

Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Genový polymorfismus Th1/Th2 cytokinů u pacientek s děložní myomatózou

MUDr. Ondřej Sosna

2011

Doktorské studijní programy v biomedicině
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Experimentální chirurgie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.

Školící pracoviště: Gynekologicko-porodnická klinika 1. LF UK a VFN v Praze

Školitel: doc. MUDr. David Kužel, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
1. ÚVOD	6
1.1 Děložní myomy	6
1.2 Cytokiny	7
1.3 Genové polymorfismy	8
2. HYPOTÉZA A CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE	9
3. MATERIÁL A METODIKA	10
3.1 Soubor pacientek	10
3.2 DNA analýza	11
3.3 Statistická analýza	12
4. VÝSLEDKY	12
4.1 Demografická data	12
4.2 Operační data	13
4.3 Polymorfismy	13
5. DISKUZE	17
6. ZÁVĚR	19
7. LITERATURA	20
8. Seznam publikací s tématikou vztahující se k disertační práci	23
9. Seznam publikací bez vztahu k disertační práci	23

ABSTRAKT

Úvod: Děložní myom (leiomyom) je nejčastěji se vyskytujícím nezhoubným nádorem v oblasti ženského genitálního traktu a představuje nejčastější indikaci k provedení hysterektomie. Jeho etiologie však stále zůstává neznámá. V posledních letech jsou podrobněji zkoumány genetické faktory podílející se na vzniku děložních myomů. Cílem naší práce bylo najít možné genetické faktory použitelné jako prognostický marker k evaluaci zvýšeného rizika vzniku tohoto onemocnění.

Metodika: Do studie jsme zařadili 102 pacientek s děložními myomy, jako kontrolní skupina sloužil soubor 145 zdravých žen. Všem těmto ženám bylo provedeno ultrazvukové vyšetření malé pánve a odebrán vzorek nesrážlivé krve. Ve skupině pacientek s děložním myomem následovala vždy po zvolené operační intervenci histologická verifikace nálezu. Princip detekce polymorfismů cytokinových genů byl založen na jednoduché PCR reakci s využitím sekvenčně specifických primerů.

Výsledky: Porovnali jsme široké spektrum SNP (z angl. single nucleotide polymorphisms) TH2/Th2 cytokinových genů celého souboru pacientek s kontrolním souborem. Frekvence většiny testovaných SNP nedosáhla u pacientek statisticky významného rozdílu. Našli jsme však zajímavý rozdíl v distribuci genotypů promotoru genu pro IL-4. Genotyp CC v pozici -590 a -33 byl zastoupen u pacientek s menší frekvencí než u kontrol ($p=0,03$). Dále jsme porovnávali pacientky s kontrolami po rozdělení souboru pacientek do dvou skupin dle jejich věku ≤ 35 a >35 . Pozorovali jsme stejný trend v nižší frekvenci genotypu CC v pozicích -590 a -33 u pacientek starších 35 let ($p=0,09$), nikoliv však u mladších pacientek. Kromě IL-4 jsme zaznamenali rozdíl v distribuci genotypů i u v rámci promotoru genu TNF α (SNP -308 A/G). Frekvence genotypu AA byla vyšší u pacientek pod 35 let ($p=0,02$). Tento rozdíl nebyl u starších pacientek potvrzen (>35).

Souhrn: Naše práce jako první analyzuje pomocí molekulárně-genetických metodik (PCR-SSP) takto rozsáhlé spektrum cytokinů a jejich polymorfismů. Výsledky naší práce naznačují možnou souvislost mezi přítomností některých genových polymorfismů cytokinů (IL-4, TNF- α) a zvýšeným rizikem vzniku děložní myomatózy. Pochopitelně budou za potřebí další výzkumné projekty k objasnění mechanismu působení výše uvedených souvislostí.

KLÍČOVÁ SLOVA

Děložní myom, leiomyom, cytokiny, interleukin 4 (IL-4), tumor nekrotizující faktor alfa (TNF α), genový polymorfismus

ABSTRACT

Background: Uterine fibroid (UF) or leiomyoma is the most frequent benign tumour upon lower genital tract and represents the most frequent indication for hysterectomy. The aetiology remains still unknown. The genetic factors contributing for the development of UF are being intensively investigated. The aim of our study was to look for possible genetic markers which could be used as prognostic tools for evaluation of an increased risk for development of UF.

Methods: The study group enrolled 102 patients diagnosed with UF and 145 healthy controls. Ultrasonographic examination of the pelvis was performed and a single blood sample was taken in all women. Histological verification followed the surgery in the patient group. The principal of the cytokine gene polymorphisms detection is based on PCR reaction with sequence-specific primers.

Results: A large spectrum of Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in patients with uterine fibroid was compared with control group. The frequencies of the majority of tested cytokine gene SNP in the patient cohort were not statistically different from the cytokine SNP in the control group. However, an intriguing association between polymorphisms of the IL-4 gene promotor at positions -590 C/T and -33 C/T, and the risk of leiomyoma was observed. The CC genotype of IL-4 at position -590 and -33 was less frequent in the patient group than in the control group ($p=0.03$). Besides IL-4, we observed different genotype distribution of the gene for TNF- α -308A/G. The frequency of genotype AA was higher in the younger (<35 years) patient group ($p=0.02$).

Conclusion: This study as a first has analysed such a large spectrum of cytokines and their polymorphism using molecular and genetic techniques (PCR-SSP). Our results suggest that certain cytokine gene polymorphisms, especially of the IL-4 and TNF- α genes may be associated with increased risk for development of uterine fibroid. Further investigation will be needed for elucidation of the mechanisms responsible for these associations.

KEY WORDS

Uterine fibroid, leiomyoma, cytokines, interleukine 4 (IL-4), tumour necrosis factor alpha (TNF- α), gene polymorfism

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1.1 Děložní myomy

Děložní myomy představují poměrně důležitý zdravotní problém současnosti a pro mnoho žen znamenají ohrožení jejich reprodukčního zdraví. Až do nedávné doby byla vzniku leiomyomů navzdory jejich prevalenci věnována jen malá pozornost. Důvodem byl možná jejich nízký potenciál k maligní transformaci. Ačkoli jsou příčiny vzniku děložních myomů stále neznámé, současná vědecká literatura obsahuje řadu informací týkajících se epidemiologie, genetiky, hormonálních aspektů a molekulární biologie těchto tumorů. Myomatózní děloha je navíc nejčastější indikací k provedení hysterektomie (Flake, 2003). Nejčastějším symptomem tohoto onemocnění je hypermenorrhoea, nepravidelné krvácení, bolesti a tlak v podbřišku, problémy s močením, defekací nebo při pohlavním styku, dále pak sterilita nebo opakované těhotenské ztráty včetně řady různých těhotenských komplikací jako je předčasný porod, abrupce placenty, patologické polohy plodu, atd. Myomy jsou benigní, monoklonální nádory složené z hladkých svalových buněk myometria, extracelulární matrix obsahující kolagen, fibronektinu a proteoglykanu.

