

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**Determinace spontánních abortů - úloha genu pro APO E, význam vybraných  
vrozých trombofilních stavů a funkce štítné žlázy v graviditě**

MUDr. Dita Kašparová

2017

---

## **Doktorské studijní programy v biomedicině**

*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

Obor: Experimentální chirurgie

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

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

Školitel: doc. MUDr. T. Fait, Ph.D.

---

## Abstrakt

**Úvod:** Spontánní potrat (SA) je nejčastější komplikací v těhotenství. Cílem práce bylo prověřit kauzalitu vybraných faktorů genetických - apolipoproteinu E (APO E), mutace faktoru V Leiden (FVL), mutace protrombinu (PT G20210A) a faktorů negenetických - tyreoidálního stimulačního hormonu (TSH), volného tyroxinu (fT4), protilátek proti tyreoidální peroxidáze (a-TPO) v etiopatogenezi časného SA.

**Materiály a metody:** Ke genotypizaci polymorfismů APO E byla využita metoda PCR-RFLP. K detekci mutací v genech FV a FII byla použita metoda HRM. Laboratorní tyreoidální markery TSH, a-TPO a fT4 byly stanoveny na automatickém analyzátoru využívajícím chemiluminiscenční imunoanalýzu. U infertilních žen po SA proběhlo do 8 týdnů od krevního odběru sonografické vyšetření štítné žlázy.

**Výsledky:** APOE genotypy ve sledovaném souboru 410 vzorků embryonální /fetální tkáně se významně neliší od kontrolní skupiny 2 606 adultních jedinců ( $P = 0.653$ ).

Ve sledovaném souboru 75 žen s izolovaným SA byla FVL mutace zjištěna v heterozygotní konstituci s prevalencí 12 %. Prevalence FVL v souboru žen s izolovaným časným SA byla signifikantně vyšší oproti kontrolní skupině 76 zdravých žen (12 % vs. 2.6 %,  $P = 0,031$ ). Při vzájemném statistickém porovnání zjištěných prevalencí PT G20210A mezi soubory žen s izolovaným SA a kontrolní skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl (4 % vs. 5.3 %,  $P = 1$ ).

Prevalence zvýšené hladiny TSH (vyšší než 2.5 mIU/l) v souboru 188 infertilních žen byla signifikantně vyšší ve srovnání se 172 zdravými těhotnými bez ohledu na počet SA ( $P = 0.005$ ). Prevalence zvýšené hladiny a-TPO (vyšší než 143 IU/ml) byla signifikantně vyšší u žen s recidivujícím a habituálním potracením ve srovnání se souborem žen s izolovaným potratem (15 % vs. 5 %  $P = 0.003$ ). Při hodnotě a-TPO nad 143 IU/ml je 116x vyšší riziko současné přítomnosti sonografických známek středního (TUS 3) a/nebo těžkého stupně (TUS 4) tyreoiditidy než přítomnosti žádných (TUS 0) a/nebo hraničních zánětlivých změn štítné žlázy (TUS 1) (OR = 16.2 [95 % CI: 14.2-947.4]).

**Závěr:** APOE polymorfismus nelze označit za determinující faktor v roli časného SA. FVL v heterozygotní konstituci lze po eliminaci základních etiologických kauzálních příčin SA označit za možný rizikový faktor izolovaného SA ( $P = 0.031$ ). Hodnotu TSH vyšší než 2.5 mIU/l lze považovat za rizikový faktor časného SA ( $P = 0.005$ ). Laboratorní nález hladiny a-TPO vyšší než 143 IU/ml lze označit za rizikový faktor pro recidivující a/nebo habituální potracení v období prvního trimestru ( $P = 0.003$ ).

**Klíčová slova:** spontánní potrat, APO E, hereditární trombofilie, tyreoidální dysfunkce

---

## **Abstract**

**Introduction:** Spontaneous abortion (SA) is the most common complication in pregnancy. The aim of the study was to investigate the causality of selected genetic factors - Apolipoprotein E (Apo E) gene polymorphism, factor V Leiden (FVL), Prothrombin (PT G20210A) and nongenetics factors - Thyroid stimulating hormone (TSH), free thyroxine (fT4), antibodies against thyroid peroxidase (a-TPO) in the role of early SA.

**Materials and methods:** For genotyping of APO E polymorphisms was used PCR-RFLP. The detection of mutations in genes FV and FII was performed using by HRM. Laboratory markers of thyroid (TSH, a-TPO and fT4) were determined by an automated analyzer using chemiluminescent immunoassay.

**Results:** APOE genotypes of investigated group of 410 samples aborted embryonic/ fetal tissues were not significantly different from 2 606 adult controls ( $P = 0.653$ ). In observed infertile group of 75 women with isolated SA was FVL detected in heterozygous constitution with a prevalence of 12 %. The prevalence of FVL in a group of women with early insulated SA was significantly higher than 76 controls (12 % vs. 2.6 %,  $P = 0.031$ ). The difference of PTG20210A prevalence between women with isolated SA and controls was not significant (4 % vs. 5.3 %,  $P = 1$ ). The prevalence of elevated TSH levels (higher than 2.5 mIU/l) was significantly higher in group of 188 infertile women compared with the 172 controls regardless of the number of SA ( $P = 0.005$ ). Prevalence of elevated levels of a-TPO (higher than 143 IU/ml) was significantly higher in women with recurrent miscarriage and habitual in comparison with the group of women with isolated SA (15 % vs. 5 %  $P = 0.003$ ). The value of a-TPO levels above 143 IU/ml is 116x higher risk of simultaneous presence of sonographic signs of middle (TUS 3) and / or serious (TUS 4) thyroiditis than the presence of any (TUS 0) and / or borderline inflammatory changes of the thyroid (TUS 1) (OR = 116.2 [95 % CI: 14.2 - 947.4]).

**Conclusion:** APOE polymorphism cannot be described as a determining factor in the role of early SA. Heterozygous FVL are after previous elimination of basic etiological causes of early SA identified as a possible risk factor for insulated SA ( $P = 0.031$ ). TSH values higher than 2.5 mIU/l can be considered as a risk factor for early SA ( $P = 0.005$ ). Laboratory findings of a-TPO greater than 143 IU / ml can be identified as a risk factor for recurrent and /or habitual abortion during the first trimester ( $P = 0.003$ ).

**Keywords:** spontaneous abortion, APOE, hereditary thrombophilia, thyroid dysfunction

---

**Publikace s IF:**

Kasparova D, Vrablik M, Fait T: Is screening for hereditary thrombophilia indicated in first early pregnancy loss? *Neuro Endocrinol Lett.*, 2012, 33(1):76-80 (IF<sub>2012</sub> 1.39)

Rynekrova J, Kasparova D, Adamkova V, Fait T, Hubacek JA: Analysis of the potencial role of Apolipoprotein E polymorphism in genetic predisposition to spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol.* 2012 Mar, 67(3):179-83 (IF<sub>2012</sub> 2.916)

Bartakova J, Potlukova E, Rogalewicz V, Fait T, Schondorfova D, Telicka Z, Kratky J, Jiskra J: Screening for autoimmune thyroid disorders after spontaneous abortion is cost-saving and it improves the subsequent pregnancyrate. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2013 Nov 22, 13:217 (IF<sub>2013</sub> 2.180)

Hubacek JA, Rynekrova J, Kasparova D, Adamkova V, Holmes MV, Fait T: Association of MTHFR genetic variants C677T and A1298C on predisposition to spontaneous abortion in Slavonic population. *Clin Chim Acta.* 2015 Feb 2,440:104-7 (IF<sub>2015</sub> 2.799)

Hubacek JA, Kasparova D, Dlouha D, Pikhart H, Bobak M, Fait T: FTO gene variant and risk of spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2016 Jan;95(1):118 (IF<sub>2016</sub> 2.191)

**Publikace bez IF:**

Kašparová D, Fait T.: Časně těhotenské ztráty a vrozené trombofilní stavy. *Čes Gyn.* 2009, 5: 360-364

Kašparová D.: Příčiny časných těhotenských ztrát. *Lékařské Listy Speciál.* 2010, 7:5-6

**Poster:**

Fait T, Kasparova D, Pitha J et al.: Genes for connexins in women with spontaneous abortion. 10<sup>th</sup> ESG, Brusel 18. - 21. 9. 13

