

Polimorfizmy 20210G>A i 19911A>G genu protrombiny a występowanie poronień nawracających

The 20210G>A and 19911A>G polymorphisms of prothrombin gene and recurrent miscarriages

Magdalena Barlik^{1,2}, Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz^{1,2}, Witold Kraśnik³, Krzysztof Drews^{1,2}

¹ Klinika Perinatologii i Chorób Kobięcych, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Polska

² Pracownia Biologii Molekularnej w Klinice Perinatologii i Chorób Kobięcych Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Polska

³ Studenckie Koło Naukowe w Klinice Perinatologii i Chorób Kobięcych, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Polska

Streszczenie

Cel pracy: Celem pracy była ocena częstości występowania oraz znaczenia obecności polimorfizmów 20210G>A i 19911A>G genu protrombiny w grupie kobiet z dwoma lub więcej poronieniami w I trymestrze ciąży.

Materiał i metoda: Badania przeprowadzono w grupie 150 kobiet z dwoma lub więcej poronieniami w I trymestrze ciąży (średnia wieku 31,5±4,1 lat) oraz 180 zdrowych kobiet z nieobciążonym wywiadem położniczym (średnia wieku 28,7±4,0 lat). Do badań zastosowano reakcję łańcuchową polimerazy oraz metodę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR/RFLP).

Wyniki: W zakresie polimorfizmu 20210G>A genu protrombiny zaobserwowano przewagę występowania genotypu 20210GA w grupie kobiet z poronieniami (2,7% vs. 1,1% w grupie kontrolnej, WR=2,44, ns), jak również allele 20210A (1,3% vs. 0,6% w grupie kontrolnej, WR=2,42, ns). W zakresie polimorfizmu 19911A>G zaobserwowano podobną częstość występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego 19911GG (22,6 vs. 21,1% w grupie kontrolnej, WR=1,10, ns) oraz zmutowanego allele 19911G (48,6% vs. 45,7%, WR=0,89, p=0,24). Odnotowano tendencję do częstszego występowania haplotypów zawierających zmutowany allel 20210A w grupie badanej (19911A/20210A 0,012934 vs. 0,003547 w grupie kontrolnej, ns).

Wnioski: Analiza wyników wskazuje na możliwy wpływ zmutowanego allele 20210A oraz brak wpływu zmutowanego allele 19911G genu protrombiny na ryzyko występowania poronień nawracających w I trymestrze ciąży w badanej grupie kobiet. Zgodnie z naszą wiedzą nie badano dotychczas związku polimorfizmu 19911A>G z występowaniem poronień nawracających. W związku z tym niezbędne są dalsze badania w większej liczbie grupie kobiet z poronieniami nawracającymi oraz uwzględniające jednocześnie inne polimorfizmy warunkujące trombofiliję oraz wpływ czynników środowiskowych.

Słowa kluczowe: **poronienia nawracające / gen protrombiny /
/ polimorfizm genetyczny /**

Adres do korespondencji:

Magdalena Barlik
Klinika Perinatologii i Chorób Kobięcych, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu
ul. Polna 33., 60-535 Poznań, Polska
tel. +48 61 8419223, fax: +48 61 8474651
e-mail: magda.barlik@op.pl

Otrzymano: 22.04.2013
Zaakceptowano do druku: 10.09.2013

Magdalena Barlik, et al. Polimorfizmy 20210G>A i 19911A>G genu protrombiny a występowanie poronień nawracających.

Abstract

Objectives: The aim of the study was to evaluate the frequency of 20210G>A and 19911A>G prothrombin gene polymorphisms in a group of women with 2 or more miscarriages in the first trimester of pregnancy.

Material and methods: The study involved 150 women with two or more miscarriages in the first trimester of pregnancy (mean age 31.5±4.1 years). The control group consisted of 180 healthy women (mean age 28.7±4.0 years). The frequency of genotypes and alleles of the investigated polymorphisms was evaluated by polymerase chain reaction/restriction fragments length polymorphism method (PCR/RFLP).

