

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Výskyt polymorfismů v genu *MTHFR* a jejich  
možná asociace se sterilitou a problematikou  
opakovaných spontánních potratů v české  
populaci**

Diplomová práce

**Bc. Markéta Stráská**

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

České Budějovice 2018

Stráská M., 2018: Výskyt polymorfismů v genu *MTHFR* a jejich možná asociace se sterilitou a problematikou opakovaných spontánních potratů v české populaci [Prevalence of the *MTHFR* gene polymorphisms and their possible association with infertility and recurrent pregnancy losses in the Czech population, Mgr. Thesis, in Czech] – p. 92, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The thesis analyses the pairs that have not been able to conceive, or they have been diagnosed with sterility and they undergo an assisted reproductive technology as a possible treatment, or they have suffered from the recurrent pregnancy loss. The data for the second part of this study were gathered from 2014 to 2018 and have been provided by genetic laboratory GENLABS from České Budějovice. This part tries to statistically express prevalence of the two most studied *MTHFR* gene polymorphisms among Czech.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 18. 04. 2018

.....  
Bc. Markéta Stráská

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda ze srdce poděkovala své školitelce Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D. nejen za odborné vedení, cenné rady, čas, dohled, ale také za financování této práce a zpřístupnění laboratoře. Další poděkování patří IVF Centru prof. Zacha Plzeň za poskytnutí pacientů a také všem účastníkům studie, kteří se uvolili a stali se její součástí. Nadále také děkuji garantovi mé práce doc. Mgr. Tomášovi Doležalovi, Ph.D., který mi umožnil spolupracovat s externím školitelem, a Mgr. Janovi Riegertovi, Ph.D. za pomoc se statistickým zpracováním dat.

V žádném případě nesmím opomenout mé jedinečné rodiče, přítele s dcerkou a ostatní členy rodiny, protože právě oni mne po celou dobu studia bezmezně podporovali a dodávali tak potřebnou sílu a motivaci v časech největší beznaděje. Děkuji!

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>2</b>
2.1	Homocystein .....	2
2.1.1	Metabolismus homocysteinu .....	2
2.1.2	Kyselina listová a foláty .....	5
2.1.3	Poruchy metabolismu homocysteinu .....	9
2.2	Methylentetrahydrofolát reduktáza .....	10
2.2.1	Polymorfismy v genu pro MTHFR .....	11
2.3	Poruchy plodnosti a sterilita .....	13
2.3.1	Klasifikace sterility .....	14
2.3.2	Rizikové faktory .....	14
2.3.3	Příčiny sterility .....	14
2.3.4	Asistovaná reprodukce .....	15
2.4	Opakované spontánní potraty .....	16
2.4.1	Rizikové faktory .....	17
<b>3</b>	<b>VYMEZENÍ CÍLŮ</b> .....	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>DESIGN EXPERIMENTŮ</b> .....	<b>19</b>
4.1	Polymorfismy v genu <i>MTHFR</i> v rámci výzkumné skupiny párů a jejich asociace s RPL a sterilitou.....	19
4.1.1	Charakteristika výzkumné skupiny .....	19
4.1.2	Dotazníkové šetření .....	22
4.1.3	Odběr a zpracování materiálu.....	23
4.1.4	Analýza dat .....	25
4.1.5	Statistické zpracování dat .....	32
4.2	Výskyt polymorfismů v genu <i>MTHFR</i> v rámci kontrolní skupiny.....	33
4.2.1	Odběr a zpracování materiálu.....	34
4.2.2	Charakteristika zkoumané populace .....	36
4.2.3	Analýza dat .....	36
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>40</b>
5.1	Polymorfismy v genu <i>MTHFR</i> v rámci výzkumné skupiny párů a jejich asociace s RPL a sterilitou.....	40
5.1.1	Zhodnocení dotazníkového šetření .....	40
5.1.2	Výsledky analýzy dat a jejich statistického zpracování .....	44
5.1.3	Výskyt genotypů polymorfismů <i>MTHFR</i> .....	46

5.1.4	Korelační vztahy s jednotlivými faktory .....	49
5.2	Výskyt polymorfismů v genu <i>MTHFR</i> v rámci kontrolní skupiny.....	50
5.2.1	Výsledky analýzy dat.....	50
5.2.2	Výskyt genotypů polymorfismů <i>MTHFR</i> .....	51
5.3	Porovnání výzkumné a kontrolní skupiny .....	53
<b>6</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>56</b>
6.1	Polymorfismy v genu <i>MTHFR</i> v rámci výzkumné skupiny párů a jejich asociace s RPL a sterilitou.....	56
6.2	Výskyt polymorfismů v genu <i>MTHFR</i> v rámci kontrolní skupiny.....	63
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>67</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>74</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>76</b>
<b>11</b>	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>78</b>
<b>12</b>	<b>PŘÍLOHA .....</b>	<b>79</b>

# 1 ÚVOD

Problematiky lidské neplodnosti a ztrátovosti plodů jsou v dnešní době celosvětovými problémy. A ačkoliv se stále více a více párů, kterým se nedaří otěhotnět, uchyluje k technikám asistované reprodukce, ani ty nemusejí být zárukou úspěchu, pokud dává vznik komplikacím spojení genetických informací matky a otce v genech, které nejsou primárně v této souvislosti zkoumány. To se může projevit na životaschopnosti vzniklého embrya.

Souvislost polymorfismů v enzymu methylenetrahydrofolát reduktáza (MTHFR) s touto problematikou je kontroverzním tématem. Ačkoliv je studií zkoumající výskyt těchto polymorfismů buďto u žen či u mužů nepřeberné množství, existuje pouze pár studií zkoumajících takové jedince jako celek, tj. jako páry, které společně dávají vzniknout novému jedinci. A vzhledem k vysoké míře výskytu 2 nejznámějších a nejstudovanějších polymorfismů C677T a A1298C, je velmi pravděpodobné, že výsledný kombinovaný genotyp potomka s sebou může přinášet jistá znevýhodnění.

Literární přehled je průřezem dané problematiky, který začíná přehledem o homocysteinu a folátech, jejichž metabolismus je klíčový pro pochopení úlohy enzymu MTHFR ve studované problematice, která je zde taktéž rozebrána v obecné rovině.

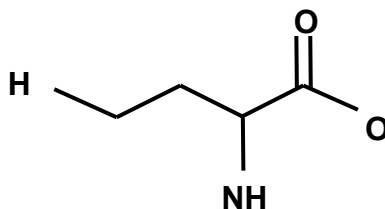
Cílem experimentální části práce je otestovat páry, kterým se nedaří otěhotnět či u nich došlo k opakovaným spontánním potratům, na *cis/trans* konfiguraci 2 nejběžnějších polymorfismů v enzymu MTHFR (C677T a A1298C) metodou PCR-RFLP a statisticky zhodnotit frekvence těchto polymorfismů v porovnání s nashromážděnými údaji genetické laboratoře GENLABS pro jedince z české populace.

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 HOMOCYSTEIN

Homocystein (Hcy; 2-amino-4-thiomásečná kyselina) byl poprvé popsán v roce 1932 (Butz & Du Vigneaud). Jedná se o neesenciální sirtou aminokyselinu, která vzniká jako meziproduct metabolické přeměny esenciální aminokyseliny methionin (Met), kterou organismus získává z potravy, na neesenciální cystein (Cys).

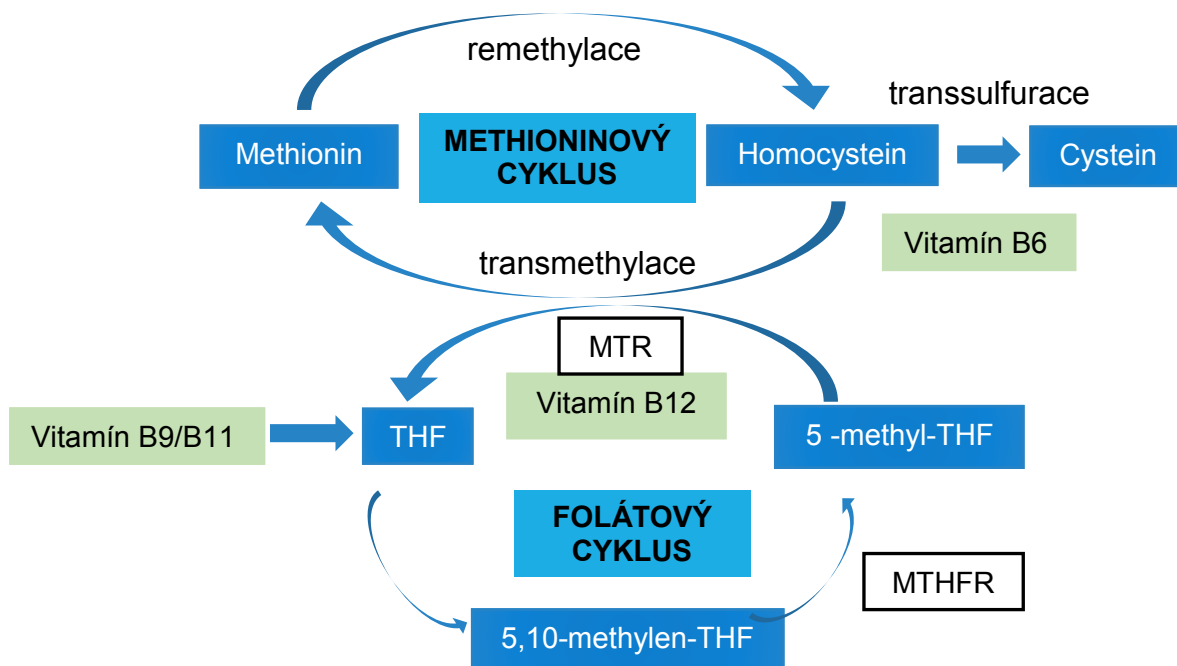
Hcy (Obr. 2.1) je mnohdy označován za „toxickou aminokyselinu“, přičemž jeho toxicitu způsobuje vodíkový atom ze sulfanylové skupiny (-SH), který může až agresivně reagovat s jinými molekulami. K tomuto jevu dochází, je-li Hcy přítomen ve zvýšeném množství (podrobněji popsáno níže). I přes své nepříznivé účinky při zvýšené koncentraci je Hcy klíčovou látkou lidského metabolismu.



Obr. 2.1: Chemická struktura homocysteinu.

#### 2.1.1 METABOLISMUS HOMOCYSTEINU

K syntéze homocysteinu dochází v lidském organismu transmethyací Met (Obr. 2.2). K degradaci Hcy dochází buďto transsulfurací na cystein, anebo je v remethylační dráze přeměněn zpět na Met (Škovierová et al., 2016).



**Obr. 2.2: Zjednodušené schéma metabolismu homocysteinu.** Bíle jsou znázorněny enzymy účastníci se jednotlivých reakcí, zeleně pak důležité kofaktory. K syntéze Hcy dochází v methioninovém cyklu transmetylací Met za pomoci MTR. Vzniklý Hcy je následně odbourán buďto transsulfurací na cystein, anebo remethylací zpět na Met za přispění folátového cyklu. Toho se účastní enzym MTHFR jakožto katalyzátor konverze 5,10-methylen-tetrahydrofolátu na 5-methyltetrahydrofolát (zpracováno dle Pokorný & Minárik, 2013).

## RE METHYLACE

Remethylační dráha zahrnuje dva navzájem propojené cykly (podrobně Obr. 2.3), jež se podílejí na přenosu methylových skupin, které s sebou přinášejí foláty z vnějšího prostředí (Erben, 2016).

## METHIONINOVÝ CYKLUS

Při remethylaci se Hcy mění zpět na Met, a to za účasti enzymů 5-methyltetrahydrofolát-homocystein-S-methyltransferáza (methioninsyntáza, MTR), anebo betain-homocystein-methyltransferáza (BHMT), jehož aktivita je omezena výhradně na jaterní tkáň (Medina et al., 2001).

Enzym MTR, jehož gen se nachází na pozici 1q43, ke své funkci potřebuje jako kofaktor vitamín B12 (kobalamin), díky němuž katalyzuje přenos methylové skupiny z 5-methyltetrahydrofolát (methyl-THF) na Hcy. Tento krok je posledním krokem v methioninovém cyklu a je to bod, díky kterému se tento cyklus propojuje s folátovým cyklem (Medina et al., 2001). Naproti tomu enzym BHMT, jež se účastní alternativní přeměny Hcy na Met v játrech, není na folátech a vitamínu B12 závislý. Přenos methylové skupiny je



zajištěn z betainu, který v organismu vzniká oxidací cholinu a lecithinu. Ty lze získat přísunem z potravy (Erben, 2016).

Vzniklý methionin, ať už vzniká kteroukoliv cestou, může být dále začleněn do peptidů anebo přeměněn na S-adenosylmethionin (SAM) za pomoci methioninadenosyltransferázy (MAT), která přenáší adenosylovou skupinu z ATP (adenosintrifosfát) na atom síry v molekule Met. SAM se jako univerzální donor methyly účastní mnohých methylačních reakcí, díky čemuž hraje klíčovou roli v buněčných procesech. V průběhu těchto reakcí se pak ze SAM odštěpí methylová skupina, která se následně podílí na tvorbě S-adenosylhomocystein (SAH). SAH je v konečné fázi reverzibilně hydrolyzován na Hcy (Forges et al., 2007).

### **FOLÁTOVÝ CYKLUS**

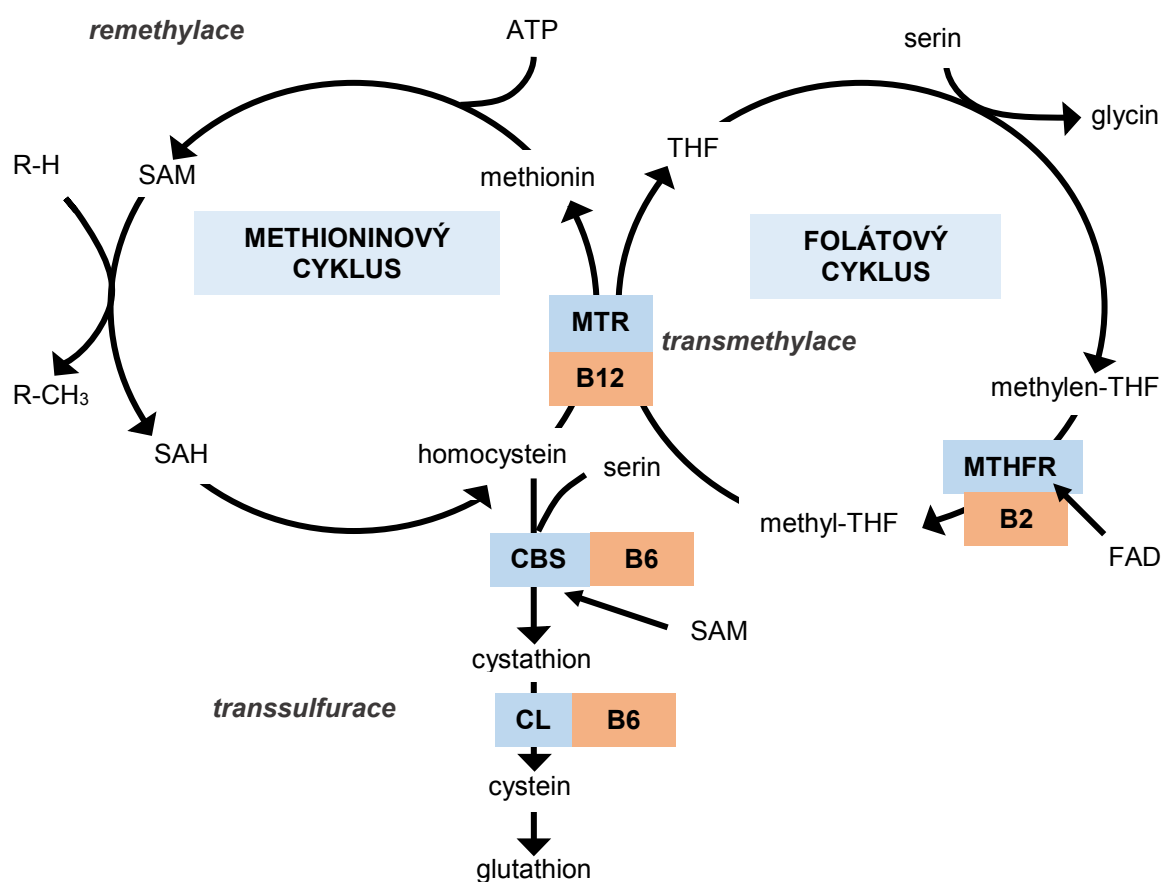
Folát vstupuje do buněk pomocí folátových receptorů, kde ho dihydrofolát reduktáza (DHFR) redukuje na tetrahydrofolát (THF) - aktivní formu kyseliny listové. Jeho hlavní funkcí je vázat jednonuhlíkaté zbytky a poskytovat je pro běh dalších reakcí.

Enzym MTHFR se celého procesu účastní jakožto katalyzátor konverze 5,10-methylentetrahydrofolátu (metylen-THF) na 5-methyltetrahydrofolát (methyl-THF; metafolin), který je potřebný pro remethylaci Hcy na Met, čímž poskytuje esenciální methylovou skupinu pro mnohé biologické procesy.

### **TRANSSULFURACE**

Transulfurační dráha se uplatňuje zejména při zvýšených nárocích na syntézu cysteinu, anebo při překročení remethylační kapacity ve folátovém cyklu a probíhá výhradně v buňkách jaterních, ledvinových, střevních a pankreatických (Pokorný & Minárik, 2013).

Prvním krokem této ireverzibilní dráhy je reakce katalyzovaná enzymem cystathionin  $\beta$ -syntáza (CBS), který zprostředkovává kondenzaci Hcy se serinem, čímž vzniká cystathionin. Ten je v dalším kroku za účasti cystathioninlyázy (CL) deaminován na cystein a  $\alpha$ -ketoglutarát. Oba tyto kroky vyžadují přítomnost kofaktoru pyridoxal-5-fosfát, který je aktivní formou vitamínu B<sub>6</sub> (Medina et al., 2001; Forges et al., 2007). Vzniklý cystein může dále sloužit jako stavební jednotka proteinů (Přistoupilová et al., 1999) anebo je při nadbytku oxidován na taurin a anorganické sírany (Medina et al., 2001).