**Monografie:**

Kašparová D: Terapeutické možnosti u žen s habituálním potrácením. In: Tomáš Fait a kol.: *Moderní farmakoterapie v gynekologii.* 1. Vydání, Praha: Maxdorf, 2014: 234-8. ISBN 978-80-7345-403-6

---

## 1. Obsah

1.	Obsah.....	1
2.	Úvod do problematiky spontánních abortů.....	2
3.	Praktická část.....	3
3.1.	Determinace spontánních abortů – úloha genu pro APO E.....	3
3.1.1.	Úvod.....	3
3.1.2.	Pracovní hypotéza a cíl 1. části projektu.....	3
3.1.3.	Materiál a metodika.....	4
3.1.4.	Výsledky.....	5
3.1.5.	Diskuze.....	5
3.1.6.	Závěr.....	6
3.2.	Spontánní aborty – význam vybraných trombofilních stavů.....	6
3.2.1.	Úvod.....	6
3.2.2.	Pracovní hypotéza a cíl 2. části projektu.....	7
3.2.3.	Materiál a metodika.....	7
3.2.4.	Výsledky.....	8
3.2.5.	Diskuze.....	9
3.2.6.	Závěr.....	10
3.3.	Spontánní aborty – význam funkce štítné žlázy.....	11
3.3.1.	Úvod.....	11
3.3.2.	Pracovní hypotéza a cíl 3. části projektu.....	12
3.3.3.	Materiál a metodika.....	12
3.3.4.	Výsledky.....	14
3.3.5.	Diskuze.....	16
3.3.6.	Závěr.....	18
4.	Závěr.....	19
5.	Bibliografie.....	20

## 2. Úvod do problematiky spontánních abortů

Spontánní potrat (SA) je jedním z prvních projevů přírodní selekce a již pouze v podobě své klinické prevalence znamená nejčastější komplikaci v těhotenství. Díky vzrůstající frekvenci SA, pokračujícímu trendu odkládání koncepčních plánů a širokému etiologickému spektru možných kauzálních příčin SA je a do budoucna velmi pravděpodobně bude problematika spontánních potratů stále více aktuální a tíživá pro ženy po stránce fyzické, psychické i sociální. Ke klinické diagnóze SA dochází s nejčastěji udávanou frekvencí 15 - 20 % (Binder, 2008). V případě těhotenských ztrát preklinických, se odhaduje, že jsou spíše vysoké. Dle všeobecného konsensu mohou dosahovat až 50 % (Binder, 2008) (Roztočil, 2007).

Embryonální vývoj je popisován jako složitý komplexní proces, do nějž zasahuje řada genetických i negenetických faktorů. Z negenetických kauzalit se jedná o faktory anatomické, fyziologické, endokrinologické, imunologické, hematologické, infekční, psychogenní a idiopatické. Tyto faktory mohou ovlivnit následující průběh embryonálního/fetálního vývoje a potenciálně vyústit v jeho poruchu, či úplnou zástavu.

Cílem diagnostické intervence je možnost predikce zvýšeného rizika SA u těhotných. Jejich preventivní opatření mohou přispět ke zkvalitnění a zefektivnění lékařské péče, snížení nákladů na péči spojenou s potrativší ženou a v neposlední řadě k psychické pohodě těhotných žen především v období prvního trimestru.

## **3. Praktická část**

### **3.1. Determinace spontánních abortů – úloha genu pro APO E**

#### **3.1.1. Úvod**

Za jednu z hlavních determinant embryonálního vývoje je považován právě genetický faktor stěžejně pro období časně gravidity (Zhang Y. X., 2009) (Garcia Enguidanos A., 2002). Gen kódující apolipoprotein E (APO E) je lokalizován na dlouhém raménku 19. chromozomu-19q13.2 (Bianca S., 2010). APO existuje ve 3 polymorfních izoformách kódovaných odlišnými alelami - epsilon 2 (E2), epsilon 3 (E3) a epsilon 4 (E4), jež jsou produktem tří nezávislých alel na tomtéž genovém lokusu. Jednotlivé izoformy se liší záměnou cysteinu (Cys) a argininu (Arg) v pozicích 112 a 158 peptidického řetězce.

Dle Cauleyho et al. v populaci dochází k selekci jedinců s APO E4 alelou (Cauley J. A., 1993). Navzdory publikované převážně negativní roli alely APO E4 v nedědičných analyzovaných patologiích se prevalence APO E4 v populaci pohybuje stále relativně vysoko v rozmezí 2 % (Panza F., 1999) – 36.8 % (Kamboh M. I., 1990) v závislosti na konkrétní populaci. Na příkladu několika málo studií, které publikovaly možný benefit přítomnosti alely APO E4 jako např. (Keltikangas-Järvinen L., 1993) nelze spolehlivě vysvětlit, proč je prevalence alely E4 v populaci stále tak vysoká (Stakias N., 2006). Jedna z diskutovaných možností je asociace alely E4 a doposud nerozpoznaného faktoru v průběhu prenatálního vývoje, jež by mohl fungovat jako protektivní činitel v průběhu ontogeneze (Zetterberg H., 2002).

#### **3.1.2. Pracovní hypotéza a cíl 1. části projektu**

Prevalence alely APO E4 jako možný protektivní faktor ve skupině spontánně potracených embryí/fétů do 12. gestačního týdne by měla být signifikantně nižší ve srovnání s kontrolní skupinou.

Cílem je porovnat frekvence APOE polymorfismů ve skupině spontánně potracených embryí/ plodů do ukončeného 12. gestačního týdne a porovnat ji s kontrolní skupinou zdravých dospělých s cílem prověřit domnělou asociaci APO E4 v genetické determinaci časného SA.



### **3.1.3. Materiál a metodika**

#### ***Vyšetřované subjekty a metody***

Sledovaný soubor SA (SA 1 – izolovaný spontánní potrat, SA 2 – recidivující a habituální potrat)

Sledovaný soubor SA byl vytvořen ze 410 vzorků spontánně potracené embryonální/fetální tkáně v klinické variantě missed abortion získaných od kavkazských žen ve věku 15 - 44 let. Ty byly dále rozčleněny do 2 příslušných skupin podle koncepční anamnézy ženy na SA 1 (334 vzorků embryonální/fetální tkáně od žen s izolovaným potratem) a SA 2 (76 vzorků embryonální/fetální tkáně od žen s recidivujícím nebo habituálním potracením).

Výzkum se uskutečnil v letech 2008 - 2010 na Gyn-por. klinice VFN a 1. LF UK v Praze, kde ženy podstoupily evakuaci dutiny děložní spojenou s instrumentální revizí v celkové anestézii, při níž byly získány vzorky potraceného embryonálního/ fetálního materiálu na histologické a genetické vyšetření. Genetické vyšetření proběhlo na pracovišti IKEM.

#### Kontrolní skupina K

Kontrolní skupinu K tvořili účastníci tzv. post-MONICA studie (Cífkova R., 2010), v níž byly získány vzorky DNA od 2 606 kavkazských jedinců ve věku 25 - 65 let. Jednalo se o soubor 1 223 mužů a 1 368 žen.

Všechny participující objekty potvrdily svou dobrovolnou účast v projektu podepsáním informovaného souhlasu.

#### ***Metodika***

Získané vzorky embryonální/ fetální tkáně byly uchovány při teplotě minus 20C. DNA byla extrahována modifikovanou třídící metodou (Miller S. A., 1988). Ke genotypizaci polymorfismů APO E byla využita metoda využívající principu polymorfizmu délky restričních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP). Polymerázová řetězová reakce za použití primerů 5'- CGC GCA GGC CCG GCT GGG CGC GGA - 3' a 5'- CGG ATG GCG CTG AGG CCG CGC TCG - 3' a restričního enzymu Hin6I (Hixson J. E., 1990).

#### Statistické zpracování

Pro statistickou analýzu byly vyšetřeny a porovnány všechny individuální genotypy a z důvodů nízké prevalence genotypů byly sloučeny genotypy APO E2/E2 spolu s APO E2/E3 a také dále APO E4/E4 spolu s APO E3/E4. Pro testování významnosti rozdílů v prevalenci alel byl použit Pearsonův chí-kvadrát test, případně Fisherův exaktní test. Hladina statistické významnosti P byla stanovena na 0.05. Data byla zpracována programem R (R Core Team, 2014, version 3.1.2) a (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### 3.1.4. Výsledky

Všech šest genotypových variant APOE bylo prokázáno jak ve sledovaném souboru SA, tak i v kontrolní skupině. Zastoupení jednotlivých APOE genotypových variant je v souladu s distribucí alel APO E publikovaných ve studiích APO E variant u středoevropské populace (Gerdes L. U., 1992) (Hubáček J. A., 2010). Nejvyšší prevalence byla zjištěna u varianty alely APO E3 (81.1 %), následovaná alelou APO E4 (11.0 %) a nejnižší prevalenci měla alela APO E2 (7.9 %).