Results: As to the 20210G>A prothrombin gene polymorphism, overrepresentations of 20210GA genotype have been observed in the group of women with miscarriages (2.7% vs. 1.1% in the control group, WR=2.44, ns), as well as overrepresentation of 20210A allele (1.3% vs. 0.6% in the control group, WR=2.42, ns). Considering the 19911A>G polymorphism, a similar frequency of mutated homozygous 19911GG genotype has been noted (22.6 vs. 21.1% in controls, OR=1.10, ns). Also, frequency of mutated 19911G allele was similar in both investigated groups with miscarriages and controls (48.6% vs. 45.7%, OR=0.89, ns).

Conclusions: Our findings suggest lack of correlation of 20210G>A and 19911A>G prothrombin gene polymorphisms with the risk of recurrent miscarriages in the first trimester of pregnancy. Further studies, concerning other genetic variants conditioning inherited thrombophilia and environmental factors influencing the risk of recurrent abortions, are needed. Therefore, further research with more numerous group of women with recurrent miscarriages and taking into account other polymorphisms of thrombophilia and influence of environmental factors is required.

Key words: **recurrent miscarriages / prothrombin gene /
genetic polymorphism /**

Wstęp

Najwięcej poronień przypada na pierwszy trymestr ciąży, a częstość ich występowania ocenia się na 10-15% wszystkich rozpoznanych ciąży. Poronienia nawracające (RM - *recurrent miscarriages*) dotyczą 1-3% kobiet, jednak tylko w 40-60% przypadków udaje się ustalić ich przyczynę. Wrodzona lub nabyta trombofilia jest uważana za jedną z przyczyn poronień nawracających. Polskie Towarzystwo Ginekologiczne zaleca już w przypadku wystąpienia dwóch lub więcej poronień rozszerzenie diagnostyki, między innymi o badania w kierunku trombofilii [1]. Najlepiej poznanymi i najczęściej opisywanymi przyczynami trombofilii wrodzonych, będących czynnikiem etiologicznym powikłań położniczych są mutacja czynnika V Leiden (ok. 20% powikłań), mutacja genu protrombiny 20210G>A (ok. 10% powikłań) oraz hiperhomocysteinemia [2, 3, 4].

Gen kodujący protrombinę zlokalizowany jest na chromosomie 11 w pobliżu centromeru i składa się z 14 eksonów o wielkości od 25 do 315 pz oraz 13 intronów o wielkości od 84 do 9447 pz. Dwa funkcjonalne polimorfizmy tego genu 19911A>G (rs3136516) oraz 20210G>A (rs1799963) związane są z podwyższonym stężeniem i aktywnością protrombiny. Silniejszy i lepiej udowodniony jest wpływ wariantu 20210G>A na zwiększone ryzyko zakrzepicy. Oznaczenie genotypu w zakresie tego polimorfizmu jest jednym z najczęściej rekomendowanych testów do określenia trombofilii wrodzonej [5]. Tranzycja guaniny na adeninę w pozycji 20210, opisywana skrótem PTM (*PTM* – ang. *prothrombin mutation*) powoduje wzrost stężenia protrombiny w surowicy krwi nawet do 20%, co wpływa na wzmożoną aktywność układu krzepnięcia i ryzyko zakrzepicy. Mutacja *PTM* powoduje stan umiarkowanej zakrzepicy poprzez aktywację kaskady krzepnięcia i tworzenie zakrzepów szczególnie w układzie żylnym [6, 7].

Polimorfizm 19911A>G zlokalizowany jest w ostatnim intronie M, który jest stosunkowo krótki o długości tylko 146 pz w porównaniu ze średnią wielkością ludzkich intronów która wynosi 1044 pz. Ten wariant genetyczny również odpowiada za zwiększone stężenie protrombiny. Allel typu dzikiego 19911A pozostaje w całkowitym sprzężeniu ze zmutowanym allelem 20210A. Natomiast obecność zmutowanego allela G w pozycji 19911 buduje motyw intronowy (triplet GGG), który jest wzmacniaczem splicingu. Odgrywa to ważną rolę przy przetwarzaniu grupy U2, do której należy intron M. Polimorfizm 19911A>G wpływa ponadto na efektywność splicingu i moduluje efekt działania polimorfizmu 20210G>A na stężenie powstającego mRNA i jego ekspresję [8]. Ponadto allel 19911G jest również częścią motywu CAGGG, jednego z dziesięciu znanych pentametrowych sekwencji, które umożliwiają określenie położenia krótkich intronów [8]. Istnieją doniesienia o zwiększeniu ryzyka zakrzepicy u nosicieli mutacji 19911A>G niezależnie od innych ewentualnie współistniejących genetycznych uwarunkowań prozakrzepowych [9, 10].