**Obr. 2.3: Metabolismus homocysteinu.** V methioninovém cyklu (vlevo) katalyzuje enzym 5-methyltetrahydrofolát-homocystein-S-methyltransferáza (MTR, v světle modrém rámečku), který ke své funkci potřebuje kofaktor vitamín B12 (kobalamin, ve světle oranžovém rámečku), přenos methylové skupiny z methyl-tetrahydrofolátu (methyl-THF) na homocystein (Hcy) za vzniku THF a methioninu. Aktivace methioninu pomocí ATP (adenosintrifosfát) dává vzniknout A-adenosylmethioninu (SAM), univerzálnímu dárci methylové skupiny. Poté se ze SAM odštěpí methylová skupina, která se podílí na tvorbě S-adenosylhomocystein (SAH). Obnova Hcy SAH hydrolázou uzavírá tento cyklus, na který navazuje cyklus folátový (vpravo), ve kterém volný THF přijímá jednouhlíkatý zbytek ze serinu, čímž vzniká methylen-THF a glycín. Methyl-THF vzniká redukcí methylen-THF díky FAD-dependentní methyltetrahydrofolát reduktáze (MTHFR) a jejímu kofaktoru vitamínu B2. Na tyto cykly navazuje transsulfurační dráha. Prvním krokem této ireverzibilní dráhy je reakce katalyzovaná enzymem cystathionin β-syntáza (CBS), který pro svou aktivaci potřebuje SAM, a jeho kofaktorem vitamínem B6 (ve světle oranžovém rámečku), kdy jeho zásluhou dochází ke kondenzaci Hcy se serinem, čímž vzniká cystathionin. Ten je v dalším kroku za účasti cystathioninylázy (CL) a opět kofaktorem ve formě vitamínu B6 deaminován na cystein a α-ketoglutarát. Cystein je limitním prekurzorem pro syntézu glutathionu (vlastní zpracování).

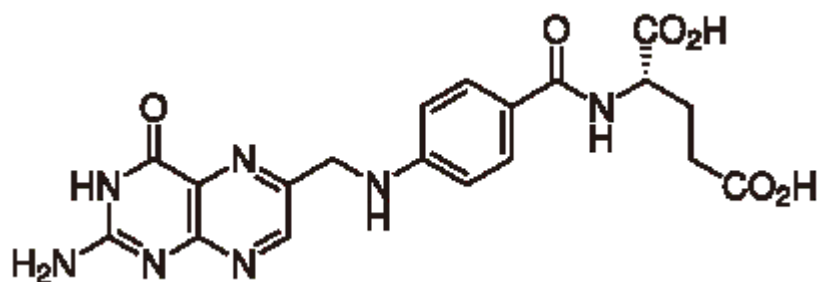
### 2.1.2 KYSELINA LISTOVÁ A FOLÁTY

Pro správný běh metabolismu Hcy jsou potřebné některé vitamíny ze skupiny B, které slouží jako kofaktory účastnících se enzymům. Patří mezi ně pyridoxalfosfát (vitamín B6), který je

důležitý pro transsulfuraci, kobalamin (vitamín B12), který se společně s enzymem MTR podílí na přeměně Hcy na Met, riboflavin (vitamín B2) a kyselina listová (vitamín B9) důležité pro remethylaci.

Kyselina listová (Obr. 2.4) je ve vodě rozpustná kyselina ve formě žluto-oranžového krystalického prášku, bez chuti a zápachu (Stránský, 2005), která sama o sobě nemá žádné biologické účinky. Biologicky aktivní jsou pouze její metabolity vznikající v játrech. Kyselinu listovou a její metabolity souhrnně nazýváme foláty (Koucký, 2011). Pod tímto pojmem se skrývá více než 100 vitamínových derivátů pteroylmonoglutamové kyseliny (Stránský, 2005).

Mezi nejvýznamnější biologicky aktivní derivát kys. listové patří methyl-THF - metafolin (Koucký, 2011), který je důležitou součástí folátového cyklu (viz 2.1.1, str. 2). Foláty jsou také důležitou komponentou metabolismu bílkovin, a kromě jiného je esenciální pro růst buněk, jejich dělení a diferenciaci (Stránský, 2005).



**Obr. 2.4: Chemická struktura kyseliny listové.** Převzato z [upload.wikimedia.org](http://upload.wikimedia.org)<sup>1</sup>.

## FORMY

V přírodě se foláty vyskytují v redukované formě (polyglutamyl). Jednouhlíkaté fragmenty [methyl (-CH<sub>3</sub>), methylen (-CH<sub>2</sub>-), formyl (-CHO) či formimino (-CH=NH)] jsou vázány k N5, N10 či k oběma pozicím na struktuře THF. Kys. listová (PGA, pteroylmonoglutamová kyselina; pteroylglutamic acid) je oxidovanou formou, která se jen zřídka vyskytuje v přírodě. Tato forma je chemicky velice stabilní, a kromě toho, že je její výroba nízkonákladová, je také jako folát přítomný ve stravě redukovatelná na THF, tudíž je přidávána do fortifikovaných jídel a vyskytuje se také v doplňcích stravy (Ebara, 2017; Ohrvik & Witthoft, 2011). Stále častěji je ale její použití přehodnocováno.

*Vzhledem k různé využitelnosti mono- a polyglutamátů byl zaveden pojem ekvivalent kyseliny listové: 1 μg ekvivalentu folátu = 1 μg folátu v potravíně = 0,5 μg syntetické kyseliny*

---

<sup>1</sup> [staženo 2018-03-04]. Dostupné na [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/cf/Folic\\_acid.svg/420px-Folic\\_acid.svg.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/cf/Folic_acid.svg/420px-Folic_acid.svg.png)

*listové (PGA). Při výpočtu příjmu ekvivalentu folátu z obohacených potravin, resp. z potravinových doplňků je používán následující vzorec:  $\mu\text{g}$  ekvivalentu folátu =  $\mu\text{g}$  folátu v potravině +  $(1,7 \times \mu\text{g}$  syntetické kyseliny listové) (...), (Stránský, 2005).*

V České republice je dle Stránského (2005) denní dávka kys. listové vypočítaná z výše uvedeného vzorce na 400  $\mu\text{g}$  ekvivalentu folátu denně pro dospělé a děti od 10 let, pro těhotné se tento příjem navyšuje o 200  $\mu\text{g}$ . Dle článku z roku 2015 uveřejněném na webových stránkách české Společnosti pro výživu je doporučena denní dávka následující – pro dospělé 200  $\mu\text{g}/\text{den}$  a pro děti 300-400  $\mu\text{g}/\text{den}$ <sup>2</sup>. Ve článku ale není uvedeno, jakým způsobem byly tyto hodnoty získány.

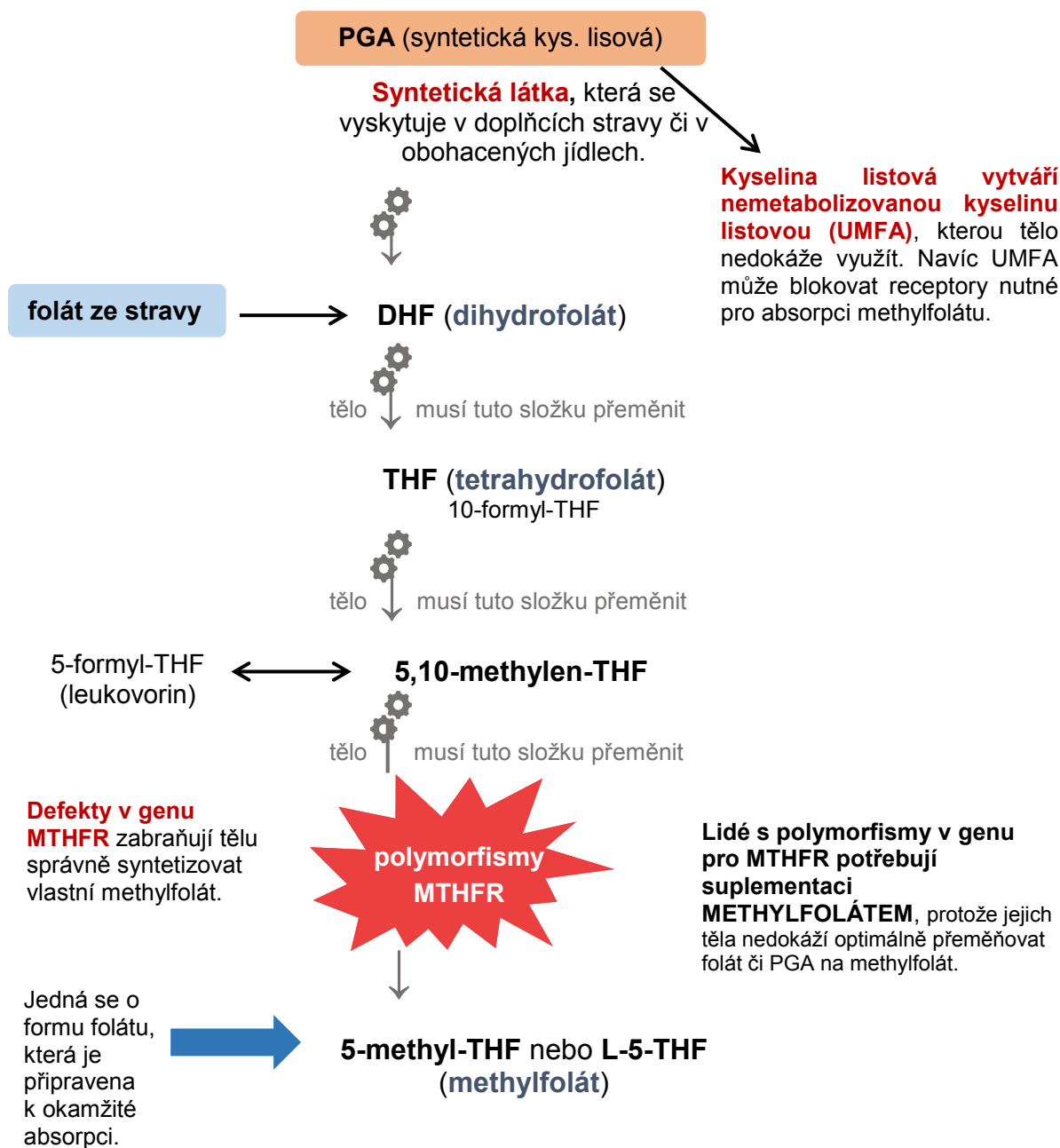
### **UMFA**

Je-li denní příjem vyšší než 400  $\mu\text{g}$ , může se do krevního oběhu dostávat nemetabolizovaná kys. listová (UMFA), (Kelly et al., 1997), což je, jak se zdá, velkým problémem. Některé studie indikují, že chronicky zvýšené hladiny UMFA mohou negativně ovlivňovat lidské zdraví, například v souvislosti s výskytem rakoviny. Figueiredo et al. (2009) ve své práci zjistili, že suplementace 1 mg PGA souvisí se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny prostaty u norských mužů (Ebbing et al., 2009). Meta-analýza z roku 2013 (Vollset et al.) ale neukázala žádný signifikantní vliv (ať už pozitivní či negativní) suplementace PGA na prvních 5 let léčby rakoviny.

V lidském těle UMFA vzniká při nadbytečném příjmu PGA (Obr. 2.5). Dnes jsou již v dostání suplementy ve formě methyl-THF (methylfolát), které jsou fundamentální především pro jedince s polymorfismy v enzymu MTHFR.

---

<sup>2</sup> Kyselina listová. Společnost pro výživu © 2018. Publikováno 3.4.2015. [cit. 2018-02-26]. Dostupné z: <http://www.vyzivaspol.cz/kyselina-listova/>



**Obr. 2.5: Proces přeměny kyseliny listové a folátů v lidském těle.** Člověk přijímá folát ze stravy ve formě polyglutamylu. Syntetická kyselina listová (PGA) ve formě pteroylmonoglutamové kys. je přijímána v doplňcích stravy či prostřednictvím fortifikovaných jídel. Při zvýšených hladinách příjmu PGA nemusí být lidské tělo schopné všechnu PGA přeměnit na DHF (dihydrofolát), čímž může docházet k ukládání nemetabolizované kys. listové (UMFA). DHF je přeměněn na tetrahydrofolát (THF), který se mění na methylen-THF. Vyskytuje-li se defekt v polymorfismu MTHFR, lidské tělo není schopné optimálně přeměňovat methylen-THF na methyl-THF (methylfolát), který je připraven k okamžité absorpci (zpracováno dle <https://methyl-life.com/addressing-mthfr/>).

## ÚČINKY NA GRAVIDITU

Je již zaběhnutým pravidlem, všem ženám plánujícím těhotenstvím či ženám již v očekávání bývá doporučena vitamínová prevence. Její nesporný kladný vliv na výskyt defektů neurální trubice (NTD) při konzumaci je dnes již celosvětově známý (Yan et al., 2012; Yang et al., 2015). V posledních letech se také objevují meta-analýzy zkoumající jej vliv s různými defekty například se *spina bifida* (rozštěp páteře), kdy je patrně zvýšená incidence v zemích, kde není suplementace folátem upravována zákonem (Atta et al., 2016). Nadále výsledky další rozsáhlé meta-analýzy z roku 2015 ukázaly, že snížení rizika narození dítěte s poruchou intrauterinního růstu (intrauterinní růstová retardace, SGA), která vede ke snížené porodní hmotnosti a/nebo porodní délce, úzce souvisí se suplementací foláty. Překvapivým závěrem je však fakt, že toto riziko se snižuje pouze u prekoncepční suplementace (Hodgetts et al., 2015). Podle studie z roku 2014 (Murto et al.) je dokonce suplementace po IVF nevýznamná a žádným způsobem těhotenství pozitivně neovlivňuje. Objevují se dokonce názory, že suplementace po 12. týdnu těhotenství, do kterého se doporučuje zvýšený příjem folátů vzhledem k NTD, může souviset s možným rozvojem dětských alergií (Kiefte-de Jong et al., 2012). Ty pravděpodobně v této souvislosti vznikají kvůli schopnosti kys. listové chovat se jako dárce methyly, díky čemuž může docházet k modifikacím exprese genů souvisejících s jejich rozvojem (McStay et al., 2017). Dunstan et al. (2012) dokonce zjistili, že příjem vyšší než 500 µg/den je asociován s mnohem větším rizikem (až 85 %) vzniku alergie v porovnání s příjmem 200 µg/den. Naopak snížený příjem folátů v průběhu prvních měsíců těhotenství se může na úrovni DNA methylace negativně podepsat na emočních problémech dětí (Devlin et al., 2010).

### 2.1.3 PORUCHY METABOLISMU HOMOCYSTEINU

V krevní plazmě se Hcy vyskytuje ve formě oxidované a redukované. Z celkového množství homocysteinu tvoří ta redukovaná, jež s sebou nese volnou sulfanylovou skupinu, pouze 1 % (Jacobsen, 1998). Většina Hcy je během několika minut až hodin oxidována (Chambers et al., 2001; Medina et al., 2001). A právě sumu redukovaných a oxidovaných forem homocysteinu nacházejících se v krevní plazmě souhrnně označujeme jako hladinu celkového homocysteinu (tHcy). Ta nabývá různých hodnot (optimálně 5–16 µmol/l; Medina et al., 2001) v závislosti na pohlaví a věku, s jehož nárůstem se postupně zvyšuje i koncentrace tHcy, následně na demografii, genetických a fyziologických faktorech, stravě, chorobách a v neposlední řadě také na medikaci (Medina & Amores-Sánchez, 2000). Patologický jev vyznačující se

zvýšeným ukládáním Hcy v plazmě označujeme jako hyperhomocysteinémii (hHcy), (Rosenzweig & Watkins, 1991).

Nejčastější příčinou hHcy jsou dysfunkce v metabolismu Hcy, mezi které řadíme i výskyt polymorfismů v genu pro enzym MTHFR, (Frosst et al., 1995; van der Put et al., 1998).

**Tab. I: Rozmezí koncentrací tHcy (μmol/l) pro jednotlivé stupně hyperhomocsteinémie (údaje převzaty z Medina et al., 2001)**

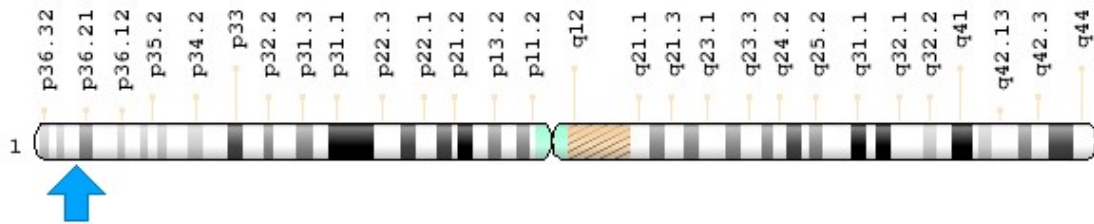
STUPEŇ HYPERHOMOCYSTEINÉMIE	KONCENTRACE tHcy (μmol/l)
mírná	15–30
středně těžká	30–100
těžká	> 100

Mezi další z možných poruch metabolismu Hcy řadíme homocystinurii. Jedná se o poruchu aktivitu enzymu CBS, který se podílí na transsulfuraci. Tato choroba byla poprvé objevena v roce 1962 u mentálně retardovaných jedinců, kteří byli vyšetřováni na výskyt abnormálních močových kyselin, a je charakterizována zvýšenou hladinou Hcy a Met v plasmě, a naopak sníženou hladinou cysteinu. Klinická manifestace zahrnuje mentální retardaci, oboustrannou dislokaci čočky (*ectopia lentis*) či kosterní abnormality (Mudd et al., 1985).

## 2.2 METHYLENTETRAHYDROFOLÁT REDUKTÁZA

Methylentetrahydrofolát reduktáza (MTHFR) je flavoprotein, jehož enzymatické vlastnosti byly poprvé popsány v roce 1971 (Kutzbach & Stokstad). Jedná se o protein se dvěma doménami – katalytickou na N-konci, která váže flavinadenindinukleotid (FAD), nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) a methylen-THF, a regulační na C-konci, jež váže SAM (Matthews et al., 1998). Tento cytoplazmatický enzym se účastní cyklu kyseliny listové v přímé závislosti na metabolismu Hcy (viz kapitola 2.1.1, str. 2).

Gen kódující enzym MTHFR je lokalizován na chromozomu 1 v oblasti 36.22 (Obr. 2.6). V minulosti se Goyette et al. (1998) domnívali, že se skládá se z 11 exonů. Později byly ale identifikovány variabilní 5' a 3' netranslatované oblasti a sestřihové varianty, které dávají vzniknout izoformám dlouhým 7,5 – 9,5 kb a proteinům o velikosti 70–77 kDa (Tran et al., 2002). Dnes se popisuje velká izoforma, která se skládá z 12 exonů. Exon 1 je nekódujícím exonem, tudíž vzniká protein o velikosti 656 aminokyselin a 74.6 kDa (Froese et al., 2016).



**Obr. 2.6: Lokalizace genu *MTHFR*** – 1p36.22, tj. na krátkém raménku (p) chromozomu 1 na pozici 36.22 (*Homo sapiens* Annotation Release 108, GRCh38.p7, Genome Decoration Page/NCBI).