Výsledné APOE genotypy v sledovaném SA souboru (APO E2/E2 + E3/E2 = 13.2 %; APO E3/E3 = 66.1 %; APO E3/E4 + E4/E4 = 19.5 %; APO E4/E2 = 1.2 %) se významně neliší ( $P = 0.653$ ) od kontrolní skupiny K (APO E2/E2 + E3/E2 = 13.3 %; APO E3/E3 = 69.1 %; APO E3/E4 + E4/E4 = 16.6 %; APO E4/E2 = 1.0 %). Distribuce genotypů APOE se významně neliší při porovnání sledovaného souboru a kontrolní skupiny ( $P = 0.653$ ).

### 3.1.5. Diskuze

Potenciální role APOE polymorfismů byla analyzována v několika studiích s odlišným designem. Všechny tyto studie byly tvořeny relativně nízkým počtem případů a kontrol. To zvyšuje riziko vzniku falešně pozitivních a falešně negativních výsledků.

Zetterberg et al. potvrdili signifikantně nižší frekvenci APOE4 u spontánně potracených embryí v porovnání s kontrolním souborem tvořeným 110 dospělými (Zetterberg H., 2002). Nezávisle byla navržena možná protektivní role APOE4 dalšími dvěma studiemi. APOE4 alela byla nalezena ve vyšší prevalenci u zdravých novorozenců ve srovnání s mrtvě narozenými (Becher J. C., 2006). Nález alely APOE4 byl signifikantně nižší u dětí s časným IDS (IDS-infant death syndrom, syndrom náhlého úmrtí) (Becher J. C., 2008).

Přítomnost APOE genotypů u žen s rekurentním SA byla řešena v několika studiích. Některé z nich nepotvrdily asociaci mezi přítomností maternálního APO E polymorfismu a rekurentního SA (Goodman C., 2010) (Bianca S., 2010) (Agarwal M., 2010) (Zhang H. L., 2010).

Následně však několika studiemi byla popsána asociace maternálního APO E genového polymorfismu a rekurentního SA, kdy APO E4 alelu označili někteří autoři jako potenciální rizikový faktor rekurentního SA (Asgari N., 2013) (Menq H. X., 2013) (Li J., 2014).

Námi nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v genotypových/alelických frekvencích APO E polymorfismů mezi vzorky spontánně potracených embryí/plodů a adultními subjekty. APOE polymorfismus proto nelze označit za determinující faktor v roli časného SA.

### 3.1.6. Závěr

Nejvyšší frekvence polymorfismů apolipoproteinu E (APO E) byla zjištěna u alely APO E3 (81.1 %), následovaná alelou APO E4 (11.0 %), nejnižší prevalenci měla alela APO E2 (7.9 %). Zastoupení jednotlivých APOE genotypových variant je v souladu s výsledky studií APO E variant u střeoevropské populace (Gerdes L. U., 1992) (Hubáček J. A., 2010).

Distribuce genotypů APOE se významně neliší při porovnání sledovaného souboru SA a kontrolní skupiny ( $P = 0.653$ ), ani u souboru žen s izolovaným potratem a souboru žen s recidivujícím a habituálním potrácením ( $P = 0.507$ ). APOE polymorfismus nelze označit za determinující faktor v roli časného SA.

## 3.2. Spontánní aborty – význam vybraných trombofilních stavů

### 3.2.1. Úvod

Jednou z dalších možných příčin SA mohou být právě hereditární trombofilní mutace. Adekvátní placentace a suficientní placentární cirkulace závisí na rovnováze mezi faktory prokoagulačními a antikoagulačními. Hereditární trombofilie představují skupinu geneticky determinovaných koagulopatií, jež svou přítomností mohou tuto rovnováhu narušit a přispět k formování trombu v uteroplacentárním či intervilózním prostoru (Brenner B., 2003) (Murphy R. P., 2000). Etiologicky se tak mohou v časně graviditě podílet nejen na časném SA, ale i následovně na pozdních těhotenských komplikacích typu pozdní SA, intrauterinní růstové restrikci (IUGR), HELLP syndromu, preeklampsii, abrupci placenty či intrauterinní smrti plodu (IUFD) (Brenner B., 2003). Patogenetický mechanismus účinku spočívá v tvorbě fibrinových depozit, hypoxických změnách v endotelu a trofoblastu, trombózách v uteroplacentárním cévním řečišti (Hudeček R., 2009).

Nejvyšší prevalenci v české populaci mají hereditární trombofilie mutace faktoru V Leiden (FVL) a mutace faktoru II (PT G20210A) (Dulíček P., 2005). Prevalence PT G20210A, jejíž podstatou je bodová mutace v 3' konci genu pro protrombin (20210G = A), v české populaci je přibližně 1-2 %. Prevalence FVL, bodová mutace DNA na pozici 506, jež způsobí záměnu aminokyseliny Argininu za glutamin, se u nás pohybuje v udávaném rozmezí 2-5 % (Dulíček P., 2002). Princip dědičnosti FVL i PT G20210A je autozomálně dominantní (Svensson P. J., 1994).

Dle řady studií (Grandone E., 1997) (Ridker P. M., 1998) jsou hereditární trombofilní mutace statisticky významným limitujícím faktorem u žen s recidivujícím a habituálním potrácením. Jiné studie hereditární trombofilie jako limitující faktor v etiologii SA nepotvrdily (Lindquist P. G., 1999).

### **3.2.2. Pracovní hypotéza a cíl 2. části projektu**

Ženy s recidivujícím (2 SA v anamnéze) a habituálním (3 a více konsektivních SA) potracením mají vyšší prevalenci hereditárních trombofilí FVL a PT G20210A.

Cílem je zjistit maternální prevalenci hereditárních trombofilních mutací FVL a PT G20210A ve sledovaném souboru žen s minimálně jedním časným spontánním abortem (SA) do 12. gestačního týdne po předchozí eliminaci základních etiologických organických příčin SA.

### **3.2.3. Materiál a metodika**

#### ***Vyšetřované subjekty a metody***

Sledovaný soubor SA (SA 1 – izolovaný spontánní potrat, SA 2 – recidivující a habituální potrat)

První část výzkumu proběhla v letech 2008 - 2010 na Gyn.-por. klinice 1. LF UK a VFN v Praze. Do vyšetřovaného souboru bylo zařazeno 100 žen české národnosti s anamnézou SA v klinické variantě missed abortion. Z nich 75 žen (75 %) potratilo právě jednou (SA 1 - izolovaný spontánní potrat), 17 (17 %) žen potratilo dvakrát (recidivující potrat) a 8 (8 %) žen 3 a vícekrát (habituální potrat). Z důvodů statistické validity dat byly ženy s 2 a 3 a více potraty sloučeny do skupiny SA 2 (recidivující a habituální potrat). Pacientky s histologicky verifikovanou diagnózou SA byly po ověření nepřítomnosti vylučujících vstupních kritérií a podpisu informovaného souhlasu (včetně souhlasu s odběrem a zpracováním genetického materiálu) přijaty do sledovaného souboru. Vylučující kritériem byla známé geneticky podmíněné onemocnění, abnormální výsledek cytogenetického vyšetření potraceného embryonálního/ fetálního materiálu, abnormální ultrazvukový nález na děloze, autoimunitní onemocnění v OA či RA, BMI nad 29.9 kg/m<sup>2</sup>, abnormální výsledky krevního vyšetření v I. trimestru, abusus drog či alkoholu v OA, infekce v I. trimestru v aktuální sledované graviditě, pozitivita protilátek proti HIV, HBsAg, anti-HCV, syfilis či jiná riziková sociálně pracovní anamnéza s možným negativním dopadem na I. trimestr gravidity.

Vlastní analytická fáze genetického vyšetření odebraného krevního vzorku na přítomnost hereditárních trombofilních stavů proběhla v rámci grantového projektu na pracovišti genetiky GHC kliniky metodou HRM.