Wzrost stężenia protrombiny u nosicielek zmutowanych wariantów obydwu polimorfizmów 19911A>G oraz 20210G>A genu protrombiny może wpływać na aktywację płytek krwi, komórek mięśni gładkich, fibroblastów, komórek mezangialnych oraz makrofagów. Poprzez wpływ na adhezję komórek, proliferację mięśni gładkich i waskulogenezę zwiększone stężenie protrombiny może zaburzać prawidłowe funkcjonowanie łożyska i być przyczyną poronień nawracających.

Cel pracy

Celem pracy była ocena częstości występowania oraz znaczenia obecności polimorfizmów 20210G>A i 19911A>G genu protrombiny w grupie kobiet z dwoma lub więcej poronieniami w I trymestrze ciąży.

Magdalena Barlik, et al. Polimorfizmy 20210G>A i 19911A>G genu protrombiny a występowanie poronień nawracających.

Tabela I. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 20210G>A czynnika II w grupie badanej z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

F2 20210	Grupa badana (n=150)		Grupa kontrolna (n=180)		WR	95%PU	p
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)			
GG	146 (97,3)	97,4	178 (98,9)	98,9	0,41	0,07-2,27	ns
GA	4 (2,7)	2,6	2 (1,1)	1,1	2,44	0,44-13,50	ns
AA	0 (0,0)	0,0	0 (0,0)	0,0	—	—	—
Suma	150 (100,0)	100,0	180 (100,0)	100,0			
Allele							
G	296 (98,7)	—	358 (99,4)	—	0,41	0,08-2,27	ns
A	4 (1,3)	—	2 (0,6)	—	2,42	0,44-13,30	ns
Suma	300 (100,0)	—	360 (100,0)	—			

Tabela II. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 19911A>G czynnika II w grupie badanej z poronieniami oraz w grupie kontrolnej.

F2 19911	Grupa badana (n=150)		Grupa kontrolna (n=180)		WR	95%PU	p
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)			
AA	47 (31,3)	29,5	43 (23,9)	26,4	1,45	0,89-2,36	ns
AG	69 (46,0)	49,6	99 (55,0)	50,0	0,70	0,45-1,08	ns
GG	34 (22,7)	20,9	38 (21,1)	23,6	1,10	0,65-1,85	ns
Suma	150 (100,0)	100,0	180 (100,0)	100,0			
Allele							
A	163 (54,3)	—	185 (51,4)	—	1,13	0,83-1,53	ns
G	137 (45,7)	—	175 (48,6)	—	0,89	0,65-1,21	ns
Suma	300 (100,0)	—	360 (100,0)	—			

Tabela III. Częstość występowania poszczególnych haplotypów badanych polimorfizmów genu protrombiny oszacowana za pomocą programu PHASE (zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm 19911A>G, druga 20210G>A).

Haplotyp	Cała grupa (n=330)		Grupa badana (n=150)		Grupa kontrolna (n=180)	
	częstość wyst.	błąd standardowy	częstość wyst.	błąd standardowy	częstość wyst.	błąd standardowy
19911A/ 20210G	0,519082	0,001340	0,530400	0,001083	0,510342	0,002520
19911G/ 20210G	0,471827	0,001340	0,456267	0,001083	0,484102	0,002520
19911A /20210A	0,008190	0,001340	0,012934	0,001083	0,003547	0,002520
19911G/ 20210A	0,000901	0,001340	0,000400	0,001083	0,002009	0,002520