## 2.2.1 POLYMORFISMY V GENU PRO *MTHFR*

V roce 2015 stanovili Burda et al. počet polymorfismů na více než 70, v roce 2016 se jejich počet vyšplhal na 109 (Froese et al., 2016). Z těchto objevených SNP (jednonukleotidových polymorfismů) se stále nejvíce ví o polymorfismech C677T a A1298C. Ty také bývají středem zájmu v souvislosti s různorodými chorobami.

### POLYMORFISMUS C677T

Polymorfismus C677T je nejznámějším a nejrozšířenějším polymorfismem. Nachází se v oblasti kódující katalytickou doménu enzymu *MTHFR* v exonu 5, kde způsobuje záměnu C za T na pozici 677. Výsledkem této záměny je substituce alaninu za valin (p.Ala222Val), což zapříčiňuje vznik termolabilní varianty enzymu *MTHFR* se sníženou enzymatickou aktivitou (Frosst et al., 1995). V porovnání s normální variantou 677CC pracuje tento enzym u variantního homozygota 677TT pouze z 30 %, u heterozygota 677CT pak zhruba z 60 % (Frosst et al., 1995; Weisberg et al., 2001). Aby nedocházelo k ukládání Hcy, je potřeba u jedinců se sníženou aktivitou *MTHFR* zvýšená suplementace folátem (Jacques et al., 1996).

Prevalence této formy se liší v závislosti na etniku a lokalizaci. V evropské populaci se výskyt průměrně udává následujícím způsobem - až 45 % homozygotů bez variantní alely (677CC), až 43 % heterozygotů (677CT) a až 12 % homozygotů s 2 variantními alelami (677TT), (Prinz-Langenohl et al., 2009).

### *MTHFR* C677T A CHOROBY

Polymorfismus C677T bývá skloňován v souvislosti s mnohými chorobami, ať už byl jeho vliv na výskyt daného onemocnění prokázán či naopak. Zřejmě nesporný je jeho vliv u těhotných žen na NTD u plodů (Yan et al., 2012; Van Der Put & Blom, 2000; Christensen et al., 1999; Whitehead et al., 1995), což potvrzuje i meta-analýza z roku 2014 (Yadav et al.). Nadále je také spojován s kardiovaskulárními chorobami (Frosst et al., 1995). Dle meta-analýzy z roku 2017 přítomnost polymorfismu C677T zvyšuje riziko ischemické cévní příhody až o 30 % (Abhinand et al., 2017). Spekulativní jsou nepříznivé účinky v souvislosti



se spontánními potraty. Ačkoliv mnohé studie tuto spojitost vyvracejí (Foka et al., 2000), jiné naopak potvrzují negativní účinek variantní homozygotní konstituce 677TT (Goodman et al., 2006). Například Ren & Wang (2006) tuto asociaci zjistili pouze v čínské populaci, což dokládá i meta-analýza z roku 2012 (Wu et al.).

## POLYMORFISMUS A1298C

Druhým nejznámějším polymorfismem objeveným v roce 1998 je substituce A za C v pozici 1298 nukleotidové sekvence, což vede ke vzniku alaninu namísto kyseliny glutamové (p.Glu429Ala). Na rozdíl od polymorfismu MTHFR C677T, který leží oblasti kódující katalytickou doménu, se polymorfismus A1298C nachází v oblasti genu kódující doménu s regulační funkcí (van der Put et al., 1998).

### MTHFR A1298C A CHOROBY

Na rozdíl od polymorfismu C677T není zcela jasné, se kterými onemocněními se A1298C pojí. Dle meta-analýzy z roku 2014 je možné považovat výskyt variantní alely 1298C jako ukazatel výskytu vrozených srdečních vad u dětských pacientů bělošské populace (Xuan et al., 2014). Yang et al. (2015) našli signifikantní spojitost s variantního genotypu 1298CC s RPL a Eloualid et al., (2012) s mužskou infertilitou, ačkoliv nabádají k podrobnějšímu prostudování dané problematiky.

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

GENOTYP	677CC	677CT	677TT
<b>1298AA</b>	100 %	66 %	25 %
<b>1298AC</b>	83 %	48 %	×
<b>1298CC</b>	31 %	×	×

*pozn.: data označená symbolem „×“ nebyla analyzována*

### KOMBINOVANÉ GENOTYPY POLYMORFISMŮ C677T A A1298C

Kombinace obou nejstudovanějších polymorfismů enzymu MTHFR jsou předmětem především recentního výzkumu. Jejich kombinované genotypy jsou označovány buďto za *cis* či *trans* konstituce (konfigurace). Za tzv. *cis* konstituce se považují genotypy s 3 a více variantními alelami (vždy jako první uváděn polymorfismu C677T a jako druhý A1298C – CT/CC, TT/AC a TT/CC), naproti tomu ostatní genotypy s žádnou či maximálně 2 variantními alelami jsou označovány za *trans* konstituce.

Někteří jejich autoři se domnívají, že *in vivo* dochází mezi těmito polymorfismy k interakci, která může vyústit v selekční nevýhodu vlivem vzniklého fenotypu (Isotalo et al., 2000; N. M. van der Put et al., 1998). Tomu by nasvědčovaly i mnohé studie, především staršího data, ve kterých nebyly *cis* konstituce vůbec nalezeny, anebo byly nalezeny u znevýhodněných skupin v různé souvislosti jako možná příčina vzniklých komplikací (například Isotalo et al., 2000). V poslední letech jsou ovšem tyto konstituce objevovány i u zdravých jedinců, a to především metodou sekvenace (Fan et al., 2016; Ogino & Wilson, 2003).

## 2.3 PORUCHY PLODNOSTI A STERILITA

*Nepłodnost je vždy diagnózou páru, tedy konkrétního muže a konkrétní ženy* (Řežábek, 2014). Dle Světové zdravotnické organizace (WHO) je neplodnost onemocnění<sup>3</sup>, které je definováno jako neschopnost počít potomka vhodně načasovaným nechráněným pohlavním stykem, a to po nejméně jednoročním snažení (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2013). Již v roce 2009 byly na žádost stejné organizace vytvořeny pracovní skupinou ICMART (International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology) klinická definice sterility a seznam pojmů používaných v asistované reprodukci, aby se tak sjednotilo celosvětové posuzování této problematiky. Tato definice pak říká, že se jedná o onemocnění reprodukčního systému definované jako neúspěch v dosažení klinického těhotenství po 12 či více měsících pravidelného nechráněného pohlavního styku (Zegers-Hochschild et al., 2009). To ve své publikaci doplňuje Řežábek (2014) o nutnost posuzovat splnění kritérií také v závislosti na věku ženy, kdy by se například u žen starších 35 let nemělo čekat na splnění této lhůty, ale léčba by měla být zahájena okamžitě. Výzkumy totiž jasně ukazují, že plodnost začíná právě po 35. roce života ženy klesat a nadále se prudce snižuje. Zhruba pouze 2 % všech dětí se narodí ženám starším 40 let (Doherty & Clark, 2006).

Odhaduje se, že potíže s neplodností celosvětově postihují přibližně 72,4 milionů lidí (9 %), přičemž zhruba 40,5 mil. z nich vyhledá odbornou pomoc (Boivin et al., 2007). Díky detailnějším prošetření příčin neplodnosti dnes již víme, že v 50 % nalezneme příčinu u ženy, ve 40 % u muže a ve zbylých 10 % zůstává příčina neznámá. Udává se, že zhruba u 20 %

---

<sup>3</sup> v tomto případě je definováno jako jakákoliv odchylka od normální struktury či funkce jakékoliv části těla, orgánu či tělního systému, která se projevuje charakteristickými symptomy a příznaky, ať už jsou etiologie, patologie a prognózy známé či neznámé

neplodných párů pak existuje příčina problémů jak na ženské, tak na mužské straně (Řežábek, 2008).

### **2.3.1 KLASIFIKACE STERILITY**

Dle WHO rozdělujeme neplodnost na neplodnost primární a sekundární. Primární neplodností se rozumí stav, kdy se konkrétnímu páru nikdy nepodařilo otěhotnět. Naproti tomu sekundárně sterilní páry nedokáží počít po předchozím otěhotnění, a to ať už toto těhotenství skončilo porodem, potratem anebo interrupcí. Obě skupiny neplodných párů jsou v populaci zastoupeny rovnoměrně (Doherty & Clark, 2006).

Další důležitou a již zmíněnou klasifikací je rozdělení na mužskou a ženskou neplodnost. V tomto ohledu je důležité posuzovat obě pohlaví také jako celek. A ačkoliv může mnohdy docházet ke kompenzaci mírných poruch díky dobrému zdravotnímu stavu jednoho z páru, mohou se s pravděpodobností 1:5 problémy vyskytnout u obou z nich (Řežábek, 2008).

### **2.3.2 RIZIKOVÉ FAKTORY**

Jednou z největších překážek v cestě za zdárným těhotenstvím je v životě ženy často ona sama, i když si to mnohé z nich tak docela neuvědomují. „Biologické hodiny“ a pokles zásoby vajíček čekajících na oplození nelze zastavit. Není tedy divu, že současný trend, kdy ženy odsouvají těhotenství do pozdějších fází života, této problematice neprospívá. Platí totiž, že ženy jsou neplodnější mezi 20. a 30. rokem svého života (Doherty & Clark, 2006). Pravděpodobnost otěhotnění pravidelným pohlavním stykem zdravé ženy do 30 let se zdravým mužem je přibližně 20–25 %. Ve 35 letech zhruba 15 % a poté se tato pravděpodobnost začíná rapidně snižovat, kdy se ve 42 letech blíží k nule (Řežábek, 2014).

Na druhou stranu i pro muže může být věk určujícím faktorem. U mužů starších 50 let dochází k poklesu libida vlivem klesající hladiny testosteronu a snížení objemu ejakulátu. Spermie mohou mít sníženou motilitu (hybnost) a nižší procento morfologicky normálních forem (Mardešić et al., 2013). Do jisté míry je plodnost ovlivňována i životním stylem, kdy například kouření, nadměrné užívání alkoholu či drog a dlouhodobý stres negativně působí na schopnost počít potomka (Doherty & Clark, 2006; Řežábek, 2008).

### **2.3.3 PŘÍČINY STERILITY**

Mezi nejčastější příčinu sterility u ženy patří oligo- či anovulace (Mardešić et al., 2013). Další velmi častým onemocněním je endometrióza, incidence se pohybuje v rozmezí 6–10 % (Mardešić et al., 2013) a u neplodných žen až v 40–60 % případů (Doherty & Clark, 2006).

Nadále mohou ke sterilitě vést i choroby děložního čípku (zhruba 5 %) či dělohy, poruchy hormonálních funkcí, jejichž nejčastějším důvodem je syndrom polycystických ovárií, kdy se při ovulaci ve vaječnících tvoří malé cysty. Další příčiny mohou souviset s předčasným ovariálním selháním a s problémy spojenými s dysfunkcí štítné žlázy (Doherty & Clark, 2006). V neposlední řadě se mohou podepsat také genetické abnormality v podobě chromozomálních aberací a translokací (Mardešić et al., 2013).

Za mužskou sterilitu považujeme stav, kdy muž není schopen oplodnit fertilní ženu. Mezi její hlavní příčiny řadíme anatomické vady urogenitálního traktu, nádorová onemocnění, genetická onemocnění, poruchy hormonálního řízení, sexuální dysfunkce a poškození varlat v důsledku exogenních vlivů (Punab et al., 2017). Svou roli hrají také autoimunita, ejakulační problémy či infekce (Doherty & Clark, 2006).

#### **2.3.4 ASISTOVANÁ REPRODUKCE**

Asistovaná reprodukce (AR) je *souhrn postupů využívajících k dosažení těhotenství laboratorního ošetření zárodečných buněk (spermii, oocytů) a embryí* (ÚZIS ČR, 2017). Tyto postupy jsou pak aplikovány při prevenci či samotné léčbě neplodných párů (Řežábek, 2014), a to ve specializovaných centrech. Počet těch platně registrovaných byl v České republice v roce 2015 stanoven na 42 a vyhledalo je více než 13 000 žen, jejichž množství se meziročně nepatrně zvyšuje (ÚZIS ČR, 2017). Není překvapením, že všechna tato centra AR musejí splňovat přísné regulace ohledně personálního obsazení, přístrojového vybavení a v neposlední řadě také musejí vykazovat úspěchy (Řežábek, 2008). Statistická data dokládají, že ke zdárnému zakončení těhotenství porodem dospěje zhruba 50 % žen, které podstoupí léčbu, z nichž větší podíl tvoří ženy mladší 40 let (ÚZIS ČR, 2017).

#### **OBECNÁ CHARAKTERISTIKA REPRODUKČNÍ TECHNOLOGIE**

Metody AR zahrnují celou škálu postupů, při kterých jsou ženám z vaječníků odebírána vajíčka, ta jsou následně mimotělně oplodněna a zavedena zpět do ženského těla – do dělohy. Tyto metody mohou využít ženy a muži s různými zdravotními problémy, které brání přirozenému početí. V následujícím výčtu jsou obecně charakterizovány metody, na které bylo dotazováno v experimentální části práce.

##### **UMĚLÁ INSEMINACE**

Umělá inseminace je metodou, při které je sperma zavedeno do pochvy, děložního čípku, dělohy či vejcovodu. úspěšnost závisí na příčině neplodnosti páru, ale zpravidla se pohybuje v rozmezí 10–15 % na jeden pokus (Doherty & Clark, 2006). Intrauterinní inseminace (IUI)

je metodou umělé inseminace, kdy jsou spermie vstříknuty přímo do dělohy ženy. Před samotným vstříkem jsou tyto spermie ošetřeny, zbaveny bakterií a seminální plazmy (Řežábek, 2014).

#### **MIMOTĚLNÍ OPLODNĚNÍ (IVF)**

*In vitro* fertilizace je nejběžnější metodou oplození, která je hojně užívána u žen s poruchou průchodnosti vejcovodů, u mužů s abnormálním počtem a/nebo funkcí spermií a celkově u párů s nevysvětlitelnou poruchou neplodnosti (Doherty & Clark, 2006). V případě extrémně sníženého počtu spermií v mužském ejakulátu se přistupuje k metodě ICSI (intracytoplasmatická injekce spermií), kdy se jedna spermie vstříkne přímo do vajíčka. Následně se po několika dnech kultivace embrya toto vzniklé embryo přenese do dělohy ženy tzv. embryotransferem (ET). Je-li potřeba vzniklá embrya uchovat pro budoucí použití, je možné je zmrazit, a to většinou až na -196 °C. V takovém případě se následný ET nazývá kryoembryotransfer (KET), (Řežábek, 2014)

## **2.4 OPAKOVANÉ SPONTÁNNÍ POTRATY**

Neschopnost ženy donosit a porodit životaschopný plod se v českých poměrech označuje jako infertilita. Takové těhotenství může končit spontánním potratem (abort), kterým je označeno neúspěšně zakončené těhotenství, které je ukončeno úmrtím či vypuzením embrya. ÚZIS ČR (2016), jež sleduje vývoj stavu potratů v České republice a tyto údaje statisticky zpracovává, *potratem rozumí ukončení těhotenství ženy, při němž:*

- a) *plod neprojevuje ani jednu ze známek života a jeho porodní hmotnost je nižší než 500 g a pokud ji nelze zjistit, jestliže je těhotenství kratší než 22 týdnů,*
- b) *z dělohy ženy bylo vyňato plodové vejce bez plodu, anebo těhotenská sliznice.*

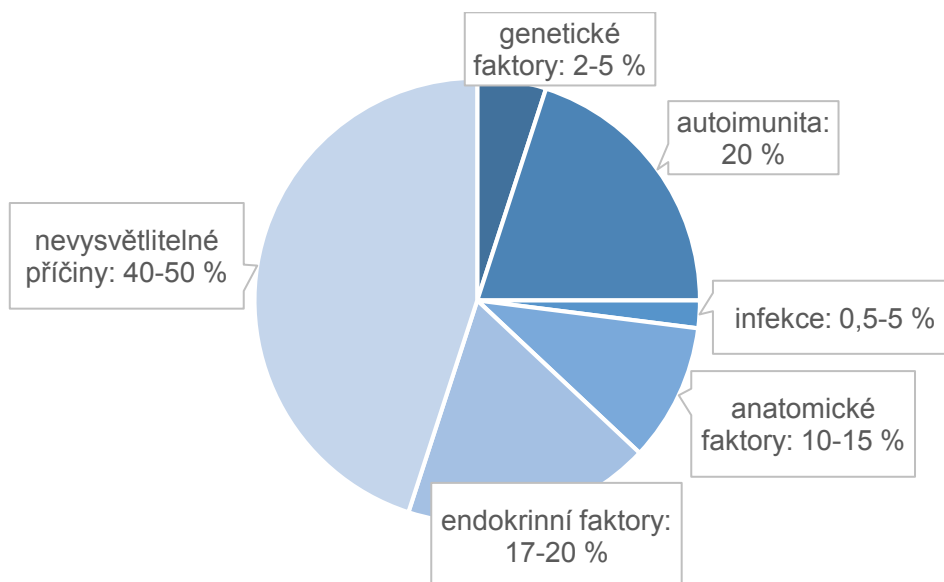
*Nadále též ukončení mimoděložního těhotenství anebo umělé přerušování těhotenství provedené podle zvláštních předpisů (...).* Opakované spontánní potraty nebo také opakované těhotenské ztráty (RPL, recurrent pregnancy loss) jsou dle Světové zdravotnické organizace obecně definovány jako 2 a více ztrát těhotenství (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2013).

Dle Carpa (2014) RPL postihují 0,6–2,3 % žen, přičemž přibližně 15 % ze všech klinicky rozpoznávaných těhotenství končí právě potratem (Ford & Schust, 2009). 50–70 % těhotenství končí hned v jeho prvopočátcích a 25 % žen o jeho předchozí existenci vůbec neví, k ukončení těhotenství dochází například ještě před menstruací či před prvními projevy těhotenských symptomů. V mnohých případech je takovým raným ukončení těhotenství tzv.

biochemické těhotenství. To je stavem, kdy žena může na základě těhotenského testu, který s různou citlivostí detekuje beta podjednotku lidského choriového gonadotropinu ( $\beta$ -hCG), odhalit graviditu již v její rané fázi. Toto těhotenství ale záhy končí ještě před potvrzením ultrazvukem (Annan et al., 2013). Zhruba 10 % spontánních potratů souvisí s vysokým podílem aneuploidií (monozomií či trizomií), (Mardešić et al., 2013).

#### 2.4.1 RIZIKOVÉ FAKTORY

I pro výskyt RPL hrají důležitou roli rizikové faktory. Následující graf (Obr. 2.7) zobrazuje procentuální rozložení nejčastějších příčin. Mezi další příčiny podobně jako v případě sterility řadíme například stres, životní styl, kouření a věk ženy (ESHRE, 2017). Podrobnější výčet rizikových faktorů je k nalezení ve Stráská (2015).