Podle WHO klasifikace se leiomyocelulární nádory dělohy dělí na leiomyom obvyklé struktury, hladkosvalový nádor nejistého maligního potenciálu a leiomyosarkom. Naprostou převahu těchto tumorů tvoří benigní leiomyomy, které jsou zároveň nejčastějšími nádory těla děložního. Děložní myom (leiomyoma uteri, uterine fibroid) je nejčastěji se vyskytujícím nezhoubným nádorem v oblasti ženského genitálního traktu. Nejvyšší frekvence výskytu myomu, 30-40% se udává u žen ve věku 40 let (Wallach, 2004). Incidence myomů je u žen černé rasy signifikantně vyšší než u bělošek (Marshall, 1997).

Rizikové faktory vzniku nebo diagnózy myomu se zvyšují s věkem, časnějším nástupem menarche, roli hrají genetické faktory, etnický původ, obezita, hypertenze a zvýšení HDL a cholesterolu (Mára, 2009). Naopak kouření je považováno za protektivní faktor. S počtem vykouřených cigaret za den relativní riziko ještě více klesá. Tento ochranný efekt však u exkuřaček mizí. Parita je nepřímo úměrná prevalenci myomů (Arici, 2003). Těhotenství v průběhu středního reprodukčního věku (25-29 let) poskytuje největší ochranu proti vývoji myomů. Na vliv kontraceptiv, exogenních hormonů a hormonální substituční terapie jsou rozporuplné názory. Příznivý vliv orální kontracepce na vývoj děložních myomů lze očekávat pouze u žen právě užívajících kontraceptiva nebo krátce po skončení jejich aplikace (Mára, 2009). Hormonální substituční terapie v postmenopauze může mírně

stimulovat růst leiomyomů nebo alespoň blokovat jejich zmenšování po menopauze. Zmenšení myomů naopak obvykle nastává účinkem GnRH agonistů.

V poslední době je věnována velká pozornost především genetickým faktorům. Bylo prokázáno, že děložní myomy se vyskytují častěji u žen s pozitivní rodinnou zátěží (Lumbiganon, 1995). Je referován vyšší výskyt děložních myomů u monozygotických dvojčat oproti dizygotickým, což nahrává některým genetickým teoriím (Gross & Morton, 2001).

Karyotyp leiomyomů je asi v 40% abnormální. Histologicky pak nacházíme častěji zvýšeně buněčné myomy nebo myomy s atypiami. U více než 100 genů v nádorových buňkách byly nalezeny poruchy regulace, včetně genů spojených s produkcí sexuálních steroidů (estrogenové receptory α a β , progesteronové receptory A a B, receptor růstového hormonu a prolaktinu, matrixové a kolagenní geny). Řada z těchto genů se podílí na řízení buněčného růstu, diferenciaci, proliferaci a mitogenezi (Mára, 2009). Mnohočetný výskyt leiomyomů (v kůži a děloze) provází tzv. hereditární leiomyomatózu neboli Reedův syndrom. Onemocnění postihuje muže i ženy. Mutací genu pro fumarát hydratázu dochází ke ztrátě tumorsupresorových mechanismů. Jde o autozomálně dominantní typ dědičnosti s neúplnou penetrancí s rizikem maligní transformace leiomyomu na leiomyosarkóm nebo vznikem renálního papilárního karcinomu (Alam, 2005).

Růstové faktory (TGF- β , bFGF, EGF, VEGF, PDGF, IGF, prolaktin), proteiny nebo polypeptidy, produkované lokálně buňkami hladkého svalstva a fibroblasty kontrolují proliferaci těchto buněk a mohou také stimulovat růst myomu. TGF- β je jediným prokázaným růstovým faktorem se zvýšenou expresí ve tkáni leiomyomu oproti zdravému myometriu (Sozen, 2006). Basis fibroblast growth factor (bFGF) působí na proliferaci buněk hladké svaloviny včetně myometria a leiomyomů a je hojně uložen v extracelulárním matrix myomů.

Je pravděpodobné, že řada významných růstových faktorů bude teprve objevena. Zatím se zdá, že růstové faktory, cytokiny a případně další látky působí při vzniku a růstu myomů jako mediátory působení ovariálních steroidů, jež hrají roli regulátorů genové exprese v buňkách (Sozen, 2006).

1.2 Cytokiny

Cytokiny jsou základní regulátory imunitního systému, tkáňové hormony - proteiny (glykoproteiny, peptidy) produkované buňkami imunitního systému, které působí prostřednictvím specifických receptorů na různé buňky imunitního systému i mimo něj (Hořejší, 2002). Na jejich produkci se podílí jak buňky přirozené, tak adaptivní imunity.

Cytokiny jsou schopné navodit například rychlé dělení a diferenciaci určitých typů buněk v boji proti patogenům, případně další procesy imunitní obrany. Cytokiny hrají důležitou roli v zánětu a při vzniku autoimunity. Ve snaze o zavedení jednotné nomenklatury byly tyto proteiny označovány jako interleukiny a číslovány podle pořadí, ve kterém byla jejich struktura poznána. V některých případech však nebyla nomenklatura interleukinů zavedena a byl ponechán tradiční název (např. tumor nekrotizující faktor, interferony, transformující růstové faktory apod.) Z těchto důvodů se začal používat obecnější termín cytokin. V posledních letech bylo též zjištěno, že některé hormony (VIP, prolaktin) mohou v určitých situacích fungovat jako cytokiny. V současnosti je známo něco okolo 120 různých cytokinů a lze předpokládat, že jejich počet bude narůstat.