Materiał i metodyka

Grupę badaną stanowiło 150 kobiet zamieszkujących region Wielkopolski z wywiadem obciążonym dwoma lub więcej poronieniami w pierwszym trymestrze ciąży (średnia wieku 31,5±4,1 lat, zakres 21-45 lat, mediana 31 lat). Wiek ciążowy, w którym doszło do poronienia określany był na podstawie daty wystąpienia ostatniej miesiączki, analizy regularności cykli miesięczkowych oraz badań ultrasonograficznych. U wszystkich pacjentek wykluczono obecność przeciwciał antyfosfolipidowych oraz innych patologii położniczych, mogących mieć związek z występowaniem powikłań zakrzepowych i poronień.

Grupa kontrolna liczyła 180 zdrowych kobiet (średnia wieku 28,7±4,0 lat, zakres 19-41 lat, mediana 28 lat). W grupie tej co najmniej jedna ciąża zakończyła się urodzeniem zdrowego, donoszonego noworodka (średni tydzień zakończenia ciąży 39,1±1,20 tc, średnia masa noworodka 3472,2±411,97 g). Wykluczono kobiety z poronieniami w wywiadzie oraz innymi powikłaniami położniczymi, które mogą być uwarunkowane zmianami zakrzepowymi (stan przedrzucawkowy i rzucawka, wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu, poród przedwczesny, przedwczesne oddzielenie łożyska, zgon płodu). Wszystkie pacjentki z grupy badanej i kontrolnej należały do rasy kaukaskiej i były narodowości polskiej.

Częstość występowania polimorfizmów genu protrombiny badano z zastosowaniem reakcji PCR/RFLP (*polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism*). DNA z leukocytów krwi izolowano stosując zestaw QIAamp DNA Blond Mini Kit (QIAGEN Inc., Niemcy). Do amplifikacji fragmentów genu czynnika II zastosowano specyficzne oligonukleotydy. Uzyskane produkty reakcji PCR 345 pz dla polimorfizmu 20210G>A oraz 271 pz dla polimorfizmu 19911G>A genu *PTM* hydrolizowano enzymami restrykcyjnymi *HindIII* (Fermentas, Litwa) i *MnII* (Eurz, Polska). Wielkości otrzymanych fragmentów po reakcji restrykcyjnej hydrolizy były następujące: w przypadku polimorfizmu 20210G>A (GG 345 pz, GA 345, 322, 23 pz, AA 322, 23 pz) a dla polimorfizmu 19911G>A (GG 179, 92 pz, GA 179, 121, 92, 58 pz, AA 121, 92, 58 pz).

Analizę statystyczną wyników częstości występowania genotypów i polimorficznych alleli badanych genów uzyskanych w pracy zastosowano program statystyczny SPSS 14.0 PL dla Windows. Wartości oczekiwane i obserwowane były zgodne z prawem Hardy-Weinberga. Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotną. W celu oceny częstości występowania haplotypów polimorfizmów genu protrombiny zastosowano programy PHASE (wersja 2.1) oraz Haploview (wersja 4.2).

Wyniki

Analizując częstość występowania polimorfizmu 20210G>A w grupie kobiet z poronieniami stwierdzono przewagę występowania heterozygotycznego genotypu 20210GA (2,7 vs. 1,1% w grupie kontrolnej, WR=2,44, $p=0,26$) oraz przewagę występowania zmutowanego allela 20210A (1,3 vs. 0,6% w grupie kontrolnej, WR=2,42, $p=0,26$). W obu badanych grupach nie stwierdzono występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego AA. (Tabela I).

W zakresie polimorfizmu 19911A>G zaobserwowano podobną częstość występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego 19911GG (22,6 vs. 21,1% w grupie kontrolnej, WR=1,10, $p=0,41$). Również frekwencja zmutowanego allela

19911G była podobna w obydwu badanych grupach z poronieniami oraz kontrolnej (48,6% vs. 45,7%, WR=0,89, $p=0,24$). (Tabela II).