**Obr. 2.7:** Etiologie opakovaných spontánních potratů. Zpracováno dle Ford & Schust, 2009.

### 3 VYMEZENÍ CÍLŮ

Hlavním cílem experimentální části práce bylo otestovat páry, kterým se nedaří otěhotnět či u nich došlo k opakovaným spontánním potratům, v souvislosti s *cis/trans* konfigurací 2 nejběžnějších polymorfismů v enzymu MTHFR (C677T a A1298C).

Cílem druhé části experimentální práce bylo statisticky zhodnotit frekvence polymorfismů MTHFR C677T a A1298C u jedinců z české populace a tyto podklady následně porovnat s údaji pro jiné světové populace. Podklady pro tuto populační studii poskytla genetická laboratoř GENLABS.

Rozdělení dílčích částí experimentů:

- 1) zhodnocení dotazníkového šetření;
- 2) zastoupení jednotlivých genotypů žen a mužů studijní skupiny párů;
- 3) zastoupení jednotlivých genotypů pro jedince z české populace;
- 4) porovnání studijní a kontrolní skupiny;
- 5) komparace dosažených výsledků a závěrů s literaturou.

## 4 DESIGN EXPERIMENTŮ

### 4.1 POLYMORFISMY V GENU *MTHFR* V RÁMCI VÝZKUMNÉ SKUPINY PÁRŮ A JEJICH ASOCIACE S RPL A STERILITOU

#### 4.1.1 CHARAKTERISTIKA VÝZKUMNÉ SKUPINY

Samotný výběr účastníků studie probíhal 2 způsoby – nejdříve byla v rámci diplomové práce navázána spolupráce s centrem prof. Zecha Plzeň. Vzhledem k tomu, že v centru prošlo velice málo párů selekčními kritérii pro zařazení do studie, bylo nutné přistoupit k dalším možnostem pro získání potřebných jedinců. Pro rozšíření skupiny účastníků studie byla, jakožto druhý způsob, využita možnost internetové výzvy, při které nábor zájemců o studii probíhal za pomoci internetového dotazníkového šetření.

Celá studie byla schválena etickou komisí Zdravotně sociální fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (Příloha 1) a všichni účastníci stvrdili svou účast podpisem na informovaném souhlasu (Příloha 2).

#### SELEKČNÍ KRITÉRIA

V rámci studie byly vyšetřeni vždy oba partneři infertilního páru či páru s idiopatickými opakovanými spontánními potraty nebo páru s opakovanými potraty po IVF/IUI. Věkové rozmezí se pro ženy pohybovalo od 18–47 let a pro muže od 18–50 let.

Do analyzované skupiny byly zařazeny páry s idiopatickou neplodností bez potratů nebo s opakovanými potraty (2 a více), kdy není známa příčina ani na ženské či na mužské straně. Základní výběr idiopatických infertilních párů byl založen na třech základních požadavcích, které museli účastníci studie splňovat: přítomnost ovulace, normální spermioqram a předpokládaná či potvrzená normální funkce a průchodnost vejcovodů.

Studie se mohly účastnit ženy, které mají problémy se štítnou žlázou, ale jsou suplementovány, což platí i pro ostatní hormonální dysfunkce, které jsou nějakým způsobem залечены a je tak zajištěno, že ženy mohou normálně otěhotnět. Stejná pravidla platila i pro muže léčené pro neplodnost. Dále participantí nemuseli mít vyšetřený karyotyp.

Nadále se studie mohly zúčastnit páry s ženskou/mužskou příčinou neplodnosti, která může být překonána technikami asistované reprodukce, a které prodělaly opakované potraty (2 a více) nebo 2 a více neúspěšné implantace po IVF nebo 2 a více neúspěšné embryotransfery. Do této skupiny byly zařazeny i páry, u kterých víme, že: muž má sníženou koncentraci spermií v ejakulátu (ale min. 10 000 000 spermií/ml), motilita i morfologie spermií v normě, u ženy byly diagnostikovány neprůchodné vejcovody apod.



#### **VYLUČOVACÍ KRITÉRIA PRO ZAŘAZENÍ DO STUDIE – ŽENY:**

- 1) Neléčitelné nebo nedostatečně léčené hormonální patologie. (pozn.: dostatečně léčené poruchy funkce štítné žlázy nejsou důvodem vyloučení ze studie, stejně tak léčený *diabetes mellitus* I. typu).
- 2) Geneticky podmíněná neplodnost (např. Turnerův syndrom).
- 3) Imunologické faktory, pokud jsou známé; např. antifosfolipidový syndrom, tvorba protilátek nebo buněčná imunita ochromující pohyb spermií, tvorba protilátek či buněčná imunita proti partnerovým spermiím.
- 4) Hematologická onemocnění.
- 5) Užívání léků, které mohou způsobovat neplodnost.
- 6) Přítomnost jiného základního onemocnění, které může negativně ovlivňovat plodnost ženy.

#### **VYLUČOVACÍ KRITÉRIA PRO ZAŘAZENÍ DO STUDIE – MUŽI:**

- 1) Vrozené nebo získané neléčitelné urogenitální abnormality.
- 2) Maligní onemocnění.
- 3) Infekce urogenitálního traktu.
- 4) Neléčitelné poruchy endokrinního systému, hormonální poruchy.
- 5) Genetické abnormality, geneticky podmíněná neplodnost.
- 6) Imunologické faktory, např. antifosfolipidový syndrom, tvorba autoprottilátek nebo buněčná imunita proti spermiím apod.
- 7) Užívání léků, které mohou způsobovat neplodnost.
- 8) Přítomnost jiného základního onemocnění, které může negativně ovlivňovat plodnost muže.

#### **SPOLUPRÁCE S IVF CENTREM PROF. ZECHA PLZEŇ**

V rámci spolupráce s IVF centrem prof. Zecha Plzeň bylo získáno 7 párů.

#### **VYHLEDÁNÍ ÚČASTNÍKŮ ONLINE**

Pro rozšíření řad účastníků pilotní studie bylo zapotřebí využít sociálních sítí a veřejných diskuzních portálů, na kterých se kumulují potenciální zájemkyně a zájemci. Výběr probíhal ve 2 etapách.

Nejdříve zájemci vyplnily Vstupní dotazník (Příloha 3), který byl vyhodnocen, a v případě, že zájemci splňovali kritéria nutná pro zařazení do studie, jim byl následně individuálně zaslán Cílený dotazník (Příloha 4). Po jeho úspěšném vyplnění byly účastníkům

zaslány odběrové soupravy na bukální stěr, instrukce pro jeho provedení a informované souhlasy.

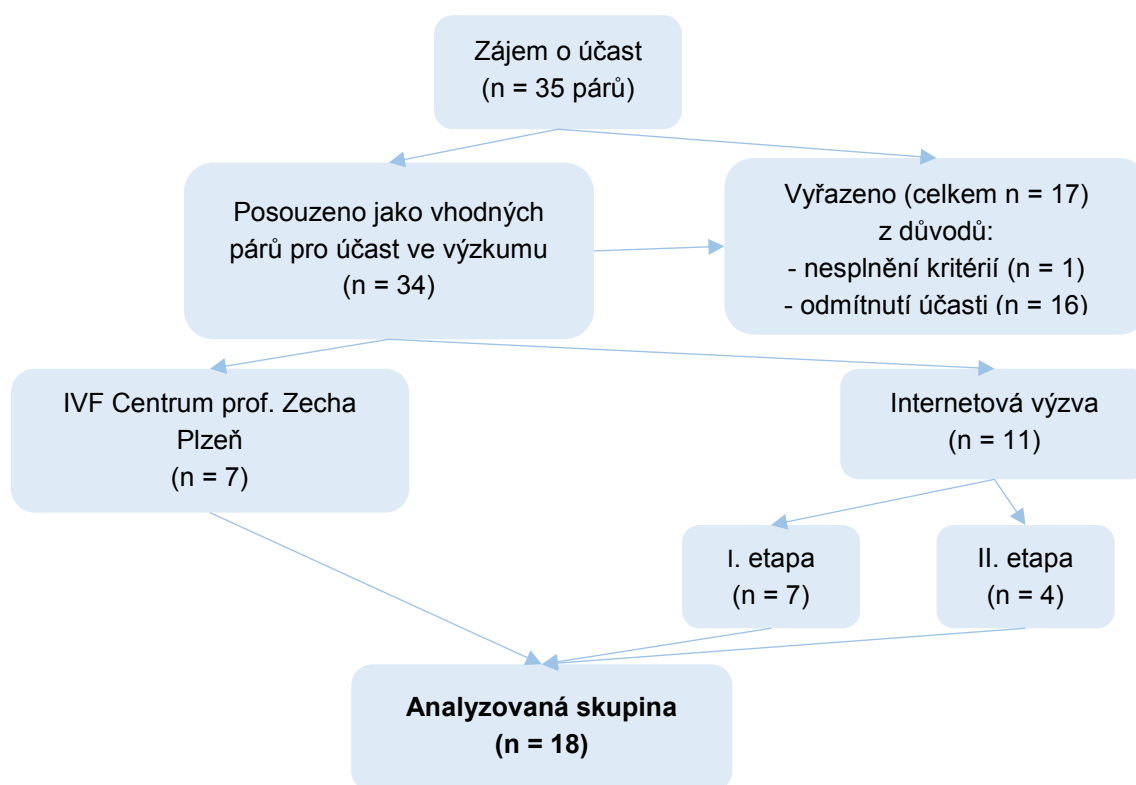
### *I. ETAPA*

V I. etapě výběru, která probíhala od 7. března 2017 do 31. března 2017 (Příloha 5), vyplnilo 1. dotazník 19 respondentů, přičemž pouze 1 dotazník byl pro nesplnění kritérií vyřazen. Ostatním 18 zájemcům byl tedy zaslán Cílený dotazník, který nakonec vyplnilo 12 z nich. Těm všem byly na začátku května zaslány odběrové soupravy s instrukcemi k jejich použití. Do konce července 2017 nám bylo na zpáteční adresu zasláno 14 z 24 vzorků, tj. 7 z 12 párů, kteří tak stvrdili svým souhlasem účast v naší pilotní studii. Zbytek vzorků (10 u 5 párů) se ani po urgováním skrze elektronickou komunikaci nepodařilo získat. Z I. etapy jsme tedy získali vzorky od 7 párů splňujících požadovaná kritéria.

### *II. ETAPA*

Vzhledem k nedostatečnému počtu vzorků zařaditelných do studie bylo nutné opakovat internetovou výzvu (Příloha 6), abychom tak získali další potřebné subjekty.

II. etapa byla zahájena 14. srpna 2017 a výběr trval do 10. září 2017. Celkově Vstupní dotazník vyplnilo 8 respondentů, kterým bylo pro splnění indikačních kritérií zaslán Cílený dotazník. Ten v druhé polovině září vyplnilo 6 zájemců (v tomto případě párů), kterým byly v druhé polovině října zaslány odběrové soupravy. Do konce listopadu 2017 nám byly zaslány vzorky od 4 párů.



**Obr. 3.4: Schéma procesu vzniku výběrového souboru.** Z celkového počtu 35 párů se zájmem o účast ve studii bylo jako vhodných párů posouzeno 34 párů, z nichž 7 vzešlo ze spolupráce s IVF Centrem prof. Zecha Plzeň a zbylých 27 pak z internetového vyhledávání. Z kategorie internetového vyhledávání své vzorky s informovanými souhlasly do laboratoře zaslalo pouze 11 z nich. Výsledně bylo vyšetřeno 18 párů.

## KONTROLNÍ SKUPINA

Jako kontrolní skupina byli použiti jedinci ze souboru české populace z 2. části experimentu (viz kapitola 4.2.2, str. 36).

### 4.1.2 DOTAZNÍKOVÉ ŠETŘENÍ

Pro získání podrobnějších informací o subjektech byl vytvořen Cílený dotazník, který byl v případě pacientů IVF centra vyplněn v přítomnosti ošetřujícího lékaře a v případě internetového získání subjektů byl vyplněn bez jakékoli odborné podpory. Pro tuto skupinu respondentů byl dotazník mírně poupraven, aby byl pro dotázané co nejpřehlednější a nejsrozumitelnější vzhledem k medicínské terminologii a možnostem internetového dotazování.

## VSTUPNÍ DOTAZNÍK

Vstupní dotazník byl poskytnut pouze dobrovolníkům, kteří zareagovali na internetové vyhledávání, abych tak došlo k eliminaci pro studii nevyhovujících jedinců. Po vyhodnocení

tohoto Vstupního dotazníku byli kontaktováni zájemci splňující kritéria. Jeho podrobné znění lze najít v příloze (Příloha 3).

## CÍLENÝ DOTAZNÍK

Cílený dotazník (podrobně Příloha 4) se skládal z 12 velkých oblastí, přičemž první z nich vnášela pouze informativní údaje o respondentech (jméno, příjmení, datum narození, adresa k zaslání odběrových souprav), zbylých 11 oblastí pak bylo věnováno hlavním výzkumným otázkám (Tab. III), které byly doplněny o podotázky zacházející do podrobností. Hlavní oblasti byly konstruovány jako uzavřené otázky s možnostmi „ano/ne“, v případě online verze dotazníku bylo využito funkce přeskokování otázek. Vybral-li respondent odpověď „ano“, zobrazily se mu podotázky k danému tématu, v opačném případě byla tato sekce přeskočena a respondent přešel k další hlavní otázce.

**Tab. III: Ukázka hlavních výzkumných otázek z dotazníkového šetření.**

<b>POŘADÍ SEKCE</b>	<b>VÝZKUMNÁ OTÁZKA</b>
1	Jak dlouho se snažíte otěhotnět?
2	Podstoupila jste někdy umělé ukončení těhotenství?
3	Prodělala jste někdy spontánní potrat po přirozeném početí (PP)?
4	Prodělala jste někdy spontánní potrat po IVF?
5	Prodělala jste někdy neúspěšný embryotransfer?
6	Prodělala jste potrat po léčbě neplodnosti?
7	Užívala jste někdy hormonální antikoncepci (HAK)?
8	Máte děti počaté přirozenou cestou (i z IVF) se stejným/jiným partnerem?
9	Užíváte v současnosti kyselinu listovou?
10	Máte vyšetřen karyotyp?
11	Léčíte se či jste se někdy léčila na neplodnost?

Jednotlivé podotázky sloužily k detailnějším odpovědím. Vesměs se jednalo o otázky dotazující se na podrobnější popis ztrát těhotenství či podstoupených metod asistované reprodukce typu *kdy; počet; možná příčina*.

### 4.1.3 ODBĚR A ZPRACOVÁNÍ MATERIÁLU

#### ODBĚR VZORKŮ

Odběr genetického materiálu ve formě bukálního stěru byl zajištěn samotnými pacienty. Ti jej provedli na základě přiloženého návodu, který jim byl zaslán na zadanou adresu společně

s odběrovými soupravami na bukální stěr (Isohelix). Ve zkratce bylo třeba provést odběr nejlépe ráno ihned po probuzení před čištěním zubů či před snídaní a provádět odběr po dobu jedné minuty. Účastníci studie byli mimo jiné poučeni, že je nutné stěry zaslat do laboratoře v den odběru, aby tak nedocházelo k jejich znehodnocení.

## IZOLACE DNA Z BUKÁLNÍHO STĚRU

Ke genetickému vyšetření byla použita DNA ze vzorků bukálního stěru získaného pomocí odběrové soupravy Isohelix. Izolace DNA probíhala za použití DDK DNA Isolation Kit DDK-50 (Isohelix) kompatibilního s odběrovými soupravami dle návodu výrobce. Přehledný soupis reagensů s jednotlivými objemy jsou k nalezení v následující tabulce (Tab. IV).

**Tab. IV: Použité reagensy a jejich objemy pro izolaci DNA z plné krve za použití DDK DNA Isolation Kit DDK-50 (Isohelix)**

REAGENCIE	OBJEM 1 IZOLACE (μl)
Solution LS (Lysis Buffer)	500
Proteináza K	20
Solution CT (Capture Buffer)	500
Solution TE (Re-hydration Buffer)*	30–100**

\*u izolací provedených od roku 2017 bylo upuštěno od přidávání TE, namísto toho byla použita H<sub>2</sub>O

\*\*objem TE byl přidán vzhledem k typu a počtu požadovaných vyšetření, v tomto případě to bylo 30 μl

Před zahájením samotné izolace byly pro jeden vzorek připraveny vždy tři 1,5 ml mikrozkušavky, které byly řádně označeny. Suchá lázeň byla nastavena na 60 °C (TDB-120, Dry block thermostat, bioSan) a Proteináza K se předem vyndala z mrazícího boxu, proto aby rozmrzla při pokojové teplotě (RT).

Do zkumavky s tamponem bukálního stěru (DNA Buccal Swabs SK-2S) bylo napipetováno 500 μl LS a 20 μl PK. Tato směs byla krátce zvortexována, stočena na stolní centrifuzě (Mini centrifuga/vortex MicroSpin V-2400, bioSan) a následně uložena k inkubaci do suché lázně při 60 °C po dobu 60 min. Po inkubaci byla zkumavka opět krátce zvortexována a stočena. Poté byl všechný supernatant přepipetován do předpřipravené 1,5 ml mikrozkušavky. K roztoku bylo přidáno 500 μl CT (Capture Buffer) a mikrozkušavka byla zcentrifugována při 13 tis. ot./min po dobu 7 min. Po centrifugaci byl supernatant dekantován tak, aby nedošlo k porušení vzniklé pelety. Po jeho odebrání byla mikrozkušavka opět krátce zcentrifugována a zbylý supernatant byl také dekantován. K peletě DNA a proteinů bylo přidáno 30–100 μl TE (Re-hydration Buffer)/H<sub>2</sub>O (Aqua pro Injection) v závislosti na

potřebné koncentraci a objemu DNA. Následovala inkubace při RT po dobu 5 min, po jejímž skončení byly mikrozkušavky zvortexovány a zcentrifugovány při 13 tis. ot./min po dobu 2 min. Vzniklý supernatant s obsaženou izolovanou DNA byl opatrně odebrán do nové 1,5 ml mikrozkušavky tak, aby nedošlo k poškození vzniklé pelety. Poté byla u vzorků změřena koncentrace DNA, a to na fluorometru (Qubit Fluorometr 2.0, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific) za použití kitu Qubit dsDNA Assay HS (Invitrogen). Takto izolovaná DNA byla uložena do mrazicího boxu a skladována při -20 °C.