Účinek cytokinů je zprostředkován přes specifické receptory o dvou podjednotkách. Jedna z nich je zodpovědná za specifickou vazbu cytokinu, zatímco druhá či třetí zajišťuje spojení se signalizačními intracelulárními molekulami. Vazba cytokinu na specifický povrchový receptor způsobí v receptorové molekule konformační změnu, která se projeví v intracelulární části receptoru a zahájí přenos signálu do buňky. Většina cytokinových receptorů je v intracelulární části nekovalentně spojena s cytoplazmatickými proteinkinázami. Proteinkinázy jsou enzymy fosforylující jiné proteiny. Tímto je spuštěna signalizační kaskáda. Výsledek signalizace přes cytokinové receptory závisí na typu buňky, povaze receptoru a na spolupůsobení jiných signálů. V konečném důsledku může dojít od stimulace buněčného dělení a diferenciaci, přes spuštění efektorových mechanismů (degranulace, aktivace membránových enzymů, chemotaxe apod.) až po zablokování buněčného cyklu a k apoptóze (Hořejší, 2002; Abbas, 2000).

Na účast cytokinů v terapii onemocnění je nutné pohlížet ze dvou zcela opačných pohledů. Na jednu stranu lze některé cytokiny podávat a tímto využívat jejich působení na jednotlivé systémy a na stranu druhou je v některých případech žádoucí působení cytokinů blokovat, jak přímou blokádu jejich tvorby, tak blokádu receptorů, kterými je jejich účinek zprostředkován.

1.3 Genové polymorfismy

Genetický polymorfismus je dle definice existence dvou nebo více alel (variant genů) v jednom lokusu, převyšující svým výskytem 1% výskyt v populaci. Jednonukleotidové polymorfismy (z angl. single nucleotide polymorphisms neboli SNP) jsou nejčastěji nacházenou genetickou změnou v lidské populaci (0,1% lidského genomu). Každý SNP

reprezentuje rozdíl (odchylku) právě v jednom nukleotidu v sekvenci DNA (Shastry, 2002). SNP mohou být součástí kódujících úseků – exonů, častěji se ale vyskytují v nekódujících oblastech – intronech. SNP jsou vhodné pro genetické či evoluční studie člověka, neboť jsou stabilní a jsou roztroušeny po celém lidském genomu s frekvencí asi 1 SNP na 1000bp. SNP se oproti náhodné mutaci předávají z generace na generaci a jde tedy o vrozenou záležitost. Mutace vzniká naopak u jedince náhodně a není zaručeno, že se předá do další generace. V oblasti genomiky dnes probíhá velmi intenzivní výzkum pomocí tzv. asociačních genomických studií. Tyto studie mapují výskyt SNP v lidském genomu a snaží se najít souvislost s konkrétním onemocněním.

Genová exprese cytokinů je přísně regulována a změny v této regulaci (genový polymorfismus, vnější vlivy) mohou ovlivnit i jejich funkci. Mohou také souviset s řadou onemocnění, s náchylností k infekcím či s reakcí na léčbu. Cytokiny a jejich receptory jsou vysoce polymorfní (Bidwell, 1999). SNP mohou ovlivnit funkci genu několika způsoby – např.: záměnou aminokyseliny (IL-13), přeskočením exonu (IL-7R α), vznikem proximálních promotorových variant (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, TNF, TGF- β), distálních promotorových variant (IL-6, IL-18) a intronové varianty (IL-8). Promotorové polymorfismy mohou narušit nebo úplně zrušit působení některých regulačních transkripčních faktorů, a tak přímo ovlivnit celou signální transdukcí. SNP u cytokinů se využívají především v asociačních studiích některých onemocnění nebo u transplantačních studií. Nicméně řada onemocnění je komplexní polygenní porucha a význam jednotlivých cytokinů a jejich polymorfismů na vývoj nebo vznik choroby je nejasný.

2. HYPOTÉZA A CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem naší práce bylo najít možné genetické faktory použitelné jako prognostický marker k evaluaci zvýšeného rizika vzniku děložních myomů. Souvislost genových polymorfismů cytokinů s patogenezí děložních myomů podporují některé konkrétní studie (Hsieh, 2007; Hsieh, 2004; Litovkin., 2007).

Naše hypotéza možné asociace genových polymorfismů cytokinů a zvýšené incidence děložní myomatózy byla založena na skutečnosti, že cytokiny mohou zvyšovat produkci matrix metaloproteináz, které mohou následně stimulovat děložní růst. (Inagaki, 2002). Tyto polymorfismy nemusí být přímo spojeny se vznikem tohoto onemocnění, ale mohou být užitečným vodítkem při studiu této multifaktoriální choroby. Některé cytokiny navíc působí

jako tzv. růstové faktory, které svým promitotickým účinkem (proliferace a diferenciacie buněk) nebo indukci syntézy extracelulární matrix nebo její remodelací vedou k fibrotizaci a růstu tumorů. Např. transformující růstový faktor beta (TGF β) patří mezi multifunkční cytokiny s promitotickým účinkem nebo vlivem na syntézu extracelulární matrix (Arici, 2000). Fibroblastový růstový faktor (bFGF) působí na proliferaci buněk hladké svaloviny včetně myometria a leiomyomů a je hojně uložen v extracelulární matrix myomů. Úloha vascular endothelial growth faktoru (VEGF), který není mitogenem pro buňky hladké svaloviny, je stimulace angiogeneze a vzestup cévní permeability, která je esenciální pro růst tumorů. Smyslem této práce byla tedy analýza genových polymorfismů širokého spektra Th1/Th2 (prozánětlivých a protizánětlivých) cytokinů u pacientek s děložními myomy a porovnání výsledků se zdravými kontrolami. Takto široké spektrum vyšetřovaných genových polymorfismů konkrétních cytokinů nebylo dosud v souvislosti s tímto onemocněním vyšetřováno.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1 Soubor pacientek