#### Kontrolní skupina K

Kontrolní skupinu tvoří soubor 76 českých žen, které dosud nepotratily. Všechny s minimálně jednou fyziologickou graviditou zakončenou úspěšně termínovým porodem a uzavřenými koncepčními plány. Ženy absolvovaly vstupní vyšetření zahrnující sběr anamnestických dat, podepsaly informovaný souhlas s genetickým vyšetřením a účastí ve

studii na soukromém gynekologickém ambulantním pracovišti v Praze v letech 2012 - 2015. Vlastní analytická fáze metodou HRM na oddělení genetiky kliniky GHC.

## ***Metodika***

### Laboratorní vyšetření

K detekci mutací v genech FV a FII byla na pracovišti GHC použita metoda High Resolution Melting - HRM (Wittwer C. T., 2003) (Erali M., 2008). Princip metody spočívá v analýze křivek tání s vysokým rozlišením.

### Statistické zpracování

Pro testování shody rozdělení věků byl použit dvouvýběrový t - test. Byl použit Poissonův regresní model s poissonovsky rozdělenou závislou veličinou. Hladina statistické významnosti byla stanovena na 0.05. Data byla zpracována programem R (R Core Team, 2014, version 3.1.2) a statistickým balíkem SPSS 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## **3.2.4. Výsledky**

Ve sledovaném souboru 100 potrativších žen bylo zjištěno anamnesticky celkem 136 časných SA. Prevalence žen s izolovaným potratem (SA 1) byla 75 %, s recidivujícím potracením 17 % a habituálním potratem 8 %. Ženy s anamnézou 2 a více SA byly z důvodu statistické validity dat sloučeny do skupiny SA 2, která finálně čítala celkovou prevalenci opakovaných SA (SA 2) 25 %.

### ***FVL***

FVL v heterozygotní konstituci byla ve sledovaném souboru bez ohledu na počet SA diagnostikována u 9 % potrativších žen. V souboru žen s izolovaným SA (SA 1) byla FVL v heterozygotní konstituci přítomna u 9 žen (12 %). V souboru žen s recidivujícím a habituálním potracením (SA 2) nebyla FVL zastižena vůbec. V kontrolní skupině byla diagnostikována u 2 žen (2.6 %). Homozygotní konstituce FVL nebyla v souboru zjištěna.

Při porovnání prevalencí FVL byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi soubory žen s izolovaným SA (SA 1) a kontrolou (12 % vs. 2.6 %,  $P = 0.031$ ). Signifikantní rozdíly mezi soubory žen s recidivujícím a habituálním potracením (SA 2) a kontrolou (0 % vs. 2.6 %,  $P = 1$ ), ani mezi soubory žen s izolovaným (SA 1) a žen s recidivujícím a habituálním potracením (SA 2) nebyly zjištěny (12 % vs. 0 %,  $P = 0.107$ ).

### ***PT G20210A***

PT G20210A v heterozygotní konstituci byla ve sledovaném souboru bez ohledu na počet SA diagnostikována u 3 % potrativších žen. V souboru žen s izolovaným SA (SA 1) byla

PT G20210A přítomna u 4 % žen, v souboru žen s recidivujícím a habituálním potrácením (SA 2) nebyla zastižena vůbec. V kontrolní skupině byla PT G20210A diagnostikována u 4 žen (5.3 %). Homozygotní konstituce PT G20210A nebyla v souboru zjištěna ani u jedné z žen.

Při statistickém porovnání prevalencí mezi soubory žen s izolovaným SA (SA 1), s recidivujícím a habituálním potrácením (SA 2) a kontrolní skupinou nebyl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl (SA 1 vs. K P = 1, SA 2 vs K P = 0.507, SA 1 vs. SA 2 P = 0.571).

### 3.2.5. Diskuze

Hereditární trombofilie se vyskytují v české populaci s minimální prevalencí 5-8 % (Dulíček P., 2012), z toho nejčastěji se jedná o klinické jednotky FVL (2-5 %) a PT G20210A (1-2 %) v heterozygotních konstitucích.

Prevalence PT G20210A uváděná pro českou populaci je přibližně 1-2 %. Ve sledovaném souboru byla PT G20210A přítomna bez ohledu na počet SA s prevalencí 3 %, tedy 1.5x vyšší než uvádí Penka (Penka M., 2009). U žen s izolovaným SA (SA1) byla zjištěna prevalence PT G20210A 4 %, což je 2x vyšší než její obvyklá prevalence v lokalitě České republiky (Penka M., 2009). U žen s recidivujícím či habituálním potrácením nebyla PT G20210A zastižena. V kontrolní skupině byla PT G20210A diagnostikována u 5.3 % žen. Což je v souladu s tezí, že i nositelky hereditární trombofilie mohou mít zcela fyziologický průběh gravidity (Said J. M., 2010). Při vzájemném statistickém porovnání zjištěných prevalencí PT G20210A mezi soubory žen s izolovaným SA (SA 1), žen s recidivujícím a habituálním potrácením (SA 2) a kontrolní skupinou nebyl zjištěn signifikantní rozdíl (SA 1 vs. K P = 1, SA 2 vs K P = 0.507, SA 1 vs. SA 2 P = 0.571).

Nejvyšší prevalenci v české populaci má heterozygotní varianta FVL, jejíž prevalence se zde pohybuje obvykle v uváděném rozmezí 2-5 %. Ve sledovaném souboru žen bez ohledu na počet SA byla FVL mutace zjištěna v heterozygotní konstituci s prevalencí 9 %, což je 1.8x vyšší hodnota prevalence než je obvykle udávaná frekvence FVL v české populaci (Dulíček P., 2005). Mnoho studií prokázalo signifikantně vyšší prevalenci FVL u žen s rekurentním SA (Brenner B., 1997) (Grandone E., 1997) (Ridker P. M., 1998) (Wramsby M. L., 2000). U žádné z námi vyšetřených 25 žen s recidivujícím a habituálním potrácením (SA 2) nebyla FVL zastižena. FVL námi nebyla potvrzena jako možný rizikový faktor recidivujícího a habituálního SA (12 % vs. 0 %, P = 0.107). Všechny diagnostikované mutace FVL v heterozygotní konstituci byly zjištěny u žen s izolovaným SA (SA 1). Její prevalence v souboru SA 1 činila 12 %, tedy 2.4x více než uvádí Dulíček (Dulíček P., 2005). Prevalence FVL v souboru žen s izolovaným časným SA byla signifikantně vyšší oproti kontrolní skupině (12 % vs. 2.6 %, P = 0.031), lze ji tak označit za možný rizikový faktor izolovaného SA po předchozí eliminaci základních etiologických agens v problematice SA.

Vysoká prevalence (klinická i preklinická) časného SA, dostupnost časně „domácí“ detekce gravidity a přetrvávající trend odkládání mateřství v kontextu s časově omezenými reprodukčními schopnostmi ženy zvyšují tlak pacientek na vyšetření etiologických příčin ideálně každého časného SA. Z klinického pohledu je nutno zmínit fakt, že k ženám s anamnézou izolovaného SA je vhodné přistupovat jako ke klinicky asymptomatickému nositeli hereditární trombofilie. Žádná z diagnostikovaných nositelek hereditární trombofilie nesplnila do uzavření studie kritéria habituálního SA. Vyšetření maternálního trombofilního statutu mutací FVL a PT G20210A je, a mělo by tak být, standardně indikováno po třetím časném SA, není-li do té doby splněno jiné indikační kritérium (Kvasnička J., 2010).

Výsledná data nepotvrdila role FVL či PT G20210A jako možných rizikových faktorů recidivujícího či habituálního potrácení, což je do jisté míry možným odrazem velikosti a skladby sledovaného souboru, či možností nediodagnostikovaných tranzitorních rizikových faktorů VTE. Jako potenciálně limitující faktor je možno vnímat neznámý trombofilní status embrya/plodu. U obou vyšetřovaných hereditárních trombofilních stavů platí autozomálně dominantní dědičnost (Svensson P. J., 1994), jež může protrombogenní „ladění“ organismu v graviditě formou paternálně zděděné trombofilie dále potencovat. Další ne zcela rutinně řešenou problematikou při recidivujícím a habituálním potrácení je právě otázka paternity, tedy zda za všemi neúspěšnými graviditami stojí paternálně jeden či více partnerů (resp. genetických identit).