#### **MĚŘENÍ KONCENTRACE IZOLOVANÉ DNA**

Před započítím měření bylo nutné vytemperovat standardy na RT a pro každý vzorek byla připravena předepsaná 0,5 ml mikrozkušavka (Qubit Assay tubes, Invitrogen), jež byla následně řádně označena. Pro každý vzorek (popř. standardu) bylo napipetováno 199  $\mu$ l Qubit dsDNA BR Bufferu a 1  $\mu$ l Qubit dsDNA BR reagentu do zásobní 1,5 ml mikrozkušavky. Zásobní roztok byl důkladně zvortexován (min. 15 s) a krátce stočen (Mini centrifuga/vortex MicroSpin V-2400, bioSan).

Potřebné standardy byly připraveny do dvou 0,5 ml mikrozkušavek za použití 190  $\mu$ l připraveného zásobního roztoku, do jedné mikrozkušavky pak bylo přidáno 10  $\mu$ l Qubit dsDNA BR Standard #1 a do druhé 10  $\mu$ l Qubit dsDNA BR Standard #2. Pro měření izolované DNA bylo použito 198  $\mu$ l ze zásobního roztoku, k nimž byly přidány 2  $\mu$ l izolované DNA. Takto vzniklá směs byla krátce zvortexována, stočena a 2 min inkubována při RT.

Samotné měření na fluorometru proběhlo po kalibraci za použití připravených roztoků obsahující standardy. Všechny naměřené hodnoty pro jednotlivé izoláty byly zaznamenány.

#### **4.1.4 ANALÝZA DAT**

Jako primární metoda užitá k detekci polymorfismů v genu *MTHFR* byla zvolena metoda PCR-RFLP. V případě nejasných výsledků byla jako druhá metoda detekce užitá Real-Time PCR (RT-PCR) nebo sekvenace PCR produktu.

##### **PCR-RFLP**

Metoda PCR-RFLP je založena na amplifikaci konkrétního úseku DNA pomocí dvojic primerů, po jejímž skončení dojde k restrikci namnožených ampliconů za použití restrikčních endonukleáz. Výsledné fragmenty lze vizualizovat například pomocí gelové elektroforézy.

### POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Po úspěšné izolaci DNA z bukálního stěru mohla proběhnout PCR reakce, která byla použita pro amplifikaci úseků vymezených primery (Tab. V), jejichž sekvence byly převzaty z Frosst et al. (1995) pro C677T a z van der Put et al. (1998) pro A1298C.

**Tab. V: Sekvence primerů použitých pro analýzu.**

NÁZEV PRIMERU	PCR PRODUKT	SEKVENCE OD 5' K 3'
MTHFR 677F	198 bp	TGA AGGG AGA AGG TGT CTG GGG GA
MTHFR 677R		AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG
MTHFR 1298F	241 bp	ATG TGG GGG GAG GAG CTG AC
MTHFR 1298R		GTC TCC CAA CTT ACC CTT CTC CC

pozn.: ,F' značí forward primer a ,R' reverse primer

Reagencie byly po rozmražení uchovávány na ledu v dekontaminovaném laminárním boxu, aby bylo zamezeno kontaminaci reakční směsi. Nejdříve byl pro každý polymorfismus připraven MasterMix, jehož komponenty byly pipetovány do 1,5 ml mikrozkušavek ve stanoveném pořadí a objemu (Tab. VI). Jako facilitátor reakce byl použit dimethylsulfoxid (DMSO). Vzniklé MasterMixy byly následně rozpipetovány po 48 µl do předem připravených a označených 0,2 ml mikrozkušavek, do nichž byla mimo laminární box přidána DNA izolátu jednotlivých účastníků studie. Výsledný objem reakční směsi pro jeden vzorek činil 50 µl. Každý dílčí běh obsahoval jak pozitivní (PK), tak negativní kontrolu (NK), která sloužila jako ukazatel správného provedení metody a možné kontaminace reakční směsi. Navíc PK (vždy heterozygotní konstituce) sloužila jako vodítko pro vizualizaci po restrikčním štěpení.

**Tab. VI: Reakční mix pro metodu PCR-RFLP**

	OBJEM 1 REAKCE	VÝROBCE
Aqua pro injectione	33,3 µl	Ardeapharma
MyTaq Red Reaction Buffer	10 µl	Bioline
MyTaq Polymerase	0,2 µl (2U)	Bioline
DMSO	2,5 µl	ROTH
Primer F + R	1 + 1 µl (40 pmol)	Elisabeth Pharmacon
<b>CELKEM</b>	<b>48 µl</b>	
DNA izolát	2 µl	

pozn.: dva udané objemy u kolonky ,Primer F + R' značí množství pro forward a reverse primery, a to pro každý z polymorfismů jiné

Po přidání DNA izolátu byly mikrozkušavky s reakční směsí důkladně zvortexovány (Mini centrifuga/vortex MicroSpin V-2400, bioSan) a krátce stočeny a ihned umístěny do připraveného gradientového termocykleru (MultiGene, Labnet). V případě, že nemohla být tato podmínka splněna, byly mikrozkušavky uskladněny při teplotě -20 °C.

PCR probíhala dle zoptimalizovaného časově-teplotního profilu pro každý polymorfismus zvlášť (přehledně uvedeno v Tab. VII a Tab. VIII).

**Tab. VII: Amplifikační profil metody PCR-RFLP pro detekci polymorfismu MTHFR C677T**

	POČET CYKLŮ	TEPLOTA	ČAS
POČÁTEČNÍ DENATURACE	1	95 °C	5 min
DENATURACE		95 °C	1 min
ANNEALING	35	60 °C	1 min
EXTENZE		72 °C	1 min
TERMINÁLNÍ EXTENZE	1	72 °C	5 min

**Tab. VIII: Amplifikační profil metody PCR-RFLP pro detekci polymorfismu MTHFR A1298C**

	POČET CYKLŮ	TEPLOTA	ČAS
POČÁTEČNÍ DENATURACE	1	95 °C	5 min
DENATURACE		95 °C	30 s
ANNEALING	30	55 °C	30 s
EXTENZE		72 °C	30 s
TERMINÁLNÍ EXTENZE	1	72 °C	5 min

#### VIZUALIZACE PCR PRODUKTŮ

Po PCR byly vždy ověřeny přítomnost a velikost amplikonů pomocí gelové elektroforézy na 4% agarózovém gelu, který byl připraven z 50 ml 1× TBE Bufferu (Thermo Scientific), ze čtyř 0,5 g agarózových tablet (Agarose Tablets, FastGene) a 15 µl barviky Midori Green Advanced DNA Stain. Na gel bylo nanášeno 5 µl pro každý vzorek a 5 µl markeru (100 bp DNA ladder; vše uvedené součástí FastGene Electrophoresis Reagent Kit, Nippon Genetics). V této chvíli bylo důležité nanést i NK, aby bylo patrné, zdali nedošlo ke kontaminaci při přípravě MasterMixu.

Podstatou elektroforetické separace je rozdělování nabitých molekul v elektrickém poli, kdy jsou tyto molekuly rozdělovány dle velikosti a elektrického náboje. Díky svému negativnímu náboji se molekuly DNA pohybují směrem ke kladně nabitě elektrodě, tzv. anodě.



Pro průběh elektroforetické separace bylo zvoleno napětí 135 V a jako elektrolyt byl použit 1× TBE Buffer. Dělení fragmentů probíhalo po dobu zhruba 15 min. Poté byl gel přenesen z elektroforetické vany (Mupid LED Illuminator, Nippon Genetics) na UV dokumentační systém (FastGene GelPic LED Box, Nippon Genetics) a výsledky gelové elektroforézy byly vyfoceny, uloženy na paměťovou kartu a uloženy do počítače.

### **PŘEČIŠTĚNÍ PCR PRODUKTŮ**

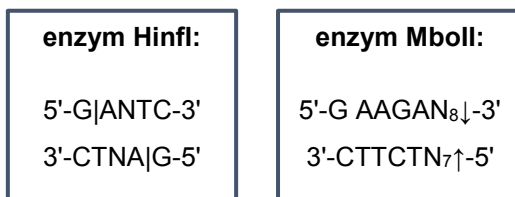
Po kontrole vzniklých PCR produktů na gelové elektroforéze bylo přistoupeno k přečištění vzniklých PCR produktů (kromě PCR produktu NK, jejíž restrikce by postrádala smysl), aby byly získané PCR produkty zakoncentrovány a aby bylo docíleno co nejzřetelnějšího výsledků štěpení.

Přečištění probíhalo metodou ethanolové precipitace. Nejdříve bylo k PCR produktu o objemu 45  $\mu$ l, jež byl přepipetován do 1,5 ml mikrozkušavky, přidán pětinašobek objemu vychlazeného 96% ethanolu (225  $\mu$ l; Penta) a desetina objemu octanu sodného (4,5  $\mu$ l; Penta). Vzniklý roztok byl několikrát převrácen v ruce jako způsob promíchání jednotlivých složek. Po tomto kroku byla směs uchována při -20 °C přes noc, aby došlo k precipitaci DNA. Druhý den byly zkumavky centrifugovány (Centrifuge 5415R, Eppendorf) při 10 °C na maximální otáčky (13,5 tis. ot./min) po dobu 30 min a vzniklý supernatant byl dekantován. K peletě byl následně přidán pětinašobek 70% ethanolu (z počátečního objemu reakce - tedy 225  $\mu$ l). Poté proběhla v pořadí druhá centrifugace za stejných podmínek po dobu 5 min a opět došlo k opatrné dekantaci supernatantu. Před konečným odpipetováním zbylého ethanolu bylo přistoupeno ke krátké centrifugaci (zhruba 15 s při maximálních otáčkách), aby došlo k úplnému odstranění ethanolu, jež by mohly negativně ovlivnit následné štěpení. Peleta se nechala pár minut vyschnout na vzduchu tak, aby nepřeschla, a byla rozpuštěna v 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (Aqua pro injection).

### **RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ (RFLP)**

RFLP probíhalo za použití restrikčních endonukleáz. K přečištěným PCR produktům o objemu 20  $\mu$ l byla přidána směs pufru a restrikčního enzymu. Tato směs byla vždy míchána na ledu jako zásobní roztok pro více reakcí. V případě MTHFR C677T bylo na jedno restrikční štěpení (restrikční místa zobrazena v Obr. 4.1) použito 5 U enzymu HinfI (5U/ $\mu$ l) a 2,3  $\mu$ l 10× CutSmart Bufferu (New England BioLabs). Totéž platilo i v případě MTHFR A1298C s tím rozdílem, že byl použit enzym MboII (5U/ $\mu$ l) s 10× Bufferem B (ThermoFisher Scientific). Po přípravě zásobního roztoku bylo do jednotlivých zkumavek přidáno 3,3  $\mu$ l směsi pufru a enzymu, směs byla promíchána propipetováním a následně byly zkumavky krátce stočeny a

umístěny do předehřátého termostatu (TDB-120, Dry block thermostat, bioSan) a inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Po inkubaci bylo přistoupeno k elektroforetické separaci restrikčních fragmentů.



**Obr. 4.1: Restrikční místa pro endonukleázy HinfI a MboII.** Označení ,N' je užito pro jakýkoliv z možných nukleotidů (A, C, G či T).

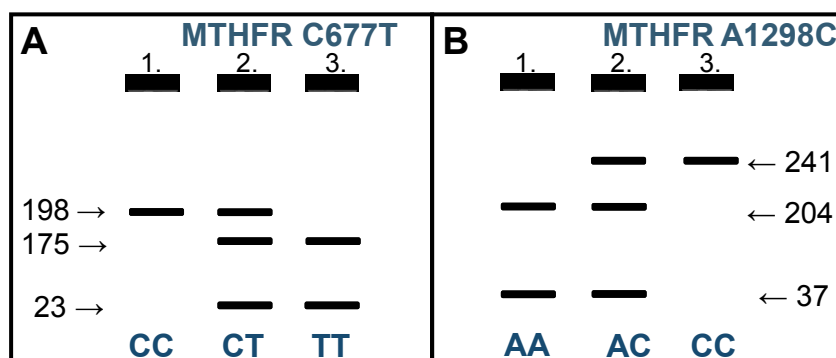
#### DETEKCE RESTRIKČNÍCH FRAGMENTŮ

Pro vizualizace výsledků RFLP analýzy byl použit nebarvený 4% agarózový gel (postup přípravy shodný s přípravou barveného gelu, pouze došlo k vynechání barvičky Midori Green Advanced DNA Stain).

Na parafilmu byl smícháno 0,5 µl fluorescenční barvičky (Midori Green Direct DNA Stain, Nippon Genetics) s 10 µl vzorku či 1 µl fluorescenční barvičky s 5 µl hmotnostního markeru 100 bp DNA ladder. Vzorky byly následně napipetovány na gel. Separace restrikčních fragmentů opět probíhala při 135 V po dobu více než 25 min, aby došlo k patrnému oddělení fragmentů (přehledně uvedeno v Tab. IX a Obr. 4.2). Po skončení elektroforézy byl gel přenesen na detekční systém a výsledné fragmenty DNA byly zdokumentovány podobně jako v případě PCR produktů.

**Tab. IX: Výsledné fragmenty vznikající po restrikčním štěpení metodou PCR-RFLP**

	<b>MTHFR C677T</b>	<b>MTHFR A1298C</b>
VARIANTNÍ ALELY	175+23 bp	241 bp
WILD-TYPE	198 bp	204+37 bp
HETEROZYGOTNÍ ALELY	198+175+23 bp	241+204+37 bp



**Obr. 4.2: Grafická vizualizace výsledných fragmentů po restričním štěpení metodou PCR-RFLP pro polymorfismy enzymu MTHFR C677T (A) a A1298C (B).** **A)** 1. jamka zobrazuje neštěpený fragment o délce 198 bp, což značí nepřítomnost variantní alely T (CC), 2. jamka pak štěpené fragmenty o délce 198, 175 a 23 bp – což poukazuje na přítomnost jedné variantní alely T (heterozygot CT) a 3. jamka zobrazuje fragmenty o délce 175 a 23 bp, které dokládají přítomnost 2 variantních alel T (TT). **B)** 1. jamka zobrazuje fragmenty o délce 204 a 37 bp, což značí nepřítomnost variantní alely C (AA), 2. jamka pak fragmenty o délce 241, 204 a 37 bp, což poukazuje na přítomnost jedné variantní alely C (heterozygot AC) a 3. jamka zobrazuje neštěpený fragment o délce 241 bp, který dokládá přítomnost 2 variantních alel C (CC).

## REAL-TIME PCR

U některých vzorků bylo po neprůkazném PCR-RFLP přistoupeno k Real-Time PCR (dále RT-PCR). Tato metoda slouží k amplifikaci a následné detekci cílové sekvence DNA pomocí specifického signálu fluorescenčně značených sond.

K práci byly použity certifikované kity MTHFR C677T PCR Kit a MTHFR A1298C PCR Kit (GeneProof), které obsahují tzv. Ready to Use MasterMixy a využívají technologie „hot start“, jež minimalizuje nespecifické reakce a zajišťuje jejich maximální citlivost. Pro fluorescenční separaci na kanálech 530 nm a 560 nm emisního spektra na termocykleru byl použit Color Compensation Kit 530/560 (GeneProof). RT-PCR byla provedena pomocí přístroje Light Cycler 2.0 od firmy Roche, přičemž reakce neprobíhá v klasických PCR zkumavkách, ale ve skleněných kapilárách.

## COLOR KOMPENZACE

Color kompenzace musí být vždy provedena před každou novou genetickou analýzou, tzn. provádí se pouze jednou, ale zvlášť pro detekci polymorfismu MTHFR C677T a pro detekci polymorfismu MTHFR A1298C. Přístroj si pak uloží hodnoty pro každou další detekci uvedených polymorfismů a je pro daný kit zkalibrován.

Míchání reakcí pro RT-PCR probíhala v dekontaminovaném laminárním boxu za použití předem vychlazeného speciálního stojánku s adaptéry vyrobeného pro práci se skleněnými kapilárami. Všechny potřebné komponenty byly před zahájením práce zvortexovány a stočeny (Mini centrifuga/vortex MicroSpin V-2400, bioSan). Do první kapiláry (Roche) bylo přidáno 20 µl Blanku, do druhé 20 µl MasterMixu 530 a do třetí 20 µl MasterMixu 560 obsahujícího kontrolní PCR produkty. Všechny kapiláry byly uzavřeny plastovou zátkou, zcentrifugovány při otáčkách 10 tis. rpm po dobu cca 15 sek (Centrifuge 5415R, Eppendorf). Po tomto úkonu byly vyňaty z adaptéru a vloženy do optimální polohy do karuselu. Společně s ním byly dle návodu zasunuty do termocycleru (LightCycler 2.0 Instrument, Roche) připojenému k ovládací jednotce. V příslušném programu došlo k vytvoření PCR profilu dle návodu výrobce.

#### **POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE**

Samotná příprava PCR mixů také probíhala v dekontaminovaném laminárním boxu za použití vychlazeného stojánku pro kapilárové adaptéry. Všechny reagenty byly před zahájením práce zvortexovány a stočeny. Do 20 µl skleněných kapilár bylo napipetováno 18 µl MasterMixu a následně 2 µl izolátu DNA či 2 µl pozitivní kontroly (Tab. X). Výsledný objem jedné reakce byl 20 µl. Každý běh obsahoval 3 kapiláry s PK (wild-type, heterozygot, variantní homozygot), kapiláru s H<sub>2</sub>O jako NK a potřebný počet kapilár s izoláty DNA. Skleněné kapiláry byly po naplnění opatrně uzavřeny plastovou zátkou a šetrně centrifugovány za stejných podmínek jako v případě color kompenzace (viz výše).

**Tab. X: Složení reakčního MasterMixu užitého v metodě RT-PCR**

<b>REAGENCIE</b>	<b>OBJEM PRO 1 REAKCI (µl)</b>
MasterMix	18
Positive Control +/-	2
nebo Positive Control -/-	2
nebo Positive Control +/-	2
nebo Izolát DNA	2
<b>CELKOVÝ OBJEM 1 REAKCE</b>	<b>20 µl</b>

*pozn.: do každé kapiláry byl vždy napipetován MasterMix a poté jedna z PK či izolát DNA*

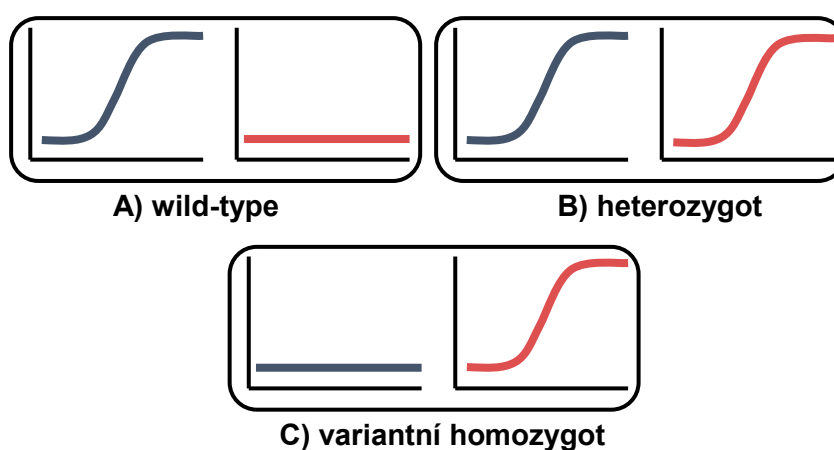
Skleněné kapiláry byly po stočení a kontrole vyjmuty z adaptéru a poté byly postupně vloženy do karuselu, který byl následně vložen do přístroje (LightCycler 2.0 Instrument, Roche). Zvolený PCR profil byl (podrobně v Tab. XI) byl pro oba polymorfismy totožný.