Do prospektivní studie bylo zařazeno 102 pacientek s děložními myomy proti souboru 145 zdravých kontrol. Vhodné kandidátky byly získány na základě odběru anamnestických dat, výsledku transvaginální sonografie na přítomnost, velikost a charakter či absenci děložních myomů s vhodným BMI ve stanoveném věkovém rozmezí. Vzhledem k rasovým rozdílům genových polymorfismů cytokinů v různých populacích byly primárně vyloučeny ženy jiné než české národnosti. Všem ženám zařazeným do studie byl odebrán vzorek nesrážlivé krve. Ve skupině pacientek s děložním myomem následovala vždy po zvolené operační intervenci histologická verifikace nálezu. Proto byl jediným vstupním histologickým kriteriem studie tzv. leiomyom obvyklé histologické struktury. Soubor pacientek s děložními myomy tvořily jednak ženy (skupina A; n=40) do věku 35 let včetně, průměrný věk 30.8 ± 3.3 (SD), s BMI<25, s negativní farmakologickou a onkologickou anamnézou a abnormální ultrasonografií malé pánve (tj. s přítomností děložního myomu/ů), jednak ženy (skupina B; n=62) starší 35 let, průměrný věk 47.9 ± 4.2 (SD) s BMI<25, s negativní farmakologickou a onkologickou anamnézou a abnormální ultrasonografií malé pánve (tj. s přítomností děložního myomu/ů). Jako minimální velikost myomu byla stanovena velikost 3 cm v případě solitárního myomu, nebo výskyt alespoň 4 drobných myomů větších než 1 cm u

mnohočetných děložních myomatóz. Průměrná velikost myomu činila $5.7 \text{ cm} \pm 1.8(\text{SD})$. Způsob operačního odstranění myomu byl různý. Ve skupině A se jednalo o tzv. dělohu šetřící výkony (vzhledem k přání zachovat fertilitu), tj. laparoskopická myomektomie (LM) 85%, laparotomická neboli otevřená myomektomie (OM) 10%, event. transcervikální resekce myomu (TCRM) 5%. Ve skupině B byla naopak provedena laparoskopicky asistovaná vaginální hysterektomie (LAVH) 93%, totální laparoskopická hysterektomie (TLH) 5% nebo abdominální hysterektomie (AH) 2%. Zdravou kontrolní skupinu tvořily ženy ($n=145$) ve věku 20-55 let, průměrný věk v tomto rozmezí zde činil $45.0 \pm 8.5(\text{SD})$ let, s BMI < 25, s negativní rodinnou, farmakologickou a onkologickou anamnézou a normální ultrasonografií malé pánve (tj. bez přítomnosti děložního myomu).

3.2 DNA analýza

DNA byla izolovaná z plné krve. Následně jsme provedli kontrolu kvality izolace DNA za pomoci spektrofotometrického měření. Poměr čisté DNA se pohyboval v rozmezí 1.7 – 1.9. DNA jsme uchovávali při teplotě -20°C . Pro typizaci polymorfismů cytokinových genů jsme zvolili soupravu Cytokine Genotyping Kit. Princip detekce polymorfismů je založen na jednoduché PCR reakci s využitím sekvenčně specifických primerů (SSP-PCR). Tyto primery mají své specifické 3'-koncové nukleotidy, které překrývají konkrétní SNP (single nucleotide polymorphism) pozice. V případě úplné kompatibility primeru (zvláště na 3'-konci) s cílovou sekvencí genomické DNA dojde k nasednutí termostabilní polymerázy a proběhne syntéza nového řetězce. Výsledné produkty PCR reakce se následně rozdělí v agarosové elektroforéze dle své velikosti a vizualizují se pod UV světlem. S pomocí dokumentačního zařízení se pořídí fotografie gelu. Na výsledné fotografii se hodnotí přítomnost/nepřítomnost produktu, jinými slovy přítomnost/nepřítomnost SNP v genomické DNA.

Byly detekovány následující cytokiny a jejich polymorfismy: interleukin IL-1 α (-889 T/C), IL-1 β (-511 T/C a +3962 T/C), IL-1R (pst11970 C/T), IL-1RA (mspa111100 T/C), IL-4R α (+1902 G/A), IL-12 (-1188 C/A), interferon (IFN)- γ (+874 A/T), TGF- β 1 (kodón 10 C/T a kodón 25 G/C), tumor nekrotizující faktor (TNF)- α (-308 G/A a -238 G/A), IL-2 (-330 T/G a +166 G/T), IL-4 (-1098 T/G, -590 T/G a -33 T/C), IL-6 (-174 G/C a nt565 G/A) a IL-10 (-1082 G/A, -819 C/T a -592 C/A).

3.3 Statistická analýza

Genotypové a alelické frekvence byly určeny přímým spočítáním a statisticky porovnány s kontrolní skupinou chí-kvadrát testem nebo Fischerovým testem v případech, kde nešlo použít chí-kvadrát test. Hladina významnosti p byla považována za statisticky významnou při hodnotách menších nebo rovných 0,05. Pro detekci významných velkých rozdílů byly pomocí algoritmu Z-score přizpůsobeny standardní odchylky mezi pozorovanými a očekávanými hodnotami v každé buňce. V případech mnohočetného porovnávání, kde v rámci jednoho genu byly sledovány 2 a více SNP, byla použita Bonferroniho metoda korekce.

4. VÝSLEDKY

4.1 Demografická data

Demografická data, kterými jsou soubory charakterizovány, jsou shrnuty v tabulce 1. Pacientky souboru byly podle věku rozděleny do dvou skupin. Skupinu A tvořilo 40 žen ≤ 35 let, průměrný věk v této skupině byl $30.8 \pm 3.3(\text{SD})$. Skupinu B tvořilo 62 žen ≥ 35 let, průměrný věk v této skupině byl $47.9 \pm 4.2(\text{SD})$. Kontrolní skupinu tvořilo 145 žen, průměrný věk byl $45.0 \pm 8.5(\text{SD})$.

Tabulka 1: demografická data

	Věk (průměr)	(SD)	BMI (průměr) [kg/m ²]
Skupina A	30.8	3.3	22.8
Skupiny B	47.9	4.2	23.9
Kontroly	45.0	8.5	23.6

4.2. Operační data

Všechny pacientky zahrnuté do studie podstoupily operační výkon na Gynekologicko-porodnické klinice VFN a 1. LF UK v letech 2007-2008. Pro skupinu A byly typické dělohu šetřící výkony (LM, OM, TCRM), pro skupinu B naopak výkony definitivní (LAVH, TLH, AH). Procentuelní zastoupení jednotlivých výkonů shrnuje tabulka 2. Průměrná velikost solitárních myomů byla $5.7 \text{ cm} \pm 1.8(\text{SD})$.

