 4, 7, 8 homozygota zmutowana  $-675 5G/-675 5G$ .

Następnie analizowano rozkład genotypów i alleli powyższego polimorfizmu w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym. W grupie kontrolnej oraz badanej odnotowano porównywalną częstość występowania niezmutowanego genotypu homozygotycznego  $-675 4G/-675 4G$  (35,0% w grupie kontrolnej vs. 32,9%,  $p=0,39$ ). Podobną sytuację obserwowano dla genotypu heterozygotycznego  $-675 4G/-675 5G$  (49,3% vs. 47,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,39$ ). Częstość występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego  $-675 5G/-675 5G$  była taka sama w obydwu analizowanych grupach (17,8% vs. 17,8%,  $p=0,56$ ) (tab. 15, ryc.14). Wartości genotypów obserwowanych były zgodne z wartościami genotypów oczekiwanych obliczanymi na podstawie prawa Hardy'ego – Weinberga (grupa badana  $\chi^2=0,01$ ,  $p=0,90$ , grupa kontrolna  $\chi^2=0,13$ ,  $p=0,72$ ).

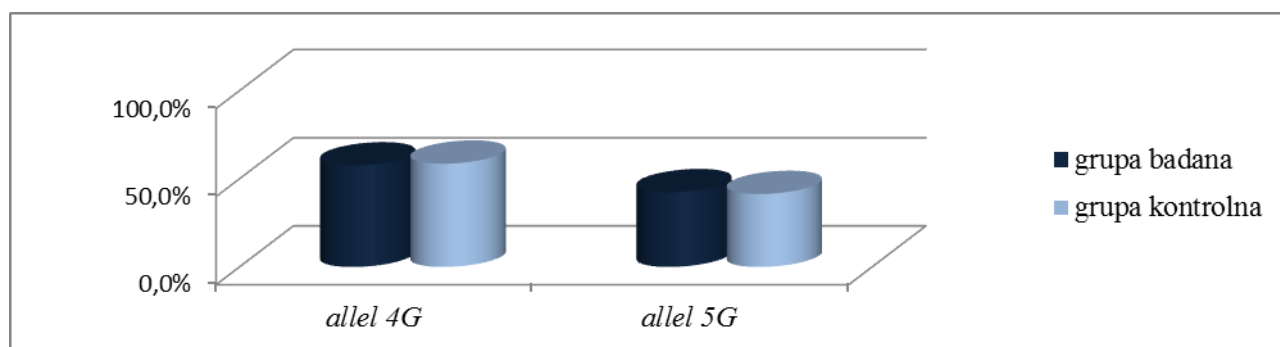
Porównanie częstości alleli polimorfizmu  $-675 4G/5G$  również nie wykazało istotnych różnic. Częstość występowania allela  $-675 4G$  w grupie badanej wynosiła 57,6%, natomiast w grupie kontrolnej 58,6% ( $p=0,42$ ). W przypadku allela  $-675 5G$  częstość ta wynosiła odpowiednio w grupie badanej 42,4% i w grupie kontrolnej 41,4% ( $p=0,42$ ) (tab. 15, ryc. 15).

**Tabela 15.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -675 4G/5G genu *PAI-1* w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

-675 4G/5G  Genotypy	Grupa badana (n=152)		Grupa kontrolna (n=180)		WR	95%PU	p
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)			
4G/4G	50 (32,9)	33,1	63 (35,0)	34,4	0,91	0,58-1,44	0,39
4G/5G	75 (49,3)	48,9	85 (47,2)	48,5	1,09	0,71-1,68	0,39
5G/5G	27 (17,8)	18,0	32 (17,8)	17,1	0,99	0,57-1,76	0,56
Suma	152 (100,0)	100	180 (100,0)	100			
Allele							
4G	175 (57,6)	—	211 (58,6)	—	0,96	0,70-1,31	0,42
5G	129 (42,4)	—	149 (41,4)	—	1,04	0,77-1,42	0,42
Suma	304 (100,0)	—	360 (100,0)	—			



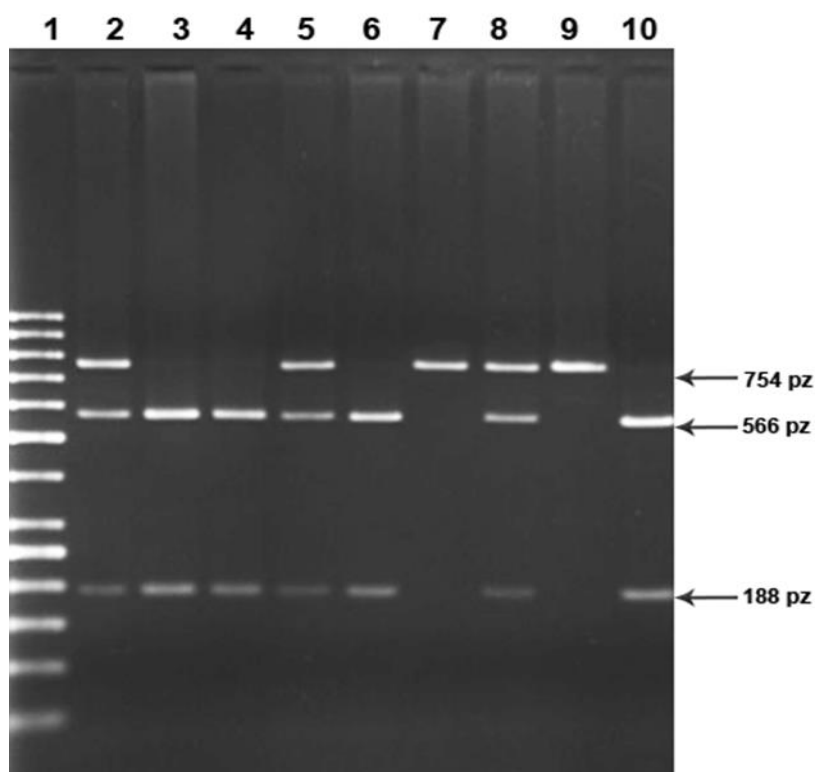
**Rycina 14.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu -675 4G/5G genu *PAI-1* w grupie badanej oraz kontrolnej.



**Rycina 15.** Częstość występowania alleli polimorfizmu -675 4G/5G genu *PAI-1* w grupie badanej oraz kontrolnej.

#### 4.2.5. Polimorfizm *HindIII* C>G genu *PAI-1*

Na fotografii 3 zaprezentowano rozkład genotypów polimorfizmu *HindIII* C>G genu *PAI-1* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *HindIII*. Dla niezmutowanego homozygotycznego genotypu *HindIII* CC uzyskiwano dwa prążki o wielkości 566 pz oraz 188 pz. W przypadku genotypu heterozygotycznego *HindIII* CG po hydrolizie enzymem restrykcyjnym uwidaczniano wszystkie trzy prążki o wielkości 754 pz, 566 pz i 188 pz. Natomiast dla zmutowanego genotypu homozygotycznego *HindIII* GG otrzymywano jeden prążek o wielkości 754 pz (fot. 5).



**Fotografia. 5.** Analiza genotypów polimorfizmu *HindIII* genu *PAI-1* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *HindIII*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 3, 4, 6, 10 homozygoty niezmutowane *HindIII* CC, tory 2, 5, 8 heterozygoty *HindIII* CG, tory 7, 9 homozygota zmutowana *HindIII* GG.

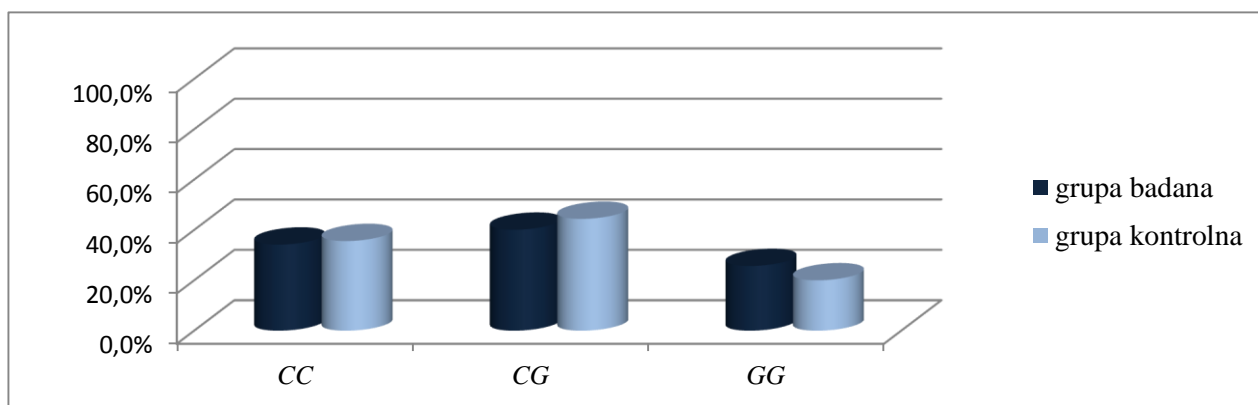
W kolejnym etapie pracy analizowano częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *HindIII* C>G genu *PAI-1* w grupie kobiet z występowaniem co najmniej dwóch poronień oraz w grupie kontrolnej kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym. Częstość występowania niezmutowanego homozygotycznego genotypu *HindIII* CC była porównywalna w obydwu grupach kobiet (34,2% w grupie badanej vs. 35,6% w grupie kontrolnej,  $p=0,44$ ). Odnotowano nieznacznie częstsze występowanie genotypu heterozygotycznego *HindIII* CG w grupie kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym w

porównaniu do grupy kobiet z występowaniem poronień (44,4% w grupie kontrolnej vs. 40,1%,  $p=0,25$ ). Jednak nie była to różnica istotna pod względem statystycznym. Odwrotną zależność odnotowano w przypadku zmutowanego genotypu homozygotycznego *HindIII GG*. Częstość jego występowania była wyższa w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej (25,7% vs. 20,0% w grupie kontrolnej,  $p=0,14$ ) (tab. 16, ryc. 16). W grupie kontrolnej nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy wartościami obserwowanymi i oczekiwanymi, co oznacza zgodność z równowagą Hardy'ego – Weinberga w obrębie badanego polimorfizmu ( $\chi^2=1,43$ ,  $p=0,23$ ), natomiast w grupie kobiet z poronieniami stwierdzono brak równowagi ( $\chi^2=5,57$ ,  $p=0,02$ ).

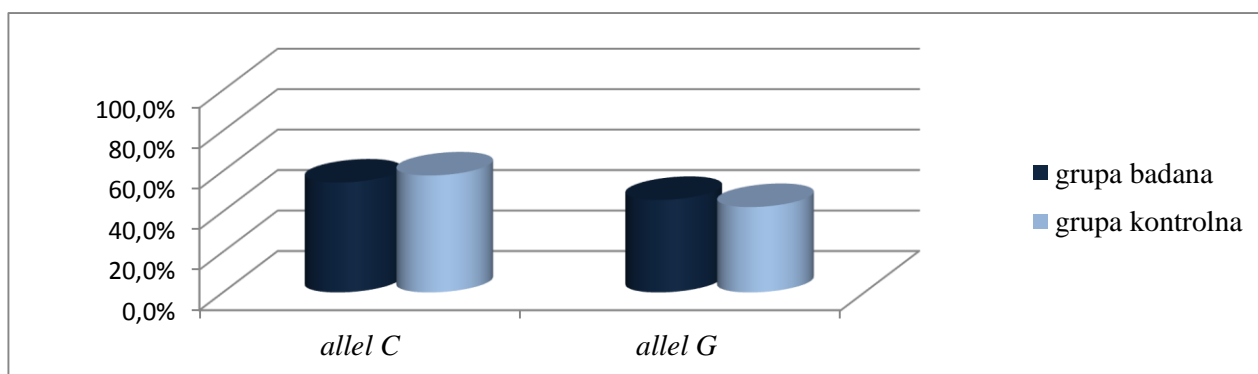
W odniesieniu do alleli polimorfizmu *HindIII C>G* zaobserwowano częstsze występowanie niezmutowanego allela *HindIII C* w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy kobiet z obciążonym wywiadem położniczym w kierunku występowania co najmniej dwóch poronień (57,8% w grupie kontrolnej vs. 54,3%,  $p=0,20$ ). Odwrotną relację zaobserwowano w przypadku zmutowanego allela *HindIII G*. Częstość jego występowania była wyższa w grupie badanej w porównaniu do grupy kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (45,7% vs. 42,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,20$ ). Obserwowane zależności nie były istotne pod względem statystycznym. (tab. 16, ryc. 17).

**Tabela 16.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *HindIII C>G* genu *PAI-1* w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

<i>HindIII</i> <i>C&gt;G</i>	<i>Grupa badana</i> ( <i>n=152</i> )		<i>Grupa kontrolna</i> ( <i>n=180</i> )		<b>WR</b>	<b>95%PU</b>	<b><i>p</i></b>
	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>			
<b><i>CC</i></b>	52 (34,2)	29,5	64 (35,6)	33,4	0,94	0,59-1,48	0,44
<b><i>CG</i></b>	61 (40,1)	49,6	80 (44,4)	48,8	0,84	0,54-1,30	0,25
<b><i>GG</i></b>	39 (25,7)	20,9	36 (20,0)	17,8	1,38	0,82-2,31	0,14
<b><i>Suma</i></b>	152 (100,0)	100	180 (100,0)	100			
<b><i>Allele</i></b>							
<b><i>C</i></b>	165 (54,3)	—	208 (57,8)	—	0,87	0,64-1,18	0,20
<b><i>G</i></b>	139 (45,7)	—	152 (42,2)	—	1,15	0,85-1,57	0,20
<b><i>Suma</i></b>	304 (100,0)	—	360 (100,0)	—			



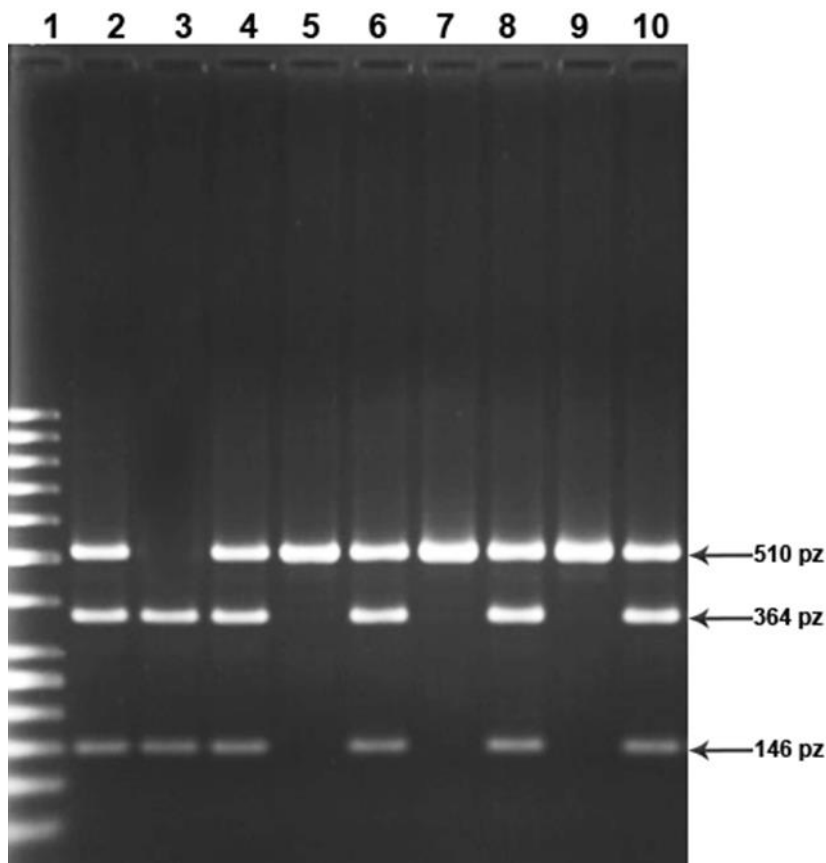
**Rycina 16.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu *HindIII C>G* genu *PAI-1* w grupie badanej i kontrolnej.



**Rycina 17.** Częstość występowania alleli polimorfizmu *HindIII C>G* genu *PAI-1* w grupie badanej i kontrolnej.

#### 4.2.6. Polimorfizm -844G>A genu *PAI-1*

Zamieszczona poniżej fotografia przedstawia rozkład genotypów polimorfizmu -844G>A genu *PAI-1* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *XhoI*. Dla niezmutowanego genotypu homozygotycznego -844GG uwidaczniano prążki o wielkości 364 pz oraz 146 pz. Dla heterozygotycznego genotypu -844GA po hydrolizie restrykcyjnej otrzymywano wszystkie trzy prążki o wielkości 510 pz, 364 pz oraz 146 pz. Obecność prążków o wielkości 510 pz odczytywano jako zmutowany genotyp homozygotyczny -844AA.



**Fotografia. 6.** Analiza genotypów polimorfizmu  $-844G>A$  genu *PAI-1* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *XhoI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tor 3 homozygota niezmutowana  $-844GG$ , tory 2, 4, 6, 8 heterozygoty  $-844GA$ , tory 5, 7, 9 homozygoty zmutowane  $-844GG$ .

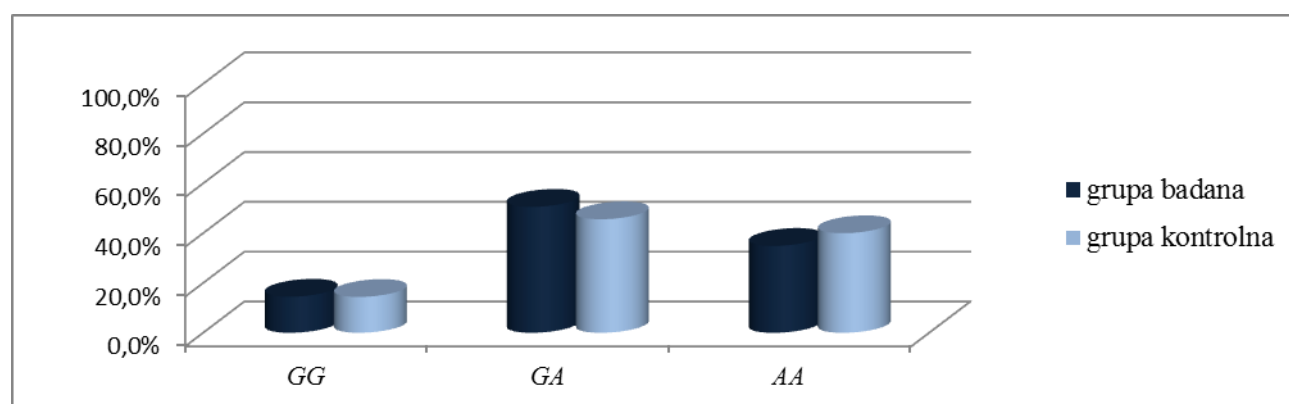
W toku dalszej analizy porównano częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu  $-844G>A$  genu *PAI-1* w grupie badanej oraz kontrolnej. Zaobserwowano bardzo zbliżoną częstość występowania niezmutowanego genotypu homozygotycznego  $-844GG$  w obydwu grupach kobiet (14,5% w grupie badanej vs. 14,4% w grupie kontrolnej,  $p=0,56$ ). Odnotowano nieznacznie tylko częstsze występowanie genotypu heterozygotycznego  $-844GA$  wśród kobiet z obciążonym wywiadem położniczym w porównaniu do grupy kontrolnej (50,6% vs. 45,6% w grupie kontrolnej,  $p=0,21$ ). Odwrotną zależność zaobserwowano w odniesieniu do zmutowanego genotypu homozygotycznego  $-844AA$ . Częstość jego występowania była nieco wyższa wśród kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym w porównaniu do grupy kobiet z występowaniem co najmniej dwóch poronień (40,0% w grupie kontrolnej vs. 34,9%,  $p=0,20$ ). Różnice te nie były statystycznie istotne (tab. 17, ryc. 18). Porównanie wartości obserwowanych z oczekiwanymi wykazało, że rozkład genotypów w badanym polimorfizmie  $-844G>A$  spełnia założenia równowagi

Hardy`ego- Weinberga ( $\chi^2=0,50$ ,  $p=0,48$  w grupie badanej i  $\chi^2=0,11$ ,  $p=0,73$  w grupie kontrolnej).

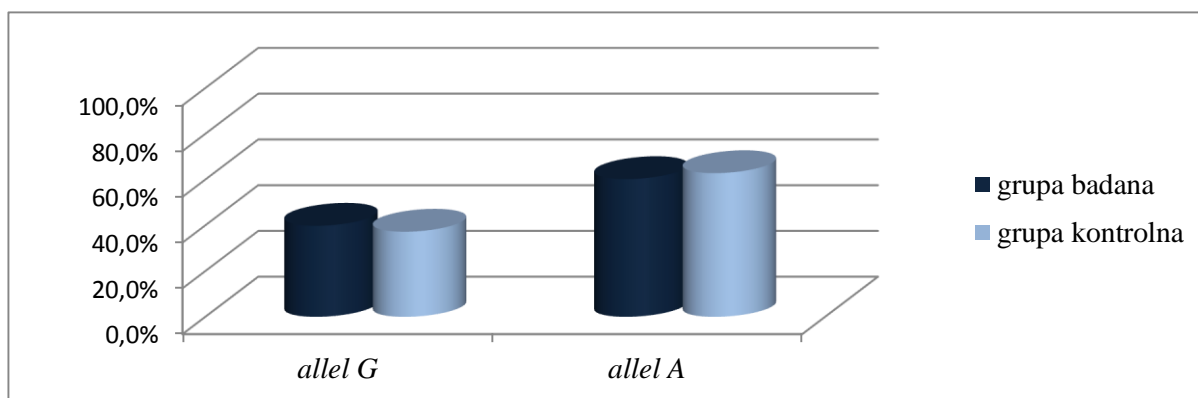
Również w przypadku analizy częstości występowania alleli polimorfizmu  $-844G>A$  genu *PAI-1* nie odnotowano istotnych różnic. Częstość występowania niezmutowanego allela  $-844G$  była podobna w obydwu grupach kobiet (39,8%, vs. 37,2%,  $p=0,27$ ). Także zmutowany allel  $-844A$  występował z podobną częstością w grupie kobiet z obciążonym wywiadem położniczym oraz w grupie kontrolnej (60,2% vs. 62,8% w grupie kontrolnej,  $p=0,27$ ) (tab. 17, ryc. 19).

**Tabela 17.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu  $-844G>A$  genu *PAI-1* w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

<b>-844G&gt;A</b>	<b>Grupa badana (n=152)</b>		<b>Grupa kontrolna (n=180)</b>		<b>WR</b>	<b>95%PU</b>	<b>p</b>
	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>			
<b>GG</b>	22 (14,5)	15,8	26 (14,4)	13,9	1,00	0,54-1,85	0,56
<b>GA</b>	77 (50,6)	47,9	82 (45,6)	46,7	1,23	0,80-1,89	0,21
<b>AA</b>	53 (34,9)	36,3	72 (40,0)	39,4	0,80	0,51-1,26	0,20
<b>Suma</b>	153 (100,0)	100	180 (100,0)	100			
<b>Allele</b>							
<b>G</b>	121 (39,8)	—	134 (37,2)	—	1,12	0,81-1,53	0,27
<b>A</b>	183 (60,2)	—	226 (62,8)	—	0,89	0,65-1,23	0,27
<b>Suma</b>	304 (100,0)	—	360 (100,0)	—			



**Rycina 18.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu  $-844G>A$  genu *PAI-1* w grupie badanej i kontrolnej.



**Rycina 19.** Częstość występowania alleli polimorfizmu  $-844G>A$  genu *PAI-1* w grupie badanej i kontrolnej.

### 4.3. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów w podgrupach kobiet z dwoma oraz z trzema i więcej poronieniami

W tej części pracy grupę badaną 152 kobiet podzielono na dwie podgrupy w zależności od ilości poronień w wywiadzie. W pierwszej podgrupie znalazło się 114 pacjentek z dwoma poronieniami w wywiadzie, natomiast w drugiej – 38 kobiet z co najmniej trzema poronieniami w wywiadzie. Oceniono częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów w poszczególnych podgrupach.

#### 4.3.1. Polimorfizm *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia

Częstość występowania genotypu homozygotycznego typu dzikiego *Arg353/Arg353* była nieco wyższa w podgrupie kobiet z dwoma poronieniami niż w grupie kontrolnej (78,0% vs. 76,1% w grupie kontrolnej,  $p=0,40$ ). Częstość występowania genotypu heterozygotycznego *Arg353/Gln353* była nieznacznie niższa w podgrupie z dwoma poronieniami niż w grupie kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (21,1% vs. 23,9% w grupie kontrolnej,  $p=0,34$ ). Zmutowany genotyp homozygotyczny *Gln353/Gln353* odnotowano tylko u jednej pacjentki w podgrupie kobiet z dwoma poronieniami w wywiadzie, natomiast u żadnej z kobiet należących do grupy kontrolnej (0,9% vs. 0,0% w grupie kontrolnej,  $p=0,39$ ). Podobnie w przypadku częstości występowania alleli nie występowały statystycznie istotne różnice w podgrupie kobiet z dwoma poronieniami oraz w grupie kontrolnej (allel *Arg353*: 88,6% vs. 88,1% w grupie kontrolnej,  $p=0,48$ ; zmutowany allel *Gln353*: 11,4% vs. 11,9% w grupie kontrolnej,  $p=0,48$ ) (tab. 18).



W podgrupie kobiet z występowaniem trzech i więcej poronień w wywiadzie częstość występowania niezmutowanego genotypu homozygotycznego *Arg353/Arg353* była wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej (86,8% vs. 76,1% w grupie kontrolnej,  $p=0,10$ ). Natomiast genotyp heterozygotyczny *Arg353/Gln353* występował częściej w grupie kontrolnej (23,9% w grupie kontrolnej vs. 13,2%,  $p=0,10$ ). Obserwowane różnice nie były istotne pod względem statystycznym. Wśród kobiet z występowaniem co najmniej 3 poronień w wywiadzie nie odnotowano występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego *Gln353/Gln353*, podobnie jak w grupie kontrolnej. Częstość występowania allele *Arg353* była wyższa w podgrupie z trzema i więcej poronieniami w porównaniu do grupy kontrolnej (93,4% vs. 88,1% w grupie kontrolnej,  $p=0,12$ ). Odwrotną sytuację zaobserwowano w stosunku do zmutowanego allele *Gln353*, który występował częściej w grupie kontrolnej (11,9% vs. 6,6% w podgrupie kobiet z  $\geq 3$  poronieniami,  $p=0,12$ ) (tab. 18).

**Tabela 18.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia w podgrupach kobiet z dwoma oraz trzema i więcej poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

<i>Arg353Gln</i>	<i>Grupa badana</i> ( <i>n</i> =152)								<i>Grupa kontrolna</i> ( <i>n</i> =180)	
	<i>2 poronienia</i> ( <i>n</i> =114)				<i>3 lub więcej poronień</i> ( <i>n</i> =38)					
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>
<i>Arg353/Arg353</i>	89 (78,0)	78,5	1,12	0,40	33 (86,8)	87,2	2,07	0,10	137 (76,1)	77,5
<i>Agr353/Gln353</i>	24 (21,1)	20,2	0,85	0,34	5 (13,2)	12,3	0,48	0,10	43 (23,9)	21,1
<i>Gln353/Gln353</i>	1 (0,9)	1,3	—	0,39	0 (0,00)	0,5	—	1	0 (0,0)	1,4
<i>Suma</i>	114 (100,0)	100			38 (100,0)	100,0			180 (100,0)	100
<i>Allele</i>										
<i>Arg353</i>	202 (88,6)	-	1,05	0,48	71 (93,4)	-	1,93	0,12	317 (88,1)	—
<i>Gln353</i>	26 (11,4)	-	0,95	0,48	5 (6,6)	-	0,52	0,12	43 (11,9)	—
<i>Suma</i>	228 (100,0)	-			76 (100,0)	-			360 (100,0)	—

\*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej

#### 4.3.2. Polimorfizm -323P0/P10 genu czynnika VII krzepnięcia

Częstość występowania genotypów polimorfizmu -323P0/P10 genu czynnika VII krzepnięcia była porównywalna w podgrupie pacjentek z występowaniem dwóch poronień w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (niezmutowany genotyp homozygotyczny -323P0/-323P0: 78,07% vs. 76,67%,  $p=0,45$ ; genotyp heterozygotyczny -323P0/-323P10: 20,18% vs. 22,78%,  $p=0,35$ ; zmutowany genotyp homozygotyczny -323P10/-323P10: 1,75% vs. 0,55%,  $p=0,33$ ). Podobnie częstość występowania alleli omawianego wariantu genetycznego była zbliżona w podgrupie kobiet z dwoma poronieniami oraz w grupie kontrolnej (niezmutowany allel -323P0: 88,16% vs. 88,06%,  $p=0,54$ ; zmutowany allel -323P10: 11,84% vs. 11,94%,  $p=0,54$ ) (tab. 19).

W przypadku analizy podgrupy pacjentek z wywiadem położniczym obciążonym co najmniej trzema poronieniami odnotowano wyższą częstość występowania niezmutowanego genotypu homozygotycznego -323P0/-323P0 w porównaniu do grupy kontrolnej (86,84% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,12$ ). Odwrotną zależność zaobserwowano w przypadku genotypu heterozygotycznego -323P0/-323P10, który występował częściej w grupie kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (22,78% w grupie kontrolnej vs. 13,16%,  $p=0,13$ ). Zmutowany genotyp homozygotyczny -323P10/-323P10 nie występował u żadnej z pacjentek z podgrupy z co najmniej trzema poronieniami i tylko u jednej kobiety z grupy kontrolnej (0,00% vs. 0,55% w grupie kontrolnej,  $p=0,83$ ). W trakcie analizy częstości występowania alleli omawianego polimorfizmu zaobserwowano częstsze występowanie niezmutowanego allela -323P0 w podgrupie pacjentek z co najmniej trzema poronieniami (93,42% vs. 88,06% w grupie kontrolnej,  $p=0,12$ ). Natomiast zmutowany allel -323P10 był obecny częściej w grupie kontrolnej kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (6,58% vs. 11,94% w grupie kontrolnej,  $p=0,12$ ) (tab. 19).

**Tabela 19.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -323P0/P10 genu czynnika VII krzepnięcia w podgrupach kobiet z dwoma oraz trzema i więcej poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

<b>-323P0/10</b>	<b>Grupa badana (n=152)</b>								<b>Grupa kontrolna (n=180)</b>	
	<b>2 poronienia (n=114)</b>				<b>3 lub więcej poronień (n=38)</b>				<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>
<b>Genotypy</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>	<b>WR</b>	<b>p</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>	<b>WR</b>	<b>p</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>
<b>P0/P0</b>	89 (78,07)	77,72	1,08	0,45	33 (86,84)	87,27	2,01	0,12	138 (76,67)	77,54
<b>P0/P10</b>	23 (20,18)	20,88	0,86	0,35	5 (13,16)	12,29	0,51	0,13	41 ( 22,78)	21,03
<b>P10/P10</b>	2 (1,75)	1,40	3,20	0,33	0 (0,00)	0,43	—	0,83	1 ( 0,55)	1,43
<b>Suma</b>	114 (100,0)	100,0			38 (100,0)	100,0			180 ( 100,00)	100
<b>Allele</b>										
<b>P0</b>	201 (88,16)	—	1,01	0,54	71 (93,42)	—	1,93	0,12	317 (88,06)	—
<b>P10</b>	27 (11,84)	—	0,99	0,54	5 (6,58)	—	0,52	0,12	43 (11,94)	—
<b>Suma</b>	228 (100,0)	—			76 (100,0)	—			360 (100,0)	—

\*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej

### 4.3.3. Polimorfizm *-122T>C* genu czynnika VII krzepnięcia

W podgrupie kobiet z dwoma poronieniami w wywiadzie częstość występowania zarówno genotypów, jak i alleli polimorfizmu *-122T>C* genu czynnika VII krzepnięcia była porównywalna z częstością obserwowaną w grupie badanej (niezmutowany genotyp homozygotyczny *-122TT*: 78,07% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,45$ ; genotyp heterozygotyczny *-122TC*: 20,18% vs. 22,78% w grupie kontrolnej,  $p=0,35$ ; zmutowany genotyp homozygotyczny *-122CC*: 1,75% vs. 0,55% w grupie kontrolnej,  $p=0,33$ ; allel *-122T*: 88,16% vs. 88,06% w grupie kontrolnej,  $p=0,54$ ; zmutowany allel *-122C*: 11,84% vs. 11,94% w grupie kontrolnej,  $p=0,54$ ) (tab. 20).

W podgrupie kobiet z występowaniem co najmniej 3 poronień w wywiadzie zwracała uwagę wyższa frekwencja niezmutowanego genotypu homozygotycznego *-122TT* w porównaniu do grupy kontrolnej kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (86,84% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,12$ ). Odwrotną sytuację obserwowano dla genotypu heterozygotycznego *-122TC*, który występował częściej w grupie kontrolnej (13,16% vs. 22,78% w grupie kontrolnej,  $p=0,13$ ). W podgrupie kobiet z 3 i więcej poronieniami nie odnotowano występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego *-122CC* (0,00% vs. 0,55% w grupie kontrolnej,  $p=0,83$ ). Również częstość występowania alleli powyższego polimorfizmu różniła się pomiędzy analizowanymi grupami kobiet. Częstość występowania niezmutowanego allela *-122T* była wyższa w podgrupie pacjentek z występowaniem co najmniej 3 poronień (93,42% vs. 88,06% w grupie kontrolnej,  $p=0,12$ ). Odwrotną sytuację obserwowano dla zmutowanego allela *-122C*, który częściej występował w grupie kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (6,58% vs. 11,94% w grupie kontrolnej,  $p=0,12$ ) (tab.20).