**Tab. XI: Amplifikační program metod RT-PCR pro MTHFR A1298C a C677T**

	POČET CYKLŮ	TEPLOTA	ČAS
POČÁTEČNÍ DENATURACE	1	95 °C	10 min
DENATURACE		95 °C	10 s
ANNEALING	40	64 °C	20 s
EXTENZE		72 °C	20 s

#### VYHODNOCOVÁNÉ SIGNÁLŮ

Po proběhlé amplifikaci bylo přistoupeno k vyhodnocení analýzy. To probíhalo na 2 kanálech – FAM a HEX. V případě wild-type genotypu byla detekována wild-type alela v kanálu FAM, byl-li nositel heterozygotem, byly detekovány obě alely – wild-type v kanálu FAM a variantní alela v kanálu HEX. V případě variantního homozygota je detekována variantní alela pouze v kanálu HEX (Obr. 4.3).



**Obr. 4.3: Vizualizace vyhodnocování amplifikačních křivek v kanálech 530 nm a 560 nm. A)** V případě wild-type genotypu je detekována wild-type alela v kanálu FAM; **B)** je-li nositel heterozygotem, jsou detekovány obě alely: wild-type v kanálu FAM a variantní alela v kanálu HEX; **C)** v případě variantního homozygota je detekována variantní alela pouze v kanálu HEX (zpracováno dle informačního letáku výrobce, GeneProof).

#### 4.1.5 STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT

Základní statistické zpracování probíhalo za použití programu Statistica 13.2. Ke zhodnocení procentuálních zastoupení jednotlivých genotypů u zkoumaných párů byla použita základní deskriptivní statistika (tabulka frekvencí).

Vliv faktorů na stupeň rizika byl hodnocen pomocí Mann-Whitney U testu na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ . Vysvětlovanou proměnnou byla kontinuální proměnná stupeň rizika (%) definovaná níže. Vysvětlující proměnné byly doba snahy o početí (roky), podstoupení interrupce, prodělání spontánního potratu po přirozeném početí, podstoupení metody AR,

užívání hormonální antikoncepce, užívání kys. listové a existence dětí se stejným/jiným partnerem. Všechny tyto faktory kromě faktoru doba snahy o početí měly binomické rozdělení (0/1).

Stupně rizika byly definovány jako procentuální ztráta aktivity enzymu MTHFR přepočítaná z Tab. II. Vzhledem k tomu, že pro genotypy CT/CC, TT/AC a TT/CC nebyla procentuální aktivita enzymu nikdy publikována, byly tyto hodnoty definovány uměle (viz Tab. XII). Udaných 100 % pro genotyp TT/CC je odvozen z předpokladu, že je tato konstituce zcela neživotaschopná. Stupně rizika párů pak byly formulovány jako průměrné hodnoty rizika pro ženu a muže z daného páru.

**Tab. XII: Kritéria definující stupně rizika (v %) užitých ke statistickému zpracování dat.** Údaje vychází z procentuální aktivity enzymu z Tab. II.

KOMBINOVANÝ GENOTYP	STUPEŇ RIZIKA [%]
CC/AA	0
CC/AC	17
CC/CC	69
CT/AA	34
CT/AC	52
CT/CC	80
TT/AA	75
TT/AC	85
TT/CC	100

U průkazných hodnot bylo užito neparametrického Spearmanova koeficientu pořadové korelace, který udává sílu vztahu mezi dvěma veličinami. Nadále byly statisticky porovnávány získané frekvence genotypů a alel obou skupin (výzkumné a kontrolní).

## 4.2 VÝSKYT POLYMORFISMŮ V GENU *MTHFR* V RÁMCI KONTROLNÍ SKUPINY

Pro tuto část práce byli použiti klienti genetické laboratoře GENLABS a sloužili jako kontrolní skupina reprezentující českou populaci.

#### 4.2.1 ODBĚR A ZPRACOVÁNÍ MATERIÁLU

Všechny výsledky detekce dvou nejznámějších polymorfismů C677T a A1298C v genu *MTHFR* zpracované v této části práce byly poskytnuty genetickou laboratoří GENLABS. Sběr podkladů probíhal od roku 2014 až do ledna 2018.

##### ODBĚR A IZOLACE DNA

Odběr bukálních stěrů si zajistili vyšetřovaní sami za pomoci bukální sady Isohelix (112 vyšetřovaných, 94 %), u zbylých 6 % (7 vyšetřovaných) byl odborně proveden odběr plné krve kvalifikovaným pracovníkem v akreditované odběrové laboratoři, se kterou genetická laboratoř dlouhodobě spolupracuje. Následně bylo přistoupeno k izolaci DNA v návaznosti na původ primárního vzorku – izolace DNA z bukálního stěru či izolace DNA z plné krve, a to vždy dle doporučení výrobce.

##### *IZOLACE DNA Z BUKÁLNÍHO STĚRU*

Postup shodný jako v kapitole 4.1.3 (str. 24).

##### *IZOLACE DNA Z PLNÉ KRVE*

Izolace z plné krve probíhala za použití PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). Přehledný soupis reagensů s jednotlivými objemy jsou k nalezení v následující tabulce (Tab. XIII).

**Tab. XIII: Použité reagensy a jejich objemy pro izolaci DNA z plné krve za použití Genomic DNA Mini Kit**

REAGENCIE	OBJEM 1 IZOLACE (μl)
RBC Lysis buffer	900 + 100
GT Buffer	200
96% ethanol	200
W1 Buffer	400
Wash Buffer	600
Elution Buffer	50

Před započítáním izolace bylo na doporučení výrobce potřeba zkontrolovat, zdali byl do Wash Bufferu přidán ethanol, a následně vytemperovat termostát (TDB-120, Dry block thermostat, bioSan) na 60 °C. Do vytemperovaného termostátu byla vložena 1,5 ml mikrozkušavka s Elution Bufferem, aby se tak eluční pufr mohl předehřát na požadovanou

teplotu. Následně byly připraveny a řádně popsány 1,5 ml mikrozkušavky určené pro jednotlivé vzorky.

Do připravené 1,5 ml mikrozkušavky bylo napipetováno vždy 300  $\mu$ l plné krve, k tomuto objemu bylo přidáno 900  $\mu$ l RBC Lysis Bufferu a výsledná směs byla promíchána pouhým převrácením v ruce. Následně probíhala inkubace po dobu 10 min při RT, po které byly mikrozkušavky zcentrifugovány (Centrifuge 5415R, Eppendorf) při 3 tis. ot./min po dobu 5 min. Supernatant byl opatrně odebrán a peleta ponechána, aby byla následně resuspendována za použití 100  $\mu$ l RBC Lysis Bufferu. Poté bylo přidáno 200  $\mu$ l GT Bufferu, vše bylo zvortexováno a krátce stočeno (Mini centrifuga/vortex MicroSpin V-2400, bioSan). Proběhla další inkubace, tentokrát v termostatu při 60 °C po dobu 15 min. Během inkubace bylo nutné každé 3 minuty všechny mikrozkušavky ručně převrátit, aby se tak inkubovaná směs promíchala. Po inkubaci bylo okem patrné, že se lyzát projasnil.

K lyzátu bylo přidáno 200  $\mu$ l 96% ethanolu a opět se celá směs zvortexovala a krátce stočila. Poté byl celý objem přepipetován na kolonku (GD Column), která byla vložena do čisté sběrné zkumavky (2 ml Collection Tube) a centrifugována při 13,5 tis. ot./min po dobu 5 minut. Po centrifugaci byla kolonka přendána do nové čisté sběrné zkumavky. Přímo na kolonku s navázanou DNA bylo napipetováno 400  $\mu$ l W1 Bufferu a zkumavky s kolonkami byly centrifugovány při 13,5 tis. ot./min po dobu 30 sekund. Ze sběrné zkumavky byl odstraněn supernatant a následně bylo na kolonku napipetováno 600  $\mu$ l Wash Bufferu. Obsah sběrné zkumavky byl opět po centrifugaci dekantován a po navrácení kolonky do sběrné zkumavky proběhla centrifugace 13,5 tis. ot./min po dobu 3 minut, aby došlo k úplnému odstranění promývacího pufu. Kolonka musela být suchá. Pokud se tak nestalo, byla předešlá centrifugace opakována.

Suchá kolonka byla přemístěna do čisté řádně označené 1,5 ml mikrozkušavky, doprostřed na filtr kolonky bylo přidáno 50  $\mu$ l Elution Bufferu vytemperováno na požadovaných 60 °C a zkumavky byly inkubovány při RT nejméně 3 minuty a finálně centrifugovány při 13,5 tis. ot./min po dobu 30 s.

#### ***MĚŘENÍ KONCENTRACE IZOLOVANÉ DNA***

Měření koncentrace probíhalo shodně jako v kapitole 4.1.3 (str. 25).



#### 4.2.2 CHARAKTERISTIKA ZKOUMANÉ POPULACE

Z údajů poskytnutých genetickou laboratoří GENLABS byly vyselektovány pouze výsledky od osob, které si nechaly vyšetřit oba polymorfismy v genu *MTHFR* (*MTHFR* C677T i *MTHFR* A1298C).

#### 4.2.3 ANALÝZA DAT

Pro detekci obou polymorfismů byly použity metody PCR-RFLP, Real-Time PCR (metodický postup je uveden v kapitole 4.1.4 na str. 30) a metoda reverzní hybridizace na stripu.

#### REVERZNÍ HYBRIDIZACE NA STRIPU

Další užitou metodou detekce polymorfismů enzymu *MTHFR* byla reverzní hybridizace na stripu za použití certifikovaného kitu CVD Strip Assay (ViennaLab) dle protokolu výrobce.

Principem metody je pomocí multiplex PCR s biotinem značenými primery amplifikovat cílové sekvence genů, které následně hybridizují ke specifickým oligonukleotidům imobilizovaným na proužcích stripu. Specifická hybridizace je vizualizována pomocí streptavidin-alkalické fosfatázy a barevného substrátu obsahující chromogen (BCIP/NTB).

CVD Strip Assay umožňuje detekovat změny v genech pro FV Leiden, FV R2 haplotyp, protrombin, FXIII,  $\beta$ -fibrinogen, PAI-1, HPA-1, *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, ACE, ApoB, ApoE. Pro naše účely však byly použity údaje pouze pro polymorfismy v genu *MTHFR*.

#### POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Pro každý vzorek byly připraveny a řádně popsány dvě 0,2 ml mikrozkušavky. Podstatným krokem bylo naředění *Taq* polymerázy na potřebnou koncentraci 0,2 U/ $\mu$ l, a to smícháním 0,4  $\mu$ l *Taq* polymerázy a 9,6  $\mu$ l *Taq* Dilution Bufferu pro jeden vzorek.

Celá práce probíhala v chladícím stojánku v dekontaminovaném laminárním boxu, kdy byly nejdříve pro všechny vzorky připraveny 2 zásobní roztoky označené jako „mix A“ a „mix B“. Mix A obsahoval 15  $\mu$ l Amplification mix A a 5  $\mu$ l naředěné *Taq* polymerázy pro každý vzorek. Mix B pak obdobně obsahoval 15  $\mu$ l Amplification mix B a 5  $\mu$ l naředěné *Taq* polymerázy. Do jedné 0,2 ml mikrozkušavky bylo napipetováno 20  $\mu$ l mixu A a do druhé následně 20  $\mu$ l mixu B, k oběma pak bylo přidáno po 5  $\mu$ l DNA (Tab. XIV). Do mikrozkušavky, která sloužila jako NK, byla přidána H<sub>2</sub>O. Všechny mikrozkušavky byly zvortexovány, krátce stočeny a vloženy do termocykleru za spuštění příslušného PCR programu (Tab. XV).

**Tab. XIV: Použité reagensie a jejich objemy PCR pro metodu reverzní hybridizace na stripu (CVD Strip Assay, ViennaLab)**

REAGENCIE	OBJEM 1 REAKCE (μl)
<i>Taq</i> Polymerase	0,4 (0,2 U/μl)
<i>Taq</i> Dilution Buffer	9,6
Amplification mix A	15
Amplification mix B	15

**Tab. XV: Amplifikační profil pro metodu reverzní hybridizace na stripu (CVD Strip Assay, ViennaLab)**

	POČET CYKLŮ	TEPLOTA	ČAS
POČÁTEČNÍ DENATURACE	1	94 °C	120 s
DENATURACE		94 °C	15 s
ANNEALING	35	58 °C	30 s
EXTENZE		72 °C	30 s
TERMINÁLNÍ EXTENZE	1	72 °C	180 s

#### VIZUALIZACE PCR PRODUKTŮ

Po skončení příslušného PCR programu byla na řadě vizualizace vzniklých PCR produktů pomocí gelové elektroforézy. Ta byla obdobně jako v kapitole 4.1.4 (str. 27) provedena na 4% nebarveném agarózovém gelu. Do jamek bylo nanášeno 5 μl PCR produktu mixu A, 5 μl PCR produktu mixu B a 5 μl hmotnostního markeru.

Po skončení separace PCR produktů (při 135 V po dobu 15 minut) byla provedena pomocí dokumentačního systému kontrola správné amplifikace příslušných fragmentů (Tab. XVI) a fotografie gelu byla uložena.

**Tab. XVI: Výsledné fragmenty PCR produktů pro metodu reverzní hybridizace na stripu**

	MIX A	MIX B
DÉLKA FRAGMENTŮ PCR PRODUKTŮ	324+297+254+223+202+173+156+134 bp	346+283+248+225 bp

#### HYBRIDIZACE

Před samotným zahájením hybridizace bylo nutné vytemperovat vodní lázeň (WSB-18, WiseBath) na 46 °C a zkontrolovat vodní hladinu, aby během hybridizace dosahovala minimálně do poloviny výšky hybridizačního korýtka. Do lázně byly vloženy nádoby s

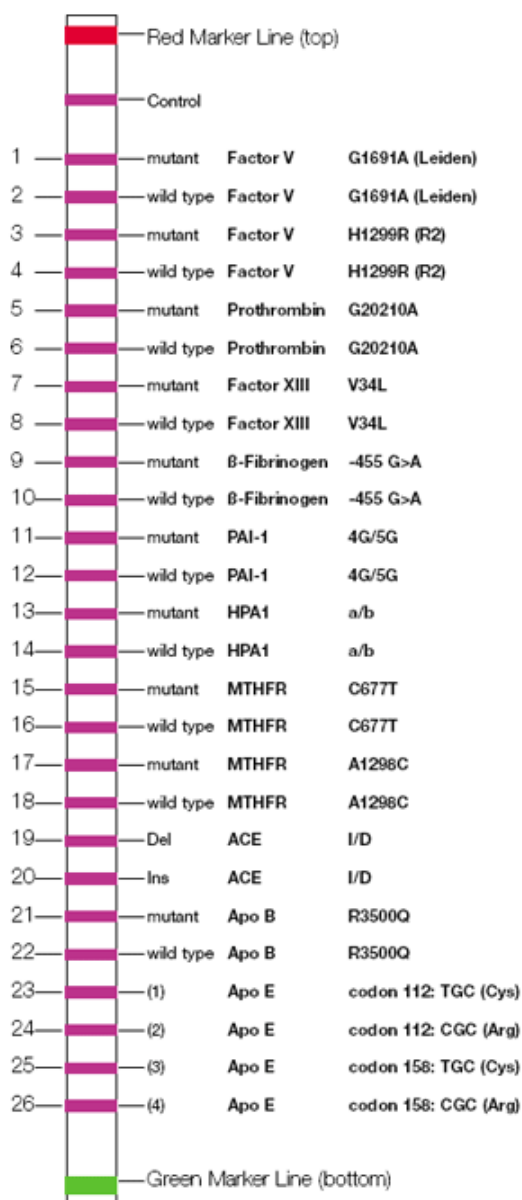
Hybridization Buffer a Wash Solution, aby se zahřály na požadovanou teplotu. Testovací proužky (dále stripy), DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B a Color Developer se nechaly vytemperovat na RT. Výměna jednotlivých roztoků probíhala rychle proto, aby nedocházelo k oschnutí stripu.

**Tab. XVII: Použité reagensie a jejich objemy použité pro hybridizaci metodou reverzní hybridizace na stripu (CVD Strip Assay, ViennaLab)**

<b>REAGENCIE</b>	<b>OBJEM 1 REAKCE (<math>\mu</math>l)</b>
DNAT	10
Amplification mix A	10
Amplification mix B	10
Hybridization Buffer	1 000
Wash Solution A	1 000 + 1 000 + 1 000
Conjugate Solution	1 000
Wash Solution B	1 000 + 1 000 + 1 000
Color Developer	1 000

Do hybridizačního korýtko bylo napipetováno 10  $\mu$ l DNAT, přímo do kapky DNAT přidáno 10  $\mu$ l Amplification mixu A a 10  $\mu$ l Amplification mixu B. Roztok, který zůstal modrý, byl inkubován při RT po dobu 5 minut. Následně byl přidán 1 ml Hybridization Buffer vytemperovaného na 46 °C, kdy po jemném zatřepání korýtkem zmizelo modré zbarvení roztoku. Pinzetou byl vložen popsáný strip do hybridizačního korýtko, které se následně nechalo inkubovat při 46 °C ve vodní lázni po dobu 30 min za pomalého třepání (přibližně 50 rpm). Po uplynutí inkubační doby byl pipetou odstraněn hybridizační roztok a přidán 1 ml Wash Solution A. Strip v něm byl ponechán pouze 10 s a roztok byl odstraněn pipetou. Znovu byl do korýtko napipetován 1 ml Wash Solution A a tentokrát se korýtko nechalo inkubovat po dobu 15 min. při 46 °C s třepáním cca 50 rpm. Tento krok byl ještě dvakrát zopakován. Po odstranění Wash Solution A byl přidán 1 ml Conjugate Solution a korýtko bylo inkubováno na třepačce při RT po dobu 30 min. Po odsátí tekutiny bylo napipetován 1 ml Wash Solution B a po 10 s došlo k jeho odsátí. Znovu se napipetoval 1 ml Wash Solution B a korýtko se nechalo inkubovat po dobu 5 min na třepačce. Tento krok byl ještě dvakrát zopakován. Po odstranění Wash Solution B byl do korýtko přidán 1 ml Color Developer, inkubace probíhala na třepačce ve tmě a při RT za občasného ručního protřepání, a to po dobu 15 min. V případě pozitivní reakce se proužky zbarvily fialově. Před odečtením výsledků byly tyto detekční

proužky opláchnuty destilovanou vodou a vysušeny filtračním papírem. Stripy jsou v laboratoři archivovány.