Tabulka 2: operační data

	LM N (%)	OM N (%)	TCRM N (%)	LAVH N (%)	TLH N (%)	AH N (%)
Skupina A ≤35 let	34 (85)	4 (10)	2 (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Skupina B □35 let	0 (0)	0 (0)	0 (0)	58 (93)	3(5)	1 (2)

4.3 Polymorfismy

Pro každý sledovaný polymorfismus byla spočítána Hardy-Weinbergova rovnováha (HWR) a žádný z nich nedosáhl statisticky významného rozdílu, tedy jak soubor pacientek, tak kontrolní soubor dosahoval rovnoměrného rozložení alel mezi homozygotními a heterozygotními jedinci. Nejprve jsme porovnali SNP cytokinových genů celého souboru pacientek s kontrolním souborem. Frekvence většiny testovaných SNP nedosáhla u pacientek statisticky významného rozdílu. Našli jsme však zajímavý rozdíl v distribuci genotypů interleukinu 4. Genotyp CC v promotorové pozici -590 a -33 byl zastoupen u pacientek s menší frekvencí než u kontrol. Tento rozdíl byl statisticky významný ($p=0,03$) (Tab. 3). Frekvence genotypů CC obou těchto polymorfismů byla stejná a činila jen 63% proti 78% v kontrolním souboru. Mezi těmito SNP je dokonce silná vazebná nerovnováha ($D \neq 0$).

Dále jsme porovnávali pacientky s kontrolami po rozdělení souboru pacientek do dvou skupin dle jejich věku ≤ 35 a > 35 . Pozorovali jsme stejný trend v nižší frekvenci genotypu CC v pozicích -590 a -33 u pacientek starších 35 let ($p=0,09$). Frekvence genotypů CC obou těchto polymorfismů byla 61% oproti 78% v kontrolní skupině. Tento trend však nebyl u mladších pacientek potvrzen (Tab. 4). Kromě IL-4 jsme zaznamenali rozdíl v distribuci genotypů i u genu TNF α (promotorový SNP -308 A/G). Frekvence genotypu AA byla vyšší u pacientek

pod 35 let. Tento výsledek byl statisticky významný ($p=0,02$). Frekvence genotypu AA ve skupině mladších pacientek činila 8% oproti 1% výskytu v kontrolním souboru. Síla testu činila v tomto případě 42%. Tento rozdíl nebyl u starších pacientek potvrzen (>35).

Tabulka 3: srovnání genotypových frekvencí pacientek a kontrolní skupiny

Cytokin	SNP	Genotyp	Kontroly N (%)	Pacienti N (%)	P hodnota
IL-1 α	-889	CC	69 (48)	51 (50)	0.70
		CT	59 (41)	42 (42)	
		TT	16 (11)	8 (8)	
IL-1 β	-511	CC	79 (54)	46 (45)	0.35
		CT	54 (37)	46 (45)	
		TT	12 (8)	10 (10)	
IL-1 β	+3962	CC	74 (51)	55 (54)	0.78
		CT	55 (38)	39 (38)	
		TT	15 (10)	8 (8)	
IL-1R	Pst 1970	CC	55 (38)	40 (39)	0.66
		CT	67 (46)	50 (49)	
		TT	23 (16)	12 (12)	
IL-1RA	Mspa1 11100	CC	13 (9)	13 (13)	0.62
		CT	63 (43)	41 (40)	
		TT	69 (48)	48 (47)	
IL-4R α	+1902	AA	84 (58)	60 (59)	0.62
		AG	56 (39)	36 (35)	
		GG	5 (3)	6 (6)	
IL-12	-1188	AA	85 (59)	54 (53)	0.24
		AC	55 (38)	42 (42)	
		CC	3 (2)	6 (6)	
IFN- γ	+874	AA	40 (28)	32 (31)	0.85
		AT	70 (49)	47 (46)	
		TT	32 (23)	23 (23)	
TGF- β 1	codon 10	CC	25 (17)	13 (13)	0.17
		CT	66 (46)	61 (60)	
		TT	54 (37)	28 (27)	
TGF- β 1	codon 25	CC	1 (1)	1 (1)	0.76

		CG	20 (14)	11 (11)	
		GG	124 (86)	90 (88)	
TNF- α	-308	AA	1 (1)	4 (4)	0.14
		AG	29 (20)	25 (25)	
		GG	113 (79)	73 (72)	
TNF- α	-238	AA	0 (0)	0 (0)	0.16
		AG	14 (10)	5 (5)	
		GG	129 (90)	97 (95)	
IL-2	-330	GG	15 (10)	12 (12)	0.95
		GT	63 (44)	44 (43)	
		TT	65 (45)	46 (45)	
IL-2	+166	GG	61 (43)	48 (47)	0.76
		GT	62 (43)	42 (41)	
		TT	20 (14)	12 (12)	
IL-4	-1098	GG	0 (0)	0 (0)	0.21
		GT	22 (15)	10 (10)	
		TT	122 (85)	92 (90)	
IL-4	-590	CC	112 (78)	64 (63)	0.03
		CT	27 (19)	34 (33)	
		TT	5 (3)	4 (4)	
IL-4	-33	CC	112 (78)	64 (63)	0.03
		CT	27 (19)	34 (33)	
		TT	5 (3)	4 (4)	
IL-6	-174	CC	27 (19)	19 (19)	0.23
		CG	72 (50)	41 (40)	
		GG	45 (31)	42 (41)	
IL-6	nt565	AA	25 (17)	18 (18)	0.21
		AG	73 (51)	41 (40)	
		GG	46 (32)	43 (42)	
IL-10	-1082	AA	42 (29)	32 (31)	0.45
		AG	83 (57)	51 (50)	
		GG	20 (14)	19 (19)	
IL-10	-819	CC	74 (51)	56 (55)	0.82
		CT	64 (44)	41 (40)	
		TT	7 (5)	5 (5)	
IL-10	-592	AA	7 (5)	5 (5)	0.82

		AC	64 (44)	41 (40)	
		CC	74 (51)	56 (55)	

Tabulka 4: distribuce IL-4 -590 a -33 genotypů u skupiny pacientek ≤ 35 let a >35 let; srovnáno s kontrolní skupinou ($p = 0.09$)