Sledovaný soubor byl podroben genetickému vyšetření zaměřenému pouze na dva hereditární trombofilní stavy s nejvyšší prevalencí v Česku. Nelze tak zcela etiologicky eliminovat uplatnění raritnějších hereditárních trombofilí, další tranzitorních rizikových faktorů VTE, či nám dosud neznámých genetických variant trombofilních mutací. A to cestou maternální, tak paternálně zděděnou prostřednictvím embryonálního/ fetálního trombogenního statutu.

### **3.2.6. Závěr**

Ženy s izolovaným SA (SA 1) po eliminaci základních etiologických příčin SA mají 2.4x vyšší prevalenci FVL heterozygotů (12 %) a 1.5x vyšší prevalenci PT G20210A heterozygotů (3 %) oproti obvykle uváděným hodnotám jejich prevalencí v české populaci (Penka M., 2009). Prevalence FVL v heterozygotní konstituci v souboru žen s izolovaným časným SA byla signifikantně vyšší oproti kontrolní skupině (12 % vs. 2.6 %,  $P = 0.031$ ). FVL v heterozygotní konstituci lze po eliminaci základních etiologických kauzálních příčin SA označit za možný rizikový faktor izolovaného SA.

V kontextu vysoké prevalence SA, pokračujícího trendu odkládání mateřství a časově omezenému reprodukčnímu období ženy potencuje každý časný SA u pacientek distres a

zesiluje snahu zjistit příčinu těhotenského neúspěchu. I přes možnou negativní roli FVL v heterozygotní konstituci v etiologii časného izolovaného SA by vyšetření trombofilního maternálního statutu vzhledem k širokému a pestrému etiologickému spektru možných příčin časného SA, multifaktoriální etiopatogenezi trombembolické nemoci a existenci dalších nevyšetřovaných hereditárních koagulopatií mělo být standardně zahájeno až po třetím časném SA, není-li splněno jiné indikační kritérium.

### **3.3. Spontánní aborty – význam funkce štítné žlázy**

#### **3.3.1. Úvod**

Poruchy štítné žlázy se vyskytují u významné části žen v reprodukčním věku. V graviditě trpí přibližně 5 % žen hypotyreózou a 10 % má pozitivní protilátky proti tyreoidálním antigenům (a-TPO). Diagnostika tyreopatií v období gravidity je díky nespecifickému klinickému obrazu založena především na laboratorních testech. Rozhodující pro diagnostiku je proto stanovení referenčních intervalů pro vyšetřované parametry tyreotropního hormonu - TSH, volného tyroxinu - fT4 a a-TPO, jež se liší v době gravidity a mimo ni (Springer D., 2009). Pokud tyreoidální dysfunkce nejsou adekvátně terapeuticky řešeny, mohou být příčinou nejen sterility, ale i četných poruch v těhotenství s důrazem na SA, poruch vývoje embrya, plodu a novorozence (Stagnaro-Green A., 2011) (Thangaratinam S., 2011).

Vztah mezi abnormální funkcí štítné žlázy a SA je znám dlouhodobě. Největší klinický dopad lze očekávat od neléčené manifestní tyreopatie (patologická hladina TSH i fT4), dále pak subklinické hypotyreózy (elevace hladin TSH při normální hladině fT4) a autoimunitní eufunkční tyreoiditidy (normální hladina TSH i fT4 při současné pozitivitě antityreoidálních protilátek a-TPO a/nebo přítomných UZ známek autoimunitního onemocnění tyreoidy, AITD). Negativní dopad na intelekt a psychomotorický vývoj dětí klinicky manifestních hypotyreózních matek byl jednoznačně prokázán (Abalovich M., 2007) (Stagnaro-Green A., 2011). U subklinické hypotyreózy a eufunkční tyreoidy s pozitivitou a-TPO se studie ve svých závěrech na negativní dopad rozcházejí. Ghassabian et al. negativní dopad jednoznačně potvrzují (Ghassabian A., 2012). Naopak Lazarus et al. klinickou souvislost subklinické hypotyreózy a eufunkční tyreoidy s pozitivitou a-TPO jednoznačně nepotvrdili (Lazarus J.H., 2012).

Někteří autoři publikovali u žen s tyreoidální dysfunkcí či eutyreoidní AITD zvýšené riziko spontánního potratu (SA) (Glinioer D., 1991) (Negro R., 2006) (Poppe K., 2008) (Benhadi N., 2009). Zmiňovaným nedostatkem většiny výše zmíněných studií, je stanovení diagnózy AITD pouze na podkladě positivity tyreoidálních protilátek bez ohledu na sonografický nález. Některé studie nebyly kontrolované.



### **3.3.2. Pracovní hypotéza a cíl 3. části projektu**

U žen po časném SA by měla být vyšší prevalence tyreopatií. Jejich přítomnost může mít negativní vliv na následnou fertilitu, což je možné efektivně ovlivnit terapií.

Cílem této části studie je komplexním vyšetřením zjistit prevalenci AITD a funkčních tyreopatií u žen po SA a porovnat ji s kontrolní skupinou těhotných žen, jež byly vyšetřeny v prvním trimestru fyziologické gravidity ukončené spontánním termínovým porodem bez anamnestického záznamu SA.

### **3.3.3. Materiál a metodika**

#### ***Vyšetřované subjekty a metody***

Sledovaný soubor SA (SA 1 – izolovaný spontánní potrat, SA 2 – recidivující a habituální potrat)

Do sledovaného souboru SA bylo zařazeno 188 žen odeslaných na Gyn. - por. kliniku VFN a 1. LF UK s diagnózou neprosperující gravidity v prvním trimestru. Ze 188 potrativších žen jich 134 (71.3 %) potratilo právě jednou (soubor SA 1 - izolovaný SA) a 54 (28.7 %) potratilo dva a/nebo vícekrát (soubor SA 2- recidivující nebo habituální SA). Žádná z těchto žen nebyla doposud sledována, ani léčena pro tyreopatii. U žádné ženy z vyšetřovaného souboru nebyl obvodním gynekologem ani praktickým lékařem proveden screening tyreopatií prekoncepčně, ani v časně fázi gravidity. Byla zde sonograficky potvrzena vstupní diagnóza SA do ukončeného 12. gestačního týdne a provedena instrumentální revize dutiny děložní v celkové anestézii. Získaný embryonální/fetální materiál byl histologicky vyšetřen, čímž byla definitivně potvrzena diagnóza SA. Všechny ženy po SA byly bezprostředně poté referovány na III. interní kliniku VFN a 1. LF UK v Praze, kde bylo provedeno komplexní vyšetření stavu štítné žlázy tj. klinické, laboratorní a sonografické. Po odběru anamnézy s důrazem na tyreopatie či jiná autoimunitní onemocnění v rodinné anamnéze a další rizikové faktory dle ATA následovalo laboratorní vyšetření tyreoidálních markerů TSH, fT4 a a-TPO. Do 2 měsíců od laboratorního odběru byla sonograficky vyšetřena štítná žláza přístrojem EnVisor Ultrasound Systém značky Phillips jediným vyšetřujícím lékařem.

#### Kontrolní skupina K

Jedná se o skupinu 172 těhotných žen, které doposud nepotratily. Všechna jejich těhotenství byla jednočetná, po celou dobu jejich trvání byla fyziologická, zakončena spontánním nekomplikovaným termínovým porodem eutrofického plodu. Vylučujícím kritériem z kontrolní skupiny byl anamnestický záznam SA v OA a/nebo tyreopatie v dispenzarizaci či již léčená. U těhotných žen byly v rámci prvotrimestrálního kombinovaného screeningu vyšetřeny rovněž tyreoidální laboratorní markery TSH, fT4 a a-TPO v rozmezí mezi

10. a 12. ukončeným týdnem gravidity na pracovišti ÚKBLD VFN a 1. LF UK v Praze v letech 2006-2007. Informace a anamnestická data byly získány na endokrinologickém oddělení III. interní kliniky a Gynekologicko-porodnické kliniky VFN a 1. LF UK v Praze.

Všechny použité metody podléhají akreditaci ČSN EN ISO/IEC 17025 a 15189.