Obr. 4.4: Vzorové uspořádání testovacího proužku z metody reverzí hybridizace na stripu (CVD Strip Assay, ViennaLab).

Převzato z <http://skafte.se/products/viennalab/images/cvdstripassay.gif>.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 POLYMORFISMY V GENU *MTHFR* V RÁMCI VÝZKUMNÉ SKUPINY PÁRŮ A JEJICH ASOCIACE S RPL A STERILITOU

Koncentrace DNA u izolovaných vzorků se pohybovala v rozmezí od 4,16 do 299 ng/μl (podrobný přehled naměřených koncentrací u jednotlivých vzorků viz Příloha 7), což bylo pro použitou metodu PCR-RFLP dostačující, nebylo tedy nutné účastníky studie žádat o nový odběr.

#### 5.1.1 ZHODNOCENÍ DOTAZNÍKOVÉHO ŠETŘENÍ

##### OBECNÉ INFORMACE O ÚČASTNÍCÍCH

Průměrný věk žen, které byly zařazeny do studie, byl 33 let a mužů 37 let. Podrobný rozpis následujících informací pro jednotlivé páry je k nalezení v příloze (Příloha 8 a Příloha 9).

##### SNAHA O POČETÍ

Až na jedinou respondentku, která udala, že se aktivně o početí nesnaží, byla průměrná doba snahy o početí stanovena na necelé 3 roky. Dvě z žen se snaží o početí se svými partnery 6 a 7 let, ovšem pouze druhá z žen je v péči lékařů AR. Celkově se v souboru vyskytuje 13 žen, které se svou snahou o početí začaly po 30. roce života, přičemž 5 z nich až ve 35. roce života či ještě později.

##### PRODĚLANÉ POTRATY

##### UMĚLÉ UKONČENÍ TĚHOTENSTVÍ

Umělé ukončení těhotenství (interrupci) podstoupilo celkem 6 žen (33 %), z nichž 1 z žen uvedla, že tak učinila z osobních důvodů, a to v 15 letech na přání matky, a 1 žena dokonce nesdělila žádný konkrétní důvod či komplikaci, které by ji k takovému rozhodnutí vedly. U zbylých 4 žen bylo umělé ukončení těhotenství indikováno ze zdravotních důvodů.

U 2 žen, které podstoupily interrupci ze zdravotních důvodů, bylo těhotenství ukončeno v 1. trimestru těhotenství, u 1 ženy ve 2. trimestru a u 1 jak v 1. tak i ve 2. trimestru. U 2 z žen (11 %), bylo ukončení doporučeno jen jednou. U první ženy byla důvodem *mola hydatinosa*<sup>4</sup> a u druhé z žen genetická vada plodu, v tomto případě došlo k ukončení těhotenství ve 2. trimestru, přesněji v 19. týdnu. U 2 žen (11 %) bylo těhotenství ukončeno dvakrát, u první ženy bylo v obou případech prokázáno zamlklé těhotenství a druhá žena své

---

<sup>4</sup> v děloze se z vajíčka vyvíjí abnormální zárodek, který není schopný samostatného života

důvody neuvědla. Jedna z žen podstoupila v konečném souhrnu celkem tři interrupce (první dvě v 1. trimestru a poslední ve 2. trimestru). U prvního přerušení byl indikací zamlklý potrat, u druhého byl pozorován žloutkový váček bez plodu a ve třetím případě účastnici začala v 17. týdnu těhotenství odtékat plodová voda (Tab. XVIII).

**Tab. XVIII: Souhrnné zastoupení žen, které podstoupily umělé ukončení těhotenství**

DŮVOD UKONČENÍ TĚHOTENSTVÍ	CELKOVÝ POČET	1. TRIMESTR			2. TRIMESTR			OBA TRIMESTRY		
		1×	2×	3×	1×	2×	3×	1×	2×	3×
		ZDRAVOTNÍ DŮVODY	4	1	1	×	1	×	×	×
OSOBNÍ DŮVODY	1	1	×	×	×	×	×	×	×	×
BEZ UDÁNÍ DŮVODU	1	×	1	×	×	×	×	×	×	×
<b>CELKEM</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>×</b>	<b>1</b>	<b>×</b>	<b>×</b>	<b>×</b>	<b>×</b>	<b>1</b>

\*2× v 1. trimestru a 1× ve 2. trimestru

#### *SPONTÁNNÍ POTRATY PO PŘIROZENÉM POČETÍ*

9 žen (50 %) udalo, že v minulosti prodělalo spontánní potrat po přirozeném početí (PP). Ve 3 případech se jednalo o jeden samovolný potrat po PP (16,6 %), u 5 žen byl spontánní potrat po PP prodělán dvakrát a u 1 ženy byly prokázány tři samovolné potraty po PP. Ve všech případech se jednalo o samovolný potrat v 1. trimestru těhotenství (Tab. XIX).

**Tab. XIX: Souhrnné zastoupení žen, které prodělaly spontánní potrat po přirozeném početí**

	CELKOVÝ POČET	1. TRIMESTR		
		1×	2×	3×
SPONTÁNNÍ POTRAT PO PŘIROZENÉM POČETÍ	9	3	5	1

#### *SPONTÁNNÍ POTRATY PO LÉČBĚ NEPLODNOSTI*

Pouze 1 pár prodělal 2 detekované spontánní potraty. V jednom případě po IVF a v tom druhém po ET.

#### *LÉČBA NEPLODNOSTI METODAMI ASISTOVANÉ REPRODUKCE*

10 párů (55,56 %) uvedlo, že podstoupilo alespoň jednu z metod léčby neplodnosti (Tab. XX). Pouze u jedné ženy byly jako důvod neplodnosti určeny endometrióza a neprůchodnost

vaječníků. U 6 párů (33,33 %) nebyla příčina odhalena, byla tedy přiřazena diagnóza idiopatické sterility, přičemž u 3 párů se jednalo o sekundární idiopatickou sterilitu. Zbylé páry důvod své léčby v dotazníku nevyplnily.

Metodu umělé inseminace IUI podstoupilo 6 párů (33,3 %). U dvou párů (11,1 %) bylo k této metodě přistoupeno dokonce pětkrát. U zbylých párů byl pro metodu IUI ve 2 případech podstoupen pouze 1 pokus, u 1 páru byl pokus opakován dvakrát a u jednoho páru třikrát. Celkově se pouze jednomu páru podařilo díky této metodě otěhotnět (5,5 %; pár 6 při 1. pokusu v říjnu 2014).

Embryotransfer celkově podstoupilo také 6 párů (33,3 %), z nichž 2 páry podstoupily pouze ET, 2 páry pouze KET a 2 páry obě z možností. Ve všech případech byl ET podstoupen pouze jedenkrát. 2 páry se podrobily dvěma KET, přičemž jeden z nich dokonce čtyřikrát, ovšem u tohoto páru (pár 4) se metodou ICSI a následně KET podařilo po třetím pokusu v září 2013 otěhotnět.

3 páry (16,67 %) byly schopné detailně uvést, jaká z metod IVF přenosu embryí předcházela. Jednalo se o metodu ICSI, kdy 2 z těchto párů prošly IVF cyklem jedenkrát a poslední pár třikrát. Jeden z párů dokonce vůbec nevedl, že některou z metod IVF podstoupil. Zbylé 2 páry metodu nespecifikovaly, ale IVF cyklus podstoupily pouze jednou.

**Tab. XX: Souhrnné zastoupení podstoupených metod AR u jednotlivých párů**

METODA	IVF			IUI				ET		KET	
	1x	2x	3x	1x	2x	3x	5x	1x	1x	2x	4x
pár 3	x	x	x	x	x	✓	x	x	x	x	x
pár 4	x	✓	x	✓	x	x	x	x	x	x	✓
pár 5	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x	x
pár 6	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x	x
pár 7	✓	x	x	x	x	x	x	✓	x	x	x
pár 8	x	x	x	x	✓	x	x	x	x	x	x
pár 11	✓	x	x	✓	x	x	x	✓	x	x	x
pár 12	✓	x	x	x	x	x	x	✓	x	✓	x
pár 14	x	x	✓	x	x	x	x	x	x	✓	x
pár 16	x	x	x	x	x	x	x	✓	✓	x	x
	3	1	1	2	1	1	2	4	1	2	1
<b>CELKEM</b>	<b>5*</b>			<b>6</b>				<b>6</b>			

\*jeden z párů (pár 16) nevedl, kolikrát IVF podstoupil

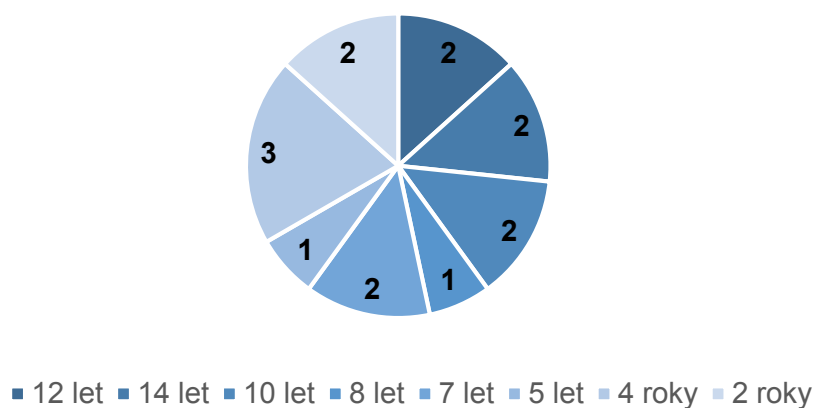
### KARYOTYP

Celkově 4 páry uvedly, že mají vyšetřen karyotyp. U 3 z nich se jednalo o normální ženský (46, XX) i normální mužský (46, XY) karyotyp. Jedna z respondentek sice zaškrtnula možnost, že mají s partnerem karyotyp vyšetřen, výsledky vyšetření ale nevedla.

### DOPLŇUJÍCÍ INFORMACE

#### HORMONÁLNÍ ANTIKONCEPCE

3 ženy (16,6 %) nikdy neužívaly hormonální antikoncepci. Průměr všech udaných roků od zbylých 15 žen činil téměř 8 let, přičemž 2 uživatelky s nejdelším intervalem udaly 14 let, ty s nejkratším 2 roky. Jedna žena uvedla, že HAK užívala dvakrát s odstupem 2 let, v obou případech po dobu 1 roku (Obr. 5.1).



**Obr. 5.1: Interval užívání HAK u účastnic studie.** Zobrazené hodnoty jsou počty uživatelek, které užívaly HAK v určitém intervalu (roky).

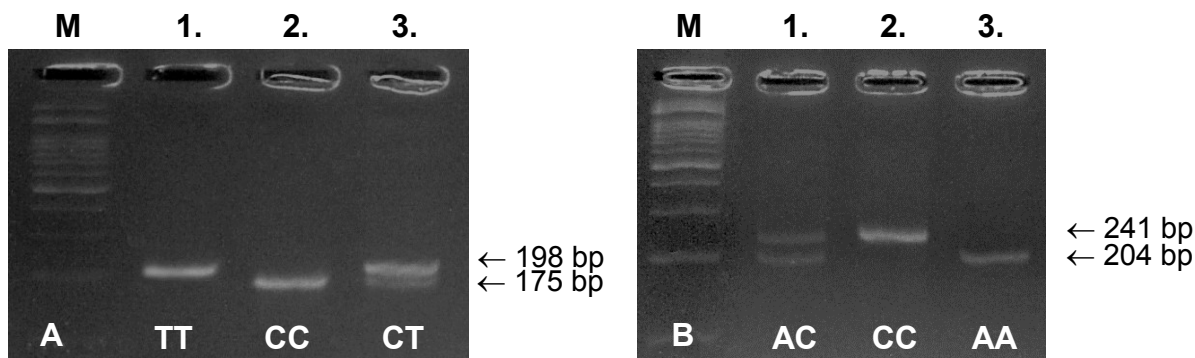
#### KYSELINA LISTOVÁ

14 žen (78 %) uvedlo, že v současné době užívá kyselinu listovou, z mužů pak užívání kys. listové nevedl žádný.



### 5.1.2 VÝSLEDKY ANALÝZY DAT A JEJICH STATISTICKÉHO ZPRACOVÁNÍ RESTRIKČNÍ ŠTĚPENÍ

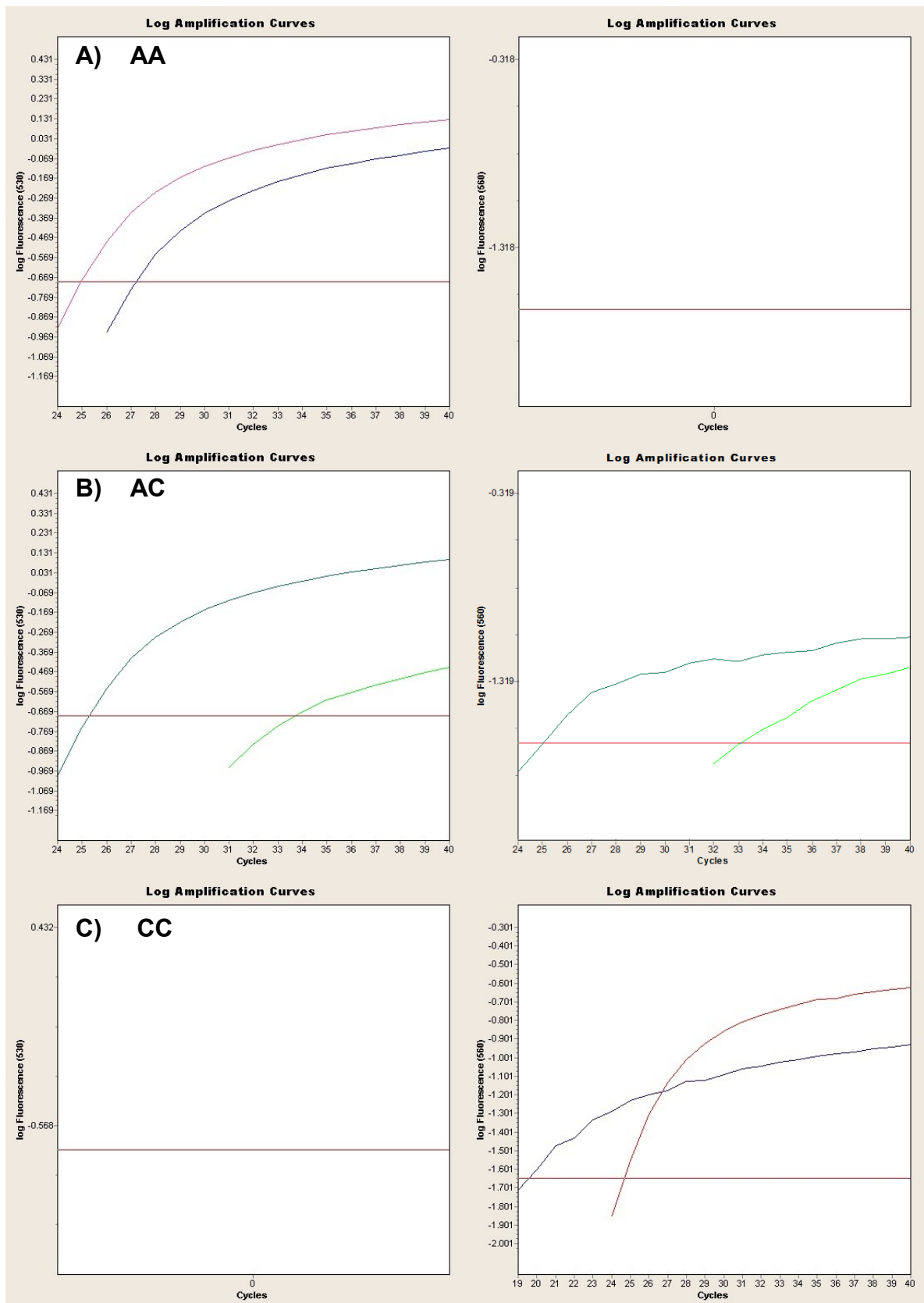
Následující gely získané metodou PCR-RFLP pro polymorfismy MTHFR C677T a A1298C vyobrazují vždy 3 konstituce (Obr. 5.2).



**Obr. 5.2: Výsledné gely po metodě PCR-RFLP.** Nejkratší fragmenty pro oba polymorfismy (23 bp a 37 bp) nejsou viditelné. **A)** M – marker; 1. jamka zobrazuje neštěpený fragment o délce 198 bp, což značí nepřítomnost variantní alely T (CC); 2. jamka zobrazuje neštěpený fragment o délce 175 bp, který dokládá přítomnost 2 variantních alel T (TT) a 3. jamka pak štěpené fragmenty o délce 198 a 175 bp – což poukazuje na přítomnost jedné variantní alely T (heterozygot CT). **B)** M – marker; 1. jamka zobrazuje fragmenty o délce 241 a 204 bp, což poukazuje na přítomnost jedné variantní alely C (heterozygot AC); 2. jamka zobrazuje neštěpený fragment o délce 241 bp, který dokládá přítomnost 2 variantních alel C (CC) a 3. jamka fragment o délce 204 bp, což značí nepřítomnost variantní alely C (AA).

#### RT-PCR

Jako ukázka výsledků analýzy metodou RT-PCR jsou použity následující zlogaritmované amplifikační křivky pro jednotlivé genotypy polymorfismu A1298C (Obr. 5.3).



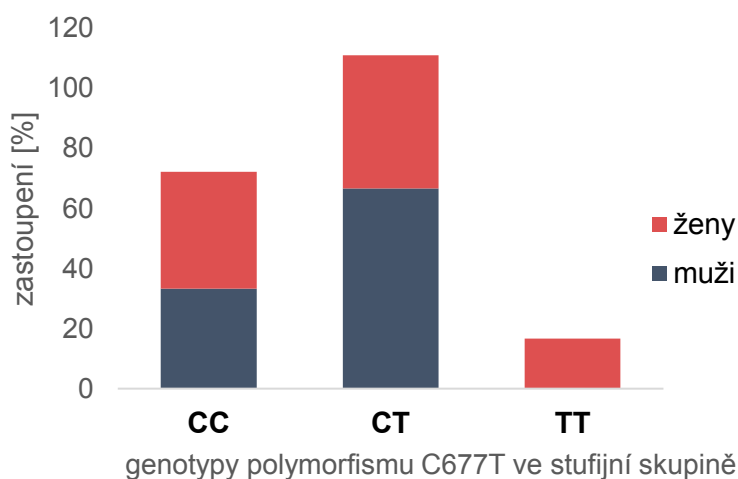
**Obr. 5.3:** Výsledné zlogaritmované křivky získané metodou RT-PCR v kanálech FAM (vlevo) a HEX (vpravo). Jedna z přítomných křivek vždy značí užitou PK. A) výsledný wild-type genotyp 1298AA; B) heterozygotní genotyp 1298AC; C) variantní genotyp 1298CC.