**Tabela 20.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-122T>C* genu czynnika VII krzepnięcia w podgrupach kobiet z dwoma oraz trzema i więcej poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

<i>-122T&gt;C</i>	<b>Grupa badana (n=152)</b>								<b>Grupa kontrolna (n=180)</b>	
	<b>2 poronienia (n=114)</b>				<b>3 lub więcej poronień (n=38)</b>					
<b>Genotypy</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>	<b>WR</b>	<b>p</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>	<b>WR</b>	<b>p</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>
<b>TT</b>	89 (78,07)	77,72	1,08	0,45	33 (86,84)	87,27	2,01	0,12	138 (76,67)	77,54
<b>TC</b>	23 (20,18)	20,88	0,86	0,35	5 (13,16)	12,29	0,51	0,13	41 (22,78)	21,03
<b>CC</b>	2 (1,75)	1,40	3,20	0,33	0 (0,00)	0,43	—	0,83	1 (0,55)	1,43
<b>Suma</b>	114 (100,0)	100,0			38 (100,0)	100,0			180 (100,00)	100
<b>Allele</b>										
<b>T</b>	201 (88,16)	—	1,01	0,54	71 (93,42)	—	1,93	0,12	317 (88,06)	—
<b>C</b>	27 (11,84)	—	0,99	0,54	5 (6,58)	—	0,52	0,12	43 (11,94)	—
<b>Suma</b>	228 (100,0)	—			76 (100,0)	—			360 (100,0)	—

\*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej

#### 4.3.4. Polimorfizm -675 4G/5G genu PAI-1

W podgrupie kobiet z występowaniem dwóch poronień w wywiadzie częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -675 4G/5G genu PAI-1 była porównywalna z częstościami obserwowanymi w grupie kontrolnej (niezmutowany genotyp homozygotyczny -675 4G/-675 4G: 32,5% vs. 35,0%,  $p=0,37$ ; genotyp heterozygotyczny -675 4G/-675 5G: 49,1% vs. 47,2%,  $p=0,42$ ; zmutowany genotyp homozygotyczny -675 5G/-675 5G: 18,4% vs. 17,8%,  $p=0,50$ ; allel -675 4G: 57,0% vs. 58,6%,  $p=0,38$ ; zmutowany allel -675 5G: 43,0% vs. 41,4%,  $p=0,38$ ) (tab.21).

Również w przypadku podgrupy kobiet z trzema i więcej poronieniami nie odnotowano istotnych różnic w występowaniu genotypów i alleli analizowanego polimorfizmu w porównaniu do grupy kontrolnej (niezmutowany genotyp homozygotyczny -675 4G/-675 4G: 34,2% vs. 35,0%,  $p=0,54$ ; genotyp heterozygotyczny -675 4G/-675 5G: 50,0% vs. 47,2%,  $p=0,45$ ; zmutowany genotyp homozygotyczny -675 5G/-675 5G: 15,8% vs. 17,8%,  $p=0,49$ ; allel -675 4G: 59,2% vs. 58,6%,  $p=0,51$ ; zmutowany allel -675 5G: 40,8% vs. 41,4%,  $p=0,51$ ) (tab.21).

**Tabela 21.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -675 4G/5G genu *PAI-1* w podgrupach kobiet z dwoma oraz trzema i więcej poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

<b>-675 4G/5G</b>	<b>Grupa badana (n=152)</b>								<b>Grupa kontrolna (n=180)</b>	
	<b>2 poronienia (n=114)</b>				<b>3 lub więcej poronień (n=38)</b>					
<b>Genotypy</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>	<b>WR</b>	<b>p</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>	<b>WR</b>	<b>p</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana a (%)</b>
<b>4G/4G</b>	37 (32,5)	32,5	0,89	0,37	13 (34,2)	35,0	0,97	0,54	63 (35,0)	34,4
<b>4G/5G</b>	56 (49,1)	49,0	1,08	0,42	19 (50,0)	48,3	1,12	0,45	85 (47,2)	48,5
<b>5G/5G</b>	21 (18,4)	18,5	1,04	0,50	6 (15,8)	16,7	0,87	0,49	32 (17,8)	17,1
<b>Suma</b>	114 (100,00)	114 (100,0)			38 (100,0)	38 (100,0)			180 (100,0)	100
<b>Allele</b>										
<b>4G</b>	130 (57,0)	—	0,94	0,38	45 (59,2)	—	1,03	0,51	211 (58,6)	—
<b>5G</b>	98 (43,0)	—	1,07	0,38	31 (40,8)	—	0,98	0,51	149 (41,4)	—
<b>Suma</b>	228 (100,0)	—			76 (100,0)	—			360 (100,0)	—

\*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej



#### 4.3.5. Polimorfizm *HindIII* C>G genu *PAI-1*

W trakcie analizy częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu *HindIII* C>G genu *PAI-1* nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy podgrupą kobiet z dwoma poronieniami w wywiadzie a grupą kontrolną (niezmutowany genotyp homozygotyczny *HindIII* CC: 35,5 vs. 35,6%,  $p=0,51$ ; genotyp heterozygotyczny *HindIII* CG: 41,2% vs. 44,4%,  $p=0,34$ ; zmutowany genotyp homozygotyczny *HindIII* GG: 23,7% vs. 20,0%,  $p=0,27$ ; allel *HindIII* C: 55,7% vs. 57,8%,  $p=0,34$ ; zmutowany allel *HindIII* G: 44,3% vs. 42,2%,  $p=0,34$ ) (tab. 22).

Częstość występowania niezmutowanego homozygotycznego genotypu *HindIII* CC była wyższa w grupie kontrolnej w porównaniu do podgrupy kobiet z trzema i więcej poronieniami w wywiadzie (35,6% w grupie kontrolnej vs. 31,6%,  $p=0,39$ ). Podobną sytuację zaobserwowano dla genotypu heterozygotycznego *HindIII* CG, który również częściej występował w grupie kontrolnej (44,4% w grupie kontrolnej vs. 26,8%,  $p=0,25$ ). Natomiast częstość występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego *HindIII* GG była wyższa w podgrupie kobiet z występowaniem co najmniej 3 poronień niż w grupie kontrolnej (31,6% vs. 20,0% w grupie kontrolnej,  $p=0,09$ ). Allel *HindIII* C występował rzadziej w podgrupie kobiet z 3 i więcej poronieniami w wywiadzie (50,0% vs. 57,8% w grupie kontrolnej,  $p=0,13$ ), natomiast częstość występowania zmutowanego allela *HindIII* G była wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej (50,0% vs. 42,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,13$ ) (tab. 22).

**Tabela 22.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *HindIII* C>G genu *PAI-1* w podgrupach kobiet z dwoma oraz trzema i więcej poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

<i>HindIII</i> C>G	<i>Grupa badana</i> (n=152)								<i>Grupa kontrolna</i> (n=180)	
	<i>2 poronienia</i> (n=114)				<i>3 lub więcej poronień</i> (n=38)					
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana</i> n (%)	<i>wartość oczekiwana</i> (%)	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana</i> n (%)	<i>wartość oczekiwana</i> (%)	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana</i> n (%)	<i>wartość oczekiwana</i> a (%)
<i>CC</i>	40 (35,1)	31,0	0,98	0,51	12 (31,6)	25,0	0,84	0,39	64 (35,6)	33,4
<i>CG</i>	47 (41,2)	49,4	0,88	0,34	14 (36,8)	50,0	0,73	0,25	80 (44,4)	48,8
<i>GG</i>	27 (23,7)	19,6	1,24	0,27	12 (31,6)	25,0	1,85	0,09	36 (20,0)	17,8
<i>Suma</i>	114 (100,0)	100,0			38 (100,0)				180 (100,0)	100
<i>Allele</i>										
<i>C</i>	127 (55,7)	—	0,92	0,34	38 (50,0)	—	0,73	0,13	208 (57,8)	—
<i>G</i>	101 (44,3)	—	1,09	0,34	38 (50,0)	—	1,37	0,13	152 (42,2)	—
<i>Suma</i>	228 (100,0)	—			76 (100,0)	—			360 (100,0)	—

\*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej

#### 4.3.6. Polimorfizm -844G>A genu PAI-1

W podgrupie kobiet z dwoma poronieniami w wywiadzie częstość występowania niezmutowanego homozygotycznego genotypu -844GG polimorfizmu -844G>A genu PAI-1 była porównywalna z częstością obserwowaną w grupie kontrolnej (14,9% vs. 14,4% w grupie kontrolnej,  $p=0,52$ ). Genotyp heterozygotyczny -844GA był obecny nieco częściej w podgrupie kobiet z dwoma poronieniami niż w grupie kontrolnej (50,9% vs. 45,6% w grupie kontrolnej,  $p=0,22$ ). Zaobserwowano nieznacznie częstsze występowanie zmutowanego genotypu homozygotycznego -844AA w grupie kontrolnej kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (40,0% w grupie kontrolnej vs. 34,2%,  $p=0,19$ ). Częstość występowania alleli była porównywalna w obydwu analizowanych grupach (allel -844G: 40,4% vs. 37,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,25$ ; allel -844A: 59,6% vs. 62,8% w grupie kontrolnej,  $p=0,25$ ). Obserwowane różnice nie były istotne pod względem statystycznym (tab. 23).

W trakcie analizy podgrupy kobiet z wywiadem położniczym obciążonym w kierunku występowania co najmniej 3 poronień zaobserwowano podobną częstość występowania niezmutowanego genotypu homozygotycznego -844GG z częstością odnotowaną w grupie kontrolnej (13,2% vs. 14,4% w grupie kontrolnej,  $p=0,54$ ). Genotyp heterozygotyczny -844GA występował nieco częściej w podgrupie kobiet z 3 i więcej poronieniami (50,0% vs. 45,6% w grupie kontrolnej,  $p=0,37$ ). Odwrotną sytuację odnotowano dla zmutowanego genotypu homozygotycznego -844AA, którego częstość była nieznacznie wyższa w grupie kontrolnej (40,0% w grupie kontrolnej vs. 36,8%,  $p=0,43$ ). ). Częstość występowania alleli była porównywalna w obydwu analizowanych grupach (allel -844G: 38,2% vs. 37,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,49$ ; allel -844A: 61,8% vs. 62,8% w grupie kontrolnej,  $p=0,49$ ) (tab. 23).

**Tabela 23.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -844G>A genu *PAI-1* w podgrupach kobiet z dwoma oraz trzema i więcej poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

844G>A	Grupa badana (n=152)								Grupa kontrolna (n=180)	
	2 poronienia (n=114)				3 lub więcej poronień (n=38)					
Genotypy	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	WR	p	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	WR	p	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)
<b>GG</b>	17 (14,9)	16,3	1,04	0,52	5 (13,2)	14,6	0,90	0,54	26 (14,4)	13,9
<b>GA</b>	58 (50,9)	48,2	1,24	0,22	19 (50,0)	47,2	1,20	0,37	82 (45,6)	46,7
<b>AA</b>	39 (34,2)	35,5	0,78	0,19	14 (36,8)	38,2	0,88	0,43	72 (40,0)	39,4
<b>Suma</b>	114 (100,0)	100,0			38 (100,0)	100,0			180 (100,0)	100
<b>Allele</b>										
<b>G</b>	92 (40,4)	—	1,14	0,25	29 (38,2)	—	1,04	0,49	134 (37,2)	—
<b>A</b>	136 (59,6)	—	0,88	0,25	47 (61,8)	—	0,96	0,49	226 (62,8)	—
<b>Suma</b>	228 (100,0)	—			76 (100,0)	—			360 (100,0)	—

\*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej

#### **4.4. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów w podgrupach kobiet z poronieniami w I trymestrze oraz w I i II trymestrze ciąży**

W kolejnym etapie pracy dokonano podziału całej grupy badanej, czyli 152 kobiet z występowaniem co najmniej dwóch poronień na dwie podgrupy w zależności od trymestru ciąży, w którym miały miejsce poronienia. Do pierwszej podgrupy włączono 123 kobiety, u których poronienia występowały wyłącznie w I trymestrze ciąży (poniżej 13 tc.). Do drugiej podgrupy natomiast zakwalifikowano 29 pacjentek, u których poronienia występowały zarówno w I, jak i w II trymestrze ciąży (poniżej 21 tc.). W obydwu podgrupach oceniono częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów.

##### **4.4.1. Polimorfizm *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia**

Częstość występowania genotypu homozygotycznego typu dzikiego *Arg353/Arg353* była porównywalna w podgrupie kobiet z poronieniami w I trymestrze i w grupie kontrolnej (79,7% vs. 76,1% w grupie kontrolnej,  $p=0,28$ ). Zaobserwowano niższą frekwencję genotypu heterozygotycznego *Arg353/Gln353* w podgrupie kobiet z utratami ciąż w I trymestrze (19,5% vs. 23,9% w grupie kontrolnej,  $p=0,22$ ). Zmutowany genotyp homozygotyczny *Gln353/Gln353* odnotowano tylko u jednej pacjentki w podgrupie kobiet z poronieniami w I trymestrze ciąży, natomiast u żadnej z kobiet należących do grupy kontrolnej (0,8% vs. 0,0%,  $p=0,41$ ). Podobnie w przypadku częstości występowania alleli nie występowały statystycznie istotnie różnice w podgrupie kobiet z poronieniami w I trymestrze ciąży oraz w grupie kontrolnej (allel *Arg353*: 89,4% vs. 88,1%,  $p=0,35$ ; zmutowany allel *Gln353*: 10,6% vs. 11,9%,  $p=0,35$ ) (tab. 24).

W podgrupie kobiet z występowaniem poronień w I i II trymestrze ciąży częstość występowania niezmutowanego genotypu *Arg353/Arg353* była wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej (82,8% vs. 76,1% w grupie kontrolnej,  $p=0,30$ ). Natomiast genotyp heterozygotyczny *Arg353/Gln353* występował częściej w grupie kontrolnej (23,9% w grupie kontrolnej vs. 17,2%,  $p=0,30$ ). Wśród kobiet z występowaniem poronień w I i II trymestrze nie odnotowano występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego *Gln353/Gln353*, podobnie jak w grupie kontrolnej. Częstość występowania allela *Arg353* była wyższa w podgrupie z poronieniami w I i II trymestrze w porównaniu do grupy kontrolnej (91,4% vs. 88,1% w grupie kontrolnej,  $p=0,31$ ). Odwrotną sytuację zaobserwowano w stosunku do zmutowanego allela *Gln353*, który występował częściej w grupie kontrolnej (11,9% w grupie kontrolnej vs. 8,6%,  $p=0,31$ ) (tab. 24).

**Tabela 24.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia w podgrupach kobiet z poronieniami w I oraz w I i II trymestrze ciąży oraz w grupie kontrolnej.

<i>Arg353Gln</i>	<i>Grupa badana (n=152)</i>								<i>Grupa kontrolna (n=180)</i>	
	<i>I trymestr (n=123)</i>				<i>I i II trymestr (n=29)</i>				<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>
<i>Arg353/Arg353</i>	98 (79,7)	79,9	1,23	0,28	24 (82,8)	83,6	1,51	0,30	137 (76,1)	77,5
<i>Arg353/Gln353</i>	24 (19,5)	19,0	0,77	0,22	5 (17,2)	15,7	0,66	0,30	43 (23,9)	21,1
<i>Gln353/Gln353</i>	1 (0,8)	1,1	—	0,41	0 (0,0)	0,7	—	1,00	0 (0,0)	1,4
<i>Suma</i>	123 (100)	100			29 (100,0)	100			180 (100,0)	100
<i>Allele</i>										
<i>Arg353</i>	220 (89,4)	-	1,15	0,35	53 (91,4)	-	1,44	0,31	317 (88,1)	—
<i>Gln353</i>	26 (10,6)	-	0,87	0,35	5 (8,6)	-	0,70	0,31	43 (11,9)	—
<i>Suma</i>	246 (100,0)	-			58 (100,0)	-			360 (100,0)	—

\*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej

#### 4.4.2. Polimorfizm -323P0/P10 genu czynnika VII krzepnięcia

Po dokonaniu podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od trymestru ciąży, w którym występowały poronienia odnotowano częstsze występowanie niezmutowanego genotypu homozygotycznego -323P0/-323P0 w podgrupie, w której utraty ciąży miały miejsce tylko w I trymestrze (81,30% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,21$ ). Odwrotną zależność odnotowano dla genotypu heterozygotycznego -323P0/-323P10, którego częstość występowania była wyższa wśród kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (22,78% w grupie kontrolnej vs. 17,07%,  $p=0,14$ ). Zmutowany genotyp homozygotyczny -323P10/-323P10 był obecny tylko u dwóch pacjentek z podgrupy z poronieniami w I trymestrze ciąży oraz u jednej kobiety z grupy kontrolnej (1,63% vs. 0,55% w grupie kontrolnej,  $p=0,36$ ). Analiza częstości występowania alleli nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami (niezmutowany allel -323P0: 89,94% vs. 88,06% w grupie kontrolnej,  $p=0,29$ ; zmutowany allel -323P10: 10,16% vs. 11,94% w grupie kontrolnej,  $p=0,29$ ) (tab. 25).

W podgrupie pacjentek, u których utraty ciąży miały miejsce zarówno w I, jak i w II trymestrze frekwencja niezmutowanego genotypu homozygotycznego -323P0/-323P0 oraz genotypu heterozygotycznego -323P0/-323P10 była zbliżona do częstości tych genotypów w grupie kontrolnej (genotyp -323P0/-323P0: 75,86% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,54$ ; genotyp -323P0/-323P10: 24,14% vs. 22,78% w grupie kontrolnej,  $p=0,52$ ). Zmutowany genotyp homozygotyczny -323P10/-323P10 nie występował u żadnej z pacjentek z podgrupy badanej i tylko u jednej z kobiet z grupy kontrolnej (0,00% vs. 0,55% w grupie kontrolnej,  $p=0,86$ ). Również analiza częstości występowania alleli nie wykazała istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami (niezmutowany allel -323P0: 87,93% vs. 88,06% w grupie kontrolnej,  $p=0,56$ ; zmutowany allel -323P10: 12,07% vs. 11,94% w grupie kontrolnej,  $p=0,56$ ) (tab.25).

**Tabela 25.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -323P0/P10 genu czynnika VII krzepnięcia w podgrupach kobiet z poronieniami w I oraz w I i II trymestrze ciąży oraz w grupie kontrolnej.

<b>-323P0/10</b>	<b>Grupa badana (n=152)</b>								<b>Grupa kontrolna (n=180)</b>	
	<b>I trymestr (n=123)</b>				<b>I i II trymestr (n=29)</b>					
<b>Genotypy</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>	<b>WR</b>	<b>p</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>	<b>WR</b>	<b>p</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>
<b>P0/P0</b>	100 (81,30)	80,71	1,32	0,21	22 (75,86)	77,32	0,96	0,54	138 (76,67)	77,54
<b>P0/P10</b>	21 (17,07)	18,26	0,70	0,14	7 (24,14)	21,22	1,08	0,52	41 (22,78)	21,03
<b>P10/P10</b>	2 (1,63)	1,03	2,96	0,36	0 (0,00)	1,46	—	0,86	1 (0,55)	1,43
<b>Suma</b>	123 (100,0)	100			29 (100,0)	100			180 (100,00)	100
<b>Allele</b>										
<b>P0</b>	221 (89,84)	—	1,20	0,29	51 (87,93)	—	0,99	0,56	317 (88,06)	—
<b>P10</b>	25 (10,16)	—	0,83	0,29	7 (12,07)	—	1,01	0,56	43 (11,94)	—
<b>Suma</b>	246 (100,0)	—			58 (100,0)	—			360 (100,0)	—

\*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej



#### 4.4.3. Polimorfizm *-122T>C* genu czynnika VII krzepnięcia

W podgrupie kobiet, u których poronienia miały miejsce tylko w I trymestrze zwracało uwagę częstsze występowanie niezmutowanego genotypu homozygotycznego *-122TT* (81,30% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,21$ ) oraz niższa częstość występowania genotypu heterozygotycznego *-122TC* (17,07% vs. 22,78% w grupie kontrolnej,  $p=0,14$ ). Częstość występowania niezmutowanego allela powyższego polimorfizmu była porównywalna w obydwu analizowanych grupach (niezmutowany allel *-122T*: 89,84% vs. 88,06% w grupie kontrolnej,  $p=0,29$ ; zmutowany allel *-122C*: 10,16% vs. 11,94% w grupie kontrolnej,  $p=0,29$ ) (tab. 26).

W podgrupie kobiet, u których poronienia miały miejsce zarówno w I, jak i II trymestrze ciąży częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-122T>C* genu czynnika VII krzepnięcia była porównywalna z odpowiednimi częstościami obserwowanymi w grupie kontrolnej (niezmutowany genotyp homozygotyczny *-122TT*: 75,86% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,54$ ; genotyp heterozygotyczny *-122TC*: 24,14% vs. 22,78% w grupie kontrolnej,  $p=0,52$ ; zmutowany genotyp homozygotyczny *-122CC*: 0,00% vs. 0,55% w grupie kontrolnej,  $p=0,86$ ; allel *-122T*: 87,93% vs. 88,06% w grupie kontrolnej,  $p=0,56$ ; zmutowany allel *-122C*: 12,07% vs. 11,94% w grupie kontrolnej,  $p=0,56$ ) (tab. 26).

**Tabela 26.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -122T>C genu czynnika VII krzepnięcia w podgrupach kobiet z poronieniami w I oraz w I i II trymestrze ciąży oraz w grupie kontrolnej.

<b>-122T&gt;C</b>	<b>Grupa badana (n=152)</b>								<b>Grupa kontrolna (n=180)</b>	
	<b>I trymestr (n=123)</b>				<b>I i II trymestr (n=29)</b>					
<b>Genotypy</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>	<b>WR</b>	<b>p</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>	<b>WR</b>	<b>p</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>
<b>TT</b>	100 (81,30)	80,71	1,32	0,21	22 (75,86)	77,32	0,96	0,54	138 (76,67)	77,54
<b>TC</b>	21 (17,07)	18,26	0,70	0,14	7 (24,14)	21,22	1,08	0,52	41 (22,78)	21,03
<b>CC</b>	2 (1,63)	1,03	2,96	0,36	0 (0,00)	1,46	—	0,86	1 (0,55)	1,43
<b>Suma</b>	123 (100,0)	100			29 (100,0)	100			180 (100,00)	100
<b>Allele</b>										
<b>T</b>	221 (89,84)	—	1,20	0,29	51 (87,93)	—	0,99	0,56	317 (88,06)	—
<b>C</b>	25 (10,16)	—	0,83	0,29	7 (12,07)	—	1,01	0,56	43 (11,94)	—
<b>Suma</b>	246 (100,0)	—			58 (100,0)	—			360 (100,0)	—

\*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej

#### 4.4.4. Polimorfizm -675 4G/5G genu PAI-1

W przypadku polimorfizmu -675 4G/5G genu PAI-1 odnotowano zbliżoną częstość występowania poszczególnych genotypów w porównaniu z częstościami obserwowanymi w grupie kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (niezmutowany genotyp homozygotyczny -675 4G/-675 4G: 31,7% vs. 35,5% w grupie kontrolnej,  $p=0,32$ ; genotyp heterozygotyczny -675 4G/-675 5G: 50,4% vs. 47,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,33$ ; zmutowany genotyp homozygotyczny -675 5G/-675 5G: 17,9% vs. 17,8% w grupie kontrolnej,  $p=0,55$ ). Podobnie częstość występowania alleli była porównywalna (allel -675 4G: 56,9% vs. 58,6% w grupie kontrolnej,  $p=0,37$ ; zmutowany allel -675 5G: 43,1% vs. 41,4% w grupie kontrolnej,  $p=0,37$ ) (tab.27).

W podgrupie kobiet z występowaniem poronień zarówno w I, jak i w II trymestrze ciąży częstość występowania genotypów polimorfizmu -675 4G/5G genu PAI-1 również była porównywalna z częstościami obserwowanymi w grupie kontrolnej (niezmutowany genotyp homozygotyczny -675 4G/-675 4G: 37,9% vs. 35,0%,  $p=0,45$ ; genotyp heterozygotyczny -675 4G/-675 5G: 44,8% vs. 47,2%,  $p=0,49$ ; zmutowany genotyp homozygotyczny -675 5G/-675 5G: 17,3% vs. 17,8%,  $p=0,59$ ). Podobnie częstość występowania alleli powyższego polimorfizmu była zbliżona w obydwu analizowanych grupach (allel -675 4G: 60,3% vs. 58,6% w grupie kontrolnej,  $p=0,46$ ; zmutowany allel -675 5G: 39,% vs. 41,4% w grupie kontrolnej,  $p=0,46$ ) (tab. 27).

**Tabela 27.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -675 4G/5G genu *PAI-1* w podgrupach kobiet z poronieniami w I oraz w I i II trymestrze ciąży oraz w grupie kontrolnej.

<b>-675 4G/5G</b>	<b>Grupa badana (n=152)</b>								<b>Grupa kontrolna (n=180)</b>	
	<b>I trymestr (n=123)</b>				<b>I i II trymestr (n=29)</b>					
<b>Genotypy</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>	<b>WR</b>	<b>p</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>	<b>WR</b>	<b>p</b>	<b>wartość obserwowana n (%)</b>	<b>wartość oczekiwana (%)</b>
<b>4G/4G</b>	39 (31,7)	32,4	0,86	0,32	11 (37,9)	36,4	1,13	0,45	63 (35,0)	34,4
<b>4G/5G</b>	62 (50,4)	49,0	1,14	0,33	13 (44,8)	47,9	0,91	0,49	85 (47,2)	48,5
<b>5G/5G</b>	22 (17,9)	18,6	1,01	0,55	5 (17,3)	15,7	0,96	0,59	32 (17,8)	17,1
<b>Suma</b>	123 (100,0)	100			29 (100,0)	100			180 (100,0)	100
<b>Allele</b>										
<b>4G</b>	140 (56,9)	—	0,93	0,37	35 (60,3)	—	1,07	0,46	211 (58,6)	—
<b>5G</b>	106 (43,1)	—	1,07	0,37	23 (39,7)	—	0,93	0,46	149 (41,4)	—
<b>Suma</b>	246 (100,0)	—			58 (100,0)	—			360 (100,0)	—

\*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej

#### 4.4.5. Polimorfizm *HindIII C>G* genu *PAI-1*

W trakcie analizy częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu *HindIII C>G* genu *PAI-1* odnotowano porównywalną częstość występowania niezmutowanego genotypu homozygotycznego *HindIII CC* w podgrupie kobiet z występowaniem poronień w I trymestrze ciąży i w grupie kontrolnej (35,8% vs. 35,6% w grupie kontrolnej,  $p=0,53$ ). Zaobserwowano, że genotyp heterozygotyczny *HindIII CG* był obecny częściej w grupie kontrolnej niż w podgrupie pacjentek z poronieniami występującymi tylko w I trymestrze (44,4% w grupie kontrolnej vs. 39,8%,  $p=0,25$ ). Odwrotna zależność dotyczyła zmutowanego genotypu homozygotycznego *HindIII GG*, którego częstość była wyższa w podgrupie z poronieniami w I trymestrze niż w grupie kontrolnej (24,4% vs. 20,0% w grupie kontrolnej,  $p=0,22$ ). Różnice te nie były istotne pod względem statystycznym. Częstość występowania alleli analizowanego polimorfizmu była porównywalna w obydwu grupach (niezmutowany allel *HindIII C*: 55,7% vs. 57,8% w grupie kontrolnej,  $p=0,33$ ; zmutowany allel *HindIII G*: 44,3% vs. 42,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,33$ ) (tab. 28).

W podgrupie kobiet z występowaniem poronień zarówno w I, jak i w II trymestrze ciąży częstość występowania niezmutowanego genotypu homozygotycznego *HindIII CC* była niższa niż w grupie kontrolnej (27,6% vs. 35,6% w grupie kontrolnej,  $p=0,27$ ). Natomiast częstość występowania genotypu heterozygotycznego *HindIII CG* była porównywalna w obydwu analizowanych grupach (41,4% vs. 44,4% w grupie kontrolnej,  $p=0,46$ ). Zaobserwowano wyższą frekwencję zmutowanego genotypu homozygotycznego *HindIII GG* w grupie kobiet z poronieniami w I i II trymestrze w porównaniu do grupy kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (31,0% vs. 20,0%,  $p=0,14$ ). Różnice te nie były statystycznie istotne. Niezmutowany allel *HindIII C* występował częściej w grupie kontrolnej (57,8% w grupie kontrolnej vs. 48,3%,  $p=0,11$ ), natomiast zmutowany allel *HindIII G* – częściej w podgrupie kobiet z poronieniami w I i II trymestrze ciąży (51,7% vs. 42,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,11$ ) (tab. 28).

**Tabela 28.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *HindIII C>G* genu *PAI-1* w podgrupach kobiet z poronieniami w I oraz w I i II trymestrze ciąży oraz w grupie kontrolnej.

<i>HindIII</i> <i>C&gt;G</i>	<i>Grupa badana</i> ( <i>n=152</i> )								<i>Grupa kontrolna</i> ( <i>n=180</i> )	
	<i>I trymestr</i> ( <i>n=123</i> )				<i>I i II trymestr</i> ( <i>n=29</i> )					
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> (%)	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> (%)	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> (%)
<i>CC</i>	44 (35,8)	31,0	1,01	0,53	8 (27,6)	23,3	0,69	0,27	64 (35,6)	33,4
<i>CG</i>	49 (39,8)	49,4	0,83	0,25	12 (41,4)	49,9	0,88	0,46	80 (44,4)	48,8
<i>GG</i>	30 (24,4)	19,6	1,29	0,22	9 (31,0)	26,8	1,80	0,14	36 (20,0)	17,8
<i>Suma</i>	123 (100,0)	100				100			180 (100,0)	100
<i>Allele</i>										
<i>C</i>	137 (55,7)	—	0,92	0,33	28 (48,3)	—	0,68	0,11	208 (57,8)	—
<i>G</i>	109 (44,3)	—	1,09	0,33	30 (51,7)	—	1,47	0,11	152 (42,2)	—
<i>Suma</i>	246 (100,0)	—			58 (100,0)	—			360 (100,0)	—

\*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej

#### 4.4.6. Polimorfizm -844G>A genu *PAI-1*

Analiza częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu -844G>A genu *PAI-1* wykazała porównywalną częstość występowania genotypu homozygotycznego -844GG w podgrupie kobiet z występowaniem poronień tylko w I trymestrze ciąży oraz w grupie kontrolnej (13,8% vs. 14,4% w grupie kontrolnej,  $p=0,51$ ). Genotyp heterozygotyczny -844GA był obecny nieznacznie częściej w podgrupie kobiet z poronieniami w I trymestrze (52,0% vs. 45,6% w grupie kontrolnej,  $p=0,16$ ). Natomiast częstość występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego -844AA była nieco wyższa w grupie kontrolnej (40,0% w grupie kontrolnej vs. 34,2%,  $p=0,18$ ). Częstość występowania alleli badanego polimorfizmu była porównywalna w obydwu analizowanych grupach (niezmutowany allel -844G: 39,8% vs. 37,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,29$ ; zmutowany allel -844A: 60,2% vs. 62,8% w grupie kontrolnej,  $p=0,29$ ) (tab.29).

Odnotowano porównywalną częstość występowania poszczególnych genotypów powyższego polimorfizmu w podgrupie kobiet z występowaniem poronień w I i II trymestrze ciąży oraz w grupie kontrolnej (-844GG: 17,3% vs. 14,4% w grupie kontrolnej,  $p=0,44$ ; -844GA: 44,85 vs. 45,6% w grupie kontrolnej,  $p=0,55$ ; -844AA: 37,9% vs. 40,0% w grupie kontrolnej,  $p=0,50$ ). Podobnie częstość występowania alleli nie różniła się istotnie pomiędzy tymi grupami kobiet (niezmutowany allel -844G: 39,7% vs. 37,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,41$ ; zmutowany allel -844A: 60,3% vs. 62,8% w grupie kontrolnej,  $p=0,41$ ) (tab. 29).

**Tabela 29.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -844G>A genu *PAI-1* w podgrupach kobiet z poronieniami w I oraz w I i II trymestrze ciąży oraz w grupie kontrolnej.