### ***Laboratorní vyšetření***

#### *Použité přístroje*

Laboratorní tyreoidální markery byly stanoveny na automatickém analyzátoru ADVIA CENTAUR Siemens Healthcare Diagnostics využívající chemiluminiscenční imunoanalýzu. Analyzátor zahrnuje dávkování vzorků a reagensů, inkubaci. Detekci a automatické vyhodnocení výsledků.

#### *Stanovení TSH, a-TPO a fT4 v séru*

Pro kvantitativní stanovení TSH byla využita sendvičová imunoanalýza s přímou chemiluminometrickou technologií.

#### *Referenční rozmezí TSH*

Pro běžnou populaci je referenční rozmezí TSH stanoveno dle výrobce soupravy na 0.55-4.78 mIU/l. Pro populaci těhotných v 10- 12. gestačním týdnu byl dle doporučení ATA a Endocrine Society nastaven interval 0.1-2.5 mIU/l včetně (Jiskra J., 2014) (Benhadi N., 2009).

#### *Referenční rozmezí fT4*

Pro běžnou populaci bylo stanoveno 12-22 pmol/l, pro těhotné ženy v prvním trimestru 11.5-18.1 pmol/l (Springer D., 2009).

#### *Referenční rozmezí a-TPO*

Pro běžnou populaci je referenční rozmezí a-TPO stanoveno dle výrobce soupravy na 0-60 IU/ml. Pro populaci těhotných byl na základě studie Springer et al. Ve VFN nastaven interval fyziologické hladiny a-TPO 0-143 IU/ml (Springer D., 2009).

### ***Sonografické vyšetření štítné žlázy***

Ultrazvukové vyšetření štítné žlázy bylo provedeno do 8 týdnů od vyšetření laboratorních tyreoidálních markerů na ultrazvukovém přístroji EnVisor Ultrasound Phillips pomocí 8-12 MHz lineární sondy (model PLF-805ST). Ultrazvuková diagnostika AITD byla vyhodnocena na základě nálezu hypoechogenity, nepravidelné struktury a hypervaskularizace. Echogenita byla hodnocena jako "normální" (0 bodů, nález rovnoměrně hyperechogenní ve srovnání s krčními svaly), „mírně snížená“ (1 bod, nález fokálně hypoechogenních oblastí ve srovnání s krčními svaly), „středně snížená“ (2 body, nález

isoechogenní struktury v porovnání s krčními svaly) a „silně snížená“ (3 body, nález hypoechogenní struktury ve srovnání s krčními svaly). Struktura byla hodnocena jako „pravidelná“ (0 bodů) nebo „nepravidelná“ (1 bod) a v barevném Dopplerovském obrazu vaskularizace jako "normální" (0 bodů) nebo nález „hypervaskularizace“ (1 bod). Součet bodů určí tzv. „tyreoidální ultrazvukové skóre“ (TUS): 0 - normální tyreoida, 1 - hraniční nález, 2 - lehký stupeň tyreoiditidy, 3 - střední stupeň tyreoiditidy, 4 - těžký stupeň tyreoiditidy. Z důvodu vyloučení možné interindividuální variability hodnocení byla všechna sonografická vyšetření provedena jedním vyšetřujícím lékařem.

### ***Statistické zpracování***

Statistické zpracování bylo provedeno s využitím metody ANOVA (Analysis of variance, Analýza rozptylu). Hladina statistické významnosti P byla stanovena na 0.05. Pro zjištění, které skupiny se liší, se používají metody mnohonásobného porovnávání. V našem případě jsme používali metodu Fisher's LSD (Fisher's least significant difference). Porovnání statistické významnosti prevalencí jednotlivých pásem sledovaných hladin vyšetřovaných parametrů (normální, zvýšená, snížená hladina) mezi soubory bylo provedeno za pomoci chí kvadrát testu při očekávaných četnostech větších než 5. Při četnostech vyšších než 1 byl použit Fisherův exaktní test.

#### **3.3.4. Výsledky**

##### ***TSH***

Průměrná hodnota TSH v sledovaném souboru potrativších žen byla 1.93 mIU/l, v souboru SA 1: 1.88 mIU/l, v souboru SA 2: 2.06 mIU/l. V kontrolní skupině zdravých těhotných činil průměr hodnoty TSH 1.63 mIU/l. Při porovnání průměrných hodnot hladiny TSH jednotlivých souborů byla zjištěna signifikantně vyšší hladina TSH ve skupině SA 1 vs. K ( $P = 0.028$ ) a SA 2 vs. K ( $P = 0.006$ ). Soubory SA 1 a SA 2 nelze spolehlivě rozlišit ( $P = 0.271$ )

V pásmu se zvýšenou hladinou TSH (nad 2.5 mIU/l) se významně lišily soubory SA 1 (17 % vs. 8 %  $P = 0.026$ ) a SA 2 (24 % vs. 8 %  $P = 0,004$ ) při porovnání s kontrolní skupinou. Soubory SA 1 a SA 2 od sebe nelze signifikantně odlišit. Prevalence pásma zvýšené hladiny TSH (nad 2.5 mIU/l) v souborech žen s potraty byly signifikantně vyšší ( $P = 0.005$ ) ve srovnání s kontrolním souborem bez ohledu na počet potratů.

##### ***fT4***

Průměrná hodnota fT4 ve sledovaném souboru byla 14.87 pmol/l, v souboru SA 1: 14.35 pmol/l, v souboru SA 2: 14.21 pmol/l. V kontrolním souboru činila průměrná hodnota fT4 14.54 pmol/l, která se signifikantně nelišila ani od SA 1, ani od SA 2.

V souboru SA 1 mělo 1 % sníženou hladinu fT4 (méně než 11.5 pmol/l). V souboru SA 2 byla u 4 % snížená hladina fT4 (méně než 11.5 pmol/l). V kontrole mělo 3 % žen sníženou hladinu fT4 (méně než 11.5 pmol/l). Při porovnání prevalencí snížené hladiny fT4 (méně než 11.5 pmol/l) se kontrola signifikantně nelišila ani od SA 1 ani od SA 2 (P hodnota nesignifikantní).

### ***a-TPO***

Průměrná hodnota hladiny protilátek a-TPO ve sledovaném souboru bez ohledu na četnost těhotenských ztrát byla 105.68 IU/ml, v souboru SA 1: 87.73 IU/ml a v SA 2: 150.22 IU/ml. V kontrolním souboru K byla průměrná hladina a-TPO 69.09 IU/ml. Průměrné hodnoty hladiny a-TPO byly signifikantně vyšší u SA 1 (87.73 vs. 69.9 P = 0.001) a SA 2 (150.22 vs. 69.09 P = 0,000) oproti kontrolní skupině K.

V souboru SA 1 činila prevalence pásma normální hladiny a-TPO 95 % a prevalence zvýšené hladiny a-TPO (vyšší než 143 IU/ml) 5 %. V souboru SA 2 mělo 85 % žen normální hladinu a-TPO a 15 % zvýšenou hladinu a-TPO (vyšší než 143 IU/ml). V kontrolním souboru bylo zjištěna u 91 % kontrol normální hladina a-TPO a u 9 % zvýšená hladina a-TPO (vyšší než 143 IU/ml). Při statistickém porovnání pásma prevalence zvýšené hladiny a-TPO byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi soubory SA 1 a SA 2 (5 % vs. 15 % P = 0.003). Soubory SA 1 a SA 2 od kontrolní skupiny nelze signifikantně odlišit (P nesignifikantní).

### ***Prevalence funkčních tyreopatií***

**Subklinická hypothyreóza** (TSH vyšší než 2.5 mIU/l & fT4 11.5-18.1 pmol/l) byla zjištěna s prevalencí v souboru SA 1: 17 %, v souboru SA 2: 22 %. V kontrolní souboru byla přítomna u 7 % žen. Při porovnání prevalencí subklinické hypothyreózy byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi soubory SA 1 a kontrolou (17 % vs. 7 % P = 0.009) a soubory SA 2 a kontrolou (22 % vs. 7 % P = 0.004). Mezi soubory SA 1 vs. SA 2 navzájem statisticky významný rozdíl zjištěn nebyl.

**Manifestní hypothyreóza** (TSH vyšší než 2.5 mIU/l & fT4 méně než 11.5 pmol/l) byla diagnostikována u 1 % žen, v souboru SA 1 u 0 %, v souboru SA 2 u 2 %. V kontrolním souboru K byla zjištěna s prevalencí 1 %. Prevalence manifestní hypothyreózy v souborech SA 1 a SA 2 se od kontrolního souboru signifikantně nelišily.