IL-4 -590	CC N (%)	CT N (%)	TT N (%)
Kontroly	112 (78)	27 (19)	5 (3)
Pacienti ≤ 35 let	25 (63)	13 (32)	2 (5)
Pacienti >35 let	38 (61)	22 (36)	2 (3)
IL-4 -33	CC	CT	TT
Kontroly	112 (78)	27 (19)	5 (3)
Pacienti ≤ 35 let	25 (63)	13 (32)	2 (5)
Pacienti >35 let	38 (61)	22 (36)	2 (3)

Tab. 5: distribuce TNF- α -308 genotypů u skupiny pacientek ≤ 35 let a >35 let; srovnáno s kontrolní skupinou ($p = 0.02$)

TNF-α -308	AA N (%)	AG N (%)	GG N (%)
Kontroly	1 (1)	29 (20)	113 (79)
Pacienti ≤ 35 let	3 (8)	6 (15)	31 (77)
Pacienti >35 let	1 (2)	20 (32)	41 (66)

5. DISKUZE

Současná odborná literatura se opakovaně věnuje rozdílům v produkci nebo aktivitě cytokinů ve vztahu k zvýšené vnímavosti nebo rezistenci k nejrůznějším infekčním procesům, autoimunitním chorobám, nádorovým onemocněním či vztahu k rejekci transplantovaných orgánů. Hypotéza možné asociace genových polymorfismů cytokinů s predispozicí k vzniku děložní myomatózy vychází ze skutečnosti, že cytokiny (glykoproteiny, polypeptidy) jako růstové faktory produkované lokálně fibroblasty a myocyty, regulují proliferaci a diferenciaci těchto buněk a indukci syntézy extracelulární matrix mohou dále stimulovat růst myomů.

Cílem studie bylo najít možné genetické markery, které by sloužily jako vhodný prognostický faktor zvýšeného rizika rozvoje děložní myomatózy a přispět tak k optimalizaci rizikových faktorů a prognózy tohoto velmi častého onemocnění. Podobně designovaná studie autorů z IKEM vyšetřila 30 pacientů s idiopatickou plicní fibrózou (intersticiální plicní proces s nekontrolovanou fibroprodukcí) proti souboru 103 zdravých dobrovolníků na genový polymorfismus podobného spektra cytokinů (Vasakova, 2006). Zmíněná studie prokázala signifikantně vyšší frekvenci genotypů CT v pozicích -590 a -33 promotoru genu pro IL-4 ve skupině pacientů s idiopatickou plicní fibrózou a podpořila tak názor na možnou roli genových polymorfismů některých cytokinů v etiopatogenezi této vážné choroby.

Literatura přináší omezená data týkající se významu jednotlivých cytokinů v souvislosti se vznikem děložní myomatózy jako je např. role epidermal growth faktoru (EGF) (Shimomura, 1998), transforming growth faktoru β (TGF- β) (Arici and Sozen, 2000) a dalších chemokinů a jejich receptorů (Syssoev, 2008). Arici 2000 kvantifikuje množství TGF- β mRNA u 18 pacientek s děložními myomy, které bylo signifikantně vyšší než TGF- β mRNA v normálním myometriu 16 zdravých žen. Stejný trend zvýšené exprese mRNA vykazovalo i měření mRNA fibronektinu v obou těchto skupinách. Sozen (2002) prokázal ve své studii zvýšenou expresi pouze v případě TGF a dále potvrdil možný regulační vliv estrogenů a progesteronu v expresi tohoto multifunkčního cytokinu mezenchymálního původu. Za klíčovou roli v patogenezi leiomyomů pak pokládá kromě cytokinů komponenty extracelulární matrix jako jsou kolagen, fibronektin, proteoglykany, matrix metaloproteinázy a jejich tkáňové inhibitory. Naproti tomu literatura poskytuje mnoho dat podporujících skutečnost, že jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) mohou mít vliv na genovou expresi konkrétních cytokinů (Fishman, 1998; Smith & Humphries 2009).

V prezentovaném souboru jsme prokázali možnou souvislost mezi polymorfismem promotoru genu pro IL-4, konkrétně v pozicích -590 C/T a -33 C/T, a rizikem vzniku myomu.

Přítomnost alely T na pozici -590 totiž zvyšuje expresi genu pro IL-4 a je spojená s rostoucí koncentrací IL-4 v séru (Rosenwasser & Borish, 1997). Naproti tomu přítomnost alely C v této pozici vede ke snížené expresi genu. Naše výsledky prezentují nižší frekvenci genotypu CC ve skupině pacientek s děložním myomem. Můžeme nyní pouze teoretizovat o tom, co je důsledkem sledované souvislosti. IL-4 byl popsán jako potentní protizánětlivý cytokin modulující aktivaci fibroblastů v nádorové tkáni a inhibující tumorem aktivovanou angiogenezi (Blankenstein, 2005). V našem souboru zdravých kontrol jsme prokázali signifikantně častější výskyt právě alely C, což by potvrdilo představu, že zdraví jedinci bez nádoru by vyšší koncentraci IL-4 v séru nepotřebovali. Rovněž byla zkoumána jeho role v procesu inhibice a regrese nádorového procesu (Hock, 1994).

Naproti tomu Hsieh, 2007 také testoval mj. polymorfismus promotoru genu pro IL-4 ve stejné pozici a kromě IL-12R β (vyšší frekvence genotypu GG u pacientek s myomy) neprokázal ve skupině svých pacientek asociaci se zvýšeným výskytem děložních myomů. Možným vysvětlením rozporu mezi tímto závěrem a námi prezentovanými výsledky je skutečnost, že autor vyšetřoval populaci premenopauzálních taiwanských žen, nikoli tedy naši kavkazskou populaci jako my.

Naše výsledky ukazují i na možnou roli genového polymorfismu TNF- α na vzniku myomů. TNF- α spolupůsobí v úvodu protizánětlivé odpovědi a v rámci reakce akutní fáze při různých infekčních a autoimunitních chorobách. Kromě výše zmíněných účinků se uplatňuje při regulaci exprese povrchových receptorů vaskulárních endotelových buněk např. pro VEGF. Možná role VEGF v patogenezi myomů byla již výše zmíněna. Popsána je také úloha genu pro TNF- α v patogenezi tumorogeneze (Chouchane, 1997). Naše studie prokázala rovněž vyšší frekvenci distribuce genotypu AA polymorfismu TNF- α v pozici -308 ve skupině mladších pacientek. Je třeba konstatovat, že budou potřeba další studie, které objasní, jakou roli hraje TNF- α v etiologii a patogenezi děložních myomů. Skupina autorů v čele s Hsiehem v roce 2004 referuje ve své práci o signifikantně vyšší frekvenci přítomnosti alely G v pozici -308 u TNF- α genu ve skupině taiwanských premenopauzálních žen s leiomyomem (Hsieh, 2004). Tento výsledek jsme v naší práci nepotvrdili, ale ani nevyvrátili. V úvahu nutno vzít hlavně skutečnost již výše zmíněné etnické heterogenity vyšetřovaných polymorfismů, kde u taiwanské populace převládá v pozici -308 alela G proti predominantní alele A u evropské populace.