844G>A	Grupa badana (n=152)								Grupa kontrolna (n=180)	
	I trymestr (n=123)				I i II trymestr (n=29)					
Genotypy	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	WR	p	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	WR	p	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)
<b>GG</b>	17 (13,8)	15,8	0,95	0,51	5 (17,3)	15,7	1,23	0,44	26 (14,4)	13,9
<b>GA</b>	64 (52,0)	47,9	1,30	0,16	13 (44,8)	47,9	0,97	0,55	82 (45,6)	46,7
<b>AA</b>	42 (34,2)	36,3	0,78	0,18	11 (37,9)	36,4	0,92	0,50	72 (40,0)	39,4
<b>Suma</b>	123 (100,0)	100			29 (100,0)	100			180 (100,0)	100
<b>Allele</b>										
<b>G</b>	98 (39,8)	—	1,12	0,29	23 (39,7)	—	1,11	0,41	134 (37,2)	—
<b>A</b>	148 (60,2)	—	0,90	0,29	35 (60,3)	—	0,90	0,41	226 (62,8)	—
<b>Suma</b>	246 (100,0)	—			58 (100,0)	—			360 (100,0)	—

\*analizowane podgrupy porównywano do grupy kontrolnej



#### 4.5. Analiza współwystępowania genotypów badanych w pracy polimorfizmów

W kolejnym etapie dokonano oceny współwystępowania genotypów polimorfizmów, uwzględniając wszystkie podgrupy kobiet. Analiza współwystępowania genotypów polimorfizmów *Arg353Gln* genu czynnika VII oraz *-675 4G/5G* genu *PAI-1* zwróciła uwagę na rzadsze w stosunku do pozostałych analizowanych podgrup współwystępowanie genotypów *Arg353/Gln353/-675 4G/-675 4G* w podgrupie pacjentek z występowaniem 3 lub więcej poronień w wywiadzie oraz w podgrupie z poronieniami występującymi zarówno w I, jak i w II trymestrze. W obydwu tych podgrupach genotypy *Arg353/Gln353/-675 4G/-675 4G* współwystępowały tylko u jednej kobiety. Ponadto zaobserwowano częstsze niż w grupie kontrolnej współwystępowanie genotypów *Arg353/Arg353/-675 4G/-675 4G* w podgrupie pacjentek z poronieniami w I i II trymestrze ciąży ( $p=0,85$ ) (tab. 30).

**Tabela 30.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *Arg353Gln* genu czynnika VII oraz *-675 4G/5G* genu *PAI-1* pomiędzy badanymi grupami kobiet (w nawiasach podano wartość %).

			<i>-675 4G/5G PAI-1</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>4G/4G</i>	<i>4G/5G</i>	<i>5G/5G</i>	
<i>Grupa badana</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	40 (26,32)	60 (39,47)	22 (14,47)	122 (80,26)
		<i>Arg353/Gln353</i>	9 (5,92)	15 (9,87)	5 (3,29)	29 (19,08)
		<i>Gln353/Gln353</i>	1 (0,66)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,66)
		<i>suma</i>	50 (32,90)	75 (49,34)	27 (17,76)	152 (100,0)
<i>2 poronienia</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	28 (24,56)	44 (38,60)	17 (14,91)	89 (78,07)
		<i>Arg353/Gln353</i>	8 (7,02)	12 (10,52)	4 (3,51)	24 (21,05)
		<i>Gln353/Gln353</i>	1 (0,88)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,88)
		<i>suma</i>	37 (32,46)	56 (49,12)	21 (18,42)	114 (100,0)
<i>3 lub więcej poronień</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	12 (31,58)	16 (42,11)	5 (13,16)	33 (86,85)
		<i>Arg353/Gln353</i>	1 (2,63)	3 (7,89)	1 (2,63)	5 (13,15)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	13 (34,21)	19 (50,00)	6 (15,79)	38 (100,0)
<i>I trymestr</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	30 (24,39)	50 (40,65)	18 (14,63)	98 (79,67)
		<i>Arg353/Gln353</i>	8 (6,51)	12 (9,76)	4 (3,25)	24 (19,52)
		<i>Gln353/Gln353</i>	1 (0,81)	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,81)
		<i>suma</i>	39 (31,71)	62 (50,40)	22 (17,89)	123 (100,0)
<i>I i II trymestr</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	10 (34,48)	10 (34,48)	4 (13,80)	24 (82,76)
		<i>Arg353/Gln353</i>	1 (3,45)	3 (10,34)	1 (3,45)	5 (17,24)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	11 (37,93)	13 (44,82)	5 (17,25)	29 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	49 (27,22)	65 (36,11)	23 (12,78)	137 (76,11)
		<i>Arg353/Gln353</i>	14 (7,78)	20 (11,11)	9 (5,00)	43 (23,89)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	63 (35,00)	85 (47,22)	32 (17,78)	180 (100,0)

W trakcie analizy współwystępowania genotypów polimorfizmów *Arg353Gln* genu czynnika VII oraz *-844G>A* genu *PAI-1* również nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy podgrupami. Zwracało jednak uwagę częstsze niż w grupie kontrolnej współwystępowanie genotypów *-844AA/Arg353/Arg353* w podgrupie pacjentek z 3 i więcej poronieniami ( $p=0,74$ ) oraz w podgrupie z poronieniami w I i II trymestrze ( $p=0,74$ ). W podgrupie kobiet z 3 i więcej poronieniami zaobserwowano współwystępowanie genotypów *-844AA/Arg353/Gln353* tylko u jednej z pacjentek ( $p=0,14$ ) (tab. 31).

**Tabela 31.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *Arg353Gln* genu czynnika VII oraz *-844G>A* genu *PAI-1* pomiędzy badanymi grupami kobiet (w nawiasach podano wartość %).

			<i>-844G&gt;A PAI-1</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	
<i>Grupa badana</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	18 (11,84)	61 (40,13)	43 (28,29)	122 (80,26)
		<i>Arg353/Gln353</i>	4 (2,63)	16 (10,53)	9 (5,92)	29 (19,08)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,66)	1 (0,66)
		<i>suma</i>	22 (14,47)	77 (50,66)	53 (34,87)	152 (100,0)
<i>2 poronienia</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	14 (12,28)	45 (39,47)	30 (26,32)	89 (78,07)
		<i>Arg353/Gln353</i>	3 (2,63)	13 (11,40)	8 (7,02)	24 (21,05)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,88)	1 (0,88)
		<i>suma</i>	17 (14,91)	58 (50,88)	39 (34,21)	114 (100,0)
<i>3 lub więcej poronień</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	4 (10,53)	16 (42,10)	<b>13 (34,21)</b>	33 (86,84)
		<i>Arg353/Gln353</i>	1 (2,63)	3 (7,90)	<b>1 (2,63)</b>	5 (13,16)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	5 (13,16)	19 (50,00)	14 (36,84)	38 (100,0)
<i>I trymestr</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	14 (11,38)	51 (41,46)	33 (26,83)	98 (79,67)
		<i>Arg353/Gln353</i>	3 (2,44)	13 (10,57)	8 (6,50)	24 (19,51)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,81)	1 (0,81)
		<i>suma</i>	17 (13,82)	64 (52,03)	42 (34,15)	123 (100,0)
<i>I i II trymestr</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	4 (13,79)	10 (34,49)	<b>10 (34,48)</b>	24 (82,76)
		<i>Arg353/Gln353</i>	1 (3,45)	3 (10,34)	1 (3,45)	5 (17,24)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	5 (17,24)	13 (44,83)	11 (37,93)	29 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	20 (11,11)	62 (34,44)	55 (30,56)	137 (76,11)
		<i>Arg353/Gln353</i>	6 (3,33)	20 (11,11)	17 (9,44)	43 (23,89)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	26 (14,44)	82 (45,56)	72 (40,00)	180 (100,0)

Analiza współwystępowania genotypów polimorfizmów *Arg353Gln* genu czynnika VII oraz *HindIII C>G* genu *PAI-1* wykazała częstsze niż w grupie kontrolnej współwystępowanie genotypów *Arg353/Arg353/HindIII GG* w podgrupach kobiet z 3 i więcej poronieniami ( $p=0,94$ ) oraz w podgrupie z utratami ciąży w I i II trymestrze ( $p=0,95$ ). Genotypy *HindIII CG/Arg353/Gln353* współwystępowały tylko u jednej pacjentki z podgrupy pacjentek z 3 i więcej poronieniami ( $p=0,14$ ). Odnotowano rzadsze niż w grupie kontrolnej współwystępowanie genotypów *HindIII CC/Arg353/Arg353* w podgrupie pacjentek z niepowodzeniami ciąży w I i II trymestrze. ( $p=0,43$ ). Natomiast w grupie kontrolnej zaobserwowano częstsze niż w pozostałych podgrupach współwystępowanie genotypów *HindIII CC/Arg353/Gln353*. Różnice te nie były statystycznie istotne (tab. 32).

**Tabela 32.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *Arg353Gln* genu czynnika VII oraz *HindIII* genu *PAI-1* pomiędzy badanymi grupami kobiet (w nawiasach podano wartość %).

			<i>HindIII C&gt;G PAI-1</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	41 (26,97)	50 (32,89)	31 (20,39)	122 (80,26)
		<i>Arg353/Gln353</i>	11 (7,24)	11 (7,24)	7 (4,61)	29 (19,08)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,66)	1 (0,66)
		<i>suma</i>	52 (34,21)	61 (40,13)	39 (25,66)	152 (100,0)
<i>2 poronienia</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	31 (27,19)	37 (32,46)	21 (18,42)	89 (78,07)
		<i>Arg353/Gln353</i>	9 (7,90)	10 (8,77)	5 (4,38)	24 (21,05)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,88)	1 (0,88)
		<i>suma</i>	40 (35,09)	47 (41,23)	27 (23,68)	114 (100,0)
<i>3 lub więcej poronień</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	10 (26,32)	13 (34,21)	<b>10 (26,32)</b>	33 (86,84)
		<i>Arg353/Gln353</i>	2 (5,26)	<b>1 (2,63)</b>	2 (5,26)	5 (13,16)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	12 (31,58)	14 (36,84)	12 (31,58)	38 (100,0)
<i>I trymestr</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	35 (28,45)	40 (32,52)	23 (18,70)	98 (79,67)
		<i>Arg353/Gln353</i>	9 (7,32)	9 (7,32)	6 (4,87)	24 (19,51)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,82)	1 (0,82)
		<i>suma</i>	44 (35,77)	49 (39,84)	30 (24,39)	123 (100,0)
<i>I i II trymestr</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	<b>6 (20,69)</b>	10 (34,48)	<b>8 (27,59)</b>	24 (82,76)
		<i>Arg353/Gln353</i>	2 (6,90)	2 (6,90)	1 (3,45)	5 (17,24)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	8 (27,59)	12 (41,38)	9 (31,03)	29 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	44 (24,44)	63 (35,00)	30 (16,67)	137 (76,11)
		<i>Arg353/Gln353</i>	<b>20 (11,12)</b>	17 (9,44)	6 (3,33)	43 (23,89)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	64 (35,56)	80 (44,44)	36 (20,00)	180 (100,0)

W całej grupie badanej nie odnotowano współwystępowania następujących genotypów: -844GG/-675 4G/-675 4G, -844GG/-675 4G/-675 5G, -844GA/-675 4G/-675 4G oraz -844AA/-675 5G/-675 5G. W grupie kontrolnej genotypy -844GA/-675 4G/-675 4G współwystępowały tylko u jednej z kobiet. Natomiast nie odnotowano współwystępowania genotypów -844GG/-675 4G/-675 4G oraz -844GG/-675 4G/-675 5G. W podgrupie pacjentek z utratami ciąży w I i II trymestrze nie zaobserwowano współwystępowania genotypów -844GA/-675 5G/-675 5G i -844AA/-675 4G/-675 5G. Powyższe różnice nie były istotne pod względem statystycznym (tab.33).

**Tabela 33.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów -675 4G/5G oraz -844G>A genu PAI-1 pomiędzy badanymi grupami kobiet (w nawiasach podano wartość %).

			<i>-844G&gt;A PAI-1</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	
<i>Grupa badana</i>	<i>PAI-1 4G/5G</i>	<i>4G/4G</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	50 (32,90)	50 (32,90)
		<i>4G/5G</i>	0 (0,00)	72 (47,37)	3 (1,97)	75 (49,34)
		<i>5G/5G</i>	22 (14,47)	5 (3,29)	0 (0,00)	27 (17,76)
		<i>suma</i>	22 (14,47)	77 (50,66)	53 (34,87)	152 (100,0)
<i>2 poronienia</i>	<i>PAI-1 4G/5G</i>	<i>4G/4G</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	37 (32,46)	37 (32,46)
		<i>4G/5G</i>	0 (0,00)	54 (47,37)	2 (1,75)	56 (49,12)
		<i>5G/5G</i>	17 (14,91)	4 (3,51)	0 (0,00)	21 (18,42)
		<i>suma</i>	17 (14,91)	58 (50,88)	39 (34,21)	114 (100,0)
<i>3 lub więcej poronień</i>	<i>PAI-1 4G/5G</i>	<i>4G/4G</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	13 (34,21)	13 (34,21)
		<i>4G/5G</i>	0 (0,00)	18 (47,37)	1 (2,63)	19 (50,00)
		<i>5G/5G</i>	5 (13,16)	1 (2,63)	0 (0,00)	6 (15,79)
		<i>suma</i>	5 (13,16)	19 (50,00)	14 (36,84)	38 (100,0)
<i>I trymestr</i>	<i>PAI-1 4G/5G</i>	<i>4G/4G</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	39 (31,71)	39 (31,71)
		<i>4G/5G</i>	0 (0,00)	59 (47,97)	3 (2,44)	62 (50,41)
		<i>5G/5G</i>	17 (13,82)	5 (4,06)	0 (0,00)	22 (17,88)
		<i>suma</i>	17 (13,82)	64 (52,03)	42 (34,15)	123 (100,0)
<i>I i II trymestr</i>	<i>PAI-1 4G/5G</i>	<i>4G/4G</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	11 (37,93)	11 (37,93)
		<i>4G/5G</i>	0 (0,00)	13 (44,83)	0 (0,00)	13 (44,83)
		<i>5G/5G</i>	5 (17,24)	0 (0,00)	0 (0,00)	5 (17,24)
		<i>suma</i>	5 (17,24)	13 (44,83)	11 (37,93)	29 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>PAI-1 4G/5G</i>	<i>4G/4G</i>	0 (0,00)	1 (0,56)	62 (34,44)	63 (35,00)
		<i>4G/5G</i>	0 (0,00)	77 (42,78)	8 (4,44)	85 (47,22)
		<i>5G/5G</i>	26 (14,44)	4 (2,22)	2 (1,12)	32 (17,78)
		<i>suma</i>	26 (14,44)	82 (46,56)	72 (40,00)	180 (100,0)

W podgrupie kobiet z utratami ciąży w I trymestrze zaobserwowano rzadsze niż w grupie kontrolnej współwystępowanie genotypów *HindIII* *CG*/-675 *4G*/-675 *4G* ( $p=0,09$ ; WR 0,54; 95%PU 0,24-1,21). W podgrupach pacjentek z 3 i więcej poronieniami w wywiadzie oraz z utratami ciąży w I i II trymestrze nie odnotowano współwystępowania niezmutowanych genotypów homozygotycznych *HindIII* *CC*/-675 *4G*/-675 *4G*. W całej grupie badanej oraz kontrolnej nie odnotowano współwystępowania zmutowanych genotypów homozygotycznych *HindIII* *GG*/-675 *5G*/-675 *5G* (tab. 34).

**Tabela 34.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów -675 *4G*/*5G* oraz *HindIII* *C*>*G* genu *PAI-1* pomiędzy badanymi grupami kobiet (w nawiasach podano wartość %).

			<i>HindIII</i> <i>C</i> > <i>G</i> <i>PAI-1</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana</i>	<i>PAI-1</i> <i>4G</i> / <i>5G</i>	<i>4G</i> / <i>4G</i>	3 (1,97)	13 (8,55)	34 (22,37)	50 (32,89)
		<i>4G</i> / <i>5G</i>	23 (15,13)	47 (30,92)	5 (3,29)	75 (49,34)
		<i>5G</i> / <i>5G</i>	26 (17,11)	1 (0,66)	0 (0,00)	27 (17,77)
		<i>suma</i>	52 (34,31)	61 (40,13)	39 (25,66)	152 (100,0)
<i>2 poronienia</i>	<i>PAI-1</i> <i>4G</i> / <i>5G</i>	<i>4G</i> / <i>4G</i>	3 (2,64)	9 (7,89)	25 (21,93)	37 (32,46)
		<i>4G</i> / <i>5G</i>	17 (14,91)	37 (32,46)	2 (1,75)	56 (49,12)
		<i>5G</i> / <i>5G</i>	20 (17,54)	1 (0,88)	0 (0,00)	21 (18,42)
		<i>suma</i>	40 (35,09)	47 (41,23)	27 (23,68)	114 (100,0)
<i>3 lub więcej poronień</i>	<i>PAI-1</i> <i>4G</i> / <i>5G</i>	<i>4G</i> / <i>4G</i>	0 (0,00)	4 (10,53)	9 (23,68)	13 (34,21)
		<i>4G</i> / <i>5G</i>	6 (15,79)	10 (26,32)	3 (7,89)	19 (50,00)
		<i>5G</i> / <i>5G</i>	6 (15,79)	0 (0,00)	0 (0,00)	6 (15,79)
		<i>suma</i>	12 (31,58)	14 (36,84)	12 (31,58)	38 (100,0)
<i>I trymestr</i>	<i>PAI-1</i> <i>4G</i> / <i>5G</i>	<i>4G</i> / <i>4G</i>	3 (2,44)	<b>9 (7,32)</b>	27 (21,95)	39 (31,71)
		<i>4G</i> / <i>5G</i>	19 (15,45)	40 (32,52)	3 (2,44)	62 (50,41)
		<i>5G</i> / <i>5G</i>	22 (17,88)	0 (0,00)	0 (0,00)	22 (17,88)
		<i>suma</i>	44 (35,77)	49 (39,84)	30 (24,39)	123 (100,0)
<i>I i II trymestr</i>	<i>PAI-1</i> <i>4G</i> / <i>5G</i>	<i>4G</i> / <i>4G</i>	0 (0,00)	4 (13,79)	7 (24,14)	11 (37,93)
		<i>4G</i> / <i>5G</i>	4 (13,79)	7 (24,14)	2 (6,90)	13 (44,83)
		<i>5G</i> / <i>5G</i>	4 (13,79)	1 (3,45)	0 (0,00)	5 (17,24)
		<i>suma</i>	8 (27,59)	12 (41,38)	9 (31,03)	29 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>PAI-1</i> <i>4G</i> / <i>5G</i>	<i>4G</i> / <i>4G</i>	5 (2,78)	23 (12,78)	35 (19,44)	63 (35,00)
		<i>4G</i> / <i>5G</i>	27 (15,00)	57 (31,66)	1 (0,56)	85 (47,22)
		<i>5G</i> / <i>5G</i>	32 (17,78)	0 (0,00)	0 (0,00)	32 (17,78)
		<i>suma</i>	64 (35,56)	80 (44,44)	36 (20,00)	180 (100,0)

Analiza współwystępowania genotypów polimorfizmów -844G>A oraz *HindIII* C>G genu *PAI-1* wykazała rzadsze współwystępowanie genotypów *HindIII* CC/-844AA ( $p=0,079$ ; WR 0,34; 95%PU 0,09-1,27) oraz *HindIII* CG/-844AA ( $p=0,058$ ; WR 0,55; 95%PU 0,28-1,09) w grupie badanej niż w kontrolnej. Współwystępowanie genotypów *HindIII* CG/-844AA było rzadsze w podgrupie z dwoma poronieniami ( $p=0,063$ ; WR 0,52; 95%PU 0,24-1,12) oraz w podgrupie z utratami ciąży w I trymestrze ( $p=0,039$ ; WR 0,48; 95%PU 0,22-1,03) niż w grupie kontrolnej (tab. 35).

**Tabela 35.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów -844G>A oraz *HindIII* C>G genu *PAI-1* pomiędzy badanymi grupami kobiet (w nawiasach podano wartość %).

			<i>HindIII</i> C>G <i>PAI-1</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana</i>	<i>PAI-1 -844G&gt;A</i>	<i>GG</i>	21 (13,82)	1 (0,66)	0 (0,00)	22 (14,47)
		<i>GA</i>	28 (18,42)	46 (30,26)	3 (1,97)	77 (50,66)
		<i>AA</i>	3 (1,97)	14 (9,21)	36 (23,69)	53 (34,87)
		<i>suma</i>	52 (34,21)	61 (40,13)	39 (25,66)	152 (100,0)
<i>2 poronienia</i>	<i>PAI-1 -844G&gt;A</i>	<i>GG</i>	16 (14,03)	1 (0,88)	0 (0,00)	17 (14,91)
		<i>GA</i>	21 (18,42)	36 (31,58)	1 (0,88)	58 (50,88)
		<i>AA</i>	3 (2,63)	10 (8,77)	26 (22,81)	39 (34,21)
		<i>suma</i>	40 (35,08)	47 (41,23)	27 (23,69)	114 (100,0)
<i>3 lub więcej poronień</i>	<i>PAI-1 -844G&gt;A</i>	<i>GG</i>	5 (13,16)	0 (0,00)	0 (0,00)	5 (13,16)
		<i>GA</i>	7 (18,42)	10 (26,31)	2 (5,27)	19 (50,00)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	4 (10,53)	10 (26,31)	14 (36,84)
		<i>suma</i>	12 (31,58)	14 (36,84)	12 (31,58)	38 (100,0)
<i>I trymestr</i>	<i>PAI-1 -844G&gt;A</i>	<i>GG</i>	17 (13,82)	0 (0,00)	0 (0,00)	17 (13,82)
		<i>GA</i>	24 (19,51)	39 (31,71)	1 (0,81)	64 (52,03)
		<i>AA</i>	3 (2,44)	10 (8,13)	29 (23,58)	42 (34,15)
		<i>suma</i>	44 (35,77)	49 (39,84)	30 (24,39)	123 (100,0)
<i>I i II trymestr</i>	<i>PAI-1 -844G&gt;A</i>	<i>GG</i>	4 (13,79)	1 (1,45)	0 (0,00)	5 (17,24)
		<i>GA</i>	2 (6,90)	7 (24,14)	4 (13,79)	13 (44,83)
		<i>AA</i>	0 (0,00)	4 (13,79)	7 (24,14)	11 (37,93)
		<i>suma</i>	6 (20,69)	12 (41,38)	11 (37,93)	29 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>PAI-1 -844G&gt;A</i>	<i>GG</i>	26 (14,44)	0 (0,00)	0 (0,00)	26 (14,44)
		<i>GA</i>	28 (15,56)	52 (28,89)	2 (1,11)	82 (45,56)
		<i>AA</i>	10 (5,55)	28 (15,55)	34 (18,89)	72 (40,00)
		<i>suma</i>	64 (35,55)	80 (44,44)	36 (20,00)	180 (100,0)

Odnotowano rzadsze w porównaniu do grupy kontrolnej współwystępowanie genotypów *-323P0/-323P10/Arg353/Gln353* w podgrupie pacjentek z 3 lub więcej poronieniami ( $p=0,085$ ; WR 0,43; 95%PU 0,14-1,27). W całej grupie badanej oraz kontrolnej nie było przypadku współwystępowania genotypów *-323P10/-323P10/Arg353/Arg353*, *-323P0/-323P10/Gln353/Gln353*, oraz *-323P0/-323P0/Gln353/Gln353*. Nie uzyskano zależności istotnych pod względem statystycznym (tab. 36).

**Tabela 36.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *Arg353Gln* i *-323P0/10* genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet (w nawiasach podano wartość %).

			<i>-323P0/10</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>P0/P0</i>	<i>P0/P10</i>	<i>P10/P10</i>	
<i>Grupa badana</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	119 (78,29)	3 (1,97)	0 (0,00)	122 (80,26)
		<i>Arg353/Gln353</i>	3 (1,97)	25 (16,45)	1 (0,66)	29 (19,08)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,66)	1 (0,66)
		<i>suma</i>	122 (80,26)	28 (18,42)	2 (1,32)	152 (100,0)
<i>2 poronienia</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	87 (76,32)	2 (1,75)	0 (0,00)	89 (78,07)
		<i>Arg353/Gln353</i>	2 (1,75)	21 (18,42)	1 (0,88)	24 (21,05)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,88)	1 (0,88)
		<i>suma</i>	89 (78,07)	23 (20,17)	2 (1,76)	114 (100,0)
<i>3 lub więcej poronień</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	32 (84,21)	1 (2,63)	0 (0,00)	33 (86,84)
		<i>Arg353/Gln353</i>	1 (2,63)	4 (10,53)	0 (0,00)	5 (13,16)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	33 (86,84)	5 (13,16)	0 (0,00)	38 (100,0)
<i>I trymestr</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	97 (78,86)	1 (0,81)	0 (0,00)	98 (79,67)
		<i>Arg353/Gln353</i>	3 (2,44)	20 (16,26)	1 (0,81)	24 (19,51)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,81)	1 (0,81)
		<i>suma</i>	100 (81,30)	21 (17,07)	2 (1,62)	123 (100,0)
<i>I i II trymestr</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	22 (75,86)	2 (6,90)	0 (0,00)	24 (82,76)
		<i>Arg353/Gln353</i>	0 (0,00)	5 (17,24)	0 (0,00)	5 (17,24)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	22 (75,86)	7 (24,14)	0 (0,00)	29 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	135 (75,00)	2 (1,11)	0 (0,00)	137 (76,11)
		<i>Arg353/Gln353</i>	3 (1,67)	39 (21,67)	1 (0,55)	43 (23,89)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	138 (76,67)	41 (22,78)	1 (0,55)	180 (100,0)



Współwystępowanie genotypów -323P0/-323P10/-675 4G/-675 4G w podgrupie pacjentek z co najmniej trzema poronieniami odnotowano tylko u jednej z pacjentek. Nie zaobserwowano współwystępowania genotypów -323P10/-323P10/-675 5G/-675 5G w całej grupie badanej oraz kontrolnej. Ponadto w grupie kontrolnej genotypy homozygotyczne -323P10/-323P10/-675 4G/-675 4G również nie współwystępowały u żadnej z pacjentek. Obserwowane zależności nie były statystycznie istotne (tab.37).

**Tabela 37.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów -675 4G/5G genu PAI-1 oraz -323P0/10 genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet (w nawiasach podano wartość %).

			<b>-323P0/10</b>			<b>Ogółem</b>
			<b>P0/P0</b>	<b>P0/P10</b>	<b>P10/P10</b>	
<b>Grupa badana</b>	<b>PAI-1 4G/5G</b>	<b>4G/4G</b>	39 (25,66)	10 (6,58)	1 (0,66)	50 (32,90)
		<b>4G/5G</b>	62 (40,79)	12 (7,89)	1 (0,66)	75 (49,34)
		<b>5G/5G</b>	21 (13,81)	6 (3,95)	0 (0,00)	27 (17,76)
		<b>suma</b>	122 (80,26)	28 (18,42)	2 (1,32)	152 (100,0)
<b>2 poronienia</b>	<b>PAI-1 4G/5G</b>	<b>4G/4G</b>	27 (23,68)	9 (7,89)	1 (0,88)	37 (32,46)
		<b>4G/5G</b>	45 (39,47)	10 (8,77)	1 (0,88)	56 (49,12)
		<b>5G/5G</b>	17 (14,91)	4 (3,51)	0 (0,00)	21 (18,42)
		<b>suma</b>	89 (78,07)	23 (20,17)	2 (1,76)	114 (100,0)
<b>3 lub więcej poronień</b>	<b>PAI-1 4G/5G</b>	<b>4G/4G</b>	12 (31,58)	<b>1 (2,63)</b>	0 (0,00)	13 (34,21)
		<b>4G/5G</b>	17 (44,74)	2 (5,26)	0 (0,00)	19 (50,00)
		<b>5G/5G</b>	4 (10,53)	2 (5,26)	0 (0,00)	6 (15,79)
		<b>suma</b>	33 (86,84)	5 (13,16)	0 (0,00)	38 (100,0)
<b>I trymestr</b>	<b>PAI-1 4G/5G</b>	<b>4G/4G</b>	30 (24,39)	8 (6,50)	1 (0,81)	39 (31,71)
		<b>4G/5G</b>	52 (42,28)	9 (7,32)	1 (0,81)	62 (50,41)
		<b>5G/5G</b>	18 (14,63)	4 (3,25)	0 (0,00)	22 (17,89)
		<b>suma</b>	100 (81,30)	21 (17,07)	2 (1,63)	123 (100,0)
<b>I i II trymestr</b>	<b>PAI-1 4G/5G</b>	<b>4G/4G</b>	9 (31,03)	2 (6,90)	0 (0,00)	11 (37,93)
		<b>4G/5G</b>	10 (34,48)	3 (10,34)	0 (0,00)	13 (44,83)
		<b>5G/5G</b>	3 (10,34)	2 (6,90)	0 (0,00)	5 (17,24)
		<b>suma</b>	22 (75,86)	7 (24,14)	0 (0,00)	29 (100,0)
<b>Grupa kontrolna</b>	<b>PAI-1 4G/5G</b>	<b>4G/4G</b>	51 (28,33)	12 (6,67)	0 (0,00)	63 (35,00)
		<b>4G/5G</b>	64 (35,56)	20 (11,11)	1 (0,56)	85 (47,22)
		<b>5G/5G</b>	23 (12,78)	9 (5,00)	0 (0,00)	32 (17,78)
		<b>suma</b>	138 (76,67)	41 (22,78)	1 (0,56)	180 (100,0)



W podgrupie pacjentek z występowaniem co najmniej 3 poronień obserwowano rzadsze współwystępowanie genotypów -323P0/-323P10/-844AA w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p=0,19$ ). W podgrupie kobiet z niepowodzeniami ciąży w I i II trymestrze obserwowano częstsze niż w grupie kontrolnej współwystępowanie genotypów -323P0/-323P10/-844GG ( $p=0,92$ ). Analiza współwystępowania genotypów polimorfizmów -844G>A genu PAI-1 oraz -323P0/10 genu czynnika VII wykazała, że w całej grupie badanej oraz kontrolnej nie współwystępowały genotypy homozygotyczne -323P10/-323P10/-844GG (tab. 38).

**Tabela 38.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów -844G>A genu PAI-1 oraz -323P0/10 genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet (w nawiasach podano wartość %).

			<b>-323P0/10</b>			<b>Ogółem</b>
			<b>P0/P0</b>	<b>P0/P10</b>	<b>P10/P10</b>	
<b>Grupa badana</b>	<b>PAI-1 -844G&gt;A</b>	<b>GG</b>	17 (11,18)	5 (3,29)	0 (0,00)	22 (14,47)
		<b>GA</b>	63 (41,45)	13 (8,55)	1 (0,66)	77 (50,66)
		<b>AA</b>	42 (27,63)	10 (6,58)	1 (0,66)	53 (34,87)
		<b>suma</b>	122 (80,26)	28 (18,42)	2 (1,32)	152 (100,0)
<b>2 poronienia</b>	<b>PAI-1 -844G&gt;A</b>	<b>GG</b>	14 (12,28)	3 (2,63)	0 (0,00)	17 (14,91)
		<b>GA</b>	46 (40,35)	11 (9,56)	1 (0,88)	58 (50,88)
		<b>AA</b>	29 (25,44)	9 (7,89)	1 (0,88)	39 (34,21)
		<b>suma</b>	89 (78,07)	23 (20,18)	2 (1,75)	114 (100,0)
<b>3 lub więcej poronień</b>	<b>PAI-1 -844G&gt;A</b>	<b>GG</b>	3 (7,89)	2 (5,26)	0 (0,00)	5 (13,16)
		<b>GA</b>	17 (44,74)	2 (5,26)	0 (0,00)	19 (50,00)
		<b>AA</b>	13 (34,21)	1 (2,63)	0 (0,00)	14 (36,84)
		<b>suma</b>	33 (86,84)	5 (13,16)	0 (0,00)	38 (100,0)
<b>I trymestr</b>	<b>PAI-1 -844G&gt;A</b>	<b>GG</b>	14 (11,38)	3 (2,44)	0 (0,00)	17 (13,82)
		<b>GA</b>	53 (43,09)	10 (8,13)	1 (0,81)	64 (52,03)
		<b>AA</b>	33 (26,83)	8 (6,50)	1 (0,81)	42 (34,15)
		<b>suma</b>	100 (81,30)	21 (17,07)	2 (1,63)	123 (100,0)
<b>I i II trymestr</b>	<b>PAI-1 -844G&gt;A</b>	<b>GG</b>	3 (10,34)	2 (6,90)	0 (0,00)	5 (17,24)
		<b>GA</b>	10 (34,48)	3 (10,34)	0 (0,00)	13 (44,83)
		<b>AA</b>	9 (31,03)	2 (6,90)	0 (0,00)	11 (37,93)
		<b>suma</b>	22 (75,86)	7 (24,14)	0 (0,00)	29 (100,0)
<b>Grupa kontrolna</b>	<b>PAI-1 -844G&gt;A</b>	<b>GG</b>	20 (11,11)	6 (3,33)	0 (0,00)	26 (14,44)
		<b>GA</b>	61 (33,89)	20 (11,11)	1 (0,56)	82 (45,56)
		<b>AA</b>	57 (31,67)	15 (8,33)	0 (0,00)	72 (40,00)
		<b>suma</b>	138 (76,67)	41 (22,78)	1 (0,56)	180 (100,0)

W podgrupie kobiet z wywiadem położniczym obciążonym w kierunku występowania co najmniej 3 poronień odnotowano częstsze współwystępowanie genotypów -323P0/-323P0/HindIII GG ( $p=0,97$ ) oraz rzadsze genotypów -323P0/-323P10/HindIII CG ( $p=0,17$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast w podgrupie pacjentek z poronieniami w I i II trymestrze ciąży obserwowano rzadsze współwystępowanie genotypów -323P0/-323P10/HindIII CC w stosunku do grupy kontrolnej ( $p=0,28$ ). U żadnej pacjentki z grupy badanej nie współwystępowały genotypy homozygotyczne -323P10/323P10/HindIII CC. Różnice te nie były statystycznie istotne (tab. 39).