**Eutyroidní AITD** (TSH 0.1- 2.5 včetně mIU/l & fT4 11.5-18.1 pmol/l & a-TPO vyšší než 143 IU/ml) byla ve sledovaném souboru zjištěna s prevalencí 4 %, v souboru SA 1 u 4 %, v souboru SA 2 u 6 %. V kontrolní souboru K byla přítomna u 5 %. Prevalence AITD v souborech SA 1 a SA 2 se od kontrolního souboru signifikantně nelišily.

### ***Význam výše hladiny a-TPO a sonografického nálezu tyreoiditidy***

Sonografický nález „normálního obrazu tyroidey“ (TUS 0) a/nebo „hraničního nálezu“ (TUS 1) byl zjištěn v souboru SA 1 s prevalencí 79 %, v souboru SA 2 s prevalencí 72 %. Prevalence „TUS 0 a/nebo „TUS 1“ v souborech SA 1 a SA 2 se navzájem signifikantně nelišily. Nález „mírného stupně tyreoiditidy“ (TUS 2) byl přítomen v souboru SA 1 s prevalencí 6 % a v souboru SA 2 13 %. Soubory od sebe nelze signifikantně odlišit. Nález „středního stupně tyreoiditidy“ (TUS 3) a/nebo „těžkého stupně tyreoiditidy“ (TUS 4) byl vyhodnocen v souboru SA 1 u 15 % žen a v souboru SA 2 u 15 % žen, což se nelišilo.

Zvýšená hladina a-TPO (vyšší než 143 IU/m) byla nalezena u 7 % žen s nálezem „TUS 0“ a/nebo „TUS 1“, u žen s nálezem „TUS 2“ s prevalencí 7 % a s prevalencí 86 % u žen s nálezem „TUS 3“ a/nebo „TUS 4“. U žen se sonografickým nálezem tyreoiditidy ve stupni „TUS 2 - 4“ byla zvýšená hladina a-TPO (vyšší než 143 IU/m) přítomna s prevalencí 93 %. Při porovnání zlogaritmovaných průměrů hladin a-TPO jednotlivých souborů byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi soubory se závěry „TUS 0“ a/nebo „TUS 1“ vs. „TUS 3“ a/nebo „TUS 4“ ( $P = 0.000$ ) a současně mezi soubory s nálezem „TUS 2“ vs. „TUS 3“ a/nebo „TUS 4“ ( $P = 0.001$ ).

#### **3.3.5. Diskuze**

Tyreopatie postihují významnou část žen v reprodukčním věku. V ČR se udává přibližně 10-15 % těhotných žen s funkční poruchou štítné žlázy (Jiskra J., 2014). Diagnostika tyreopatií v období gravidity je díky nespecifickému klinickému obrazu založena především na laboratorních testech. Rozhodující pro diagnostiku je proto stanovení referenčních intervalů pro vyšetřované parametry TSH, fT4 a a-TPO, jež se liší v době gravidity a mimo ni (Springer D., 2009). TSH je pro svou přesnost a spolehlivost vnímán jako klíčový tyreoidální marker v období těhotenství. V naší práci vycházíme z doporučení ATA z roku 2011 (Abalovich M., 2007), výsledků studie Benhadi et al., kteří pro TSH v I. trimestru podali důkaz, že i „vyšší normální“ hodnoty (s mediánem 1.48 mIU/l) jsou spojeny se zvýšeným rizikem SA a úmrtí plodu či novorozence (Benhadi N., 2009) a výsledků studie Casey et al., že hodnoty TSH v dolní části rozmezí či mírně pod ním jsou z hlediska vývoje těhotenství bezpečné (Casey B. M., 2006)

Průměrná hodnota hladin TSH sledovaných souborů vykazovala vzrůstající tendenci v závislosti na počtu potratů (K: 1.63 mIU/l, SA 1: 1.88 mIU/l, SA 2: 2.06 mIU/l). Hladina TSH byla signifikantně vyšší u žen s izolovaným potratem ( $P = 0.028$ ) a žen s recidivujícím a habituálním potrácením ( $P = 0.006$ ) ve srovnání s kontrolní skupinou. Prevalence zvýšené hladiny TSH (vyšší než 2.5 mIU/l) vzrůstala v reakci na rostoucí počet potratů (K: 8 %, SA 1: 17 %, SA 2: 24 %). Prevalence zvýšené hladiny TSH (vyšší než 2.5 mIU/l) v souborech žen s přítomností SA byly signifikantně vyšší ve srovnání s kontrolou bez ohledu na počet potratů

( $P = 0.005$ ). Hodnotu TSH nad 2.5mIU/l v I. trimestru lze tak označit za potenciální rizikový faktor pro časný SA ( $P = 0.005$ ).

Vyšetření hladiny a-TPO je nezbytné pro komplexní zhodnocení stavu štítné žlázy. Dle Jiskry přibližně 10 % českých gravidních žen má zvýšenou hladinu a-TPO (vyšší než 143 IU/ml) (Jiskra J., 2014). Ženy s anamnézou recidivujícího a habituálního potratu měly prevalenci a-TPO positivity 15 %, tedy 1.5x vyšší než je její obvykle udávaná prevalence v graviditě.

Průměrné hodnoty hladin a-TPO vykazovaly vzrůstající tendenci v závislosti na počtu potratů (K: 69.09 IU/ml, SA 1: 87.73 IU/ml, SA 2: 150.22 IU/ml). Hladina a-TPO byla v souborech žen s izolovaným potratem ( $P = 0.001$ ) a žen s recidivujícím a habituálním potracením ( $P = 0.000$ ) signifikantně vyšší než v kontrolním souboru. Prevalence zvýšené hladiny a-TPO (vyšší než 143 IU/ml) byla signifikantně vyšší ( $P = 0.003$ ) u žen s recidivujícím a habituálním potracením (SA 2) ve srovnání se souborem žen s izolovaným potratem (SA 1). Hladinu a-TPO nad 143 IU/ml je možné považovat za potencionální rizikový faktor pro recidivující a habituální časně těhotenské ztráty ( $P = 0.003$ ). Což je v souladu s Jiskrovým doporučením vyšetření laboratorních tyreoidálních parametrů po SA ideálně při plánování další gravidity prekoncepčně, či v období okolo 5. - 6. gestačního týdne (Jiskra J., 2014).

Hladina a-TPO byla signifikantně vyšší u žen s tyreoidálním ultrazvukovým skóre (TUS) středního „TUS 3“ nebo těžkého stupně „TUS 4“ oproti ženám s nálezem žádné „TS 0“ nebo hraniční tyreoiditidy „TUS 1“ ( $P = 0.000$ ). U 87 % infertilních žen s laboratorně prokázanou elevací hladiny a-TPO nad 143 IU/ml byl při provedeném sonografickém vyšetření současně zjištěn obraz tyreoiditidy ve „středním- TUS 3“ nebo „těžkém-TUS 4 stupni“ zánětlivých změn. Prevalence zvýšené hladiny a-TPO (nad 143 IU/ml) byla signifikantně vyšší u žen s ultrazvukovým nálezem středního „TUS 3“ nebo těžkého „TUS4“ stupně tyreoiditidy oproti ženám s žádným „TS 0“ či hraničním „TS 1“ nálezem ( $P = 0.001$ ). Lze tak shrnout, že výsledná hodnota tyreoidálního ultrazvukového skóre závisí na sérové koncentraci a-TPO.

Při hodnotě a-TPO nad 143 IU/ml je 116x vyšší riziko současné přítomnosti sonografických známek středního a/nebo těžkého stupně tyreoiditidy, než-li přítomnosti žádných a/nebo hraničních zánětlivých změn štítné žlázy (OR = 116.2 [95 % CI: 14.2 - 947.4]).

Subklinická hypotyreóza je častou příčinou infertility v České republice s obvykle udávanou prevalencí okolo 5 % gravidních (Jiskra J., 2014). U infertilních žen bez ohledu na četnost těhotenských ztrát byla přítomna s prevalencí 19 %, tj. v 3.8x vyšší hodnotě. Prevalence subklinické hypotyreózy vykazovala vzestupnou tendenci v reakci na počet potratů (K: 7 %, SA 1: 17 %, SA 2: 22 %). Subklinická hypotyreóza byla signifikantně častější u žen s potraty oproti kontrolní skupině ( $P = 0.003$ ).