Litovkin a kol., 2007 ve své studii genového polymorfismu -174 G/C genu pro IL-6 uvádí, že tento SNP není rizikovým faktorem velkého významu pro rakovinu prsu (ukrajinská populace), nicméně popisuje jistý trend asociace mezi mutantní alelou C a náchylností

k děložnímu leiomyomu. V naší studii jsme tento trend nepotvrdili, přestože patříme do stejné kavkazské populace.

6. ZÁVĚR

Tato studie byla navržena s cílem nalézt nové poznatky v oblasti predikce výskytu a diagnostiky děložní myomatózy a výsledky aplikovat v prevenci. Naše práce jako první analyzuje pomocí molekulárně-genetických metodik (PCR-SSP, sekvenování) takto rozsáhlé spektrum následujících cytokinů a jejich polymorfismů: interleukin IL-1 α (-889 T/C), IL-1 β (-511 T/C a +3962 T/C), IL-1R (pst11970 C/T), IL-1RA (mspa111100 T/C), IL-4R α (+1902 G/A), IL-12 (-1188 C/A), interferon (IFN)- γ (+874 A/T), TGF- β 1 (kodón 10 C/T a kodón 25 G/C), tumor nekrotizující faktor (TNF)- α (-308 G/A a -238 G/A), IL-2 (-330 T/G a +166 G/T), IL-4 (-1098 T/G, -590 T/G a -33 T/C), IL-6 (-174 G/C a nt565 G/A) a IL-10 (-1082 G/A, -819 C/T a -592 C/A). Frekvence většiny testovaných SNP nedosáhla u pacientů statisticky významného rozdílu. Zaznamenali jsme ale zajímavý rozdíl v distribuci genotypů interleukinu 4. Genotyp CC v promotorové pozici -590 a -33 byl zastoupen u pacientek s menší frekvencí než u kontrol ($p=0,03$). Mezi těmito SNP je dokonce silná vazebná nerovnováha ($D\neq 0$). Práce dále srovnává pacientky s kontrolami po rozdělení souboru pacientek do dvou skupin dle jejich věku ≤ 35 a >35 . Byl pozorován stejný trend v nižší frekvenci genotypu CC v pozicích -590 a -33 u pacientek starších 35 let ($p=0,09$), nikoliv však u mladších pacientek. Kromě IL-4 jsme zaznamenali rozdíl v distribuci genotypů i u genu TNF α (promotorový SNP -308 A/G). Frekvence genotypu AA byla vyšší u pacientek pod 35 let ($p=0,02$). Tento rozdíl nebyl u starších pacientek potvrzen (>35). Závěrem můžeme tedy konstatovat, že výsledky naší práce naznačují možnou souvislost mezi přítomností některých genových polymorfismů cytokinů (IL-4, TNF- α) a zvýšeným rizikem vzniku děložní myomatózy. Pochopitelně budou za potřebí další výzkumné projekty k objasnění mechanismu působení výše uvedených souvislostí.

7. LITERATURA

1. Abbas A, Lichtman A, Pober J: Cellular and Molecular Immunology, 4th edn. Philadelphia: W. B. Saunders; 2000
2. Alam NA, Olpin S, Leigh, IM. Fumarate hydratase mutations and predisposition to cutaneous leiomyomas, uterine leiomyomas and renal cancer. *Br J Dermatol* 2005; 153:11-17.
3. Arici A, Sozen I. Expression, menstrual cycle-dependent activation, and bimodal mitogenic effect of transforming growth factor-beta1 in human myometrium and leiomyoma. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:76-83.
4. Arici A, Sozen I. Transforming growth factor-beta3 is expressed at high levels in leiomyoma where it stimulates fibronectin expression and cell proliferation. *Fertil Steril* 2000;73:1006-11.
5. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. *Genes Immun.* 1999, 1, p. 1 –17.
6. Blankenstein, T. (2005) The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. *Curr. Opin. Immunol.*, 17, 180.
7. Flake, GP., Andersen, J., Dixon D.: Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ Health Perspect.* 2003, 111(8), p. 1037-54
8. Fishman,D., Faulds,G., Jeffery,R., Mohamed-Ali,V., Yudkin,J.S., Humphries,S. & Woo,P. (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J. Clin. Invest.*, 102, 1369.
9. Gross, K., Morton, C.: Genetics and the development of fibroids. *Clin Obstet gynecol*, 2001, 44, p. 335-349
10. Horeksi V, Bartunkova J: Základy imunologie, 2. vydání: Triton; 2002
11. Hsieh,Y.Y., Chang,C.C., Tsai,C.H., Lin,C.C. & Tsai,F.J. (2007) Interleukin (IL)-12 receptor beta1 codon 378 G homozygote and allele, but not IL-1 (beta-511 promoter,