**Tabela 39.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *HindIII C>G* genu *PAI-1* oraz -323 P0/10 genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet (w nawiasach podano wartość %).

			<i>-323P0/10</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>P0/P0</i>	<i>P0/P10</i>	<i>P10/P10</i>	
<i>Grupa badana</i>	<i>HindIII PAI-1</i>	<i>CC</i>	41 (26,97)	11 (7,24)	0 (0,00)	52 (34,21)
		<i>CG</i>	50 (32,89)	10 (6,58)	1 (0,66)	61 (40,13)
		<i>GG</i>	31 (20,40)	7 (4,60)	1 (0,66)	39 (25,66)
		<i>suma</i>	122 (80,26)	28 (18,42)	2 (1,32)	152 (100,0)
<i>2 poronienia</i>	<i>HindIII PAI-1</i>	<i>CC</i>	32 (28,07)	8 (7,02)	0 (0,00)	40 (35,09)
		<i>CG</i>	37 (32,46)	9 (7,89)	1 (0,88)	47 (41,23)
		<i>GG</i>	20 (17,54)	6 (5,26)	1 (0,88)	27 (23,68)
		<i>suma</i>	89 (78,07)	23 (20,17)	2 (1,76)	114 (100,0)
<i>3 lub więcej poronień</i>	<i>HindIII PAI-1</i>	<i>CC</i>	9 (23,68)	3 (7,89)	0 (0,00)	12 (31,58)
		<i>CG</i>	13 (34,21)	<b>1 (2,63)</b>	0 (0,00)	14 (36,84)
		<i>GG</i>	<b>11 (28,95)</b>	1 (2,63)	0 (0,00)	12 (31,58)
		<i>suma</i>	33 (86,84)	5 (13,16)	0 (0,00)	38 (100,0)
<i>I trymestr</i>	<i>HindIII PAI-1</i>	<i>CC</i>	36 (29,27)	8 (6,50)	0 (0,00)	44 (35,77)
		<i>CG</i>	40 (32,52)	8 (6,50)	1 (0,81)	49 (39,84)
		<i>GG</i>	24 (19,51)	5 (4,07)	1 (0,81)	30 (24,39)
		<i>suma</i>	100 (81,30)	21 (17,07)	2 (1,63)	123 (100,0)
<i>I i II trymestr</i>	<i>HindIII PAI-1</i>	<i>CC</i>	<b>5 (17,24)</b>	3 (10,34)	0 (0,00)	8 (27,59)
		<i>CG</i>	10 (34,48)	2 (6,90)	0 (0,00)	12 (41,38)
		<i>GG</i>	7 (24,14)	2 (6,90)	0 (0,00)	9 (31,03)
		<i>suma</i>	22 (75,86)	7 (24,14)	0 (0,00)	29 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>HindIII PAI-1</i>	<i>CC</i>	44 (24,44)	19 (10,56)	1 (0,56)	64 (35,56)
		<i>CG</i>	64 (35,56)	16 (8,89)	0 (0,00)	80 (44,44)
		<i>GG</i>	30 (16,67)	6 (3,33)	0 (0,00)	36 (20,00)
		<i>suma</i>	138(76,67)	41 (22,78)	1 (0,56)	180 (100,0)

W podgrupie kobiet z występowaniem 3 lub więcej poronień zwracała uwagę niższa frekwencja współwystępowania genotypów *-122TT/Arg353/Gln353* w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p=0,085$ ; WR 0,43; 95%PU 0,14-1,27). Nie odnotowano współwystępowania genotypów *-122TT/Gln353/Gln353*, *-122TC/Gln353/Gln353* oraz *-122CC/Arg353/Arg353* u żadnej pacjentki z całej grupy badanej oraz kontrolnej. Nie uzyskano zależności istotnych pod względem statystycznym (tab.40).

**Tabela 40.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *Arg353Gln* i *-122T>C* genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet (w nawiasach podano wartość %).

			<i>-122T&gt;C</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>	
<i>Grupa badana</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	119 (78,29)	3 (1,97)	0 (0,00)	122 (80,26)
		<i>Arg353/Gln353</i>	3 (1,97)	25 (16,45)	1 (0,66)	29 (19,08)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,66)	1 (0,66)
		<i>suma</i>	122 (80,26)	28 (18,42)	2 (1,32)	152 (100,0)
<i>2 poronienia</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	87 (76,32)	2 (1,75)	0 (0,00)	89 (78,07)
		<i>Arg353/Gln353</i>	2 (1,75)	21 (18,42)	1 (0,88)	24 (21,05)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,88)	1 (0,88)
		<i>suma</i>	89 (78,07)	23 (20,17)	2 (1,76)	114 (100,0)
<i>3 lub więcej poronień</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	32 (84,21)	1 (2,63)	0 (0,00)	33 (86,84)
		<i>Arg353/Gln353</i>	1 (2,63)	<b>4 (10,53)</b>	0 (0,00)	5 (13,16)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	33 (86,84)	5 (13,16)	0 (0,00)	38 (100,0)
<i>I trymestr</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	97 (78,86)	1 (0,81)	0 (0,00)	98 (79,67)
		<i>Arg353/Gln353</i>	3 (2,44)	20 (16,26)	1 (0,81)	24 (19,51)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,81)	1 (0,81)
		<i>suma</i>	100 (81,30)	21 (17,07)	2 (1,62)	123 (100,0)
<i>I i II trymestr</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	22 (75,86)	2 (6,90)	0 (0,00)	24 (82,76)
		<i>Arg353/Gln353</i>	0 (0,00)	5 (17,24)	0 (0,00)	5 (17,24)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	22 (75,86)	7 (24,14)	0 (0,00)	29 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>F7 Arg353Gln</i>	<i>Arg353/Arg353</i>	135 (75,00)	2 (1,11)	0 (0,00)	137 (76,11)
		<i>Arg353/Gln353</i>	3 (1,67)	39 (21,67)	1 (0,55)	43 (23,89)
		<i>Gln353/Gln353</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	138 (76,67)	41 (22,78)	1 (0,55)	180 (100,0)

Współwystępowanie genotypów *-122TC/-675 4G/-675 4G* w podgrupie pacjentek z co najmniej trzema poronieniami odnotowano tylko u jednej z pacjentek. Nie zaobserwowano współwystępowania genotypów *-122CC/-675 5G/-675 5G* w całej grupie badanej oraz kontrolnej. Ponadto w grupie kontrolnej genotypy homozygotyczne *-122CC/-675 4G/-675 4G* również nie współwystępowały u żadnej z pacjentek. Obserwowane zależności nie były statystycznie istotne (tab.41).

**Tabela 41.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *-675 4G/5G* genu *PAI-1* oraz *-122T>C* genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet (w nawiasach podano wartość %).

			<i>-122T&gt;C</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>	
<i>Grupa badana</i>	<i>PAI-1 4G/5G</i>	<i>4G/4G</i>	39 (25,66)	10 (6,58)	1 (0,66)	50 (32,90)
		<i>4G/5G</i>	62 (40,79)	12 (7,89)	1 (0,66)	75 (49,34)
		<i>5G/5G</i>	21 (13,81)	6 (3,95)	0 (0,00)	27 (17,76)
		<i>suma</i>	122 (80,26)	28 (18,42)	2 (1,32)	152 (100,0)
<i>2 poronienia</i>	<i>PAI-1 4G/5G</i>	<i>4G/4G</i>	27 (23,68)	9 (7,89)	1 (0,88)	37 (32,46)
		<i>4G/5G</i>	45 (39,47)	10 (8,77)	1 (0,88)	56 (49,12)
		<i>5G/5G</i>	17 (14,91)	4 (3,51)	0 (0,00)	21 (18,42)
		<i>suma</i>	89 (78,07)	23 (20,17)	2 (1,76)	114 (100,0)
<i>3 lub więcej poronień</i>	<i>PAI-1 4G/5G</i>	<i>4G/4G</i>	12 (31,58)	1 (2,63)	0 (0,00)	13 (34,21)
		<i>4G/5G</i>	17 (44,74)	2 (5,26)	0 (0,00)	19 (50,00)
		<i>5G/5G</i>	4 (10,53)	2 (5,26)	0 (0,00)	6 (15,79)
		<i>suma</i>	33 (86,84)	5 (13,16)	0 (0,00)	38 (100,0)
<i>I trymestr</i>	<i>PAI-1 4G/5G</i>	<i>4G/4G</i>	30 (24,39)	8 (6,50)	1 (0,81)	39 (31,71)
		<i>4G/5G</i>	52 (42,28)	9 (7,32)	1 (0,81)	62 (50,41)
		<i>5G/5G</i>	18 (14,63)	4 (3,25)	0 (0,00)	22 (17,89)
		<i>suma</i>	100 (81,30)	21 (17,07)	2 (1,63)	123 (100,0)
<i>I i II trymestr</i>	<i>PAI-1 4G/5G</i>	<i>4G/4G</i>	9 (31,03)	2 (6,90)	0 (0,00)	11 (37,93)
		<i>4G/5G</i>	10 (34,48)	3 (10,34)	0 (0,00)	13 (44,83)
		<i>5G/5G</i>	3 (10,34)	2 (6,90)	0 (0,00)	5 (17,24)
		<i>suma</i>	22 (75,86)	7 (24,14)	0 (0,00)	29 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>PAI-1 4G/5G</i>	<i>4G/4G</i>	51 (28,33)	12 (6,67)	0 (0,00)	63 (35,00)
		<i>4G/5G</i>	64 (35,56)	20 (11,11)	1 (0,56)	85 (47,22)
		<i>5G/5G</i>	23 (12,78)	9 (5,00)	0 (0,00)	32 (17,78)
		<i>suma</i>	138 (76,67)	41 (22,78)	1 (0,56)	180 (100,0)

W podgrupie pacjentek z występowaniem co najmniej 3 poronień obserwowano rzadsze współwystępowanie genotypów *-122TC/-844AA* w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p=0,19$ ). W podgrupie kobiet z niepowodzeniami ciąży w I i II trymestrze obserwowano częstsze niż w grupie kontrolnej współwystępowanie genotypów *-122TC/-844GG* ( $p=0,92$ ). Analiza współwystępowania genotypów polimorfizmów *-844G>A* genu *PAI-1* oraz *-122T>C* genu czynnika VII wykazała, że w całej grupie badanej oraz kontrolnej nie współwystępowały genotypy homozygotyczne *-122CC/-844GG*. (tab. 42).

**Tabela 42.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *-844G>A* genu *PAI-1* oraz *-122T>C* genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet (w nawiasach podano wartość %).

			<i>-122T&gt;C</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>	
<i>Grupa badana</i>	<i>PAI-1 -844G&gt;A</i>	<i>GG</i>	17 (11,18)	5 (3,29)	0 (0,00)	22 (14,47)
		<i>GA</i>	63 (41,45)	13 (8,55)	1 (0,66)	77 (50,66)
		<i>AA</i>	42 (27,63)	10 (6,58)	1 (0,66)	53 (34,87)
		<i>suma</i>	122 (80,26)	28 (18,42)	2 (1,32)	152 (100,0)
<i>2 poronienia</i>	<i>PAI-1 -844G&gt;A</i>	<i>GG</i>	14 (12,28)	3 (2,63)	0 (0,00)	17 (14,91)
		<i>GA</i>	46 (40,35)	11 (9,56)	1 (0,88)	58 (50,88)
		<i>AA</i>	29 (25,44)	9 (7,89)	1 (0,88)	39 (34,21)
		<i>suma</i>	89 (78,07)	23 (20,18)	2 (1,75)	114 (100,0)
<i>3 lub więcej poronień</i>	<i>PAI-1 -844G&gt;A</i>	<i>GG</i>	3 (7,89)	2 (5,26)	0 (0,00)	5 (13,16)
		<i>GA</i>	17 (44,74)	2 (5,26)	0 (0,00)	19 (50,00)
		<i>AA</i>	13 (34,21)	1 (2,63)	0 (0,00)	14 (36,84)
		<i>suma</i>	33 (86,84)	5 (13,16)	0 (0,00)	38 (100,0)
<i>I trymestr</i>	<i>PAI-1 -844G&gt;A</i>	<i>GG</i>	14 (11,38)	3 (2,44)	0 (0,00)	17 (13,82)
		<i>GA</i>	53 (43,09)	10 (8,13)	1 (0,81)	64 (52,03)
		<i>AA</i>	33 (26,83)	8 (6,50)	1 (0,81)	42 (34,15)
		<i>suma</i>	100 (81,30)	21 (17,07)	2 (1,63)	123 (100,0)
<i>I i II trymestr</i>	<i>PAI-1 -844G&gt;A</i>	<i>GG</i>	3 (10,34)	2 (6,90)	0 (0,00)	5 (17,24)
		<i>GA</i>	10 (34,48)	3 (10,34)	0 (0,00)	13 (44,83)
		<i>AA</i>	9 (31,03)	2 (6,90)	0 (0,00)	11 (37,93)
		<i>suma</i>	22 (75,86)	7 (24,14)	0 (0,00)	29 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>PAI-1 -844G&gt;A</i>	<i>GG</i>	20 (11,11)	6 (3,33)	0 (0,00)	26 (14,44)
		<i>GA</i>	61 (33,89)	20 (11,11)	1 (0,56)	82 (45,56)
		<i>AA</i>	57 (31,67)	15 (8,33)	0 (0,00)	72 (40,00)
		<i>suma</i>	138 (76,67)	41 (22,78)	1 (0,56)	180 (100,0)

W podgrupie kobiet z wywiadem położniczym obciążonym w kierunku występowania co najmniej 3 poronień odnotowano częstsze współwystępowanie genotypów *-122TT/HindIII GG* ( $p=0,97$ ) oraz rzadsze genotypów *-122TC/HindIII CG* ( $p=0,17$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast w podgrupie pacjentek z poronieniami w I i II trymestrze ciąży obserwowano rzadsze współwystępowanie genotypów *-122TC/HindIII CC* w stosunku do grupy kontrolnej ( $p=0,28$ ). U żadnej pacjentek z grupy badanej nie współwystępowały genotypy homozygotyczne *-122CC/HindIII CC*. Różnice te nie były statystycznie istotne (tab. 43).

**Tabela 43.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *HindIII C>G* genu *PAI-1* oraz *-122T>C* genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet (w nawiasach podano wartość %).

			<i>-122T&gt;C</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>	
<b>Grupa badana</b>	<b><i>HindIII PAI-1</i></b>	<b><i>CC</i></b>	41 (26,97)	11 (7,24)	0 (0,00)	52 (34,21)
		<b><i>CG</i></b>	50 (32,89)	10 (6,58)	1 (0,66)	61 (40,13)
		<b><i>GG</i></b>	31 (20,40)	7 (4,60)	1 (0,66)	39 (25,66)
		<b><i>suma</i></b>	122 (80,26)	28 (18,42)	2 (1,32)	152 (100,0)
<b>2 poronienia</b>	<b><i>HindIII PAI-1</i></b>	<b><i>CC</i></b>	32 (28,07)	8 (7,02)	0 (0,00)	40 (35,09)
		<b><i>CG</i></b>	37 (32,46)	9 (7,89)	1 (0,88)	47 (41,23)
		<b><i>GG</i></b>	20 (17,54)	6 (5,26)	1 (0,88)	27 (23,68)
		<b><i>suma</i></b>	89 (78,07)	23 (20,17)	2 (1,76)	114 (100,0)
<b>3 lub więcej poronień</b>	<b><i>HindIII PAI-1</i></b>	<b><i>CC</i></b>	9 (23,68)	3 (7,89)	0 (0,00)	12 (31,58)
		<b><i>CG</i></b>	13 (34,21)	<b>1 (2,63)</b>	0 (0,00)	14 (36,84)
		<b><i>GG</i></b>	<b>11 (28,95)</b>	1 (2,63)	0 (0,00)	12 (31,58)
		<b><i>suma</i></b>	33 (86,84)	5 (13,16)	0 (0,00)	38 (100,0)
<b>I trymestr</b>	<b><i>HindIII PAI-1</i></b>	<b><i>CC</i></b>	36 (29,27)	8 (6,50)	0 (0,00)	44 (35,77)
		<b><i>CG</i></b>	40 (32,52)	8 (6,50)	1 (0,81)	49 (39,84)
		<b><i>GG</i></b>	24 (19,51)	5 (4,07)	1 (0,81)	30 (24,39)
		<b><i>suma</i></b>	100 (81,30)	21 (17,07)	2 (1,63)	123 (100,0)
<b>I i II trymestr</b>	<b><i>HindIII PAI-1</i></b>	<b><i>CC</i></b>	<b>5 (17,24)</b>	3 (10,34)	0 (0,00)	8 (27,59)
		<b><i>CG</i></b>	10 (34,48)	2 (6,90)	0 (0,00)	12 (41,38)
		<b><i>GG</i></b>	7 (24,14)	2 (6,90)	0 (0,00)	9 (31,03)
		<b><i>suma</i></b>	22 (75,86)	7 (24,14)	0 (0,00)	29 (100,0)
<b>Grupa kontrolna</b>	<b><i>HindIII PAI-1</i></b>	<b><i>CC</i></b>	44 (24,44)	19 (10,56)	1 (0,56)	64 (35,56)
		<b><i>CG</i></b>	64 (35,56)	16 (8,89)	0 (0,00)	80 (44,44)
		<b><i>GG</i></b>	30 (16,67)	6 (3,33)	0 (0,00)	36 (20,00)
		<b><i>suma</i></b>	138(76,67)	41 (22,78)	1 (0,56)	180 (100,0)

W podgrupie pacjentek z występowaniem co najmniej 3 poronień zaobserwowano wyższą frekwencję współwystępowania genotypów homozygotycznych *-122TT/-323P0/-323P0* ( $p=0,95$ ) oraz niższą częstość współwystępowania genotypów heterozygotycznych *-122TC/-323P0/-323P10* ( $p=0,13$ ) w porównaniu do grupy kontrolnej. W całej grupie badanej oraz wśród pacjentek z wywiadem położniczym nieobciążonym w kierunku występowania poronień nie odnotowano współwystępowania genotypów *-122TT/-323P0/-323P10*, *-122TT/-323P10/-323P10*, *-122TC/-323P0/-323P0*, *-122CC/-323P0/-323P0* oraz *-122CC/-323P0/-323P10* (tab. 44).

**Tabela 44.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *-323P0/P10* oraz *-122T>C* genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet (w nawiasach podano wartość %).

			<i>-122T&gt;C</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>	
<i>Grupa badana</i>	<i>-323 P0/10</i>	<i>P0/P0</i>	122 (80,26)	0 (0,00)	0 (0,00)	122 (80,26)
		<i>P0/P10</i>	0 (0,00)	28 (18,42)	0 (0,00)	28 (18,42)
		<i>P10/P10</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (1,32)	2 (1,32)
		<i>suma</i>	122 (80,26)	28 (18,42)	2 (1,32)	152 (100,0)
<hr/>						
<i>2 poronienia</i>	<i>-323 P0/10</i>	<i>P0/P0</i>	89 (78,07)	0 (0,00)	0 (0,00)	89 (78,07)
		<i>P0/P10</i>	0 (0,00)	23 (20,17)	0 (0,00)	23 (20,17)
		<i>P10/P10</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (1,76)	2 (1,76)
		<i>suma</i>	89 (78,07)	23 (20,17)	2 (1,76)	114 (100,0)
<hr/>						
<i>3 lub więcej poronień</i>	<i>-323 P0/10</i>	<i>P0/P0</i>	33 (86,84)	0 (0,00)	0 (0,00)	33 (86,84)
		<i>P0/P10</i>	0 (0,00)	5 (13,16)	0 (0,00)	5 (13,16)
		<i>P10/P10</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	33 (86,84)	5 (13,16)	0 (0,00)	38 (100,0)
<hr/>						
<i>I trymestr</i>	<i>-323 P0/10</i>	<i>P0/P0</i>	100 (81,30)	0 (0,00)	0 (0,00)	100 (81,30)
		<i>P0/P10</i>	0 (0,00)	21 (17,07)	0 (0,00)	21 (17,07)
		<i>P10/P10</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (1,63)	2 (1,63)
		<i>suma</i>	100 (81,30)	21 (17,07)	2 (1,63)	123 (100,0)
<hr/>						
<i>I i II trymestr</i>	<i>-323 P0/10</i>	<i>P0/P0</i>	22 (75,86)	0 (0,00)	0 (0,00)	22 (75,86)
		<i>P0/P10</i>	0 (0,00)	7 (24,14)	0 (0,00)	7 (24,14)
		<i>P10/P10</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	22 (75,86)	7 (24,14)	0 (0,00)	29 (100,0)
<hr/>						
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>-323 P0/10</i>	<i>P0/P0</i>	138(76,67)	0 (0,00)	0 (0,00)	138(76,67)
		<i>P0/P10</i>	0 (0,00)	41 (22,78)	0 (0,00)	41 (22,78)
		<i>P10/P10</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (0,56)	1 (0,56)
		<i>suma</i>	138(76,67)	41 (22,78)	1 (0,56)	180 (100,0)

## 5. DYSKUSJA

### 5.1. Warianty genetyczne czynnika VII krzepnięcia a ryzyko występowania powikłań położniczych

Związek wariantów genetycznych genu czynnika VII krzepnięcia z występowaniem powikłań położniczych jest przedmiotem wielu współczesnych analiz. Stosunkowo dużo badań skupia się na polimorfizmach tego genu warunkujących niedobór czynnika VII i w związku z tym prowadzących do powstawania groźnych krwotoków w przebiegu ciąży, porodu czy połogu. Co ciekawe, u pacjentek będących nosicielami genotypu heterozygotycznego pod względem mutacji warunkujących niedobór czynnika VII w ciąży obserwuje się wzrost jego stężenia. Ryzyko groźnych krwotoków jest przy tym największe we wczesnych etapach ciąży z powodu nieadekwatnego wzrostu stężenia czynnika VII [81]. Wynika to z faktu, że w ciąży obserwuje się wzrost stężenia wszystkich czynników krzepnięcia, w tym przede wszystkim VII, VIII, X, XII, XIII oraz fibrynogenu.

W przypadku pacjentek będących nosicielami genotypu homozygotycznego pod względem mutacji warunkujących niedobór czynnika VII krzepnięcia ryzyko obfitych krwotoków w czasie ciąży, porodu, połogu czy poronienia jest znacznie podwyższone. W niektórych doniesieniach podkreśla się również wagę współistnienia niedoboru czynnika VII z niedoborami innych czynników krzepnięcia, a także z genetycznie uwarunkowaną trombofilią w etiologii poronień nawracających i innych powikłań w przebiegu ciąży. Vora i wsp. opisali przypadki kliniczne pięciu kobiet z ciężkim niedoborem czynników krzepnięcia, których wywiad położniczy był obciążony występowaniem poronień nawracających. U dwóch pacjentek występował niedobór czynnika X, u trzeciej pacjentki niedobór czynnika XI, u czwartej niedobór czynnika VII, natomiast u piątej niedobór czynnika von Willebranda. Szczegółowe badania w kierunku trombofilii wykazały obecność przeciwciał antyfosfolipidowych u czterech kobiet, przy czym u jednej z tych pacjentek odnotowano wariant -675 4G/-675 4G genu *PAI-1*. U piątej kobiety wykazano niedobór białka C. Obserwacje tych badaczy podkreślają złożoną patogenezę poronień nawracających, a także zwracają uwagę na fakt, że występowanie genetycznie uwarunkowanej trombofilii nie wyklucza jednoczesnego niedoboru czynników krzepnięcia [171].

Stosunkowo mało badań dotyczy natomiast podwyższonego stężenia i aktywności czynnika VII w surowicy i związanej z tym wzmożonej gotowości prozakrzepowej, co może skutkować występowaniem licznych powikłań w przebiegu ciąży, w tym poronień



nawracających. Problem ten był przedmiotem analizy Miller i wsp. Autorzy badania oceniali osoczną aktywność czynnika VII (FVII:C) u 65 kobiet z występowaniem co najmniej 3 poronień oraz u 31 kobiet z utratą ciąży w II lub III trymestrze. Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 81 kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym. Aktywność czynnika VII (FVII:C) była statystycznie istotnie wyższa w grupie kobiet z nawracającymi utratami ciąży. Ponadto odnotowano wyższe stężenie czynnika VII (FVIIa) w grupie pacjentek z występowaniem co najmniej 3 poronień [100]. Należy podkreślić, że liczne badania z zakresu kardiologii dowodzą związku analizowanych w prezentowanej rozprawie doktorskiej polimorfizmów genu czynnika VII krzepnięcia ze wzrostem jego stężenia oraz aktywności w surowicy.

Do nieco innych wniosków prowadzą wyniki badania Nelson i wsp. Celem tej analizy była ocena związku zaburzeń hemostatycznych z występowaniem poronień nawracających. Do grupy badanej zakwalifikowano 134 pacjentki. U wszystkich kobiet oceniono m.in. stężenie czynnika VII w surowicy. Odnotowano niższe stężenie czynnika VII oraz fibrynogenu w osoczu kobiet z obciążonym wywiadem położniczym. U pacjentek, u których stężenie czynnika VII było mniejsze niż 94% wartości prawidłowej ryzyko wystąpienia poronienia było zwiększone 3-krotnie [108].

Badania kliniczne oceniające korzyści leczenia przeciwzakrzepowego u ciężarnych pacjentek z wrodzoną trombofilią są oparte na założeniu, że genetycznie uwarunkowana skłonność do nadmiernej aktywności prozakrzepowej często manifestuje się nie tylko jako występowanie poronień nawracających, ale także porodów przedwczesnych. Celem analizy Hartel i wsp. była ocena wpływu polimorfizmów genetycznych warunkujących trombofilię lub wykazujących efekt antyzakrzepowy na częstość występowania porodu przedwczesnego. Badanie przeprowadzono w grupie 593 noworodków o małej masie urodzeniowej urodzonych przedwcześnie, 278 noworodków urodzonych o czasie oraz wśród matek dzieci z obydwu grup. Analiza genetyczna dotyczyła czynnika V Leiden, polimorfizmu *G20210A* genu protrombiny, polimorfizmu *121 del/ins* genu czynnika VII krzepnięcia oraz polimorfizmu *Val34Leu* genu czynnika XIII krzepnięcia. Zaobserwowano częstsze występowanie polimorfizmu *121 del/ins* genu czynnika VII krzepnięcia wśród noworodków urodzonych przedwcześnie (29,0 vs. 20,0 %;  $p=0,009$ ) oraz ich matek (26,2 vs. 17,6 %;  $p=0,009$ ). Wyniki tego badania wskazują na potencjalną rolę wariantów genetycznych czynnika VII krzepnięcia w powikłaniu położniczym, jakim jest poród przedwczesny [61].

### 5.1.1. Polimorfizm *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia a ryzyko występowania poronień nawracających

Większość analiz dotyczących związku czynnika VII krzepnięcia z występowaniem poronień nawracających skupia się na zmianach jego stężenia lub aktywności w surowicy krwi. Jedyną opublikowaną dotąd pracą na temat korelacji polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII z występowaniem tego powikłania położniczego jest publikacja Seremak-Mrozikiewicz i wsp., która ukazała się w 2009 roku. Należy podkreślić, że prezentowana rozprawa doktorska jest zatem drugą analizą dotyczącą powyższego zagadnienia. Autorzy publikacji Seremak-Mrozikiewicz i wsp. hipotezę badawczą oparli na licznych doniesieniach z zakresu kardiologii sugerujących związek polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII z ryzykiem występowania chorób sercowo-naczyniowych. Uważa się, że u nosicieli zmutowanego allele *Gln353* dochodzi do zmniejszenia stężenia i aktywności czynnika VII w osoczu, co wiąże się z redukcją nasilenia kaskady krzepnięcia i obniżeniem ryzyka rozwoju chorób o podłożu zakrzepowym [107, 144].

W cytowanej pracy do grupy badanej zakwalifikowano 104 kobiety, u których w wywiadzie położniczym potwierdzono wystąpienie co najmniej dwóch poronień między 6 a 13 tygodniem ciąży. Do grupy kontrolnej natomiast, włączono 163 zdrowe kobiety, u których wykluczono występowanie poronień oraz potwierdzono w wywiadzie wystąpienie co najmniej jednej ciąży zakończonej urodzeniem zdrowego, donoszonego noworodka. Analiza dotyczyła kobiet z populacji polskiej. Zaobserwowano większą częstość występowania niezmutowanego homozygotycznego genotypu *Arg353/Arg353* w grupie kobiet z występowaniem poronień (89,69% vs. 74,85% w grupie kontrolnej,  $p=0,086$ ). Ponadto odnotowano niższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego *Arg353/Gln353* wśród pacjentek z obciążonym wywiadem położniczym (17,31% vs. 25,15% w grupie kontrolnej,  $p=0,086$ ). Co więcej częstość występowania zmutowanego allele *Gln353* była większa w grupie kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (12,58% vs. 8,65% w grupie kobiet z występowaniem poronień,  $p=0,101$ ) [144].

W przedstawianej rozprawie doktorskiej częstość występowania genotypów polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia w grupie badanej pacjentek z występowaniem co najmniej dwóch poronień oraz w grupie kontrolnej nie odbiegała od wyników otrzymanych przez Seremak-Mrozikiewicz i wsp. W przypadku zmutowanego allele *Gln353* nie odnotowano jednak przewagi jego występowania w grupie kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (89,8% vs. 88,1% w grupie kontrolnej,  $p=0,28$ ). Obserwowano również porównywalną częstość występowania niezmutowanego genotypu

homozygotycznego *Arg353/Arg353* w grupie kobiet z poronieniami w porównaniu do grupy kontrolnej (80,3% vs. 76,1%,  $p=0,22$ ). W obydwu analizach nie zaobserwowano różnic istotnych pod względem statystycznym.

W dalszej części pracy Seremak-Mrozikiewicz i wsp. autorzy odnotowali niższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego *Arg353/Gln353* zarówno w podgrupie kobiet z dwoma, jak i z co najmniej trzema poronieniami w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio: 16,25% oraz 20,83% vs. 25,15%). Podobnie, w prezentowanej rozprawie doktorskiej również zaobserwowano niższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego *Arg353/Gln353* w podgrupie kobiet z dwoma, a zwłaszcza w podgrupie pacjentek z co najmniej trzema poronieniami w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio: 21,1% vs. 13,2% vs. 23,9%). Co więcej częstość występowania zmutowanego allela *Gln353* była wyraźnie niższa w podgrupie kobiet z występowaniem co najmniej 3 poronień w porównaniu do grupy kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (6,6% vs. 11,9%,  $p=0,12$ ).

W pracy Seremak-Mrozikiewicz i wsp. odnotowano niższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego *Arg353/Gln353* w podgrupie kobiet z poronieniami między 6 a 9 tc. w porównaniu do grupy kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (13,85% vs. 25,15%,  $WR=0,47$ ;  $p=0,04$ ). W trakcie analizy częstości występowania genotypu homozygotycznego *Arg353/Arg353* wykazano jego częstsze występowanie w podgrupie kobiet z utratami ciąży między 6 a 9 tc. (86,15% vs. 74,85%,  $WR=2,1$ ;  $p=0,04$ ), w podgrupie z poronieniami między 10 a 13 tc. (75,00% vs. 74,85%,  $p=ns$ ), jak również w podgrupie, w której niepowodzenia położnicze miały miejsce między 6 a 13 tc. (78,26% vs. 74,85%,  $p=ns$ ) w porównaniu do grupy kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym [144]. Także w przedstawianej rozprawie doktorskiej po uwzględnieniu podziału całej grupy badanej na podgrupy w zależności od trymestru ciąży, w którym miało miejsce niepowodzenie odnotowano podobne zależności. Obserwowano niższą frekwencję genotypu heterozygotycznego *Arg353/Gln353* zarówno w podgrupie kobiet z poronieniami w I trymestrze ciąży (19,5% vs. 23,9%,  $p=0,22$ ), jak i w podgrupie pacjentek z utratami ciąży w I i II trymestrze w porównaniu do grupy kontrolnej (17,2% vs. 23,9%,  $p=0,30$ ). Ponadto zwraca uwagę wyraźnie niższa frekwencja zmutowanego allela *Gln353* w podgrupie pacjentek z występowaniem poronień zarówno w I, jak i w II trymestrze ciąży w porównaniu do grupy kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (8,6% vs. 11,9%,  $p=0,31$ ).

Otrzymane wyniki sugerują słaby związek badanego polimorfizmu z częstością występowania poronień nawracających. Zwraca jednak uwagę mniejsza częstość występowania genotypu heterozygotycznego *Arg353/Gln353* oraz niższa częstość występowania zmutowanego allela *Gln353* w podgrupach pacjentek z obciążonym wywiadem położniczym. Może to sugerować ochronną rolę zmutowanego allela *Gln353* w stosunku do występowania poronień. Podobnych wniosków dostarcza analiza Seremak-Mrozikiewicz i wsp. [144].