Ponadto wyznaczono obecność czterech haplotypów (19911A/20210G, 19911G/20210G, 19911A/20210A, 19911G/20210A) występujących u kobiet w obydwu badanych grupach. Odnotowano tendencję do częstszego występowania haplotypów zawierających zmutowany allel 20210A w grupie badanej (19911A/20210A 0,012934 vs. 0,003547 w grupie kontrolnej). Haplotyp zawierający obydwa zmutowane allele 19911G/20210A występował w obydwu grupach w bardzo niewielkiej częstości. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w częstości występowania poszczególnych haplotypów pomiędzy grupą kobiet badanych i grupą kontrolną. (Tabela III).

Dyskusja

Polimorfizm 20210G>A genu protrombiny

Uważa się, że ryzyko poronienia u nosicieli genotypu 20210GA wzrasta ponad dwukrotnie, a w przypadku późnych poronień nawet trzykrotnie [11]. Jednak w związku z tym, że częstość występowania polimorfizmu 20210G>A w populacji ogólnej jest relatywnie niska, jego wpływ na ryzyko występowania poronień nawracających pozostaje nadal dyskusyjny [12].

Carp i wsp. analizowali grupę 108 kobiet z trzema lub więcej poronieniami w wywiadzie oraz w grupie kontrolnej 82 zdrowych kobiet. Pacjentki należały do populacji izraelskiej. Częstość występowania genotypu 20210GA w grupie badanej wynosiła 4,6%, natomiast w grupie kontrolnej 6,1%. Badacze podzielili grupę badaną na dwie podgrupy – 70 kobiet z poronieniami w I trymestrze ciąży oraz 38 kobiet z poronieniami w I oraz II trymestrze. Zaobserwowano częstsze występowanie *PTM* u pacjentek z poronieniami w I oraz II trymestrze (7,9% vs. 2,86% w podgrupie z poronieniami tylko w I trymestrze ciąży) [13].

W analizie grupy 75 pacjentek z dwoma lub więcej poronieniami przed 12 tc. przeprowadzonej przez Pihusch i wsp. zaobserwowano występowanie genotypu 20210GA 6,7% vs. 0,8% w grupie kontrolnej (WR=8,53). Ponadto Autorzy tego badania zasugerowali, że mutacja *PTM* poprzez zwiększenie stężenia protrombiny powoduje wywołuje umiarkowany stan zakrzepowy, ale także poprzez wpływ na adhezję i proliferację komórek zaburza funkcjonowanie łożyska [14].

Związek *PTM* ze zwiększonym ryzykiem poronień w I trymestrze ciąży potwierdzają również wyniki badania Reznikoff-Etievian i wsp. U 20 pacjentek (7,6%) spośród 260 kobiet z obciążonym wywiadem w kierunku występowania poronień przed 10 t.c. stwierdzono występowanie polimorfizmu 20210G>A. W grupie kontrolnej odsetek ten wynosił tylko 2,9% [15].

Foka i wsp. analizowali częstość występowania *PTM* u 80 pacjentek z dwoma lub więcej poronieniami w wywiadzie, grupę kontrolną stanowiło 100 zdrowych kobiet. Badanie przeprowadzono wśród populacji greckiej. Odnotowano występowanie polimorfizmu 20210G>A u 7 (9%) pacjentek z grupy badanej i u 2 (2%) z grupy kontrolnej WR=4,7, $p=0,038$ [16].

W prezentowanej pracy zaobserwowano przewagę występowania genotypu heterozygotycznego GA w grupie 150 kobiet z poronieniami w I trymestrze ciąży 2,7% vs. 1,1% w grupie kontrolnej, przy wysokim współczynniku ryzyka WR=2,44 ($p=0,2$). Również częstość występowania zmutowanego allela 20210A była dwukrotnie większa w grupie badanej 1,3% vs. 0,6%

Magdalena Barlik, et al. Polimorfizmy 20210G>A i 19911A>G genu protrombiny a występowanie poronień nawracających.

w grupie kontrolnej. Wyniki te sugerują możliwy udział polimorfizmu 20210G>A w etiologii poronień nawracających w badanej grupie kobiet.