Přístup specialistů k managementu subklinické hypotyreózy není plně jednotný. U žen se subklinickou hypotyreózou by substituční terapie levotyroxinem (LTX) měla být v graviditě spíše zahájena (Jiskra J., 2014) (Potluková E, 2011). Námi zjištěná vyšší koncentrace TSH (vyšší než 2.5 mIU/l) a vyšší prevalence subklinické hypotyreózy u žen s jedním nebo více potraty oproti kontrolní skupině tento přístup podporují.

### **3.3.6. Závěr**

Průměrné hodnoty sérových koncentrací TSH signifikantně stoupaly s počtem SA a byly u žen s potraty signifikantně vyšší než u kontrol (P = 0.028), resp. (P = 0.006). Subklinická hypotyreóza byla signifikantně častější u žen s potraty (19 %) oproti kontrolní skupině (7 %). Její prevalence byla vyšší u žen s recidivujícími a habituálními potraty (22 %) oproti ženám s izolovaným potratem (17 %). Hodnotu TSH vyšší než 2.5mIU/l lze považovat za rizikový faktor časného SA (P = 0.005).

Průměrné hodnoty sérových koncentrací a-TPO vykazovaly vzrůstající tendenci v závislosti na počtu potratů a byly signifikantně vyšší u žen s potraty ve srovnání s kontrolní skupinou (P = 0.001) resp. (P = 0.000). Laboratorní nález hladiny a-TPO vyšší než 143 IU/ml lze označit za rizikový faktor pro recidivující a/nebo habituální potracení v období prvního trimestru (P = 0.003).

Výsledná hodnota tyreoidálního ultrazvukového skóre (TUS) závisí na sérové koncentraci a-TPO. Při hodnotě a-TPO nad 143mIU/l bylo 116x vyšší riziko současné přítomnosti sonografických známek „středního“ nebo „těžkého“ stupně tyreoidity (OR = 116.2 [95 % CI: 14.2 - 947.4]).

Zavedením a především důslednou realizací tyreoidálního screeningu v graviditě dle doporučení ČES ČLS JEP by bylo možné včas tyto rizikové těhotné zachytit. Vzhledem ke snadné, dostupné a levné terapii levotyroxinem a vysoké compliance žen v období gravidity by bylo možné tímto postupem pravděpodobně efektivně snížit nejen počet následných potratů, ale mnohých dalších těhotenských komplikací.

## 4. Závěr

Časný spontánní abort je nejčastější komplikací v graviditě. Etiologické spektrum kauzálních příčin infertility v období prvního trimestru je pestré. Standardně bývá diagnostický algoritmus zahájen po třetí časně klinické těhotenské ztrátě, tedy jsou-li splněny podmínky habituálního potrácení. Díky pokračujícímu trendu vzrůstající prevalence infertility v období prvního trimestru a odkládání reprodukčních plánů je a do budoucna zdá se bude problematika infertility stále více aktuální a tíživá pro ženy po stránce fyzické, psychické i sociální. Preventivní opatření mohou přispět ke zkvalitnění a zefektivnění lékařské péče, snížení nákladů na péči spojenou s potrativší ženou a v neposlední řadě k psychické pohodě těhotných žen především v období prvního trimestru, jež je mnohými specialisty stále považováno za tzv. „šedou zónu“ gravidity s minimální možností terapeutické intervence.

Z vyšetřovaných kauzálních genetických faktorů infertility APOE polymorfismus a PTG20210A nelze označit za determinující faktory v roli časného SA. I přes možnou negativní roli FVL v heterozygotní konstituci v etiologii časného izolovaného SA (12 % vs. 2.6 %,  $P = 0.031$ ) vzhledem k pestrému etiologickému spektru možných příčin časného izolovaného SA, multifaktoriální etiopatogenezi trombembolické nemoci a existenci dalších nevyšetřovaných hereditárních koagulopatií by vyšetření maternálního hereditárního trombofilního statutu mělo být standardně zahájeno až po třetím časném SA, není-li splněno jiné indikační kritérium.

Z negenetických maternálních kauzalit byl prověřován význam tyreoidální funkce v roli determinujícího faktoru časně infertility. Subklinická hypotyreóza byla signifikantně častější u infertilních žen oproti kontrolní skupině (19 % vs. 7 %  $P = 0.003$ ). Hodnotu TSH vyšší než 2.5 mIU/l lze považovat za rizikový faktor časného SA ( $P = 0.005$ ). Průměrné hodnoty sérových koncentrací a-TPO vykazovaly vzrůstající tendenci v závislosti na počtu potratů a byly signifikantně vyšší u žen s potraty ve srovnání s kontrolní skupinou ( $P = 0.001$ ) resp. ( $P = 0.000$ ). Laboratorní nález hladiny a-TPO vyšší než 143 IU/ml lze označit za rizikový faktor pro recidivující a/nebo habituální potrácení v období prvního trimestru ( $P = 0.003$ ). Výsledná hodnota tyreoidálního ultrazvukového skóre (TUS) závisí na sérové koncentraci a-TPO. Při hodnotě a-TPO nad 143 mIU/l bylo 116x vyšší riziko současné přítomnosti sonografických známek „středního“ nebo „těžkého“ stupně tyreoidity ( $OR = 116.2$  [95 %CI: 14.2-947.4]). Zavedením a především důslednou realizací tyreoidálního screeningu v graviditě dle doporučení ČES ČLS JEP by bylo možné včas tyto rizikové těhotné zachytit. Vzhledem ke snadné, dostupné a levné terapii levotyroxinem a vysoké compliance žen v období gravidity by bylo možné tímto postupem pravděpodobně efektivně snížit nejen počet následných potratů, ale mnohých dalších těhotenských komplikací.



## 5. Bibliografie

**Abalovich M, et al. 2007.** Clinical Practise Guideline. Management of Thyroid Dysfunction during Pregnancy and Postparturum. *J Clin Endocrinol Metab.* 92, 2007, Sv. 8, stránky 41-47.

**Benhadi N, et al. 2009.** Higher maternal TSH levels in pregnancy are associated with increased risk for miscarriage, fetal and neonatal death. *Eur J Endocrinol.* 160, 2009, stránky 985-991.

**Brenner B, Kupfermirc B. 2003.** Inherited thrombophilia and poor pregnancy outcome. *Best Pract Res Clin Obstet gynecol.* 3, 2003, stránky 427-439.

**Cauley JA, et al. 1993.** Apo E allele frequencies in younger (age 42-50) vs older (age 65-90) women. *Genetic Epidemiol.* 10, 1993, Sv. 1, stránky 27-34.

**Dulíček P, et al. 2005.** Výskyt venózního trombembolismu u žen s Leidenskou mutací v souvislosti s graviditou a šestineděním. *Čes Gyn.* 70, 2005, Sv. 2, stránky 133-138.

**Glinoer D, et al. 1991.** Pregnancy in patients with mild thyroid abnormalities: Maternal and neonatal repercussions. *J Clin Endocrinol. Metab.* 71, 1991, stránky 421-427.

**Grandone E, et al. 1997.** Factor V Leiden is associated with repeated and recurrent unexplained fetal losses. *Thromb Haemost.* 77, 1997, Sv. 5, stránky 822-824.

**Jiskra, J. 2014.** Farmakoterapie nemocí štítné žlázy v graviditě, po porodu a u infertilních žen. [autor knihy] Zikán M., Mašata J. et al. *Fait. T. Moderní farmakoterapie v gynekologii a porodictví.* Praha: Maxdorf, 2014. ISBN 978-80-7345-403-6.

**Kvasnička, J. 2010.** Doporučený postup pro indikaci molekulárně genetických vyšetření v rámci diagnostiky trombofilních stavů v žilním systému. *Vnitř Lék.* 56, 2010, Sv. 12, str. 1.

**Springer D, et al. 2009.** Reference Intervals in Evaluation of Maternal Thyroid Function during the first Trimester of Pregnancy. *Eur. J. Endocrinol.* 160, 2009, stránky 791-797.

**Stagnaro-Green A, et al. 2011.** American Thyroid Disease during Pregnancy and Postpartum. Guidelines of the American Thyroid Association for the Diagnosis and Management of Thyroid Disease during Pregnancy and Postpartum. *Thyroid.* 21, 2011, Sv. 10, stránky 1081-1125.