### **5.1.2. Polimorfizm -323P0/P10 genu czynnika VII krzepnięcia a ryzyko występowania poronień nawracających**

Analiza dostępnej ogólnosiwiatowej literatury pozwala stwierdzić, że prezentowana rozprawa doktorska jest pierwszą próbą oceny związku polimorfizmu -323P0/P10 genu czynnika VII krzepnięcia z ryzykiem występowania poronień nawracających. Badania dotyczące powyższego wariantu genetycznego skupiają się głównie na jego udziale w rozwoju chorób sercowo-naczyniowych, u których podłoża leżą zaburzenia zakrzepowe. Co ciekawe, wnioski wynikające z tych analiz nie są jednoznaczne. Wyniki niektórych prac wskazują na protekcyjną rolę zmutowanego allela -323P10 w stosunku do rozwoju choroby niedokrwiennej serca, inne, przeciwnie – dowodzą jego udziału w zwiększeniu ryzyka wystąpienia m.in. zawału serca [10, 67, 104, 137]. Doniesienia te, które przedstawiono szerzej w kolejnym podrozdziale pracy, były podstawą wyboru polimorfizmu -323P0/P10 genu czynnika VII krzepnięcia do badania w aspekcie ryzyka występowania nawracających utrat ciąży.

Otrzymane wyniki sugerują związek polimorfizmu -323P0/P10 z ryzykiem występowania poronień nawracających. Zwraca uwagę nieco wyższa frekwencja niezmutowanego genotypu homozygotycznego -323P0/-323P0 (80,26% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,25$ ) oraz niższa częstość występowania genotypu heterozygotycznego -323P0/-323P10 w grupie badanej (18,42% vs. 22,78% w grupie kontrolnej,  $p=0,20$ ). Podobną zależność obserwowano również po dokonaniu podziału całej grupy badanej na podgrupy w zależności od ilości poronień w wywiadzie. Szczególnie wyraźnie różnice te są widoczne w podgrupie pacjentek z występowaniem co najmniej 3 poronień (genotyp -323P0/-323P0: 86,84% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,12$ ; genotyp -323P0/-323P10: 13,16% vs. 22,78% w grupie kontrolnej,  $p=0,13$ ). W tej podgrupie pacjentek zwraca również uwagę

niższa częstość występowania zmutowanego allela *-323P10* (6,58% vs. 11,94% w grupie kontrolnej,  $p=0,12$ ).

Odnotowane zależności sugerują protekcyjną rolę zmutowanego allela *-323P10* w stosunku do występowania poronień, zwłaszcza w podgrupie pacjentek z co najmniej 3 utratami ciąży. Jednak po uwzględnieniu podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od trymestru, w którym doszło do utraty ciąży powyższe założenie nie znajduje pełnego odzwierciedlenia. W trakcie analizy podgrupy kobiet, u których poronienia miały miejsce zarówno w I, jak i w II trymestrze ciąży odnotowano podobną częstość występowania niezmutowanego genotypu homozygotycznego *-323P0/-323P0* (75,86% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,54$ ) oraz nieznacznie wyższą genotypu heterozygotycznego *-323P0/-323P10* (24,14% vs. 22,78% w grupie kontrolnej,  $p=0,52$ ). Jednak biorąc pod uwagę fakt, że zależność polegająca na wyższej częstości niezmutowanego genotypu homozygotycznego *-323P0/-323P0* oraz niższej genotypu heterozygotycznego *-323P0/-323P10* była obserwowana w podgrupie kobiet z utratami ciąży występującymi tylko w I trymestrze, można założyć protekcyjną rolę zmutowanego allela *-323P10* w stosunku do poronień mających miejsce we wczesnych etapach ciąży, zwłaszcza w podgrupie kobiet z występowaniem co najmniej 3 utrat ciąży.

### **5.1.3. Polimorfizm *-122T>C* genu czynnika VII krzepnięcia a ryzyko występowania poronień nawracających**

Należy zaznaczyć, że przeprowadzona w prezentowanej rozprawie doktorskiej analiza korelacji polimorfizmu *-122T>C* genu czynnika VII krzepnięcia z ryzykiem występowania poronień nawracających jest pierwszym tego typu badaniem. Dostępna ogólnosiwiatowa literatura nie zawiera żadnych pozycji dotyczących tego zagadnienia.

Otrzymane wyniki wskazują na możliwą rolę polimorfizmu *-122T>C* genu czynnika VII krzepnięcia w zwiększeniu ryzyka nawracających utrat ciąży. Wskazuje na to nieco wyższa częstość występowania niezmutowanego genotypu *-122TT* u wszystkich pacjentek z grupy badanej (80,26% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,25$ ) oraz wyższa częstość genotypu heterozygotycznego *-122TC* u kobiet z grupy z nieobciążonym wywiadem położniczym (18,42% vs. 22,78% w grupie kontrolnej,  $p=0,20$ ). Zależności te są widoczne znacznie wyraźniej po dokonaniu podziału całej grupy badanej w zależności od ilości poronień w wywiadzie oraz trymestru, w którym miały miejsce utraty ciąży.

Wśród pacjentek, u których wystąpiły co najmniej 3 poronienia zaobserwowano wyższą częstość występowania niezmutowanego genotypu homozygotycznego *-122TT* (86,84% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,12$ ). Z kolei genotyp heterozygotyczny *-122TC* wykazywał wyższą frekwencję w grupie kontrolnej (13,16% w grupie kobiet z co najmniej 3 poronieniami vs. 22,78% w grupie kontrolnej,  $p=0,13$ ). Co więcej częstość występowania alleli powyższego polimorfizmu różniła się pomiędzy analizowanymi grupami kobiet. Częstość występowania niezmutowanego allela *-122T* była wyższa w podgrupie pacjentek z występowaniem co najmniej 3 poronień (93,42% vs. 88,06% w grupie kontrolnej,  $p=0,12$ ). Odwrotną sytuację obserwowano dla zmutowanego allela *-122C*, który częściej występował w grupie kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (6,58% vs. 11,94% w grupie kontrolnej,  $p=0,12$ ). Natomiast w podgrupie kobiet, u których poronienia miały miejsce tylko w I trymestrze zwracało uwagę częstsze występowanie niezmutowanego genotypu homozygotycznego *-122TT* (81,30% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,21$ ) oraz niższa częstość genotypu heterozygotycznego *-122TC* (17,07% vs. 22,78% w grupie kontrolnej,  $p=0,14$ ).

Otrzymane wyniki sugerują możliwą protekcyjną rolę zmutowanego allela *-122C* w stosunku do ryzyka wystąpienia poronień nawracających, szczególnie w podgrupie kobiet z co najmniej 3 utratami ciąży.

Ciekawą obserwacją dotyczącą wariantów *-323P0/P10* oraz *-122T>C* genu czynnika VII krzepnięcia jest identyczna częstość występowania poszczególnych genotypów i alleli tych polimorfizmów w grupie pacjentek z występowaniem poronień oraz w grupie kontrolnej. Taki sam rozkład genotypów i alleli obserwowano również po dokonaniu podziału całej grupy badanej na podgrupy w zależności od tygodnia ciąży, w którym miało miejsce niepowodzenie oraz w zależności od ilości poronień. Van't Hooft i wsp. przeprowadzili jedną z nielicznych analiz, w której jednocześnie oceniono częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmów *-323P0/P10*, *-122T>C*, *-401G>T*, *-402G>A* oraz *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia. Badanie, do którego włączono 183 zdrowych mężczyzn w średnim wieku dotyczyło związku powyższych wariantów genetycznych ze stężeniem czynnika VII w surowicy krwi. Należy zaznaczyć, że autorzy tego opracowania również zwrócili uwagę na identyczną częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmów *-323P0/P10* oraz *-122T>C* [169].

## 5.2. Znaczenie polimorfizmów genu czynnika VII krzepnięcia w rozwoju chorób o etiologii zakrzepowej

Uważa się, że jedną z przyczyn występowania nawracających utrat ciąży są zaburzenia prowadzące do rozwoju trombofilii. Co więcej, wiele badań dowodzi roli trombofilii również w patogenezie innych powikłań położniczych, takich jak stan przedrzucawkowy i rzucawka, przedwczesne oddzielenie łożyska, wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu czy zgon wewnątrzmaciczny. Z drugiej strony nie jest do końca jasne czy proces zakrzepowy jest zjawiskiem pierwotnym, czy też wtórnym w etiologii poronień u pacjentek z trombofilią. Jednak liczne badania wykazują, że stosowanie heparyny może zmniejszać częstość występowania poronień nawracających u pacjentek z trombofilią wrodzoną. Wskazuje to na istotny efekt antykoagulacyjny heparyny w zapobieganiu rozwojowi tego powikłania położniczego [14, 17, 51, 58, 60, 101].

Analizowane w prezentowanej rozprawie doktorskiej polimorfizmy genu czynnika VII są w większości po raz pierwszy badane w aspekcie związku ze zwiększeniem ryzyka poronień nawracających. Jedyne dostępne w międzynarodowej literaturze doniesienie na ten temat dotyczy korelacji mutacji *Arg353Gln* z występowaniem powyższego powikłania położniczego. Polimorfizmy *-323P0/P10* oraz *-122T>C* zostały ocenione w kontekście poronień nawracających po raz pierwszy w przedstawianej pracy. Przy wyborze badanych w pracy wariantów genetycznych czynnika VII kierowano się założeniem, że polimorfizmy te mogą warunkować trombofilie wrodzone a tym samym być czynnikiem ryzyka występowania poronień nawracających. Hipotezę tę oparto na licznych doniesieniach, głównie z zakresu kardiologii, dowodzących związku badanych polimorfizmów z rozwojem chorób o etiologii zakrzepowej. Należy przede wszystkim podkreślić wpływ analizowanych wariantów genetycznych na zwiększenie stężenia i aktywności czynnika VII, co warunkuje nadmierną gotowość prozakrzepową. W trakcie ciąży, przy towarzyszącym fizjologicznym wzroście stężenia niektórych czynników krzepnięcia może to skutkować zwiększeniem ryzyka wystąpienia licznych powikłań położniczych, w tym poronienia.

### 5.2.1. Znaczenie polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia w etiologii chorób o podłożu zakrzepowym

W ciągu ostatnich lat wykazano, że podwyższone stężenie czynnika VII w surowicy jest czynnikiem ryzyka niedokrwiennych chorób sercowo-naczyniowych. Potwierdzają to m.in. dane uzyskane przez grupę *Northwick Park Heart Study* wskazujące na podwyższone stężenie czynnika VII jako na marker predykcyjny zawału serca. Zwiększenie aktywności czynnika VII w osoczu o wartość jednego odchylenia standardowego (25% normy) wiązało się ze zwiększeniem ryzyka zawału serca o 62% w ciągu kolejnych 5 lat. Dla porównania wzrost stężenia cholesterolu o jedno odchylenie standardowe zwiększa ryzyko zawału serca o 47% [98].

W badaniu Iacoviello i wsp. analizowano polimorfizm *Arg353Gln* genu czynnika VII w aspekcie ryzyka wystąpienia zawału serca. Do grupy badanej zakwalifikowano 165 osób powyżej 45 roku życia z obciążonym wywiadem w kierunku wystąpienia zawału serca oraz których krewny I stopnia również przebył zawał serca i/lub udar mózgu przed 65 rokiem życia. Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 225 osób powyżej 45 roku życia, u których wykluczono występowanie zawału serca, choroby niedokrwiennej serca, niedokrwienego udaru mózgu oraz przemijających ataków niedokrwiennych (TIA – *transient ischemic attacks*). Również wywiad rodzinny osób z grupy kontrolnej był nieobciążony występowaniem powyższych chorób. U wszystkich osób oznaczono ponadto aktywność i stężenie czynnika VII w surowicy. Badanie przeprowadzono wśród populacji włoskiej. U nosicieli zmutowanego genotypu homozygotycznego *Gln353/Gln353* odnotowano niższe ryzyko wystąpienia zawału serca. Natomiast niezmutowany genotyp homozygotyczny *Arg353/Arg353* wiązał się z najwyższym ryzykiem zawału serca. Częstość występowania zmutowanego allela *Gln353* była niższa u pacjentów w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej. Co więcej u nosicieli genotypu *Gln353/Gln353* aktywność i stężenie czynnika VII w surowicy były istotnie niższe niż u nosicieli genotypu *Arg353/Arg353*. U pacjentów z niską aktywnością czynnika VII ryzyko wystąpienia zawału serca było mniejsze niż w przypadku prawidłowej lub podwyższonej aktywności czynnika VII. Niższa częstość występowania zmutowanego allela *Gln353* wśród osób z wywiadem rodzinnym obciążonym w kierunku występowania zawału serca oraz niedokrwienego udaru mózgu sugeruje jego ochronną rolę w rozwoju chorób o etiologii zakrzepowej [69].

Celem pracy Mrozikiewicz i wsp. była ocena wpływu polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia na ryzyko wystąpienia powikłań po przezskórnej śródnaczyniowej angioplastyce wieńcowej (PTCA – *percutaneous transluminal coronary angioplasty*),



kierunkowej tnącej aterektomii (DCA – *directional coronary atherectomy*) oraz zakładaniu stentów. Istnieją dowody na rolę zewnątrzpochodnego szlaku krzepnięcia, w którego aktywację zaangażowany jest właśnie czynnik VII, w wewnątrznaczyniowym tworzeniu skrzepów po uszkodzeniu ściany naczynia. W oparciu o te doniesienia oraz o dowody na związek allelela *Gln353* ze zmniejszonym ryzykiem wystąpienia chorób o etiologii zakrzepowej, w tym zawału serca, Mrozikiewicz i wsp. analizowali polimorfizm *Arg353Gln* w aspekcie powikłań po przezskórnych interwencjach wieńcowych, których podstawowym mechanizmem patofizjologicznym jest formowanie zakrzepów. Do badania przeprowadzonego w populacji niemieckiej włączono 666 pacjentów z chorobą niedokrwienną serca, którzy poddani byli przezskórnej interwencji wieńcowej. Wystąpienie powikłań (zawał serca, zgon, potrzeba rewaskularyzacji) oceniano w przebiegu 30 dni po zabiegu. Powikłania te wystąpiły u 43 pacjentów, przy czym u 42 rozwinęły się w pierwszych 7 dniach po zabiegu. Odnotowano jeden przypadek zgonu. Wśród tych 43 pacjentów 4 osoby były nosicielami genotypu heterozygotycznego *Arg353/Gln353*, a 39 nosicielami genotypu homozygotycznego *Arg353/Arg353*. Nie odnotowano występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego *Gln353/Gln353* w grupie pacjentów z wystąpieniem powikłań. Częstość występowania powikłań wynosiła 2,5% u nosicieli zmutowanego allelela *Gln353* oraz 7,7% u nosicieli niezmutowanego genotypu homozygotycznego *Arg353/Arg353* ( $p=0,013$ ). Co więcej, zaobserwowano redukcję ryzyka wystąpienia powikłań u nosicieli zmutowanego allelela *Gln353* w porównaniu do nosicieli niezmutowanego genotypu homozygotycznego *Arg353/Arg353* (odpowiednio: ponowna rewaskularyzacja 1,9% vs. 5,3%, zawał serca 0,6% vs. 2,2%, zgon 0% vs. 0,2%) [107].

Oceniono również aktywność i stężenie czynnika VII w surowicy. Aktywność czynnika VII była niższa odpowiednio o 20,7% ( $p=0,001$ ) oraz 36,3% ( $p=0,04$ ) u nosicieli genotypu heterozygotycznego *Arg353/Gln353* oraz zmutowanego genotypu homozygotycznego *Gln353/Gln353* w porównaniu do nosicieli niezmutowanego genotypu homozygotycznego *Arg353/Arg353*. Podobnie, odnotowano zmniejszenie stężenia czynnika VII odpowiednio o 30,9% ( $p=0,05$ ) i o 49,0% ( $p=0,12$ ). Autorzy sugerują, że polimorfizm *Arg353Gln* jest polimorfizmem funkcjonalnym, przy czym obserwuje się tzw. *gene-dose effect*. Wyraża się to redukcją aktywności czynnika VII o 21% u nosicieli genotypu heterozygotycznego *Arg353/Gln353* oraz o 36% u nosicieli zmutowanego genotypu homozygotycznego *Gln353/Gln353*. Analogiczna zależność dotyczy stężenia czynnika VII w surowicy, gdzie w przypadku nosicieli zmutowanego genotypu homozygotycznego *Gln353/Gln353* stężenie to obniża się o 49% [107].

Kolejnym badaniem dowodzącym związku omawianego polimorfizmu z występowaniem powikłań zakrzepowych jest analiza Pushkov i wsp. przeprowadzona w populacji rosyjskiej. Do badania włączono 1145 pacjentów hospitalizowanych w oddziałach kardiologicznych z wywiadem obciążonym w kierunku występowania ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego. U wszystkich osób oznaczono częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Ala455Val* genu trombomoduliny oraz *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia. Wyniki analizy genetycznej zestawiono z występowaniem w trakcie obserwacji trwającej 62,5 miesiąca zawału serca lub udaru niedokrwiennego mózgu. Wśród kobiet ryzyko wystąpienia tych chorób było wyższe u nosicielek zmutowanego allela *Val455* oraz genotypu heterozygotycznego niezmutowanego *Arg353/Arg353*. Takiej zależności nie odnotowano u mężczyzn. U kobiet, które były nosicielkami zmutowanego allela *Val455* oraz niezmutowanego genotypu heterozygotycznego *Arg353/Arg353* ryzyko wystąpienia powikłań w trakcie leczenia po epizodzie ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego (zawał serca, udar niedokrwienne mózgu) była znacznie wyższe niż wśród kobiet, które były nosicielkami niezmutowanego homozygotycznego genotypu *Ala455/Ala455* oraz zmutowanego allela *Gln353*. Co więcej powikłania te pojawiały się wcześniej w pierwszej podgrupie pacjentek (po 40,5 vs. 50,6 miesiąca). Badanie to ponownie dowodzi prawdopodobnej ochronnej roli allela *Gln353* w stosunku do rozwoju zmian zakrzepowych [123].

Badanie przeprowadzone w bardzo dużej liczbie grupie osób przedstawiono w publikacji Fujimaki i wsp. Do grupy badanej włączono 1339 pacjentów z przewlekłą chorobą nerek (z czego u 496 wystąpił zawał serca) oraz 843 osób stanowiących grupę kontrolną. Badanie dotyczyło populacji japońskiej. Analizowano 248 polimorfizmów 181 genów w celu ustalenia genetycznej predyspozycji do wystąpienia zawału serca wśród pacjentów z przewlekłą chorobą nerek. Wykazano istotny związek polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia niedokrwienia mięśnia sercowego. Co więcej, dowiedziono, że zmutowany allel *Gln353* pełni rolę ochronną w stosunku do wystąpienia tego powikłania zakrzepowego [49].

Protekcijnej roli allela *Gln353* dowodzą również wyniki badania Ekstrom i wsp. Autorzy tej pracy oceniali związek pomiędzy stanem zapalnym a wariantami genetycznymi czynnika VII krzepnięcia u 387 pacjentów po zawale serca oraz u 387 zdrowych osób stanowiących grupę kontrolną. U wszystkich osób oceniono stężenie białka C-reaktywnego (CRP – *C-reactive protein*), stężenie i aktywność czynnika VII, stężenie fibrynogenu i interleukiny-6 oraz częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Arg353Gln*. Stężenie CRP, fibrynogenu oraz interleukiny-6 było wyższe wśród pacjentów z grupy

badanej. Stężenie czynnika VII było niższe wśród osób po zawale serca w porównaniu do grupy kontrolnej, natomiast aktywność czynnika VII pozostawała podobna w obydwu analizowanych grupach. Nie odnotowano istotnych różnic co do częstości allelela *Gln353*, jednak jego obecność wiązała się z niższym stężeniem i aktywnością czynnika VII u osób z obu analizowanych grup. Obserwowany stan zapalny o niewielkim nasileniu 3 miesiące po zawale serca nie jest najważniejszym czynnikiem wpływającym na stężenie czynnika VII krzepnięcia. Obecność allelela *353Gln* poprzez wpływ na obniżenie stężenia i aktywności czynnika VII w surowicy może odgrywać protekcyjną rolę w stosunku do ryzyka zawału serca [43].

### **5.2.2. Znaczenie polimorfizmu -323P0/P10 genu czynnika VII krzepnięcia w rozwoju chorób o etiologii zakrzepowej**

Choroba niedokrwienna serca jest jedną z głównych przyczyn zgonów w krajach rozwijających się. Jest to patologia uwarunkowana wieloczynnikowo, na rozwój której duży wpływ mają zarówno czynniki środowiskowe, jak również komponenta genetyczna. Aktywacja koagulacji odgrywa istotną rolę w formowaniu się zakrzepu, w związku z czym zmiany w układzie krzepnięcia wpływają na nasilenie choroby niedokrwiennej serca. Wysokie stężenie czynnika VII może wzmacniać aktywację kaskady krzepnięcia w trakcie przerywania blaszki miażdżycowej, co istotnie zwiększa ryzyko zmian zakrzepowych. Te obserwacje, łącznie z doniesieniami na temat wpływu wariantów genetycznych na stężenie i aktywność czynnika VII skłoniły badaczy Mo i wsp. do przeprowadzenia metaanalizy dotyczącej związku wybranych polimorfizmów genu czynnika VII krzepnięcia, w tym polimorfizmu -323P0/P10 z ryzykiem rozwoju choroby niedokrwiennej serca w różnych populacjach. Przeanalizowano łącznie 39 badań przeprowadzonych w dużych liczebnie populacjach, z czego 12 dotyczyło wariantu -323P0/P10. Ostatecznie ryzyko zawału serca w związku z powyższym wariantem genetycznym oceniono u 2862 osób stanowiących grupę badaną oraz u 4240 osób zakwalifikowanych do grupy kontrolnej. Wartość *p* była niższa niż 0,001, co potwierdza znaczenie zmutowanego allelela -323P10 w etiologii choroby niedokrwiennej serca [104].

Kolejnych dowodów na związek polimorfizmu -323P0/P10 genu czynnika VII krzepnięcia z ryzykiem rozwoju zmian zakrzepowych dostarcza praca Ben-Hadj-Khalifa i wsp., gdzie grupę badaną stanowiło 308 pacjentów z rozpoznaniem ostrym incydentem sercowo-naczyniowym oraz 312 osób włączonych do grupy kontrolnej. Oceniono stężenie

czynnika VII w surowicy, które było statystycznie istotnie wyższe wśród pacjentów z grupy badanej. Stężenie to korelowało z ciężkością przebiegu choroby. W trakcie analizy genetycznej autorzy opracowania poza polimorfizmem *-323P0/P10*, analizowali również wariant *Arg353Gln* genu czynnika VII. Nosicielstwo zmutowanego allela *Gln353* związane było z redukcją stężenia czynnika VII w surowicy, jednak co ciekawe, rozkład genotypów tego polimorfizmu był porównywalny w grupie badanej i kontrolnej. U nosicieli zmutowanego allela *-323P10*, mimo iż nie odnotowano jego wpływu na stężenie czynnika VII, zaobserwowano wzrost ryzyka wystąpienia ostrego incydentu sercowo-naczyniowego [10].

Celem pracy Sakowicz i wsp. była ocena związku polimorfizmu *-323P0/P10* oraz *IVS7* genu czynnika VII krzepnięcia z ryzykiem wystąpienia zawału serca u osób poniżej 45 roku życia. Badanie przeprowadzono w populacji polskiej. Do grupy badanej włączono 266 pacjentów z wywiadem obciążonym w kierunku wystąpienia zawału serca poniżej 45 roku życia, natomiast grupę kontrolną stanowiło 137 zdrowych osób w wieku powyżej 45 lat. U nosicieli zmutowanego allela *-323P10* odnotowano zmniejszone ryzyko zawału serca (WR = 0,40; 95%PU = 0,20 – 0,80). Mimo iż badanie to potwierdza związek polimorfizmu *-323P0/P10* z rozwojem chorób o podłożu zakrzepowym, to otrzymane przez autorów wyniki odbiegają od obserwacji innych badaczy. W cytowanych w niniejszej rozprawie opracowaniach obecność zmutowanego allela *-323P10* wiązała się ze zwiększeniem ryzyka rozwoju powikłań o etiologii zakrzepowej. W pracy Sakowicz i wsp. odnotowano jednak protekcyjny wpływ tego allela w stosunku do ryzyka wystąpienia zawału serca. Nie zaobserwowano związku polimorfizmu *IVS7* z ryzykiem wystąpienia niedokrwienia mięśnia sercowego [137].

Podobnych wniosków dostarcza analiza Huang i wsp., gdzie również wykazano protekcyjną rolę zmutowanego allela *-323P10* w stosunku do rozwoju zawału serca. Analizę przeprowadzono w dużej liczbie grupie 1020 pacjentów z potwierdzoną w badaniu angiograficznym chorobą niedokrwinną serca. Do grupy kontrolnej włączono 1112 zdrowych osób. Badanie genetyczne dotyczyło rozkładu genotypów i alleli polimorfizmów *-323P0/P10*, *R353Q* oraz *HVR4* genu czynnika VII krzepnięcia. Wyniki badania wskazują na protekcyjną rolę zmutowanego allela *-323P10* [67].

### **5.2.3. Znaczenie polimorfizmu -122T>C genu czynnika VII krzepnięcia w rozwoju chorób o etiologii zakrzepowej**

Większość analiz dotyczących polimorfizmu -122T>C genu czynnika VII krzepnięcia przedstawiana jest w aspekcie związku haplotypów, które współtworzy również ten wariant genetyczny z ryzykiem wystąpienia konkretnych chorób. Należy zwrócić uwagę na fakt, że istnieją jedynie nieliczne doniesienia na temat powyższego polimorfizmu, a dotyczą one głównie zagadnień z zakresu kardiologii. Autorami jednego z nich są Reiner i wsp., którzy analizowali związek haplotypów genu czynnika VII z ryzykiem chorób sercowo-naczyniowych w dwóch dużych badaniach populacyjnych przeprowadzonych w Stanach Zjednoczonych. Jedno z badań (n=671) dotyczyło związku haplotypów genu czynnika VII z ryzykiem wystąpienia powikłań zakrzepowych, w tym zawału serca w grupie kobiet w średnim wieku. Drugie natomiast (n=1040), było badaniem kohortowym na temat czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych w grupie młodych mężczyzn. W analizie uwzględniono 20 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, przy czym zwrócono uwagę na występowanie trzech głównych grup haplotypów (stanowiących 98%), jedną z nich współtworzyły allele polimorfizmu -122T>C. W badaniu dotyczącym kobiet odnotowano redukcję stężenia czynnika VII i obniżenie ryzyka wystąpienia zawału serca u nosicielek tego haplotypu. Ochronny wpływ powyższego haplotypu nie był natomiast obserwowany po uwzględnieniu dodatkowych czynników ryzyka, takich jak wysoki wskaźnik BMI, hipercholesterolemia, cukrzyca, niskie stężenie cholesterolu frakcji HDL. Podobnie w analizie dotyczącej mężczyzn haplotyp współtworzony przez allele polimorfizmu -122T>C korelował z niższym stężeniem czynnika VII [129].

### **5.2.4. Znaczenie innych polimorfizmów genu czynnika VII krzepnięcia w etiologii chorób o podłożu zakrzepowym**

Polimorfizmy -402G>A oraz -401G>T genu czynnika VII znajdują się w jego odcinku promotorowym. W pracy van't Hooft i wsp. wykazano, że są one istotnie związane z poziomem transkrypcji genu czynnika VII w badaniu *in vitro* na komórkach z linii HepG2, a ponadto mają istotny udział w zmienionym osoczym stężeniu czynnika VII *in vivo*. Zaobserwowano, że allel -401T jest związany z obniżeniem nasilenia podstawowej transkrypcji genu, natomiast allel -402A wywołuje odwrotny efekt. Odnotowano istotną korelację pomiędzy obydwojma powyższymi polimorfizmami a całkowitym stężeniem oraz stężeniem aktywowanego czynnika VII w osoczu [169].

W analizie van't Hooft i wsp. grupę badaną stanowiło 183 zdrowych mężczyzn w średnim wieku z populacji szwedzkiej. Łączna analiza powyższych polimorfizmów wykazała 18% zmianę w przypadku całkowitego stężenia i 28% zmianę stężenia aktywnego czynnika VII. Ponadto zaobserwowano, że wpływ polimorfizmu *-401G>T* na aktywność czynnika VII był znacznie silniejszy niż polimorfizmu *-402G>A*. Przy czym oba warianty genetyczne wykazywały podobny efekt co do stężenia czynnika VII [169].

Uważa się, że obecność allelela *-401T* wiąże się z wyraźną redukcją transkrypcji genu czynnika VII i obniżeniem całkowitego stężenia czynnika VII w surowicy. Natomiast wzmagający transkrypcję wpływ allelela *-402A* jest relatywnie słaby. Jednak na poziomie populacyjnym całkowity efekt obecności polimorfizmów *-402G>A* oraz *-401G>T* genu czynnika VII jest porównywalny z uwagi na 3-krotnie wyższą częstość występowania allelela *-402A* w porównaniu do allelela *-401T*. Prawdopodobnie powyższe warianty genetyczne wpływają na wiązanie się białek jądrowych do promotora genu czynnika VII w hepatocytach przez co zmieniają jego ekspresję i stopień sekrecji czynnika VII przez wątrobę. Skutkuje to zmniejszonym (allel *-401T*) lub zwiększonym (allel *-402A*) stężeniem czynnika VII w osoczu. Molekularne podstawy tych zależności nie są do końca wyjaśnione [169].

Również w przypadku polimorfizmu *-402G>A* genu czynnika VII krzepnięcia odnotowano związek z ryzykiem wystąpienia choroby niedokrwiennej serca. W publikacji Kang i wsp. analizie genetycznej mającej na celu ocenę częstości występowania genotypów i alleleli powyższego wariantu genetycznego poddano 60 pacjentów z chorobą niedokrwinną serca oraz 149 zdrowych osób stanowiących grupę kontrolną. Ponadto oznaczono aktywność i stężenie czynnika VII w surowicy, które były statystycznie istotnie wyższe w grupie badanej. Co więcej, w przypadku stężenia czynnika VII zaobserwowano pozytywną korelację ze zmutowanym genotypem homozygotycznym *-402AA*. Pozwoliło to autorom wysunąć wniosek o pośredniej roli polimorfizmu *-402G>A* w rozwoju choroby niedokrwiennej serca poprzez regulację stężenia czynnika VII w surowicy [77].

Stężenie czynnika VII krzepnięcia koreluje nie tylko z ryzykiem wystąpienia zawału serca, ale również, jak wynika z obserwacji tego samego zespołu badaczy Kang i wsp., z ryzykiem udaru niedokrwiennej mózgu. Autorzy cytowanej publikacji analizowali związek wariantów genetycznych czynnika VII, w tym polimorfizmów *-402G>A*, *-401G>T*, *5'F7A1/A2*, *IVS7* oraz *Arg353Gln* ze stężeniem czynnika VII w surowicy oraz z występowaniem ostrego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego. Wybór powyższych wariantów genetycznych był podyktowany istnieniem doniesień potwierdzających

uwarunkowanie stężenia czynnika VII czynnikami środowiskowymi, jak również genetycznymi. Substytucja argininy glutaminą w pozycji 353 oraz 10-nukleotydowa insercja w odcinku promotorowym genu (*5'F7*) mogą odpowiadać za jedną trzecią zmian stężenia czynnika VII w surowicy. Natomiast polimorfizm *-401G>T* - za 18% tych zmian. Co więcej te warianty genetyczne zwykle związane są z obniżeniem stężenia czynnika VII. Natomiast zmutowany allel *-402A*, który odpowiada za 28% zmian, związany jest ze wzrostem tego stężenia. Badaniem objęto 62 pacjentów, u których potwierdzono udar niedokrwienny mózgu za pomocą rezonansu magnetycznego, grupę kontrolną stanowiło 149 zdrowych osób. Wyniki analizy Kang i wsp. wskazują jednoznacznie, że podwyższone stężenie czynnika VII w surowicy odgrywa istotną rolę w etiopatogenezie powikłań zakrzepowych w przebiegu udaru niedokrwiennego mózgu. Nie odnotowano natomiast istotnych różnic w częstości występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów pomiędzy analizowanymi grupami. Jednak wykazany związek badanych polimorfizmów z modulacją stężenia czynnika VII krzepnięcia w surowicy pozwala zakładać ich udział w etiologii powikłań niedokrwiennych, w tym udaru mózgu [78].

Podobne konkluzje wynikają z obserwacji Bozzini i wsp., którzy w swojej analizie oceniali związek polimorfizmów genu czynnika VII krzepnięcia, w tym polimorfizmu *-402G>A* z ryzykiem wystąpienia zawału serca wśród 934 pacjentów z zaawansowaną chorobą niedokrwienną serca. Odnotowano, że obecność zmutowanego allela *-402A* korelowała z istotnym statystycznie zwiększeniem stężenia czynnika VII w surowicy u mężczyzn. Co więcej, wśród mężczyzn nosicieli zmutowanego allela *-402A* z ciężką postacią choroby niedokrwiennej serca zaobserwowano wzrost ryzyka zawału serca (WR=1,79; 95% PU 1,15-2,80) [15].