Polimorfizm 19911A>G genu protrombiny

W ostatnim czasie został opisany wpływ polimorfizmu 19911A>G na wzrost aktywności protrombiny w osoczu oraz wzrost ryzyka wystąpienia zakrzepicy wśród rasy kaukaskiej, chociaż okazuje się on być słabszy niż w przypadku polimorfizmu 20210G>A [6, 9].

Chinthammitr i wsp. w dużej grupie pacjentów wskazali na polimorfizm 19911A>G jako na niezależny czynnik ryzyka zakrzepicy oraz jednocześnie czynnik łagodnie podwyższający aktywność protrombiny [10]. Również Martinelli i wsp. wykazali na polimorfizm 19911A>G jako na niezależny czynnik ryzyka powstawania zakrzepicy żył głębokich (podwyższenie ryzyka wystąpienia zakrzepicy 1,5 raza). Natomiast dodatkowo przy obecności polimorfizmu 19911A>G oraz allela 20210A zaobserwowano 2-krotne podwyższenie ryzyka wystąpienia zakrzepicy [9]. Z kolei w następnej pracy ci sami autorzy wskazali na brak wpływu polimorfizmu 19911A>G na ryzyko wystąpienia zakrzepicy żylnych zatok mózgowych [17].

Perez-Ceballos i wsp. zasugerowali, że genotyp 19911AG zwiększa ryzyko zakrzepicy żył głębokich u nosicieli genotypu 20210GA [18]. To interesujące spostrzeżenie poparte jest wcześniejszym, sugerującym całkowite sprzężenie allela typu dzikiego 19911A ze zmutowanym allelem 20210A. Ponadto inne badania sugerują, że allel G jest związany z niewielkim wzrostem aktywności protrombiny, powoduje on podwyższenie poziomu protrombiny o 4 U/dL w stosunku do allela A, dlatego sam prawdopodobnie nie powoduje wzrostu ryzyka wystąpienia zakrzepicy (po wykluczeniu nosicieli, u których jednocześnie występuje allel 20210A) [19]. Pozostaje to w zgodzie z naszymi obserwacjami, gdzie w grupie badanej jednocześnie odnotowaliśmy wyższą częstość występowania zmutowanego allela 20210A oraz allela typu dzikiego 19911A. (Tabela I oraz II).

Wnioski

Analiza wyników wskazuje na możliwy wpływ zmutowanego allela 20210A oraz brak wpływu zmutowanego allela 19911G genu protrombiny na ryzyko występowania poronień nawracających w I trymestrze ciąży w badanej grupie kobiet.

Zgodnie z naszą wiedzą nie badano dotychczas związku polimorfizmu 19911A>G z występowaniem poronień nawracających. Jednocześnie należy podkreślić małą ilość badań dotyczących polimorfizmu 19911A>G genu protrombiny i jego wpływu na występowanie zmian zakrzepowych, jak również małą ilość analiz współwystępowania alleli obydwu badanych w pracy polimorfizmów genu protrombiny. W związku z tym niezbędne są dalsze badania w większej liczbie grupie kobiet z poronieniami nawracającymi oraz uwzględniające jednocześnie inne polimorfizmy warunkujące trombofilie oraz wpływ czynników środowiskowych [20].

Oświadczenie autorów:

1. Lek. med. Magdalena Barlik – opracowanie metodyki, protokołu analizy i interpretacji danych – autor zgłaszający – odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Prof. dr hab. n. med. Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz – opracowanie koncepcji i założeń badania.
3. Witold Kraśnik – gromadzenie danych klinicznych pacjentek, dobór piśmiennictwa.
4. Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Drews – opracowanie koncepcji i założeń badania.

Źródło finansowania: badania statutowe Kliniki Perinatologii i Chorób Kobietych UM Poznań – nr: 202-01-02218344-0003344.