- 3953 exon 5, receptor antagonist), IL-2 114, IL-4-590 intron 3, IL-8 3'-UTR 2767, and IL-18 105, are associated with higher susceptibility to leiomyoma. *Fertil. Steril.*, 87, 886.
12. Hsieh,Y.Y., Chang,C.C., Tsai,F.J., Lin,C.C., Yeh,L.S. & Tsai,C.H. (2004) Tumor necrosis factor-alpha-308 promoter and p53 codon 72 gene polymorphisms in women with leiomyomas. *Fertil. Steril.*, 82 Suppl 3, 1177.
 13. Hock,H., Dorsch,M., Richter,G., Kunzendorf,U., Kruger-Krasagakes,S., Blankenstein,T., Qin,Z. & Diamantstein,T. (1994) Tumor-cell-targeted cytokine gene transfer in experimental models for cancer therapy. *Nat. Immun.*, 13, 85.
 14. Chouchane,L., Ahmed,S.B., Baccouche,S. & Remadi,S. (1997) Polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha promoter region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. *Cancer*, 80, 1489
 15. Inagaki,N., Ung,L., Otani,T., Wilkinson,D. & Lopata,A. (2003) Uterine cavity matrix metalloproteinases and cytokines in patients with leiomyoma, adenomyosis or endometrial polyp. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 111, 197.
 16. Litovkin,K.V., Domenyuk,V.P., Bubnov,V.V. & Zaporozhan,V.N. (2007) Interleukin-6 -174G/C polymorphism in breast cancer and uterine leiomyoma patients: a population-based case control study. *Exp. Oncol.*, 29, 295
 17. Mára M, Holub Z a kol. Děložní myomy. Moderní diagnostika a léčba. Grada Publishing, a.s., 2009
 18. Marshall LM, Spiegelman D, Barbieri RI, et al. Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. *Obstet Gynecol* 1997;90:963-73.
 19. Rosenwasser,L.J. & Borish,L. (1997) Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10). *Am. J. Respir. Crit Care Med.*, 156, S152.
 20. Shastry BS. SNP alleles in human disease and evolution. *J. Hum. Genet.*, 2002, 47, p. 561–566.

21. Shimomura,Y., Matsuo,H., Samoto,T. & Maruo,T. (1998) Up-regulation by progesterone of proliferating cell nuclear antigen and epidermal growth factor expression in human uterine leiomyoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, 83, 2192.
22. Smith AJ, Humphries SE. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009, 20, p.43-59.
23. Sozen I, Arici A. Cellular biology of myomas: interaction of sex steroids with cytokines and growth factors. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2006;33:41-58.
24. Sozen I, Arici. Interactions of cytokines, growth factors, and the extracellular matrix in the cellular biology of uterine leiomyomata. *Fertil Steril.* 2002;78:1-12.
25. Syssoev,K.A., Kulagina,N.V., Chukhlovin,A.B., Morozova,E.B. & Totolian,A.A. (2008) Expression of mRNA for chemokines and chemokine receptors in tissues of the myometrium and uterine leiomyoma. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 145, 84.
26. Vasakova M, Striz I, Slavcev A, Jandova S, Kolesar L, Sulc J. Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in patient with idiopathic pulmonary fibrosis. *Tissue Antigens* 2006, 67 (3):229-32
27. Wallach EE, Vlahos NF. Uterine myomas: an overview of development, clinical features, and management. *Obstet Gynecol* 2004;104:393-406.

8. PUBLIKACE S TÉMATIKOU VZTAHUJÍCÍ SE K DISERTAČNÍ PRÁCI

1. **Sosna O**, Kolesar L, Slavcev A, Skibová J, Fait T., Mara M., Striz I, Kuzel D.: Th1/Th2 cytokine gene polymorphisms in patients with uterine fibroid. Folia Biol (Praha). 2010;56(5):206-10. **IF: 1,14**
2. **Sosna O**, Kuzel D, Mára M.: Etiopathogenesis of uterine fibroid: current knowledge. Ceska Gynekol. 2008 Jun;73(3):184-7. Review.
3. Mara M, Maskova J, Fucikova Z, Kuzel D, Belsan T, **Sosna O.**: Midterm clinical and first reproductive results of a randomized controlled trial comparing uterine fibroid embolization and myomectomy. Cardiovasc Intervent Radiol. 2008 Jan-Feb;31(1):73-85. Epub 2007 Oct 18. **IF: 1,25**
4. Mára M, Fucíková Z, Kuzel D, **Sosna O**, Dundr P, Kríz P, Koryntová D.: Enucleation of intramural uterine fibroids in women at fertile age: midterm results of prospective clinical trials. Ceska Gynekol. 2006 Jan;71(1):16-24.

9. SEZNAM PUBLIKACÍ S TÉMATIKOU BEZ VZTAHU K DISERTAČNÍ PRÁCI

1. Kuzel D, Horak P, Hrazdirova L, Kubinova K, **Sosna O**, Mara M.: „See and Treat“ hysteroscopy after missed abortion. Minim Invasive Ther Allied Technol. 2010 Jan;20(1):14-7. **IF: 1,611**
2. Kuzel D, Weiss P, Kubínová K, Masková L, **Sosna O**, Bartosová L, Horák P, Tóth D, Fanta M, Mára M.: Sexual functions after laparoscopically assisted vaginal hysterectomy (LAVH) and total laparoscopic hysterectomy (TLH) in preoperatively asymptomatic women. Ceska Gynekol. 2009 Apr;74(2):130-7.
3. Kuzel D, Tóth D, Fucíková Z, Bartosová L, Mára M, Hrusková H, Fanta M, Zizka Z, **Sosna O**, Kubínová K, Dohnalová A.: Uterine arteries doppler velocitometry provides 3-years follow up endometrial ablation outcome. Prague Med Rep. 2008;109(2-3):166-74.
4. Janota J., Pomyje J., Toth D., **Sosna O.**, Zivny J., Kuzel D., Stranak Z., Necas E., Zivny JH.: Expression of angiopoeitic factors in normal and type-I diabetes placenta: a pilot study. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol., 111(2), p. 153-156, 2003 . **IF: 1,565**

5. Binder T, Salaj P, **Sosna O**, Hájek Z.: The May-Hegglin anomaly in pregnancy. 2 case reports. Ceska Gynekol. 2003 Oct;68(5):330-3.
6. Krejčí V, Lindner J, Hájek Z, **Sosna O**, Bláha J, Zouhar T, Zivný J.: Massive pulmonary embolism after delivery by cesarean section. Ceska Gynekol. 2002 Jan;67(1):35-8.
7. **Sosna O**, Zivný JH, Necas E, Fait T, Zivný J.: Impaired development of uteroplacental circulation. Ceska Gynekol. 2002 Jul;67(4):226-9. Review.
8. **Sosna O.**, Matouš B.: Papillomavirové infekce v gynekologii a porodnictví. Gynekolog, 10, 2001, p. 71-74
9. Fait T., **Sosna O.**: Management předčasného porodu. Medicína v Praxi, 3, 2001, p. 71-73
10. Fait T., **Sosna O.**: Umělé ukončení těhotenství v prvním trimestru. Moderní gynekologie a porodnictví, 10, p. 181-185, 2001
11. **Sosna O.**, Pařízek A., Fait T.: Intrauterinní smrt plodu. Diagóza, 43, 2000, p. 7