Warfaryna będąca antagonistą witaminy K stosowana jest jako doustny środek przeciwkrzepliwy. Dawka warfaryny stosowana w celu wywołania efektu antykoagulacyjnego jest osobniczo zmienna. Prawdopodobnie jest to uwarunkowane licznymi czynnikami genetycznymi, z których tylko część jest związana z wariantami cytochromu CYP2C9. Wydaje się, że polimorfizmy genów kodujących czynniki krzepnięcia zależne od witaminy K, w tym czynnika VII mogą odpowiadać za zmienną wrażliwość na warfarynę. Te założenia były podstawą analizy D'Ambrosio i wsp., którzy w grupie 147 pacjentów przyjmujących warfarynę ze wskazań kardiologicznych badali frekwencję genotypów i alleli wybranych polimorfizmów, w tym wariantów *-402G>A* oraz *-401G>T* genu czynnika VII krzepnięcia. Ocenianym punktem końcowym analizy był wpływ tych mutacji na osobniczą wrażliwość na warfarynę w celu uzyskania pożądanego efektu antykoagulacyjnego. Zaobserwowano, że u

nosicieli niezmutowanego homozygotycznego genotypu *-401GG* stosowana dawka warfaryny była wyższa niż u nosicieli zmutowanego allele *-401T*. Pośrednio dowodzi to możliwej roli powyższych wariantów genetycznych w regulacji kaskady krzepnięcia i ewentualnych jej zaburzeń [31].

**Tabela 45.** Częstość występowania w populacji ogólnej prezentowanych powyżej polimorfizmów genu czynnika VII krzepnięcia.

<b>Polimorfizm</b>	<b>Allele</b>	<b>Częstość występowania w populacji ogólnej</b>	<b>Autor</b>
<i>Arg353Gln</i>	<i>Arg353</i>	0,80	Green i wsp., 1991
	<i>Gln353</i>	0,20	
<i>-402G&gt;A</i>	<i>-402G</i>	0,71	Van't Hooft i wsp., 1999
	<i>-402A</i>	0,29	
<i>-401G&gt;T</i>	<i>-401G</i>	0,91	Van't Hooft i wsp., 1999
	<i>-401T</i>	0,09	
<i>-323P0/10</i>	<i>-323P0</i>	0,77 (0,91)	Marchetti i wsp., 1993; (Van't Hooft i wsp., 1999)
	<i>-323P10</i>	0,23 (0,09)	
<i>-122T&gt;C</i>	<i>-122T</i>	0,91	Van't Hooft i wsp., 1999
	<i>-122C</i>	0,09	



**Tabela 46.** Badania potwierdzające udział analizowanych w pracy i innych polimorfizmów genu czynnika VII krzepnięcia w rozwoju chorób o podłożu zakrzepowym.

<i>Polimorfizm</i>	<i>Autor</i>	<i>Populacja</i>	<i>Grupa badana</i>	<i>Grupa kontrolna</i>	<i>Oceniany punkt końcowy</i>
<i>Arg353Gln</i>	Iaciovello i wsp., 1998	włoska	165	225	zwiększone ryzyko zawału serca
<i>Arg353Gln</i>	Mrozikiewicz i wsp., 2000	niemiecka	666	-	zwiększone ryzyko powikłań po PTCA i DCA
<i>Arg353Gln</i>	Pushkov i wsp., 2011	rosyjska	1145	-	zwiększone ryzyko zawału serca, udaru mózgu
<i>Arg353Gln</i>	Fujimaki i wsp., 2009	japońska	1339	843	zwiększone ryzyko zawału serca
<i>Arg353Gln</i>	Ekstrom i wsp., 2007	szwedzka	387	387	zwiększone ryzyko zawału serca
<i>Arg353Gln</i>	Mo i wsp., 2011	metaanaliza	9151	14099	zwiększone ryzyko choroby niedokrwiennej serca
<i>Arg353Gln</i>	Wu i wsp., 2001	USA	2574	-	zwiększone ryzyko choroby niedokrwiennej serca
<i>-323P0/P10</i>	Mo i wsp., 2011	metaanaliza	2862	4240	zwiększone ryzyko choroby niedokrwiennej serca
<i>-323P0/P10</i>	Ben-Hadj-Khalifa i wsp., 2013	tunezyjska	308	312	zwiększone ryzyko ostrego incydentu sercowego
<i>-323P0/P10</i>	Sakowicz i wsp., 2010	polska	266	137	zwiększone ryzyko zawału serca <45 r.ż.
<i>-323P0/P10</i>	Huang i wsp., 2009	chińska	1020	1112	zwiększone ryzyko zawału serca
<i>-402G&gt;A</i>	Kang i wsp., 2002	chińska	60	149	zwiększone ryzyko zawału serca
<i>-402G&gt;A</i> <i>-401G&gt;T</i> <i>Arg353Gln</i>	Kang i wsp., 2004	chińska	62	149	możliwy wpływ na ryzyko wystąpienia udaru niedokrwiennego mózgu
<i>-402G&gt;A</i> <i>-401G&gt;T</i>	D'Ambrosio i wsp., 2004	włoska	147	-	zmienna wrażliwość na warfarynę
<i>-402G&gt;A</i>	Bozzini 2004	włoska	934	-	zwiększone ryzyko zawału serca

PTCA – *percutaneous transluminal coronary angioplasty*, przezskórna śródnaczyniowa angioplastyka wieńcowa; DCA – *directional coronary atherectomy*, kierunkowa tnąca aterektomia

### 5.3. Warianty genetyczne inhibitora aktywatora plazminogenu-1 (PAI-1) a ryzyko występowania powikłań położniczych

Warianty genetyczne inhibitora aktywatora plazminogenu-1 są częstym przedmiotem analiz dotyczących powikłań położniczych. Poza występowaniem poronień nawracających badania te wskazują na korelację polimorfizmów genu *PAI-1* z ryzykiem rozwoju stanu przedrzucawkowego, nadciśnienia ciążowego, wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu czy obumarcia wewnątrzmacicznego. Uważa się, że jednym z mechanizmów prowadzących do tego typu niepowodzeń w przebiegu ciąży są zmiany w hemostazie warunkujące trombofilię. Trombofilia uwarunkowana genetycznie w połączeniu z fizjologicznie występującym stanem gotowości prozakrzepowej w trakcie ciąży spowodowanym wzrostem stężenia czynników prozakrzepowych, spadkiem stężenia białka S, nabytą opornością na białko C oraz zmniejszoną fibrynolizą, może prowadzić do zaburzeń w krążeniu maciczo-łożyskowym. Nieprawidłowe funkcjonowanie jednostki maciczo-łożyskowej natomiast, jest w każdym przypadku niekorzystne dla właściwego przebiegu ciąży. Co więcej, nadmierne uwalnianie z komórek endotelium PAI-1, który jest kluczowym regulatorem endogennej aktywności fibrynolitycznej, prowadzi do powstania mikrozakrzepów w tętnicach spiralnych i redukuje przepływ łożyskowy. Potwierdzają to badania wskazujące na wyższe stężenie PAI-1 m.in. u pacjentek ze stanem przedrzucawkowym [9, 19, 106].

Jednym z częściej badanych w aspekcie powikłań położniczych wariantów genetycznych genu *PAI-1* jest funkcjonalny polimorfizm *-675 4G/5G*. Allel *-675 4G* warunkuje bardziej nasiloną transkrypcją genu niż zmutowany allel *-675 5G*, w związku z czym warunkuje wyższe stężenie PAI-1 i zwiększoną gotowość prozakrzepową. Sugeruje się udział polimorfizmu *-675 4G/5G* w etiologii wewnątrzmacicznego obumarcia płodu, przedwczesnego oddzielenia łożyska, wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu, poronień nawracających oraz stanu przedrzucawkowego [53, 106, 172]. Również w przypadku pozostałych analizowanych w prezentowanej rozprawie doktorskiej polimorfizmów genu *PAI-1*, *-844G>A* oraz *HindIII C>G* wykazano związek ze zwiększonym ryzykiem występowania niepowodzeń w przebiegu ciąży, w tym poronień nawracających czy stanu przedrzucawkowego [32, 44]. Uważa się, że powyższe warianty genetyczne wpływają na regulację ekspresji genu, zwiększając stężenie PAI-1 w surowicy, tym samym warunkując rozwój stanu prozakrzepowego.

### **5.3.1. Polimorfizm -675 4G/5G genu *PAI-1* a ryzyko występowania poronień nawracających**

Homozygotyczność pod względem genotypu delecyjnego -675 4G/-675 4G wiąże się ze zwiększonym stężeniem PAI-1 w surowicy i w związku z tym z redukcją nasilenia fibrynolizy w porównaniu do nosicieli genotypu insercyjnego -675 5G/-675 5G. U nosicieli genotypu heterozygotycznego obserwuje się natomiast pośrednią wartość stężenia PAI-1. Wynika z tego, że zmutowany allel -675 5G może pełnić protekcyjną rolę w stosunku do ryzyka występowania poronień nawracających.

Należy podkreślić, że dla prawidłowego procesu implantacji niezwykle istotna jest inwazja cytotrofoblastu w ścianę macicy, co ma miejsce zwykle między 8 a 10 tygodniem ciąży. PAI-1, natomiast wspólnie z innymi czynnikami fibrynolitycznymi odgrywa istotną rolę w kontroli procesów proteolitycznych, przebudowy w obrębie tkanek oraz migracji komórek w czasie inwazji trofoblastu. W związku z tym uważa się, że zmienione stężenie PAI-1 uwarunkowane występowaniem polimorfizmów jego genu może skutkować wystąpieniem poronień zwłaszcza w I trymestrze ciąży.

W prezentowanej pracy nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy częstością występowania genotypów i alleli badanego polimorfizmu w analizowanych grupach. Zaobserwowano podobną częstość występowania niezmutowanego genotypu homozygotycznego -675 4G/-675 4G w grupie kontrolnej oraz w grupie kobiet z obciążonym wywiadem położniczym (35,0% w grupie kontrolnej vs. 32,9%,  $p=0,39$ ). Genotyp heterozygotyczny -675 4G/-675 5G był obserwowany w zbliżonej częstości w grupie badanej w porównaniu do grupy zdrowych kobiet (49,3% vs. 47,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,39$ ). Również zmutowany allel -675 5G występował z podobną częstością w grupie badanej oraz kontrolnej (42,4% vs. 41,4%,  $p=0,42$ ).

Istotnej roli mutacji genu *PAI-1* i innych genetycznych czynników warunkujących trombofilie wrodzone w procesie implantacji dowodzi badanie Coulam i wsp. W analizie tej oceniono częstość występowania 10 polimorfizmów warunkujących stan hiperkoagulacji, w tym wariantu -675 4G/5G genu *PAI-1* u 42 pacjentek z powtarzającymi się niepowodzeniami implantacji po zapłodnieniu pozaustrojowym (IVF – *in vitro fertilisation*) oraz u 20 zdrowych kobiet stanowiących grupę kontrolną. U pacjentek z grupy badanej odnotowano istotną przewagę występowania wariantu -675 4G/5G genu *PAI-1* ( $p=0,007$ ). Co więcej, nie zaobserwowano różnic w częstości występowania innych badanych polimorfizmów [29].

W aktualnej literaturze znajdują się doniesienia potwierdzające korelację polimorfizmu *-675 4G/5G* genu *PAI-1* ze zwiększeniem ryzyka poronień nawracających. Jednym z nich jest analiza Subrt i wsp., której celem była ocena częstości występowania genotypów i alleli powyższego wariantu genetycznego i ich związku z obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych w grupie 157 pacjentek z wywiadem położniczym obciążonym w kierunku występowania poronień nawracających. Odnotowano statystycznie istotną korelację pomiędzy tym powikłaniem a genotypem *-675 4G/-675 4G*. Natomiast nie obserwowano związku polimorfizmu *-675 4G/5G* z obecnością przeciwciał antyfosfolipidowych w tej grupie pacjentek. Autorzy badania wywnioskowali, że niezmutowany genotyp homozygotyczny *-675 4G/-675 4G* warunkujący wyższe stężenie PAI-1 w surowicy zwiększa ryzyko występowania poronień nawracających niezależnie od ewentualnej obecności przeciwciał antyfosfolipidowych [155].

Na niezależną od innych prozakrzepowych czynników rolę polimorfizmu *-675 4G/5G* genu *PAI-1* w etiologii poronień nawracających zwłaszcza w I trymestrze ciąży wskazują również wyniki uzyskane przez Ivanov i wsp. W grupie 110 pacjentek z wywiadem obciążonym w kierunku występowania poronień nawracających przed 10 tc. oraz u 97 zdrowych kobiet, u których potwierdzono występowanie co najmniej jednej donoszonej ciąży oceniono częstość występowania genotypów i alleli powyższego wariantu genetycznego oraz polimorfizmów *20210G>A* genu protrombiny, *677C>T* genu *MTHFR* oraz czynnika V Leiden. Odnotowano większą częstość polimorfizmu genu *PAI-1* w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej (41,8% vs. 26,8%, WR 1,96;  $p=0,034$ ). Co więcej, różnica ta była nadal obserwowana po wykluczeniu z obydwu grup nosicielek czynnika V Leiden, mutacji *20210G>A* genu protrombiny oraz *677C>T* genu *MTHFR* [70].

Dowodów na statystycznie istotną zależność pomiędzy polimorfizmem *-675 4G/5G* genu *PAI-1* a występowaniem poronień w I trymestrze ciąży dostarcza analiza Sun i wsp. Badanie przeprowadzono w grupie 142 pacjentek z zespołem policystycznych jajników (u 83 z nich wystąpiło co najmniej jedno poronienie) oraz u 107 zdrowych kobiet. Wykazano, że częstość występowania genotypu *-675 4G/-675 4G* oraz allela *-675 4G* były statystycznie istotnie większe w grupie pacjentek z poronieniami niż w grupie kontrolnej ( $p<0,05$ ). Co więcej, korelowało to z podwyższonym stężeniem PAI-1 w surowicy [156].

Bardzo ciekawą pracą dotyczącą genetycznych uwarunkowań trombofilii i ich związku z występowaniem poronień nawracających jest analiza Coulam i wsp. Autorzy założenia pracy oparli o udokumentowany już fakt, że trombofilia wrodzona jest czynnikiem ryzyka chorób sercowo-naczyniowych, w tym przede wszystkim zakrzepicy żył głębokich

oraz niepowodzeń położniczych, takich jak powtarzające się utraty ciąży. Celem badania było porównanie częstości występowania dziewięciu mutacji warunkujących trombofilę wrodzoną, w tym polimorfizmu -675 4G/5G genu *PAI-1* w grupie kobiet z wywiadem obciążonym w kierunku poronień nawracających oraz w grupie pacjentów, u których wystąpiła zakrzepica żył głębokich. Do badania włączono 550 pacjentek z poronieniami nawracającymi, 43 pacjentów z żylną chorobą zakrzepowo-zatorową oraz 41 zdrowych kobiet. U wszystkich osób przeprowadzono analizę genetyczną pod kątem obecności polimorfizmów 1691G>A oraz H1299R genu czynnika V, 20210G>A genu protrombiny, V34L genu czynnika XIII, -455G>A genu beta-fibrynogenu, L33P genu ludzkiego antygeny płytkowego 1a/b, 677C>T i 1298A>C genu *MTHFR* oraz -675 4G/5G genu *PAI-1*. U pacjentów z zakrzepicą żył głębokich odnotowano istotnie wyższą częstość występowania wszystkich wariantów genetycznych w porównaniu do grupy pacjentek z poronieniami oraz grupy zdrowych kobiet. Warianty genetyczne V34L genu czynnika XIII oraz -675 4G/5G genu *PAI-1* występowały statystycznie częściej wśród kobiet z poronieniami niż w grupie kontrolnej. W grupie pacjentek z poronieniami oraz w grupie z zakrzepicą żył głębokich dominującymi wariantami genetycznymi były V34L genu czynnika XIII oraz -675 4G/5G genu *PAI-1*. Wynika z tego, że badania w kierunku wrodzonej trombofilii ukierunkowane tylko na polimorfizmy genu *MTHFR*, protrombiny oraz czynnika V Leiden często mogą być niemiarodajne i dawać fałszywie ujemny wynik. W związku z tym autorzy powyższego opracowania sugerują włączenie oznaczania wariantu -675 4G/5G genu *PAI-1* do panelu badań przesiewowych w kierunku trombofilii [30].

### **5.3.2. Polimorfizm -844G>A genu *PAI-1* a ryzyko występowania poronień nawracających**

Wyniki aktualnych analiz wskazują na udział polimorfizmu -844G>A genu *PAI-1* w regulacji jego ekspresji i modulacji stężenia PAI-1 w surowicy. Uważa się, że allel -844A jest związany ze wzrostem stężeniem PAI-1 w surowicy, co skutkuje hipofybrynolizą i zwiększoną podatnością na rozwój chorób o etiologii zakrzepowej [35, 159]. W związku z tym należałoby się spodziewać, że zmutowany allel -844A koreluje z ryzykiem występowania poronień nawracających. W prezentowanej rozprawie doktorskiej nie zaobserwowano takiej zależności. Odnotowano podobną częstość występowania niezmutowanego genotypu homozygotycznego -844GG w obydwu analizowanych grupach kobiet (14,5% w grupie badanej vs. 14,4% w grupie kontrolnej,  $p=0,56$ ). Co więcej, zmutowany genotyp

homozygotyczny -844AA był obserwowany nieco częściej w grupie zdrowych kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym niż w grupie badanej (40,0% vs. 34,9%,  $p=0,20$ ). Częstość występowania niezmutowanego allela -844G była podobna w obydwu badanych grupach kobiet (39,8% vs. 37,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,27$ ). Również zmutowany allel -844A występował ze zbliżoną częstością w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej zdrowych kobiet (62,8% vs. 60,2% w grupie badanej,  $p=0,27$ ). Po dokonaniu podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od ilości poronień oraz trymestru ciąży, w którym miały miejsca utraty ciąż także nie zaobserwowano istotnych różnic w występowaniu genotypów i alleli analizowanego polimorfizmu. Uzyskane wyniki nie pozwalają stwierdzić korelacji wariantu -844G>A genu *PAI-1* z występowaniem poronień nawracających.

Należy podkreślić, że prezentowane opracowanie jest jedną z nielicznych w ogólnościowej literaturze analiz dotyczących związku polimorfizmu -844G>A genu *PAI-1* z ryzykiem nawracających utrat ciąż. Natomiast wyniki dostępnych badań pozostają ze sobą w sprzeczności. Jeon i wsp. ocenili frekwencję genotypów i alleli pięciu polimorfizmów genu *PAI-1* (-844G>A, -675 4G/5G, 43G>A, 9785G>A oraz 11053T>G) w grupie 308 pacjentek z nawracającymi utratami ciąż. Do grupy kontrolnej włączono 227 zdrowych kobiet. Badanie przeprowadzono w populacji południowo-koreańskiej. Wykazano, że genotyp -675 4G/-675 4G oraz haplotyp -844AA/-675 4G/-675 4G/11053GG pozostawały w pozytywnej korelacji z ryzykiem poronień nawracających. Haplotyp -844A/-675 4G/43G/9785G/11053G warunkował natomiast występowanie stanu hipofibrynolitycznego, który charakteryzował się zwiększonym stężeniem PAI-1 w surowicy, zwiększoną liczbą płytek krwi, skróceniem czasu protrombinowego oraz redukcją czasu częściowej tromboplastyny po aktywacji. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy sugerują, że polimorfizmy -844G>A, -675 4G/5G oraz 11053T>G są markerami zwiększonego ryzyka występowania poronień nawracających [72].

Takiej zależności nie potwierdzają jednak wyniki otrzymane przez Magdoud i wsp., którzy ocenili częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmów -844G>A oraz -675 4G/5G u 304 kobiet z poronieniami nawracającymi w wywiadzie oraz u 371 kobiet stanowiących grupę kontrolną. Analizę przeprowadzono w populacji tunezyjskiej. Odnotowano statystycznie istotną korelację z ryzykiem powtarzających się utrat ciąż jedynie w przypadku wariantu -675 4G/5G ( $p<0,001$ ), natomiast nie w stosunku do polimorfizmu -844G>A ( $p=0,507$ ). Również analiza haplotypów nie potwierdziła udziału wariantu -844G>A w etiologii poronień nawracających. Zwiększone ryzyko wystąpienia tego

powikłania położniczego było uwarunkowane obecnością w obrębie haplotypu allele  $-675\ 4G$  niezależnie od alleli polimorfizmu  $-844G>A$  [92].

Polimorfizm  $-844G>A$  genu *PAI-1* jest przedmiotem jedynie kilku opracowań. Wybór tego właśnie wariantu genetycznego do analizy w prezentowanej rozprawie doktorskiej podyktowany był głównie istnieniem pewnych dowodów na jego związek z ryzykiem rozwoju chorób o etiologii zakrzepowej. Dostarcza ich m.in. badanie Abboud i wsp., którzy oceniali związek wariantów  $-844G>A$  oraz  $-675\ 4G/5G$  ze zmianami stężenia PAI-1 i tkankowego aktywatora plazminogenu (tPA) u 305 pacjentów z zawałem serca. Grupę kontrolną stanowiło 328 zdrowych osób. W przeciwieństwie do stężenia tPA, średnie stężenie PAI-1 było wyższe wśród pacjentów z grupy badanej. Zwiększenie stężenia PAI-1 było bardziej wyrażone u nosicieli alleli  $-844A$  oraz  $-675\ 4G$ . Statystycznie większa częstość występowania alleli  $-675\ 4G$  i  $-844A$  oraz genotypów  $-844AA$  i  $-675\ 4G/-675\ 4G$  obserwowana była u osób z obciążonym wywiadem w kierunku wystąpienia zawału serca. Obserwowano również wyższą częstość występowania haplotypu  $-675\ 4G/-844A$  oraz odpowiednio niższą częstość występowania haplotypu  $-675\ 5G/-844G$  w grupie badanej w porównaniu do osób włączonych od grupy kontrolnej. Otrzymane wyniki jednoznacznie sugerują związek alleli  $-675\ 4G$  oraz  $-844A$  ze zwiększeniem ryzyka zawału serca pośrednio poprzez wpływ na stężenie PAI-1 w surowicy krwi [1].

Do nieco innych wniosków doszli autorzy badania Saidi i wsp., którzy oceniali częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmów  $-675\ 4G/5G$  oraz  $-844G>A$  w grupie 135 pacjentów z udarem niedokrwinnym mózgu oraz u 118 zdrowych osób. Dodatkowo oznaczono stężenie PAI-1 i tPA u wszystkich uczestników badania. U pacjentów z grupy badanej stężenie PAI-1 było istotnie wyższe, a tPA niższe niż wśród zdrowych osób. Ponadto odnotowano częstsze występowanie polimorfizmu  $-675\ 4G/5G$  w grupie pacjentów z udarem, natomiast częstość genotypów i alleli wariantu  $-844G>A$  była porównywalna w obydwu grupach. Jednak analiza haplotypów wykazała, że haplotyp  $-675\ 4G/-844A$  bardziej niż haplotypy  $-675\ 5G/-844A$  i  $-675\ 4G/-844G$  korelował z redukcją ryzyka wystąpienia udaru niedokrwinnego mózgu (WR=0,43; 95%PU = 0,20-0,97) [136].

### 5.3.3. Polimorfizm *HindIII* C>G genu *PAI-1* a ryzyko występowania poronień nawracających

Analiza dostępnej literatury pozwala stwierdzić, że prezentowana rozprawa doktorska jest pierwszą przeprowadzoną próbą oceny związku polimorfizmu *HindIII* C>G genu *PAI-1* z ryzykiem występowania poronień nawracających. Mimo iż różnice w częstości występowania genotypów i alleli powyższego wariantu genetycznego w grupie pacjentek z występowaniem poronień oraz w grupie kontrolnej nie były istotne pod względem statystycznym, zwraca uwagę fakt częstszego występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego *HindIII* GG oraz zmutowanego allela *HindIII* G w grupie badanej. Częstość występowania genotypu *HindIII* GG w grupie kobiet z obciążonym wywiadem położniczym wynosiła 25,7%, natomiast wśród kobiet z grupy kontrolnej 20,0% ( $p=0,14$ ). Zmutowany allel *HindIII* G również częściej był obserwowany w grupie pacjentek z występowaniem poronień (45,7% vs. 42,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,20$ ).

Różnice te były jeszcze bardziej wyraźne po dokonaniu podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od ilości poronień oraz trymestru ciąży, w którym miały miejsce niepowodzenia. Widoczne jest to zwłaszcza w podgrupie pacjentek, u których wystąpiły 3 lub więcej poronień. U tych pacjentek częstość występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego *HindIII* GG była wyraźnie wyższa niż w grupie kontrolnej (31,6% vs. 20,0% w grupie kontrolnej,  $p=0,09$ ). Podobną zależność obserwowano w przypadku zmutowanego allela *HindIII* G, którego frekwencja również była wyższa (50,0% vs. 42,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,13$ ). W podgrupie kobiet z dwoma poronieniami w wywiadzie frekwencja zmutowanego genotypu homozygotycznego *HindIII* GG wynosiła 23,7% vs. 20,0% w grupie kontrolnej,  $p=0,27$ , a częstość występowania zmutowanego allela *HindIII* G - 44,3% vs. 42,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,34$ . Tendencja do częstszego występowania zmutowanego genotypu *HindIII* GG i zmutowanego allela *HindIII* G była także szczególnie wyraźna w podgrupie pacjentek, u których poronienia miały miejsce zarówno w I, jak i w II trymestrze ciąży (odpowiednio: genotyp *HindIII* GG: 31,0% vs. 20,0% w grupie kontrolnej,  $p=0,14$ ; allel *HindIII* G: 51,7% vs. 42,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,11$ ).

Uzyskane wyniki wskazują na możliwy udział zmutowanego allela *HindIII* G oraz zmutowanego genotypu homozygotycznego *HindIII* GG w etiologii poronień nawracających w I i II trymestrze ciąży. To postawienia takiej hipotezy skłaniają również dowody na związek zmutowanego allela *HindIII* G z zakłóceniem prawidłowej regulacji translacji genu *PAI-1*, co prawdopodobnie skutkuje wzrostem stężenia *PAI-1* w surowicy krwi [35].



**Tabela 47.** Badania dotyczące udziału analizowanych w pracy polimorfizmów genu *PAI-1* w etiologii poronień nawracających.

<i>Polimorfizm</i>	<i>Autor</i>	<i>Populacja</i>	<i>Grupa badana</i>	<i>Grupa kontrolna</i>	<i>Najważniejsze wnioski</i>
-675 4G/5G	Subrt i wsp., 2013	czeska	157	-	wzrost ryzyka RM niezależnie od obecności przeciwciał antyfosfolipidowych
-675 4G/5G	Ivanov i wsp., 2010	bułgarska	110	97	wzrost ryzyka RM w I trymestrze ciąży niezależnie od obecności innych mutacji warunkujących trombofilie wrodzoną
-675 4G/5G	Sun i wsp., 2010	tajwańska	83	107	wzrost ryzyka RM w I trymestrze ciąży u pacjentek z PCOS
-675 4G/5G	Coulam i wsp., 2008	USA	550	84	wzrost ryzyka RM istotny czynnik warunkujący trombofilie wrodzoną
-675 4G/5G	Coulam i wsp., 2006	USA	42	20	powtarzające się niepowodzenia implantacji po IVF-ET
-675 4G/5G oraz -844G>A	Jeon i wsp., 2013	południowo-koreańska	308	227	wzrost ryzyka RM
-675 4G/5G oraz -844G>A	Magdoud i wsp., 2013	tunezyjska	304	371	wzrost ryzyka RM jedynie w przypadku polimorfizmu -675 4G/5G

RM – recurrent miscarriages, poronienia nawracające; PCOS – polycystic ovary syndrome, zespół policystycznych jajników; IVF-ET – in vitro fertilisation - embryo transfer, zapłodnienie pozaustrojowe

**Tabela 48.** Badania dotyczące udziału analizowanych w pracy polimorfizmów genu *PAI-1* w rozwoju chorób o podłożu zakrzepowym.

<i>Polimorfizm</i>	<i>Autor</i>	<i>Populacja</i>	<i>Grupa badana</i>	<i>Grupa kontrolna</i>	<i>Najważniejsze wnioski</i>
-675 4G/5G oraz -844G>A	Abboud i wsp., 2010	tunezyjska	305	328	związek alleli -675 4G oraz -844A ze zwiększeniem ryzyka zawału serca
-675 4G/5G oraz -844G>A	Saidi i wsp., 2007	tunezyjska	135	118	zwiększenie ryzyka udar niedokrwiennego mózgu jedynie w przypadku polimorfizmu -675 4G/5G
-844G>A oraz <i>Hind III C&gt;G</i>	De la Cruz- Mosso i wsp., 2012	meksykańska	48	52	polimorfizm -844G>A jest związany ze zwiększonym ryzykiem rozwoju zespołu metabolicznego, otyłości oraz aterogenego profilu lipidowego; polimorfizm <i>HindIII</i> <i>C&gt;G</i> warunkuje podwyższone stężenie cholesterolu we krwi, co sprzyja rozwojowi zespołu metabolicznego
-675 4G/5G	Ferrara i wsp., 2013	włoska	50	118	wzrost rozległości zakrzepicy żył głębokich kończyn dolnych po operacjach chirurgicznych, ortopedycznych i urologicznych
-675 4G/5G	Gong i wsp., 2012	metaanaliza	12461	14993	zwiększenie ryzyka zawału serca
-675 4G/5G	Li, 2012	metaanaliza dotycząca populacji chińskiej	879	628	zwiększenie ryzyka choroby niedokrwiennej serca u nosicieli allele -675 4G

#### **5.4. Postępowanie u pacjentek z trombofilią wrodzoną i występowaniem poronień nawracających – przegląd aktualnych doniesień**

Według WHO terminem „poronienia nawracające” powinno się określać co najmniej trzy następujące po sobie utraty ciąży. Jednak w praktyce klinicznej wystąpienie już dwóch poronień skłania do poszerzenia diagnostyki w celu ustalenia podłoża tej patologii, wdrożenia odpowiedniego leczenia oraz oceny ryzyka kolejnego niepowodzenia. Po wykluczeniu przyczyn anatomicznych, immunologicznych, hormonalnych czy zakaźnych poszerzeniem diagnostyki powinny być badania ukierunkowane na wykrycie ewentualnych mutacji w genach kodujących czynniki krzepnięcia oraz fibrynolizy, a także warunkujących niedobór inhibitorów krzepnięcia. Jest to postępowanie zgodne z rekomendacjami Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego [130, 131].

Celem wytycznych wydanych w 2013 roku przez *American College of Obstetricians and Gynecologists* (ACOG) był przegląd najczęstszych przyczyn trombofilii, ocena ich związku z ryzykiem żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej u matki i nieprawidłowego przebiegu ciąży, wskazań do wykonywania badań w kierunku wrodzonej nadkrzepliwości oraz dostępnych metod terapeutycznych stosowanych u takich pacjentek. W opracowaniu tym zwrócono szczególną uwagę na czynnik V Leiden, mutację *G20210A* genu protrombiny, niedobór białka C i S oraz antytrombiny i mutacje genu *MTHFR*. Wspomniano również o rzadziej badanych przyczynach trombofilii uwarunkowanych przez inne mutacje czynnika V, warianty w odcinku promotorowym genu *PAI-1*, niedobór białka Z oraz mutacje wzmagające aktywność prozakrzepową innych białek zaangażowanych w regulację kaskady krzepnięcia. Co ciekawe, jakkolwiek dostępne metaanalizy i duże retrospektywne badania kohortowe potwierdziły związek między wrodzoną trombofilią a poronieniami występującymi w I trymestrze ciąży, nie wykazano takiej korelacji w prospektywnych badaniach kohortowych. Jest to kolejny dowód na to, że współcześnie nadal istnieje ogromna potrzeba prowadzenia analiz mających na celu wyjaśnienie roli mutacji czynników zaangażowanych w hemostazę w etiologii utraty ciąży [2].

Autorzy opracowania podkreślili również, że badania przesiewowe w kierunku trombofilii przynoszą korzyści jedynie w przypadku, gdy uzyskane wyniki mogą wpłynąć na wybór metody leczenia. Nie ma jednak potrzeby wykonywania tego typu diagnostyki u pacjentek z już ustaloną przyczyną występowania poronień. Lekiem z wyboru u pacjentek z wrodzoną trombofilią wydaje się być heparyna drobnocząsteczkowa. Na decyzję dotyczącą wyboru metody terapii (profilaktyka przeciwzakrzepowa, leczenie antykoagulacyjne czy też

odstąpienie od leczenia farmakologicznego) wpływ ma wywiad dotyczący występowania żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej, ciężkości trombofilii wrodzonej oraz współistnienie dodatkowych czynników ryzyka (m.in. planowane rozwiązanie ciąży cięciem cesarskim, otyłość, przedłużone unieruchomienie, obciążony wywiad rodzinny w kierunku epizodów zakrzepowo-zatorowych). Wszystkie pacjentki powinny być poddane indywidualnej ocenie [2].

Rekomendacje co do stosowania heparyny celem zapobiegania poronieniu w ostatnim czasie podlegają gwałtownym zmianom w oparciu o dowody uzyskane z prospektywnych analiz. Obecnie heparynę stosuje się u pacjentek z zespołem antyfosfolipidowym. Jednak kryteria diagnostyczne APS zostały ostatnio zaostrzone. Nadal nie ma konsensusu co do właściwego czasu rozpoczęcia terapii, nie jest jasne bowiem czy główny efekt terapeutyczny polega na inhibicji zmian zakrzepowych od I trymestru ciąży, czy dotyczy to raczej poprawy warunków implantacji, co sugerowałoby rozpoczęcie leczenia już od okresu okołoolulacyjnego [21].