Piśmiennictwo

1. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego w zakresie wybranych patologii wczesnej ciąży oraz postępowania w ciąży po zapłodnieniu in vitro. *Ginekol Dopl.* Wydanie specjalne. Luty 2008, 208-212.
2. Pinjala R, Reddy L, Nihar R, [et al.]. Thrombophilia - how far and how much to investigate? *Indian J Surg.* 2012, 74, 157-162.
3. Skrzypczak J, Rajewski M, Wirstlein P, [et al.]. Incidence of hereditary thrombophilia in women with pregnancy loss in multicenter studies in Poland. *Ginekol Pol.* 2012, 83, 330-336.
4. Miranda-Vilela A. Role of polymorphisms in factor V (FV Leiden), prothrombin, plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and cystathionine β-synthase (CBS) genes as risk factors for thrombophilias. *Mini Rev Med Chem.* 2012, 12, 997-1006.
5. Filipcikova R, Brezinova J, Oborna I, [et al.]. The occurrence of genetic thrombophilic markers in patients evaluated for infertility. *Ceska Gynecol.* 2013, 78, 73-77.
6. Castoldi E, Simioni P, Tormene D, [et al.]. Differential effects of high prothrombin levels on thrombin generation depending on the cause of the hyperprothrombinemia. *J Thromb Haemost.* 2007, 5, 971-979.
7. Ślęzak R, Łączmański Ł, Karpiński P, [et al.]. The role of 1691G>A (Leiden) mutation in factor V gene, 20210G>A in prothrombin gene and 677C>T in MTHFR gene in etiology of early pregnancy loss. *Ginekol Pol* 2011, 82, 446-450.
8. von Ahnen N, Oellerich M. The intronic prothrombin 19911A>G polymorphism influences splicing efficiency and modulates effects of the 20210G>A polymorphism on mRNA amount and expression in a stable reporter gene assay system. *Blood.* 2004, 103, 586-593.
9. Martinelli I, Battaglioli T, Tosoletto A, [et al.]. Prothrombin A19911G polymorphism and the risk of venous thromboembolism. *J Thromb Haemost.* 2006, 4, 2582-2586.
10. Chinthammitr Y, Vos H, Rosendaal F, [et al.]. The association of prothrombin A19911G polymorphism with plasma prothrombin activity and venous thrombosis: results of the MEGA study, a large population-based case-control study. *J Thromb Haemost.* 2006, 4, 2587-2592.
11. Brenner B. Hypercoagulability and recurrent miscarriages. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2010, 8, 467-469.
12. Carp H. Thrombophilia and recurrent pregnancy loss. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2006, 33, 429-442.
13. Carp H, Salomon O, Seidman D, [et al.]. Prevalence of genetic markers for thrombophilia in recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod.* 2002, 17, 1633-1637.
14. Plihusch R, Buchholz T, Lohse P, [et al.]. Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: prothrombin increases the risk in the first trimester. *Am J Reprod Immunol.* 2001, 46, 124-131.
15. Reznikoff-Etiévant M, Cayol V, Carbone B, [et al.]. Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations are risk factors for very early recurrent miscarriage. *BJOG.* 2001, 108, 1251-1254.
16. Foka Z, Lambropoulos A, Saravelos H, [et al.]. Factor V Leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod.* 2000, 15, 458-462.
17. Martinelli I, Bucciarelli P, De Stefano V, [et al.]. Effect of prothrombin 19911 A>G polymorphism on the risk of cerebral sinus-venous thrombosis. *Eur J Neurol.* 2010, 17, 1482-1485.
18. Pérez-Ceballos E, Corral J, Alberca I, [et al.]. Prothrombin A19911G and G20210A polymorphisms' role in thrombosis. *Br J Haematol.* 2002, 118, 610-614.
19. Ceelie H, Bertina R, Hylckama-Vlieg A, [et al.]. Polymorphisms in the prothrombin gene and their association with plasma prothrombin levels. *Thromb Haemost.* 2001, 85, 1066-1070.
20. Bradley L, Palomaki G, Bienstock J, [et al.]. Can Factor V Leiden and prothrombin G20210A testing in women with recurrent pregnancy loss result in improved pregnancy outcomes?: Results from a targeted evidence-based review. *Genet Med.* 2012, 14, 39-50.