## **5.5. Podsumowanie**

Powtarzające się niepowodzenia ciąży mają ogromny wpływ na status psychosocjalny par doświadczających tej patologii. Dlatego też badania mające na celu poprawę metod diagnostycznych oraz rozwój nowych metod terapeutycznych są niezbędne. Związek pomiędzy trombofilią a występowaniem poronień był obserwowany w licznych badaniach, jednak nadal podkreśla się fakt, że mechanizmy patofizjologiczne odpowiedzialne za tę korelację są niedostatecznie poznane. Skuteczność leczenia przeciwkrzepliwego u kobiet z wywiadem położniczym obciążonym w kierunku utrat ciąży jest badana już od ponad 30 lat [34, 146]. Optymalna terapia u pacjentek z poronieniami nawracającymi oraz potwierdzoną trombofilią ciągle pozostaje w sferze dyskusji. Warto podkreślić również, że zespół antyfosfolipidowy jest jedynym jak dotąd rodzajem trombofilii, którego związek z nieprawidłowym przebiegiem ciąży został jednoznacznie udowodniony. Badania dotyczące nadkrzepliwości i poronień nawracających ograniczone są zwykle do mniejszych obserwacyjnych analiz heterogennych populacji. Leczenie oparte na stosowaniu heparyny oraz kwasu acetylosalicylowego jest bardzo często stosowane u kobiet z zespołem antyfosfolipidowym oraz innymi rodzajami trombofilii, mimo iż nie ma niezbitych dowodów na to, że jest to najskuteczniejsza metoda terapeutyczna.

Przedstawione powyżej zagadnienia po raz kolejny podkreślają wagę badań mających na celu określenie etiologii poronień nawracających. Ostatnio w celu zidentyfikowania pacjentek o bardzo wysokim ryzyku poronień nawracających analizuje się łącznie wrodzoną nadkrzepliowość oraz współistniejące czynniki środowiskowe. Etiologia nawracających utrat ciąży jest wieloczynnikowa, a ustalenie skutecznej terapii nadal pozostaje wyzwaniem. Jak dotąd szeroko stosuje się sposoby terapeutyczne dobierane na podstawie metod empirycznych. Jednak korzystniejszą opcją wydaje się być zachęcanie pacjentek obciążonych występowaniem poronień nawracających do brania udziału w wysokiej jakości badaniach prowadzonych z zachowaniem zasad prawidłowej metodologii, które mają na celu określenie optymalnych zaleceń terapeutycznych. Diagnostyczne testy laboratoryjne wymagają standaryzacji, niezbędne są również prawidłowo zaplanowane badania wielośrodkowe, aby aktualną wiedzę móc oprzeć na niezbitych dowodach [97, 147, 158].

## 6. WNIOSKI

1. W pracy wskazano na prawdopodobną ochronną rolę zmutowanego allela *Gln353* polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia w stosunku do występowania poronień nawracających w I oraz II trymestrze ciąży.
2. Wskazano na możliwą protekcyjną rolę zmutowanego insercyjnego allela *-323P10* polimorfizmu *-323P0/P10* oraz zmutowanego allela *-122C* polimorfizmu *-122T>C* genu czynnika VII krzepnięcia w stosunku do występowania poronień nawracających, szczególnie w podgrupie kobiet z co najmniej 3 utratami ciąży.
3. W badaniu nie wykazano związku polimorfizmów *-675 4G/5G* oraz *-844G>A* genu *PAI-1* z ryzykiem występowania poronień nawracających.
4. Zmutowany allel *HindIII G* oraz zmutowany genotyp homozygotyczny *HindIII GG* polimorfizmu *HindIII C>G* genu *PAI-1* prawdopodobnie zwiększają ryzyko występowania poronień nawracających.
5. Ocena współwystępowania genotypów dodatkowo potwierdza możliwe znaczenie polimorfizmów *Arg353Gln*, *-323P0/P10* i *-122T>C* genu czynnika VII krzepnięcia oraz *HindIII C>G* genu *PAI-1* w etiologii poronień nawracających.

## 7. STRESZCZENIE

Do najczęstszych i najlepiej udokumentowanych trombofilli wrodzonych, mających związek z występowaniem niepowodzeń położniczych, w tym poronień nawracających należą przedłużona aktywność czynnika V Leiden, wzrost stężenia protrombiny oraz zaburzenia termolabilności reduktazy metylenotetrahydrofolianowej. W ostatnich latach zwrócono również uwagę na możliwy związek wariantów genetycznych czynnika VII krzepnięcia oraz inhibitora aktywatora plazminogenu-1 (PAI-1) ze zwiększonym ryzykiem występowania poronień nawracających.

Celem pracy było określenie znaczenia wybranych polimorfizmów genów czynnika VII krzepnięcia (*Arg353Gln*, *-323P0/P10*, *-122T>C*) oraz *PAI-1* (*-675 4G/5G*, *-844G>A*, *HindIII C>G*) w etiologii poronień nawracających. Przy wyborze badanych w pracy wariantów genetycznych kierowano się założeniem, że polimorfizmy te mogą warunkować trombofilie wrodzone, a tym samym być czynnikiem ryzyka powtarzających się utrat cięż. Należy przede wszystkim podkreślić, że większość z przedstawianych wariantów genetycznych została po raz pierwszy oceniona w kontekście związku z występowaniem poronień nawracających w prezentowanej rozprawie doktorskiej.

Do analizy włączono dwie grupy pacjentek: 152 kobiety (średnia wieku  $30,16 \pm 3,82$  lat, zakres 21-45 lat, mediana 30 lat) z obciążonym wywiadem w kierunku występowania poronień (dwóch lub więcej) w I i II trymestrze ciąży oraz 180 kobiet (średnia wieku  $29,46 \pm 4,26$  lat, zakres 19-42 lata, mediana 29 lat), u których potwierdzono w wywiadzie co najmniej jedną ciążę o niepowikłanym przebiegu, zakończoną urodzeniem zdrowego, donoszonego noworodka oraz wykluczono wystąpienie poronień. Podczas analizy dwukrotnie dokonano podziału grupy badanej na podgrupy. Pierwszy podział dotyczący ilości poronień wyłonił dwie podgrupy pacjentek: 114 kobiet z dwoma poronieniami w wywiadzie oraz 38 kobiet z trzema i więcej poronieniami w wywiadzie. Drugi podział dotyczył natomiast trymestru ciąży, w którym wystąpiło poronienie: 123 pacjentki, u których poronienia występowały tylko w I trymestrze ciąży, poniżej 13 tc. oraz 29 kobiet, u których poronienia miały miejsce zarówno w I, jak i w II trymestrze ciąży, poniżej 21 tc. Do badań zastosowano łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) oraz metodę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP).

W przypadku polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia zaobserwowano niższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego *Arg353/Gln353* w podgrupie kobiet z dwoma, a zwłaszcza w podgrupie pacjentek z co najmniej trzema

poronieniami w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio: 21,1% vs. 13,2% vs. 23,9% w grupie kontrolnej). Częstość występowania zmutowanego allele *Gln353* była wyraźnie niższa w podgrupie kobiet z występowaniem co najmniej 3 poronień w porównaniu do grupy kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (6,6% vs. 11,9%,  $p=0,12$ ). Obserwowano niższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego *Arg353/Gln353* zarówno w podgrupie kobiet z poronieniami w I trymestrze ciąży (19,5% vs. 23,9%,  $p=0,22$ ), jak i w podgrupie pacjentek z utratami ciąż w I i II trymestrze w porównaniu do grupy kontrolnej (17,2% vs. 23,9%,  $p=0,30$ ). Ponadto zwraca uwagę wyraźnie niższa częstość występowania zmutowanego allele *Gln353* w podgrupie pacjentek z występowaniem poronień zarówno w I, jak i w II trymestrze ciąży w porównaniu do grupy kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (8,6% vs. 11,9%,  $p=0,31$ ).

W trakcie analizy polimorfizmu *-323P0/P10* genu czynnika VII krzepnięcia zwrócono uwagę na nieco wyższą częstość występowania niezmutowanego genotypu homozygotycznego *-323P0/-323P0* (80,26% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,25$ ) oraz niższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego *-323P0/-323P10* w grupie badanej (18,42% vs. 22,78% w grupie kontrolnej,  $p=0,20$ ). Szczególnie wyraźnie różnice te są widoczne w podgrupie pacjentek z występowaniem co najmniej 3 poronień (genotyp *-323P0/-323P0*: 86,84% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,12$ ; genotyp *-323P0/-323P10*: 13,16% vs. 22,78% w grupie kontrolnej,  $p=0,13$ ). W tej podgrupie pacjentek zwraca również uwagę niższa częstość występowania zmutowanego allele *-323P10* (6,58% vs. 11,94% w grupie kontrolnej,  $p=0,12$ ).

Odnotowano nieco wyższą częstość występowania niezmutowanego genotypu *-122TT* polimorfizmu *-122T>C* genu czynnika VII krzepnięcia u wszystkich pacjentek z grupy badanej (80,26% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,25$ ) oraz wyższą częstość genotypu heterozygotycznego *-122TC* u kobiet z grupy z nieobciążonym wywiadem położniczym (18,42% vs. 22,78% w grupie kontrolnej,  $p=0,20$ ). Wśród pacjentek, u których wystąpiły co najmniej 3 poronienia zaobserwowano wyższą częstość występowania niezmutowanego genotypu homozygotycznego *-122TT* (86,84% vs. 76,67% w grupie kontrolnej,  $p=0,12$ ). Z kolei genotyp heterozygotyczny *-122TC* wykazywał wyższą frekwencję w grupie kontrolnej (13,16% w grupie kobiet z co najmniej 3 poronieniami vs. 22,78% w grupie kontrolnej,  $p=0,13$ ). Częstość występowania niezmutowanego allele *-122T* była wyższa w podgrupie pacjentek z występowaniem co najmniej 3 poronień (93,42% vs. 88,06% w grupie kontrolnej,  $p=0,12$ ). Odwrotną sytuację obserwowano dla zmutowanego allele *-122C*, który częściej



występował w grupie kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (6,58% vs. 11,94% w grupie kontrolnej,  $p=0,12$ ).

Częstość występowania genotypu *HindIII GG* polimorfizmu *HindIII C>G* genu *PAI-1* w grupie kobiet z obciążonym wywiadem położniczym wynosiła 25,7%, natomiast wśród kobiet z grupy kontrolnej 20,0% ( $p=0,14$ ). Zmutowany allel *HindIII G* również częściej był obserwowany w grupie pacjentek z występowaniem poronień (45,7% vs. 42,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,20$ ). W podgrupie pacjentek z 3 i więcej poronieniami częstość występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego *HindIII GG* była wyraźnie wyższa niż w grupie kontrolnej (31,6% vs. 20,0% w grupie kontrolnej,  $p=0,09$ ). Podobną zależność obserwowano w przypadku zmutowanego allela *HindIII G*, którego frekwencja również była wyższa w tej podgrupie (50,0% vs. 42,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,13$ ). Tendencja do częstszego występowania zmutowanego genotypu *HindIII GG* i zmutowanego allela *HindIII G* była także szczególnie wyraźna w podgrupie pacjentek, u których poronienia miały miejsce zarówno w I, jak i w II trymestrze ciąży (odpowiednio: genotyp *HindIII GG*: 31,0% vs. 20,0% w grupie kontrolnej,  $p=0,14$ ; allel *HindIII G*: 51,7% vs. 42,2% w grupie kontrolnej,  $p=0,11$ ).

W przypadku polimorfizmów  $-675\ 4G/5G$  oraz  $-844G>A$  nie odnotowano istotnych różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli pomiędzy analizowanymi grupami kobiet.

Analiza otrzymanych wyników pozwala wysunąć następujące wnioski:

1. W pracy wskazano na prawdopodobną ochronną rolę zmutowanego allela *Gln353* polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia w stosunku do występowania poronień nawracających w I oraz II trymestrze ciąży.
2. Wskazano na możliwą protekcyjną rolę zmutowanego insercyjnego allela  $-323P10$  polimorfizmu  $-323P0/P10$  oraz zmutowanego allela  $-122C$  polimorfizmu  $-122T>C$  genu czynnika VII krzepnięcia w stosunku do występowania poronień nawracających, szczególnie w podgrupie kobiet z co najmniej 3 utratami ciąży.
3. W badaniu nie wykazano związku polimorfizmów  $-675\ 4G/5G$  oraz  $-844G>A$  genu *PAI-1* z ryzykiem występowania poronień nawracających.
4. Zmutowany allel *HindIII G* oraz zmutowany genotyp homozygotyczny *HindIII GG* polimorfizmu *HindIII C>G* genu *PAI-1* prawdopodobnie zwiększają ryzyko występowania poronień nawracających.
5. Ocena współwystępowania genotypów dodatkowo potwierdza możliwe znaczenie polimorfizmów *Arg353Gln*,  $-323P0/P10$  i  $-122T>C$  genu czynnika VII krzepnięcia oraz *HindIII C>G* genu *PAI-1* w etiologii poronień nawracających.

## 8. SUMMARY

Factor V Leiden, increased prothrombin concentration and changed thermolability of methyltetrahydrofolate reductase are the most common and well documented reasons of inherited thrombophilia, which is the risk factor of recurrent miscarriages. Some of the recent studies has also focused on a possible correlation of genetic variants of coagulation factor VII and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) with an increased risk of recurrent pregnancy loss.

The aim of the study was to evaluate the role of polymorphisms of factor VII gene (*Arg353Gln*, *-323P0/P10*, *-122T>C*) and *PAI-1* gene (*-675 4G/5G*, *-844G>A*, *HindIII C>G*) in the etiology of recurrent miscarriages. According to many nowadays studies those genetic variants may result in inherited thrombophilia and be the risk factor of recurrent abortions. It is worth remarking that most of these polymorphisms has been evaluated in correlation with recurrent pregnancy loss for the first time in the presented study.

To the study group 152 women (mean age  $30,16 \pm 3,82$  years, range 21-45 years, median 30 years) with a positive history of at least two pregnancy losses in the first and in the second trimester were enrolled. The control group consisted of 180 women (mean age  $29,46 \pm 4,26$  years, range 19-42 years, median 29 years) with a positive history of at least one uncomplicated pregnancy ended with a delivery at term and a negative history of miscarriages. The study group has been divided twice. The first division concerned the amount of abortions (114 women with two miscarriages and 38 women with at least three miscarriages). And the second division concerned the trimester of pregnancy when the abortion occurred (123 women with miscarriages in the first trimester, <13 gw. and 29 women with miscarriages in the first and in the second trimester, <21 gw.). Genetic analysis was performed with the use of polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism method (PCR/RFLP).

As to the *Arg353Gln* factor VII gene polymorphism lower frequency of heterozygotic *Arg353/Gln353* genotype in the subgroup of women with two miscarriages and especially in the subgroup of women with at least three miscarriages in comparison to the control group has been observed (respectively: 21,1% vs. 13,2% vs. 23,9% in the control group). The frequency of mutated *Gln353* allele was significantly lower in the subgroup of women with at least three miscarriages (6,6% vs. 11,9% in the control group,  $p=0,12$ ). There has been observed lower frequency of *Arg353/Gln353* genotype in the subgroup of women with miscarriages in the first trimester (19,5% vs. 23,9%,  $p=0,22$ ), as well as in the subgroup with

pregnancy loss in the first and in the second trimester (17,2% vs. 23,9%,  $p=0,30$ ) in comparison to the control group. Moreover, lower frequency of mutated *Gln353* allele in the subgroup of women with pregnancy loss in the first and in the second trimester in comparison to the control group has been noted (8,6% vs. 11,9%,  $p=0,31$ ).

Analysis of *-323P0/P10* factor VII gene polymorphism revealed slightly higher frequency of homozygotic *-323P0/-323P0* genotype (80,26% vs. 76,67% in the control group,  $p=0,25$ ) and lower frequency of heterozygotic *-323P0/-323P10* genotype in the whole study group (18,42% vs. 22,78% in the control group,  $p=0,20$ ). Those differences were more remarkable in the subgroup of women with at least three miscarriages (genotype *-323P0/-323P0*: 86,84% vs. 76,67% in the control group,  $p=0,12$ ; genotype *-323P0/-323P10*: 13,16% vs. 22,78% in the control group,  $p=0,13$ ). In this subgroup of women lower frequency of mutated *-323P0* allele has been noted (6,58% vs. 11,94% in the control group,  $p=0,12$ ).

In the whole study group slightly higher frequency of homozygotic *-122TT* genotype (80,26% vs. 76,67% in the control group,  $p=0,25$ ) of *-122T>C* factor VII gene polymorphism was observed. Moreover, *-122TC* genotype was more frequent in the control group (18,42% vs. 22,78% in the control group,  $p=0,20$ ). In the subgroup of women with three or more miscarriages the frequency of homozygotic *-122TT* genotype was higher in comparison to the control group (86,84% vs. 76,67% in the control group,  $p=0,12$ ). And *-122TC* genotype was more frequent in the control group (13,16% in the subgroup of women with at least three miscarriages vs. 22,78% in the control group,  $p=0,13$ ). The frequency of *-122T* allele was higher in the subgroup of patients with three or more abortions (93,42% vs. 88,06% in the control group,  $p=0,12$ ). And mutated *-122C* allele was observed more frequently in the control group in comparison to the subgroup of women with at least three miscarriages (6,58% vs. 11,94% in the control group,  $p=0,12$ ).

The frequency of *HindIII GG* genotype of *HindIII C>G PAI-1* gene polymorphism in the whole study group was 25,7% and in the control group – 20,0% ( $p=0,14$ ). Mutated *HindIII G* allele was also observed more frequently in the whole study group (45,7% vs. 42,2% in the control group,  $p=0,20$ ). In the subgroup of women with at least three abortions the frequency of mutated homozygotic *HindIII GG* genotype was visibly higher than in the control group (31,6% vs. 20,0% in the control group,  $p=0,09$ ). Similar correlation was observed as to the mutated *HindIII G* allele which was also noted more frequently in the subgroup of women with three or more miscarriages (50,0% vs. 42,2% in the control group,  $p=0,13$ ). A tendency of higher frequency of mutated homozygotic *HindIII GG* genotype and mutated *HindIII G* allele was also revealed in the subgroup of patients with miscarriages in

the first and in the second trimester (relatively: *HindIII* GG: 31,0% vs. 20,0% in the control group,  $p=0,14$ ; *HindIII* G: 51,7% vs. 42,2% in the control group,  $p=0,11$ ).

The study did not reveal any significant differences as to the frequency of genotypes and alleles of -675 4G/5G and -844G>A PAI-1 gene polymorphisms in analyzed groups of women.

Analysis of obtained results allows to state the following conclusions:

1. Obtained results suggest probable protective role of mutated *Gln353* allele of *Arg353Gln* factor VII gene polymorphism as to the risk of recurrent miscarriages in the first and in the second trimester of pregnancy.
2. Presented study points out possible protective role of mutated -323P10 allele of -323P0/P10 factor VII gene polymorphism and mutated -122C allele of -122T>C factor VII gene polymorphism as to the occurrence of recurrent abortions, especially in the subgroup of women with three or more pregnancy losses.
3. Performed analysis did not reveal any correlation of -675 4G/5G and -844G>A PAI-1 gene polymorphisms with the risk of recurrent miscarriages.
4. Mutated *HindIII* G allele and mutated homozygotic *HindIII* GG genotype of *HindIII* C>G PAI-1 gene polymorphism probably increase the risk of recurrent abortions.
5. Evaluation of coexistence of analyzed genotypes additionally confirms possible role of *Arg353Gln*, -323P0/P10 and -122T>C factor VII gene polymorphisms and *HindIII* C>G PAI-1 gene polymorphism in the etiology of recurrent miscarriages.

## 9. PIŚMIENNICTWO

1. Abboud N, Ghazouani L, Saidi S, Ben-Hadj-Khalifa S, Addad F, Almawi WY, Mahjoub T. Association of PAI-1 4G/5G and -844G/A gene polymorphisms and changes in PAI-1/tissue plasminogen activator levels in myocardial infarction: a case-control study. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010, 14, 23-27.
2. American College of Obstetricians and Gynecologists. Practice Bulletin. Clinical management guidelines for obstetricians-gynecologists. Inherited Thrombophilias in Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2013, 122, 706-717.
3. Austin H, Hooper WC, Lally C, Dilley A, Ellingsen D, Wideman C, Wenger NK, Rawlins P, Silva V, Evatt B. Venous thrombosis in relation to fibrinogen and factor VII genes among African-Americans. *J Clin Epidemiol*. 2000, 53, 997-1001.
4. Bal J. Metody badania genomu. W: *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*. Pod red. Bal J. Wydawnictwo Naukowe PWN, W-wa 2001, 80-148.
5. Barlik M, Seremak-Mrozikiewicz A, Kraśnik W, Drews K. Polimorfizmy 20210G>A i 19911A>G genu protrombiny a występowanie poronień nawracających. *Ginekol Pol*. 2013, 84, 830-834.
6. Bartlett, JM, Stirling DA. Short History of the Polymerase Chain Reaction. *PCR Protocols*. 2003, 226, 3-6.
7. Bartosh N, Tomlin T, Cable C, Halka K. Newly diagnosed congenital factor VII deficiency and utilization of activated recombinant factor VII (NovoSeven). *Clin Pharmacol*. 2013, 5, 53-58.
8. Bauer KA. The thrombophilias: well defined risk factors with uncertain therapeutic implications. *Ann Intern Med*. 2001, 135, 367-373.
9. Belo L, Santos-Silva A, Rumley A, Lowe G, Pereira-Leite L, Quintanilha A, Rebelo I. Elevated tissue plasminogen activator as a potential marker of endothelial dysfunction in pre-eclampsia: correlation with proteinuria. *BJOG*. 2002, 109, 1250-1255.
10. Ben-Hadj-Khalifa S, Lakhil B, Nsiri B, Mahjoub T, Almawi WY. Factor VII levels, R353Q and -323P0/10 Factor VII variants, and the risk of acute coronary syndrome among Arab-African Tunisians. *Mol Biol Rep*. 2013, 40, 3793-3798.
11. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994, 369, 64-67.
12. Borensztajn K, Sobrier ML, Fischer AM, Chafa O, Amselem S, Tapon-Breton J. Factor VII gene intronic mutation in a lethal factor VII deficiency: effects on splice-site selection. *Blood*. 2003, 102, 561-563.
13. Brenner B, Sarig G, Weiner Z. Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause. *Thromb Haemost*. 1999, 82, 6-9.
14. Brenner B, Bar J, Ellis M, Yarom I, Yohai D, Samueloff A. Live-Enox Investigators. Effects of enoxaparin on late pregnancy complications and neonatal outcome in women with recurrent pregnancy loss and thrombophilia: results from the Live-Enox study. *Fertil Steril*. 2005, 84, 770-773.
15. Bozzini C, Girelli D, Bernardi F, Ferraresi P, Olivieri O, Pinotti M, Martinelli N, Manzato F, Friso S, Villa G, Pizzolo F, Beltrame F, Corrocher R. Influence of polymorphisms in the factor VII gene promoter on activated factor VII levels and on the risk of myocardial infarction in advanced coronary atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2004, 92, 541-549.
16. Brylski J. PCR - najpopularniejsza metoda badania DNA. *IGM*. 2009, 3, 1-3.

17. Carp H, Dolitzky M, Inbal A. Thromboprophylaxis improves the live birth rate in women with consecutive recurrent miscarriages and hereditary thrombophilia. *J Thromb Haemost.* 2003, 1, 433-438.
18. Castoldi E, Simioni P, Kalafatis M, Lunghi B, Tormene D, Girelli D, Girolami A, Bernardi F. Combinations of 4 mutations (FV R506Q, FV H1299R, FV Y1702C, PT 20210G/A) affecting the prothrombinase complex in a thrombophilic family. *Blood.* 2000, 96, 1443-1448.
19. Chambers JC, Fusi L, Malik IS, Haskard DO, De Swiet M, Kooner JS. Association of maternal endothelial dysfunction with preeclampsia. *JAMA.* 2001, 285, 1607-1612.
20. Check JH. A practical approach to the prevention of miscarriage. Part 4 - role of infection. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2010, 37, 252-255.
21. Check JH. The use of heparin for preventing miscarriage. *Am J Reprod Immunol.* 2012, 67, 326-333.
22. Chżyński K, Pietrucha T. Hemostatyczne czynniki ryzyka choroby niedokrwiennej serca (cz. IV). Gen PAI-1. Polimorfizmy w genie PAI -1. *Forum Kardiologów.* 2001, 6, 59-62.
23. Christiansen OB. Evidence-based investigations and treatments of recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2005, 83, 821-839.
24. Christiansen OB. Epidemiologia nawracających utrat ciąży. W: Poronienia nawracające. Pod red. Skrzypczak J. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, W-wa, 2011, 34-55.
25. Clifford K, Rai R, Watson H, Regan L. An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage: preliminary experience of 500 consecutive cases. *Hum Reprod.* 1994, 9, 1328-1332.
26. Coldwell BJ, Steinkeler J, Warner MA. Ultrasound of the gravid uterus. *Ultrasound Q.* 2012, 28, 87-95.
27. Comp PC, Nixon RR, Cooper MR, Esmon CT. Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis. *J Clin Invest.* 1984, 74, 2082-2088.
28. Cooney MJ, Benson CB, Doubilet PM. Outcome of pregnancies in women with uterine duplication anomalies. *J Clin Ultrasound.* 1998, 26, 3-6.
29. Coulam CB, Jeyendran RS, Fishel LA, Roussev R. Multiple thrombophilic gene mutations are risk factors for implantation failure. *Reprod Biomed Online.* 2006, 12, 322-327.
30. Coulam CB, Wallis D, Weinstein J, DasGupta DS, Jeyendran RS. Comparison of thrombophilic gene mutations among patients experiencing recurrent miscarriage and deep vein thrombosis. *Am J Reprod Immunol.* 2008, 60, 426-431.
31. D'Ambrosio RL, D'Andrea G, Cappucci F, Chetta M, Di Perna P, Brancaccio V, Grandone E, Margaglione M. Polymorphisms in factor II and factor VII genes modulate oral anticoagulation with warfarin. *Haematologica.* 2004, 89, 1510-1516.
32. Dawson S, Hamsten A, Wiman B, Henney A, Humphries S. Genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus is associated with altered levels of plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity. *Arterioscler Thromb.* 1991, 11, 183-190.
33. Di Micco P, D'uva M, Strina I, De Placido G, Di Fiore R, Quaranta S, Castaldo G. Recurrent pregnancy loss and thrombophilia. *Clin Lab.* 2007, 53, 309-314.
34. de Jong PG, Goddijn M, Middeldorp S. Antithrombotic therapy for pregnancy loss. *Hum Reprod Update.* 2013, 19, 656-673.
35. De la Cruz-Mosso U, Muñoz-Valle JF, Salgado-Goytia L, García-Carreón A, Illades-Aguiar B, Castañeda-Saucedo E, Parra-Rojas I. Relationship of metabolic syndrome and its components with -844 G/A and HindIII C/G PAI-1 gene polymorphisms in Mexican children. *BMC Pediatr.* 2012, 29, 12-41.

36. Doggen CJM, Bertina RM, Manger Cats V i wsp. The 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor – 1 gene is not associated with myocardial infarction. *Thromb Haemost.* 1999, 82, 115-120.
37. Dossenbach-Glaninger A, van Trotsenburg M, Dossenbach M, Oberkanins C, Moritz A, Krugluger W, Huber J, Hopmeier P. Plasminogen Activator Inhibitor 1 4G/5G Polymorphism and Coagulation Factor XIII Val34Leu Polymorphism: Impaired Fibrinolysis and Early Pregnancy Loss. *Clin Chem.* 2003, 49, 1081-1086.
38. Dossenbach-Glaninger A, Trotsenburg M, Dossenbach MR, Oberkanins C, Huber J, Hopmeier P. Elevated coagulation factor VIII and the risk for recurrent early pregnancy loss. *Thromb Haemost.* 2004, 91, 694–699.
39. Drews K, Seremak-Mrozikiewicz A. Choroby immunologiczne. W: *Ciąża Wysokiego Ryzyka*, pod. red. Bręborowicz GH, Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań 2010, 887-894.
40. D’Uva M, Di Micco P, Strina I, De Placido G. Recurrent Pregnancy Loss and Thrombophilia. *J Clin Med Res.* 2010, 2, 18–22.
41. Eblen AC, Gercel-Taylor C, Shields LB. Alterations in humoral immune responses associated with recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2000, 73, 305-313.
42. Egeberg O. Inherited antithrombin III deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorr.* 1965, 13, 516-530.
43. Ekström M, Silveira A, Bennermo M, Eriksson P, Tornvall P. Coagulation factor VII and inflammatory markers in patients with coronary heart disease. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2007, 18, 473-477.
44. Fabbro D, D’Elia AV, Spizzo R, Driul L, Barillari G, Di Loreto C, Marchesoni D, Damante G. Association between plasminogen activator inhibitor 1 gene polymorphisms and preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest.* 2003, 56, 17-22.
45. Farquharson R, Jauniaux E, Exalto N. On behalf of the ESHRE Special Interest group for Early Pregnancy (SIGEP): Updated and revised nomenclature for the description of early pregnancy events. *Hum Reprod.* 2005, 20, 3008-3011.
46. Faught W, Garner P, Jones G, Ivey B. Changes in protein C and protein S levels in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1995, 172, 147-150.
47. Ferrara F, Meli F, Raimondi F, Montalto S, Cospite V, Novo G, Novo S. The association between the 4G/5G polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 gene and extension of postsurgical calf vein thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2013, 24, 237-242.
48. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJH, den Heijer M, Kluijtmans LAJ, van den Heuvel LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genet.* 1995, 10, 111-113.
49. Fujimaki T, Kato K, Yoshida T, Oguri M, Watanabe S, Metoki N, Yoshida H, Satoh K, Aoyagi Y, Nishigaki Y, Tanaka M, Nozawa Y, Kimura G, Yamada Y. Association of genetic variants with myocardial infarction in Japanese individuals with chronic kidney disease. *Thromb Haemost.* 2009, 101, 963-968.
50. Garcia JGN. Molecular mechanisms of thrombin-induced human and bovine endothelial cell activation. *J Lab Clin Med.* 1992, 120, 513–519.
51. Giancotti A, La Torre R, Spagnuolo A, D’Ambrosio V, Cerekja A, Piazze J, Chistolini A. Efficacy of three different antithrombotic regimens on pregnancy outcome in pregnant women affected by recurrent pregnancy loss. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012, 25, 1191-1194.
52. Gietka-Czernel M. *Ciąża a choroby tarczycy. Ginekologia po Dyplomie.* 2013, 15, 46-58.

53. Glueck CJ, Kupferminc MJ, Fontaine RN, Wang P, Weksler BB, Eldor A. Genetic hypofibrinolysis in complicated pregnancies. *Obstet Gynecol.* 2001, 97, 44-48.
54. Gong LL, Peng JH, Han FF, Zhu J, Fang LH, Wang YH, Du GH, Wang HY, Liu LH. Association of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor polymorphism with myocardial infarction: a meta-analysis. *Thromb Res.* 2012, 130, 43-51.
55. Green F, Kelleher C, Wilkes H, Temple A, Meade T, Humphries S. A common genetic polymorphism associated with lower coagulation factor VII levels in healthy individuals. *Arterioscler Thromb.* 1991, 11, 540-546.
56. Greer IA. Inherited thrombophilia and venous thromboembolism. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003, 17, 413-425.
57. Grenett HE, Khan N, Jiang W, Booyse FM. Identification of the Hind III polymorphic site in the PAI-1 gene: analysis of the PAI-1 Hind III polymorphism by PCR. *Genet Test.* 2000, 4, 65-68.
58. Gris JC, Mercier E, Quéré I, Lavigne-Lissalde G, Cochery-Nouvellon E, Hoffet M, Ripart-Neveu S, Tailland ML, Dauzat M, Marès P. Low-molecular-weight heparin versus low-dose aspirin in women with one fetal loss and a constitutional thrombophilic disorder. *Blood.* 2004, 103, 3695-3699.
59. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest.* 1981, 68, 1370-1373.
60. Han AR, Ahn H, Vu P, Park JC, Gilman-Sachs A, Beaman K, Kwak-Kim J. Obstetrical outcome of anti-inflammatory and anticoagulation therapy in women with recurrent pregnancy loss or unexplained infertility. *Am J Reprod Immunol.* 2012, 68, 418-427.
61. Härtel C, von Otte S, Koch J, Ahrens P, Kattner E, Segerer H, Möller J, Diedrich K, Göpel W. Polymorphisms of haemostasis genes as risk factors for preterm delivery. *Thromb Haemost.* 2005, 94, 88-92.
62. Heywood DM, Carter AM, Catto AJ, Bamford JM, Grant PJ. Polymorphisms of the factor VII gene and circulating FVII:C levels in relation to acute cerebrovascular disease and poststroke mortality. *Stroke.* 1997, 28, 816-821.
63. Hirakawa T, Minegishi T, Tano M, Kameda T, Kishi H, Ibuki Y, Mizutani T, Miyamoto K. Effect of prolactin on the expression of luteinizing hormone receptors during cell differentiation in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 1999, 140, 3444-3451.
64. Henry M, Chomiki N, Scarabin PY, Alessi MC, Peiretti F, Arveiler D, Ferrières J, Evans A, Amouyel P, Poirier O, Cambien F, Juhan-Vague I. Five frequent polymorphisms of the PAI-1 gene: lack of association between genotypes, PAI activity, and triglyceride levels in a healthy population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997, 17, 851-858.
65. Hoffman CJ, Miller RH, Hultin MB. Correlation of factor VII activity and antigen with cholesterol and triglycerides in healthy young adults. *Arterioscler Thromb.* 1992, 12, 267-270.
66. Homburg R. The management of infertility associated with polycystic ovary syndrome. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003, 1, 109-117.
67. Huang H, Jia S, Chen S, Sha Y, Ma A, Ma X, Zhang J, Bai X, He L. The coagulation factor VII gene polymorphisms in patients with myocardial infarction in Ningxia Hui and Han population. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 2009, 26, 653-658.
68. Humphries S, Temple A, Lane A, Green F, Cooper J, Miller G. Low plasma levels of factor VIIc and antigen are more strongly associated with the 10 base pair promoter (-323) insertion than the glutamine 353 variant. *Thromb Haemost.* 1996, 75, 567-572.
69. Iacoviello L, Di Castelnuovo A, De Knijff P, D'Orazio A, Amore C, Arboretti R, Klufft C, Benedetta Donati M. Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1998, 338, 79-85.



70. Ivanov P, Komsa-Penkova R, Ivanov I, Konova E, Kovacheva K, Simeonova M, Tanchev S. Plasminogen activator inhibitor type 1 activity in women with unexplained very early recurrent pregnancy loss. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2010, 49, 3-8.
71. Jauniaux E, Farquharson RG, Christiansen OB, Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 2006, 21, 2216-2222.
72. Jeon YJ, Kim YR, Lee BE, Choi YS, Kim JH, Shin JE, Rah H, Cha SH, Lee WS, Kim NK. Genetic association of five plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss in Korean women. *Thromb Haemost*. 2013, 110, 742-750.
73. Jędrzejczak P, Łuczak-Wawrzyniak J, Szyfter J, Przewoźna J, Tazarek-Hauke G, Pawelczyk L. Feelings and emotions in women treated for infertility. *Przegl Lek*. 2004, 61, 1334-1337.
74. Kagami M, Maruyama T, Koizumi T, Miyazaki K, Nishikawa-Uchida S, Oda H, Uchida H, Fujisawa D, Ozawa N, Schmidt L, Yoshimura Y. Psychological adjustment and psychosocial stress among Japanese couples with a history of recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod*. 2012, 27, 787-794.
75. Kain K, Catto AJ, Young J, Bamford J, Bavington J, Grant PJ. Coagulation factor VII activity, Arg/Gln353 polymorphism and features of insulin resistance in first-degree-relatives of South Asian patients with stroke. *Thromb Haemost*. 2002, 88, 954-960.
76. Kamalanathan S, Sahoo JP, Sathyapalan T. Pregnancy in polycystic ovary syndrome. *Indian J Endocrinol Metab*. 2013, 17, 37-43.
77. Kang W, Wang H, Xiong L, Wang X, Chu H, Qu B, Liu X, Yin J, Duan B, Yu J, Wang Z. Study on plasma coagulation factor VII (FVII) levels and polymorphisms of FVII gene in patients with coronary heart disease. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2002, 23, 457-459.
78. Kang WY, Wang HL, Xiong LF, Wang XF, Chu HY, Qu B, Liu XF, Yin J, Duan BH, Wang ZY. Polymorphisms of the coagulation factor VII gene and its plasma levels in relation to acute cerebral infarction differences in allelic frequencies between Chinese Han and European populations. *Chin Med J (Engl)*. 2004, 117, 717-724.
79. Koller F, Loeliger A, Duckert F. Experiments on a new clotting factor (Factor VII). *Acta Haematol*. 1951, 6, 1-18.
80. Kujovich J. Thrombophilia and pregnancy complications. *Am J Obstet Gynecol*. 2004, 191, 412-424.
81. Kulkarni AA, Lee CA, Kadir RA. Pregnancy in women with congenital factor VII deficiency. *Haemophilia*. 2006, 12, 413-416.
82. Kupfermanc MJ. Thrombophilia and pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003, 1, 111.
83. Kurzawińska G, Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Barlik M, Mrozikiewicz PM. Genetic conditioned changes in activity of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and recurrent miscarriages. *Ginekol Pol*. 2009, 80, 762-767.
84. Kurzawińska G, Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Barlik M, Mrozikiewicz PM. Inherited thrombophilia as the reason of recurrent miscarriages in the first trimester of pregnancy. *Ginekol Pol*. 2009, 80, 657-663.
85. Kwak-Kim J, Agcaoili MS, Aleta L, Liao A, Ota K, Dambaeva S, Beaman K, Kim JW, Gilman-Sachs A. Management of women with recurrent pregnancy losses and antiphospholipid antibody syndrome. *Am J Reprod Immunol*. 2013, 69, 596-607.
86. Latos-Bieleńska A. Przyczyny poronień nawracających – aspekt genetyczny. W: *Poronienia nawracające*. Pod red. Skrzypczak J. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, W-wa, 2011, 56-66.

87. Lawyer, F, Stoffel S, Saiki R, Chang S, Landre P, Abramson R, Gelfand, D. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods Appl.* 1993, 2, 275–287.
88. Li YY. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G gene polymorphism and coronary artery disease in the Chinese Han population: a meta-analysis. *PLoS One.* 2012, 7, e33511.
89. Lin PC. Reproductive outcome in women with uterine anomalies. *J Womens Health.* 2004, 13, 33-39.
90. Liu Y, Heng CK, Saha N, Hong S, Low PS. Genotype associations of factor VII gene with plasma factor VII coagulant activity and antigen levels in healthy Chinese. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2002, 13, 217-224.
91. Łuczak-Wawrzyniak J, Czrnecka-Iwańczuk M, Bukowska A, Konofalska N. Early and late psychological effects of pregnancy loss. *Ginekol Pol.* 2010, 81, 374-377.
92. Magdoud K, Herbepin VG, Touraine R, Almawi WY, Mahjoub T. Plasminogen activator inhibitor 1 4G/5G and -844G/A variants in idiopathic recurrent pregnancy loss. *Am J Reprod Immunol.* 2013, 70, 246-252.
93. Malinowski A, Wilczyński J. Immunologiczne mechanizmy utrzymania ciąży. *Ginekol Prakt.* 2003, 4, 47-56.
94. Marchetti G, Patracchini P, Papacchini M, Ferrati M, Bernardi F. A polymorphism in the 5' region of coagulation-factor VII gene (f7) caused by an inserted decanucleotide. *Hum Genet.* 1993, 90, 575–576.
95. Martinelli I, Taioli E, Cetin I, Marinoni A, Gerosa S, Villa MV, Bozzo M, Mannucci PM. Mutations in coagulation factors in women with unexplained late fetal loss. *N Engl J Med.* 2000, 343, 1015-1018.
96. McGrogan A, Snowball J, de Vries CS. Pregnancy losses in women with Type 1 or Type 2 diabetes in the UK: an investigation using primary care records. *Diabet Med.* 2013, 30. doi: 10.1111/dme.12332.
97. McNamee K, Dawood F, Farquharson R. Recurrent miscarriage and thrombophilia: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2012, 24, 229-234.
98. Meade TW, Ruddock V, Chakrabarti R, Miller GJ. Fibrinolytic activity, clotting factors, and long-term incidence of ischaemic heart disease in the Northwick Park Heart Study. *Lancet.* 1993, 342, 1076-1079.
99. Mierla D, Szmal C, Neagos D, Cretu R, Stoian V, Jordan D. Association of Prothrombin (A20210G) and Factor V Leiden (A506G) with Recurrent Pregnancy Loss. *Maedica (Buchar).* 2012, 7, 222-226.
100. Miller CH, De Staercke C, Benson J, Hooper WC, Dilley A, Evatt BL, Benito C, Patterson-Barnett A, Eller D, Philipp CS. Elevated factor VII as a risk factor for recurrent fetal loss. Relationship to factor VII gene polymorphisms. *Thromb Haemost.* 2005, 93, 1089-1094.
101. Mitić G, Novakov Mikić A, Povazan L, Mitreski A, Kopitović V, Vejnović T. Thromboprophylaxis implementation during pregnancy in women with recurrent foetal losses and thrombophilia. *Med Pregl.* 2011, 64, 471-475.
102. Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R, Derksen RH, DE Groot PG, Koike T, Meroni PL, Reber G, Shoenfeld Y, Tincani A, Vlachoyiannopoulos PG, Krilis SA. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost.* 2006, 4, 295-306.
103. Młynarska A, Waszyrowski T. Inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1 w patogenezie zaburzeń naczyniowych. *Forum Kardiologów.* 2000, 2, 50-55.

104. Mo X, Hao Y, Yang X, Chen S, Lu X, Gu D. Association between polymorphisms in the coagulation factor VII gene and coronary heart disease risk in different ethnicities: a metaanalysis. *Medical Genetics*. 2011, 12, 107.
105. Mokafih M, Igala M, Oukkache B. Spontaneous miscarriages and congenital protein S deficiency: a case report. *Ann Biol Clin*. 2013, 71, 174-176.
106. Morgan JA, Bombell S, McGuire W. Association of Plasminogen Activator Inhibitor-Type 1 (-675 4G/5G) Polymorphism with Pre-Eclampsia: Systematic Review. *PLoS One*. 2013, 8, e56907.
107. Mrozikiewicz P, Cascorbi I, Ziemer S, Laule M, Meisel C, Stangl V, Rutsch W, Wernecke K, Baumann G, Roots I, Stangl K. Reduced procedural risk for coronary catheter interventions in carriers of the coagulation factor VII-Gln353 gene. *J Am Coll Cardiol*. 2000, 36, 1520-1525.
108. Nelson DB, Ness RB, Grisso JA, Cushman M. Influence of hemostatic factors on spontaneous abortion. *Am J Perinatol*. 2001, 18, 195-201.
109. Nicolaes GA, Dahlbäck B. Factor V and thrombotic disease: description of a janus-faced protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002, 22, 530-538.
110. Nigro G, Mazzocco M, Mattia E, Di Renzo GC, Carta G, Anceschi MM. Role of the infections in recurrent spontaneous abortion. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011, 24, 983-989.
111. O'Hara PJ, Grant FJ, Haldeman BA, Gray CL, Insley MY, Hagen FS, Murray MJ. Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987, 84, 5158-5162.
112. Ozdemir O, Yenicesu GI, Silan F, Köksal B, Atik S, Ozen F, Göl M, Cetin A. Recurrent pregnancy loss and its relation to combined parental thrombophilic gene mutations. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2012, 16, 279-286.
113. Padilla-Gutiérrez JR, Palafox-Sánchez CA, Valle Y, Orozco-Barocio G, Oregón-Romero E, Vázquez-Del Mercado M, Rangel-Villalobos H, Llamas-Covarrubias MA, Muñoz-Valle JF. Plasminogen activator inhibitor-1 polymorphisms (-844 G>A and HindIII C>G) in systemic lupus erythematosus: association with clinical variables. *Clin Exp Med*. 2011, 11, 11-17.
114. Pasińska M, Soszyńska K, Runge A, Dabrowska A, Juraszek A, Janiszewska T, Olga H. Molecular diagnostic tests for thrombophilia in patients referred to genetic counseling clinic because due to recurrent pregnancy failure. One center's experience. *Ginekol Pol*. 2012, 83, 178-182.
115. Patil R, Ghosh K, Satoskar P, Shetty S. Elevated procoagulant endothelial and tissue factor expressing microparticles in women with recurrent pregnancy loss. *PLoS One*. 2013, 8, e81407.
116. Pavlov AR, Pavlova NV, Kozyavkin SA, Slesarev AI. Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. *Trends Biotechnol*. 2004, 22, 253-260.
117. Pinjala RK, Reddy LR, Nihar RP, Praveen GV, Sandeep M. Thrombophilia - how far and how much to investigate? *Indian J Surg*. 2012, 74, 157-162.
118. Pollak ES, Hung HL, Godin W, Overton GC, High KA. Functional characterization of the human factor VII 5'-flanking region. *J Biol Chem*. 1996, 271, 1738-1747.
119. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-prime-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood*. 1996, 88, 3698-3703.

120. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012, 98, 1103-1111.
121. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2013, 99, 63.
122. Probst TM, Hill JA. Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med*. 2000, 18, 341-350.
123. Pushkov AA, Blagodatskikh KA, Nikitin AG, Agapkina IuV, Brovkin AN, Chudakova DA, Evdokimova MA, Aseicheva OIu, Osmolovskaia VS, Minushkina LO, Baklanova TN, Talyzin PA, Donetskaia OP, Tereshchenko SN, Dzhaiani NA, Akatova EA, Glezer MG, Galiavich AS, Zakirova VB, Koziolova NA, Iagoda AV, Boeva OI, Horolets EV, Shlyk SV, Volkova EG, Margarian MP, Guz' IO, Konstantinov VO, Sidorenko BA, Zateishchikov DA, Nosikov VV. Polymorphic markers Ala455Val of the THBD gene and Arg353Gln of the F7 gene and association with unfavorable outcomes of coronary atherosclerosis in patients with a history of acute ischemic heart disease. *Genetika*. 2011, 47, 1386-1392.
124. Quenby SM, Farquharson RG. Predicting recurrent miscarriage: what is important? *Obstet Gynecol*. 1993, 82, 132-138
125. Rai R, Backos M, Rushworth F, Regan L. Polycystic ovaries and recurrent miscarriage – a reappraisal. *Hum Reprod*. 2000, 15, 612-615.
126. Rai R. Is miscarriage a coagulopathy? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2003, 15, 265-268.
127. Regan L, Bakcos M, Farquharson RG. Recurrent Miscarriage. W: High Risk Pregnancy, James DK, Steer PJ, Weiner CP, Gonik B. 4<sup>th</sup> edition, 2010 Saunders, An imprint of Elsevier Inc.
128. Regan L, Rai R. Thrombophilia and pregnancy loss. *J Reprod Immunol*. 2002, 55, 163-180.
129. Reiner AP, Carlson CS, Rieder MJ, Siscovick DS, Liu K, Chandler WL, Green D, Schwartz M, Nickerson DA. Coagulation factor VII gene haplotypes, obesity-related traits, and cardiovascular risk in young women. *Thromb Haemost*. 2007, 5, 42-49.
130. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego w zakresie wybranych patologii wczesnej ciąży oraz postępowania w ciąży po zapłodnieniu *in vitro*. *Ginekologia po Dyplomie*. Wydanie specjalne. Grudzień 2005, 36-41.
131. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego w zakresie wybranych patologii wczesnej ciąży oraz postępowania w ciąży po zapłodnieniu *in vitro*. *Ginekologia po Dyplomie*. Wydanie specjalne. Luty 2008, 208-212.
132. Reznikoff-Etiévant M, Cayol V, Carbonne B. Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations are risk factors for very early recurrent miscarriage. *BJOG*. 2001, 108, 1251-1254.
133. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucl Acids Res*. 1990, 18, 6409-6412.
134. Sabater-Lleal M, Chill'on M, Howard TE, Gil E, Almasye L, Blangero J, Fontcuberta J, Soria J. Functional analysis of the genetic variability in the F7 gene promoter. *Atherosclerosis*. 2007, 195, 262-268.
135. Sacchi E, Tagliabue L, Scoglio R, Baroncini C, Coppola R, Bernardi F, Mannucci PM. Plasma factor VII levels are influenced by a polymorphism in the promoter region of the FVII gene. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1996, 7, 114-117.
136. Saidi S, Slamia LB, Mahjoub T, Ammou SB, Almawi WY. Association of PAI-1 4G/5G and -844G/A gene polymorphism and changes in PAI-1/tPA levels in stroke: a case-control study. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2007, 16, 153-159.

137. Sakowicz A, Fendler W, Lelonek M, Gluba A, Pietrucha T. Two polymorphisms of the FVII gene and their impact on the risk of myocardial infarction in poles under 45 years of age. *Mol Biol (Mosk)*. 2010, 44, 229-234.
138. Salwa K, Dickerman JD. Hereditary thrombophilia. *Thrombosis Journal*. 2006, 4, 15.
139. Sarig G, Younis JS, Hoffman R, Lanir N, Blumenfeld Z, Brenner B. Thrombophilia is common in women with idiopathic pregnancy loss and is associated with late pregnancy wastage. *Fertil Steril*. 2002, 77, 342-347.
140. Sarvananthan T, Das S. Thrombosis: simplified. *Phlebology* 2012, 27, suppl 2, 12-22.
141. Semczuk M. Zespół antyfosfolipidowy w przebiegu ciąży – diagnostyka i profilaktyka. *Prz Menopauzal*, 2010, 4, 271-274.
142. Seremak-Mrozikiewicz A, Barlik M, Borowczak P, Kurzawińska G, Kraśnik W, Nowocień G, Drews K. The frequency of 677C>T polymorphism of *MTHFR* gene in the Polish population. *Arch Perinat Med*. 2013, 19, 12-18.
143. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Kurzawińska G, Bogacz A, Grześkowiak E, Mrozikiewicz PM. The significance of 1793G>A polymorphism in *MTHFR* gene in women with first trimester recurrent miscarriages. *Neuro Endocrinol Lett*. 2010, 31, 717-723.
144. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Kurzawińska G, Barlik M, Mrozikiewicz PM. Związek polimorfizmu *Arg353Gln* czynnika VII krzepnięcia z poronieniami nawracającymi. *Ginekol Pol*. 2009, 80, 8-13.
145. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Barlik M. The course of pregnancy, delivery and puerperium in a women with multifactoral thrombophilia – a case report. *Ginekol Pol*. 2009, 80, 299-302.
146. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Puacz P, Kaluba-Skotarczak A. Trombophilia dziedziczna u kobiet z poronieniami nawracającymi oraz utratami ciąży w wywiadzie – doświadczenia własne. *Ginekol Pol*. 2008, 79, 630-634.
147. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Sobieszczyk S. Zasady postępowania oraz stosowanie profilaktyki przeciwzakrzepowej u ciężarnych z powikłaniami położniczymi oraz trombofilią wrodzoną. *Ginekol Pol*. 2007, 78, 971-976.
148. Skrzypczak J. Standardy postępowania w nieprawidłowościach pierwszego trymestru ciąży. W: *Poronienia nawracające*. Pod red. Skrzypczak J. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, W-wa, 2011, 197-209.
149. Skrzypczak J. Przyczyny poronień nawracających – zespół antyfosfolipidowy. W: *Poronienia nawracające*. Pod red. Skrzypczak J. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, W-wa, 2011, 75-91.
150. Skrzypczak J. Poronienie. W: *Ciąża wysokiego ryzyka*. Pod red. Bręborowicz GH. Wydanie III uaktualnione i rozszerzone. Ośrodek Wydawnictw Naukowych, Poznań 2010, 97-120.
151. Smith ML, Schust DJ. Endocrinology and recurrent early pregnancy loss. *Semin Reprod Med*. 2011, 29, 482-490.
152. Soldo V, Cutura N, Zamurovic M. Defect of methylenetetrahydrofolate reductase in a patient with ten habitual miscarriages: a case report. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2012, 39, 556-558.
153. Sotiriadis A, Papatheodorou S, Makrydimas G. Threatened miscarriage: evaluation and management. *BMJ*. 2004, 329, 152-155.
154. Stryer L. Poznawanie genów. W: *Biochemia*. Pod red. Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL. Wydawnictwo Naukowe PWN, W-wa 2009, 121-150.
155. Subrt I, Ulcova-Gallova Z, Cerna M, Hejnalova M, Slovanova J, Bibkova K, Micanova Z. Recurrent pregnancy loss, plasminogen activator inhibitor-1 (-675) 4G/5G

- polymorphism and antiphospholipid antibodies in Czech women. *Am J Reprod Immunol.* 2013, 70, 54-58.
156. Sun L, Lv H, Wei W, Zhang D, Guan Y. Angiotensin-converting enzyme D/I and plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G gene polymorphisms are associated with increased risk of spontaneous abortions in polycystic ovarian syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2010, 33, 77-82.
  157. Szkodziak P, Paszkowski T, Paszkowski M, Radomański T. Poronienie. W: *Położnictwo tom 2 – Medycyna matczyno- płodowa.* Pod red. Bręborowicz GH, Paszkowski T. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, W-wa 2012, 2-9.
  158. Tang AW, Quenby S. Recent thoughts on management and prevention of recurrent early pregnancy loss. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2010, 22, 446-451.
  159. Torres-Carrillo N, Torres-Carrillo NM, Vázquez-Del Mercado M, Rangel-Villalobos H, Parra-Rojas I, Sánchez-Enríquez S, Muñoz-Valle JF. Distribution of --844 G/A and Hind III C/G PAI-1 polymorphisms and plasma PAI-1 levels in Mexican subjects: comparison of frequencies between populations. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2008, 14, 220-226.
  160. Torres-Carrillo N, Torres-Carrillo NM, Martínez-Bonilla GE, Vázquez-Del Mercado M, Palafox-Sánchez CA, Oregón-Romero E, Bernard-Medina AG, Rangel-Villalobos H, Muñoz-Valle JF. Plasminogen activator inhibitor-1 C/G polymorphism in relation to plasma levels in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med.* 2009, 9, 223-228.
  161. Troiano RN, McCarthy SM. Mullerian duct anomalies: imaging and clinical issues. *Radiology.* 2004, 233, 19-34.
  162. Twig G, Shina A, Amital H, Shoenfeld Y. Pathogenesis of infertility and recurrent pregnancy loss in thyroid autoimmunity. *J Autoimmun.* 2012, 38, 275-281.
  163. World Health Organization recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period. *Acta Obstet Gynaecol Scand.* 1977, 56, 247-253.
  164. Weng X, Odouli R, Li DK. Maternal caffeine consumption during pregnancy and the risk of miscarriage: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol.* 2008, 198, 279.e1-8.
  165. Wilcox AJ, Weinberg CR, O'Connor JF, et al. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med.* 1988, 319, 189-194.
  166. Winter PC, Hickey GI, Fletcher HL. Genetyka populacji i ewolucja – Geny w populacjach: równowaga Hardy'ego-Weinberga. W: *Genetyka. Krótkie wykłady.* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2010, 262-271.
  167. Wu AH, Tsongalis GJ. Correlation of polymorphisms to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular diseases. *Am J Cardiol.* 2001, 87, 1361-1366.
  168. Vallerie AM, Breech LL. Update in mullerian anomalies: diagnosis, management and outcomes. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2010, 22, 381-387.
  169. van 't Hooft FM, Silveira A, Tornvall P, Iliadou A, Ehrenborg E, Eriksson P, Hamsten A. Two common functional polymorphisms in the promoter region of the coagulation factor VII gene determining plasma factor VII activity and mass concentration. *Blood.* 1999, 93, 3432-3441.
  170. Vora S, Shetty S, Salvi V, Satoskar P, Ghosh K. Thrombophilia and unexplained pregnancy loss in Indian patients. *Natl Med J India.* 2008, 21, 116-119.
  171. Vora S, Shetty S, Ghosh K. Coagulation factor deficiency as a cause of recurrent fetal loss: a red herring! *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2007, 18, 571-574.
  172. Yamada N, Arinami T, Yamakawa-Kobayashi K, Watanabe H, Sohda S, Hamada H, Kubo T, Hamaguchi H. The 4G/5G polymorphism of the plasminogen activator inhibitor-1 gene is associated with severe preeclampsia. *J Hum Genet.* 2000, 45, 138-141.

## 10. SPIS TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII

**Tabela 1.** Częstość występowania w populacji ogólnej genetycznie uwarunkowanych zaburzeń hemostazy mogących być przyczyną poronień nawracających [wg Salwa 2006].

**Tabela 2.** Charakterystyka porównawcza kobiet z grupy badanej i kontrolnej.

**Tabela 3.** Charakterystyka badanych w pracy polimorfizmów.

**Tabela 4.** Startery użyte do reakcji PCR.

**Tabela 5.** Skład mieszaniny do reakcji PCR (podano stężenie wyjściowe na 1 próbkę w  $\mu\text{L}$ ).

**Tabela 6.** Warunki reakcji PCR.

**Tabela 7.** Skład mieszaniny do hydrolizy produktu PCR enzymem restrykcyjnym (podano stężenie wyjściowe na 1 próbkę w  $\mu\text{l}$ ).

**Tabela 8.** Wielkości fragmentów po reakcji hydrolizy oraz zastosowane enzymy restrykcyjne.

**Tabela 9.** Charakterystyka porównawcza kobiet z grupy badanej i kontrolnej.

**Tabela 10.** Charakterystyka porównawcza kobiet z podgrupy z dwoma poronieniami oraz z podgrupy z trzema i więcej poronieniami.

**Tabela 11.** Charakterystyka porównawcza kobiet z podgrupy z występowaniem poronień w I trymestrze oraz z podgrupy z występowaniem poronień w I i II trymestrze ciąży.

**Tabela 12.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 13.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-323P0/P10* genu czynnika VII krzepnięcia w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 14.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-122T>C* genu czynnika VII krzepnięcia w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 15.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-675 4G/5G* genu *PAI-1* w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 16.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *HindIII C>G* genu *PAI-1* w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 17.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-844G>A* genu *PAI-1* w grupie kobiet z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 18.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia w podgrupach kobiet z dwoma oraz trzema i więcej poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 19.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-323P0/P10* genu czynnika VII krzepnięcia w podgrupach kobiet z dwoma oraz trzema i więcej poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 20.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-122T>C* genu czynnika VII krzepnięcia w podgrupach kobiet z dwoma oraz trzema i więcej poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 21.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-675 4G/5G* genu *PAI-1* w podgrupach kobiet z dwoma oraz trzema i więcej poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 22.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *HindIII C>G* genu *PAI-1* w podgrupach kobiet z dwoma oraz trzema i więcej poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 23.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-844G>A* genu *PAI-1* w podgrupach kobiet z dwoma oraz trzema i więcej poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 24.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia w podgrupach kobiet z poronieniami w I oraz w I i II trymestrze ciąży oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 25.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-323P0/P10* genu czynnika VII krzepnięcia w podgrupach kobiet z poronieniami w I oraz w I i II trymestrze ciąży oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 26.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-122T>C* genu czynnika VII krzepnięcia w podgrupach kobiet z poronieniami w I oraz w I i II trymestrze ciąży oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 27.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-675 4G/5G* genu *PAI-1* w podgrupach kobiet z poronieniami w I oraz w I i II trymestrze ciąży oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 28.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *HindIII C>G* genu *PAI-1* w podgrupach kobiet z poronieniami w I oraz w I i II trymestrze ciąży oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 29.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-844G>A* genu *PAI-1* w podgrupach kobiet z poronieniami w I oraz w I i II trymestrze ciąży oraz w grupie kontrolnej.

**Tabela 30.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *Arg353Gln* genu czynnika VII oraz *-675 4G/5G* genu *PAI-1* pomiędzy badanymi grupami kobiet.

**Tabela 31.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *Arg353Gln* genu czynnika VII oraz *-844G>A* genu *PAI-1* pomiędzy badanymi grupami kobiet.

**Tabela 32.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *Arg353Gln* genu czynnika VII oraz *HindIII* genu *PAI-1* pomiędzy badanymi grupami kobiet.

**Tabela 33.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *-675 4G/5G* oraz *-844G>A* genu *PAI-1* pomiędzy badanymi grupami kobiet.

**Tabela 34.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *-675 4G/5G* oraz *HindIII C>G* genu *PAI-1* pomiędzy badanymi grupami kobiet.

**Tabela 35.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *-844G>A* oraz *HindIII C>G* genu *PAI-1* pomiędzy badanymi grupami kobiet.

**Tabela 36.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *Arg353Gln* i *-323P0/10* genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet.

**Tabela 37.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *-675 4G/5G* genu *PAI-1* oraz *-323 P0/10* genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet.

**Tabela 38.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *-844G>A* genu *PAI-1* oraz *-323 P0/10* genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet.

**Tabela 39.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *HindIII C>G* genu *PAI-1* oraz *-323 P0/10* genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet.

**Tabela 40.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *Arg353Gln* i *-122T>C* genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet.

**Tabela 41.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *4G/5G* genu *PAI-1* oraz *-122T>C* genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet.

**Tabela 42.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *-844G>A* genu *PAI-1* oraz *-122T>C* genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet.

**Tabela 43.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *HindIII C>G* genu *PAI-1* oraz *-122T>C* genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet.

**Tabela 44.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *-323P0/10* oraz *-122T>C* genu czynnika VII pomiędzy badanymi grupami kobiet.

**Tabela 45.** Częstość występowania w populacji ogólnej prezentowanych powyżej polimorfizmów genu czynnika VII.

**Tabela 46.** Badania potwierdzające udział analizowanych w pracy i innych polimorfizmów genu czynnika VII krzepnięcia w rozwoju chorób o podłożu zakrzepowym.

**Tabela 47.** Badania dotyczące udziału analizowanych w pracy polimorfizmów genu *PAI-1* w etiologii poronień nawracających.

**Tabela 48.** Badania dotyczące udziału analizowanych w pracy polimorfizmów genu *PAI-1* w rozwoju chorób o podłożu zakrzepowym.



- Rycina 1.** Przyczyny poronień nawracających.
- Rycina 2.** Podział trombofilii na wrodzoną i nabytą oraz jej najczęstsze przyczyny.
- Rycina 3.** Schemat kaskady krzepnięcia z uwzględnieniem przyczyn trombofilii wrodzonej.
- Rycina 4.** Schemat przedstawiający analizowane w pracy polimorfizmy genu czynnika VII krzepnięcia.
- Rycina 5.** Udział inhibitora aktywatora plazminogenu (PAI-1) w układzie fibrynolizy [wg Młynarska i wsp., 2000 w modyfikacji własnej].
- Rycina 6.** Polimorfizm -675 4G/5G genu *PAI-1*.
- Rycina 7.** Schemat przedstawiający analizowane w pracy polimorfizmy genu *PAI-1*.
- Rycina 8.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia w grupie badanej i kontrolnej.
- Rycina 9.** Częstość występowania alleli polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII krzepnięcia w grupie badanej i kontrolnej.
- Rycina 10.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu -323P0/P10 genu czynnika VII krzepnięcia w grupie badanej i kontrolnej.
- Rycina 11.** Częstość występowania alleli polimorfizmu -323P0/P10 genu czynnika VII krzepnięcia w grupie badanej i kontrolnej.
- Rycina 12.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu -122T>C genu czynnika VII krzepnięcia w grupie badanej i kontrolnej.
- Rycina 13.** Częstość występowania alleli polimorfizmu -122T>C genu czynnika VII krzepnięcia w grupie badanej i kontrolnej.
- Rycina 14.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu -675 4G/5G genu *PAI-1* w grupie badanej oraz kontrolnej.
- Rycina 15.** Częstość występowania alleli polimorfizmu -675 4G/5G genu *PAI-1* w grupie badanej oraz kontrolnej.
- Rycina 16.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu *HindIII* genu *PAI-1* w grupie badanej i kontrolnej.
- Rycina 17.** Częstość występowania alleli polimorfizmu *HindIII* genu *PAI-1* w grupie badanej i kontrolnej.
- Rycina 18.** Częstość występowania genotypów polimorfizmu -844G>A genu *PAI-1* w grupie badanej i kontrolnej.
- Rycina 19.** Częstość występowania alleli polimorfizmu -844G>A genu *PAI-1* w grupie badanej i kontrolnej.

**Fotografia 1.** Analiza genotypów polimorfizmu *Arg353Gln* genu czynnika VII po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *MspI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 3, 4, 5, 8, 10 homozygoty niezmutowane *Arg353/Arg353*, tory 1, 6, heterozygoty *Arg353/Gln353*, tory 7, 9 homozygota zmutowana *Gln353/Gln353*.

**Fotografia 2.** Analiza genotypów polimorfizmu -323P0/P10 genu czynnika VII po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Eco130I*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 homozygoty niezmutowane -323P0/-323P0, tor 8 heterozygota -323P0/-323P10, tor 2 homozygota zmutowana -323P10/-323P10.

**Fotografia 3.** Analiza genotypów polimorfizmu -122T>C genu czynnika VII po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *SduI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 homozygoty niezmutowane -122TT, tor 8 heterozygota -122TC, tor 2 homozygota zmutowana -122CC.

**Fotografia 4.** Analiza genotypów polimorfizmu -6754G/5G genu *PAI-1* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *BsII*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 5, 6 homozygoty niezmutowane -675 4G/-675 4G, tory 3, 9, 10 heterozygoty -675 4G/-675 5G, tory 2, 4, 7, 8 homozygota zmutowana -675 5G/-675 5G.

**Fotografia 5.** Analiza genotypów polimorfizmu *HindIII* genu PAI-1 po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *HindIII*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 3, 4, 6, 10 homozygoty niezmutowane *HindIII* CC, tory 2, 5, 8 heterozygoty *HindIII* CG, tory 7, 9 homozygota zmutowana *HindIII* GG.

**Fotografia 6.** Analiza genotypów polimorfizmu -844G>A genu PAI-1 po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *XhoI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tor 3 homozygota niezmutowana -844GG, tory 2, 4, 6 ,8 heterozygoty -844GA, tory 5, 7, 9 homozygoty zmutowane -844GG.