### 5.1.3 VÝSKYT GENOTYPŮ POLYMORFISMŮ MTHFR

Analýza polymorfismů v genu *MTHFR* byla provedena vždy u obou partnerů z páru. Jednotlivé výsledky jsou pokaždé přehledně zaznamenány v tabulkách, které jsou k nahlédnutí v Příloze, a vizualizovány v grafech.

#### MTHFR C677T

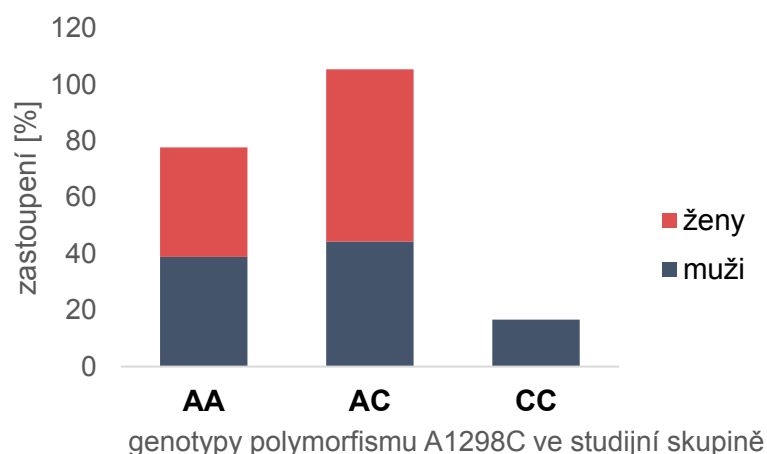
Z celkové studované skupiny (18 žen a 18 mužů) byly pro polymorfismus C677T nalezeny následující genotypy. Genotyp 677CC byl nalezen u 7 žen (38,89 %) a 6 mužů (33,33 %), heterozygotní genotyp 677CT u 8 žen (44,44 %) a 12 mužů (66,67 %) a přítomnost dvou variantních alel 677TT byla detekována pouze u 3 žen (16,67 %), u mužů se tato varianta neprokázala (Obr. 5.4).



**Obr. 5.4:** Procentuální zastoupení detekovaných genotypů polymorfismů C677T u žen a mužů ze studijní skupiny

#### MTHFR A1298C

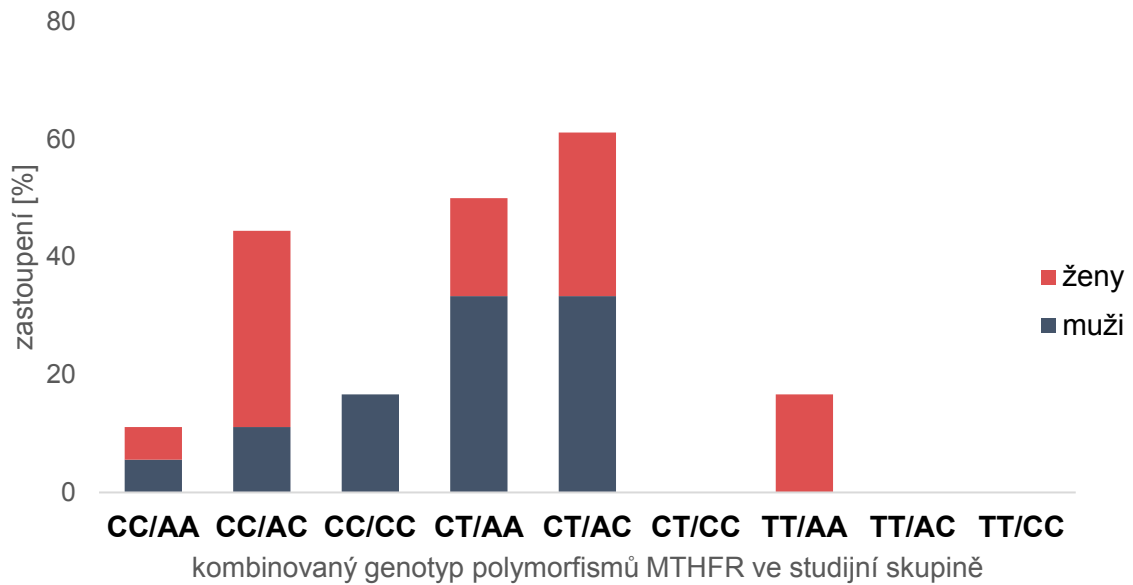
Genotyp 1298AA byl detekován shodně u 7 žen (38,89 %) a 7 mužů (38,89 %), heterozygotní konstituce 1298AC u 11 žen (61,11 %) a 8 mužů (44,44 %) a konstituce 1298CC nebyla u žen nalezena vůbec a mužů ve 3 případech (16,67 %), (Obr. 5.5).



**Obr. 5.5: Procentuální zastoupení detekovaných genotypů polymorfismů A1298C u žen a mužů ze studijní skupiny**

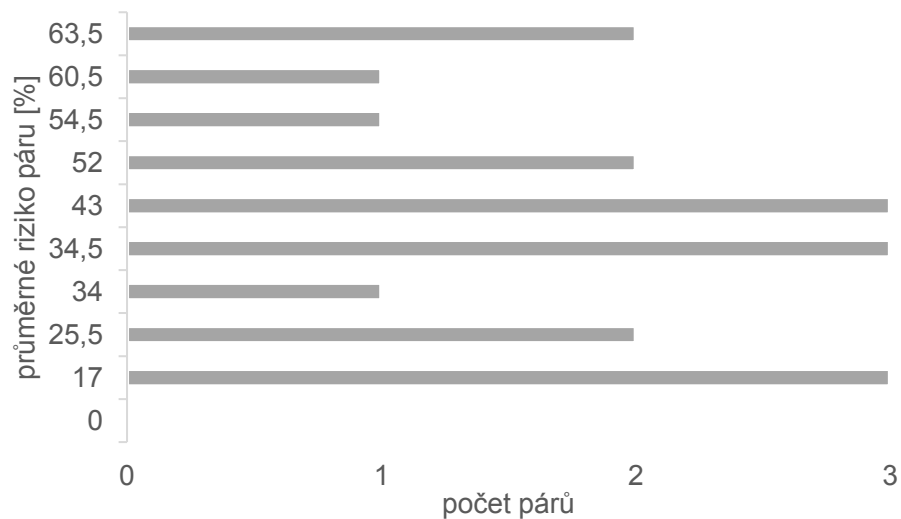
#### KOMBINOVANÝ GENOTYP

V případě kombinovaných genotypů obou polymorfismů MTHFR C677T a A1298C byly detekovány následující genotypy (Obr. 5.6). Nositeli kombinovaného genotypu CC/AA byli pouze 1 žena (5,6 %) a 1 muž (5,56 %), nositeli kombinovaného genotypu CC/AC bylo 6 žen (33,33 %) a 2 muži (11,11 %). Kombinovaný genotyp CC/CC nebyl v případě žen nalezen a u mužů byl nalezen ve 3 případech (16,67 %). Konstituce CT/AA byla zjištěna u 3 žen (16,67 %) a 6 mužů (33,33 %). Heterozygotní kombinace pro oba polymorfismy CT/AC byla zastoupena u 5 žen (27,8 %) a 6 mužů (33,3 %). Výskyt obou variantních alel T pro polymorfismus C677T byl detekován pouze v konstituci TT/AA u 3 žen (16,7 %). Cis konfigurace (CT/CC, TT/AC, TT/CC) nebyly nalezeny u žádného jedince této skupiny.



**Obr. 5.6: Výskyt kombinovaných genotypů polymorfismů MTHFR C677T a A1298C u žen a mužů ze studijní skupiny párů**

Výsledné shrnutí nalezených kombinovaných genotypů přiřazených k jejich nositeli jsou k nahlédnutí v tabulce v příloze (Příloha 13). Z té je také patrné, jaké genotypy mají žena i muž z jednoho páru, ze kterých bylo vytvořeno průměrné riziko páru (Obr. 5.7).



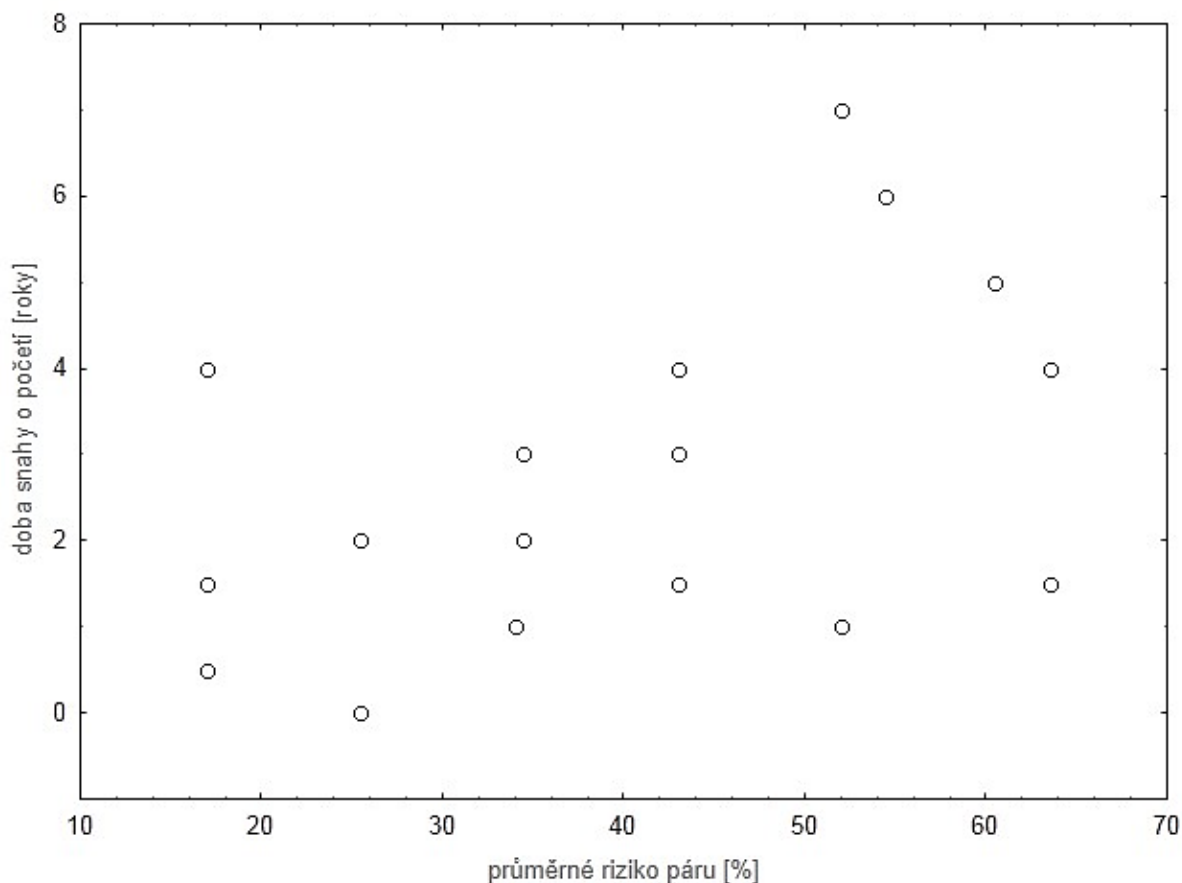
**Obr. 5.7: Průměrná rizika párů ze studijní skupiny**

### 5.1.4 KORELAČNÍ VZTAHY S JEDNOTLIVÝMI FAKTORY

Po provedení Mann-Whitneyova U testu byly výsledky všech proměnných neprůkazné (Tab. XXI). Jedinou proměnnou s indikativním vlivem ( $p = 0,055$ ) byl faktor doba snahy o početí (roky), kdy se zvyšujícím se průměrným rizikem páru stoupá i doba snahy o početí (Obr. 5.8).

Tab. XXI: Vliv faktorů na stupeň rizika (Mann-Whitney U test)

PROMĚNNÁ	U	P-VALUE
INTERRUPCE	30,5	0,639
SPONTÁNNÍ POTRAT PO PŘIROZENÉM POČETÍ	33,5	0,594
IVF	36,0	0,856
HORMONÁLNÍ ANTIKONCEPCE	19,5	0,767
KYS. LISTOVÁ	21,0	0,490
DĚTI SE STEJNÝM/INÝM PARTNEREM	28,5	0,390



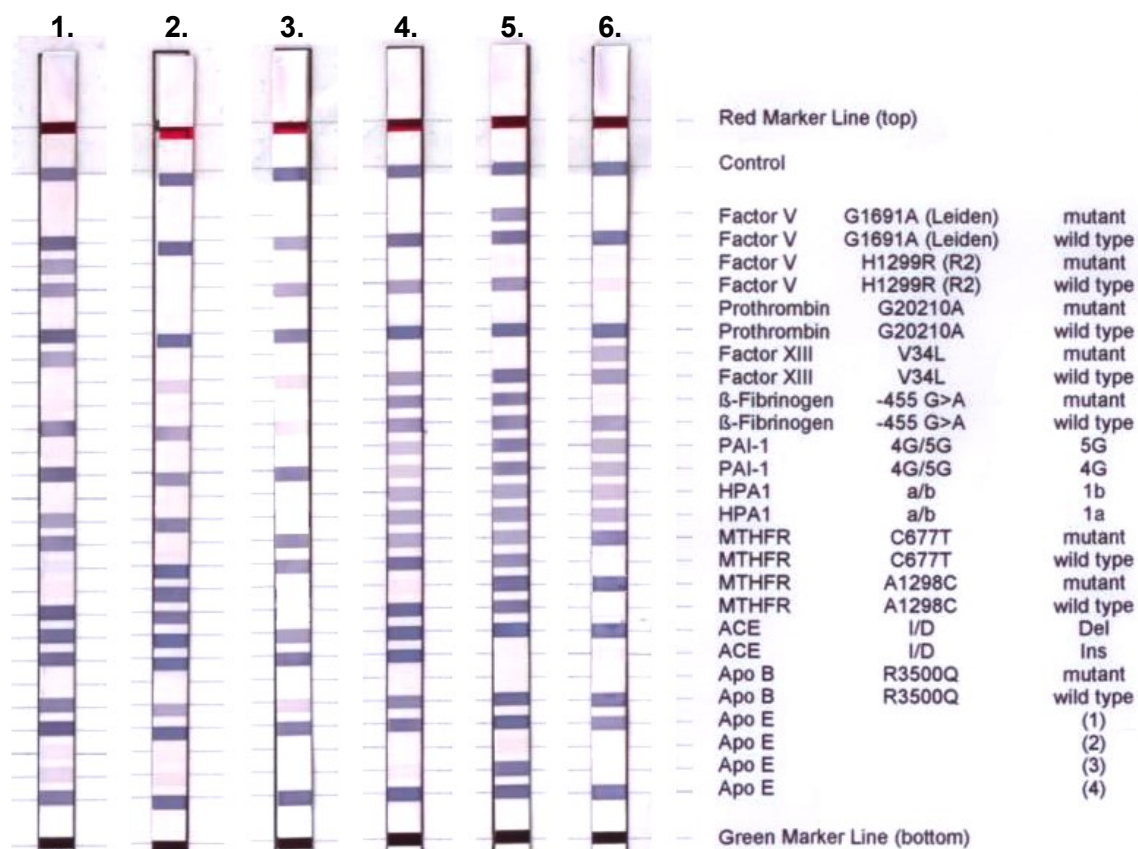
Obr. 5.8: Korelační vztah mezi průměrným rizikem páru a dobou snahy o početí.  $n = 18$ ; Spearman's Rank-Order Correlation,  $r_s = 0,46$ ;  $p = 0,055$ .

## 5.2 VÝSKYT POLYMORFISMŮ V GENU *MTHFR* V RÁMCI KONTROLNÍ SKUPINY

### 5.2.1 VÝSLEDKY ANALÝZY DAT

#### REVERZNÍ HYBRIDIZACE NA STRIPU

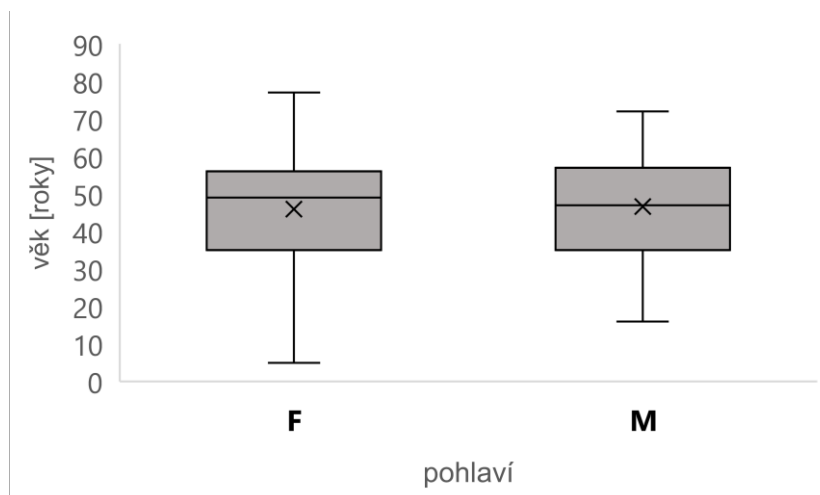
Ukázka získaných stripů metodou reverzní hybridizace je k vidění na následujícím obrázku (Obr. 5.9).



**Obr. 5.9:** Ukázka získaných genotypů polymorfismů C677T a A1298C v genu *MTHFR* pomocí reverzní hybridizace na stripu (CVD Strip Assay, ViennaLab). Jednotlivé stripy zobrazují následující nalezené *trans* konstituce: 1. CC/AA; 2. CC/AC; 3. CC/TT; 4. CT/AA; 5. CT/AC a 6. TT/AA.

## CHARAKTERISTIKA ZKOUMANÉHO SOUBORU

V této části práce byl na polymorfismy enzymu MTHFR analyzován soubor čítající 114 osob, z nichž se v 77 případech jednalo o ženu a ve zbylých 37 o muže. Průměrný věk žen byl shodně stanoven na 46 let u obou pohlaví (Obr. 5.10).



**Obr. 5.10:** Věkové rozložení zkoumaného souboru z kontrolního souboru pro jednotlivá pohlaví. ‚F‘ značí ženy a ‚M‘ muže. Medián pro obě pohlaví roven 49 letům.

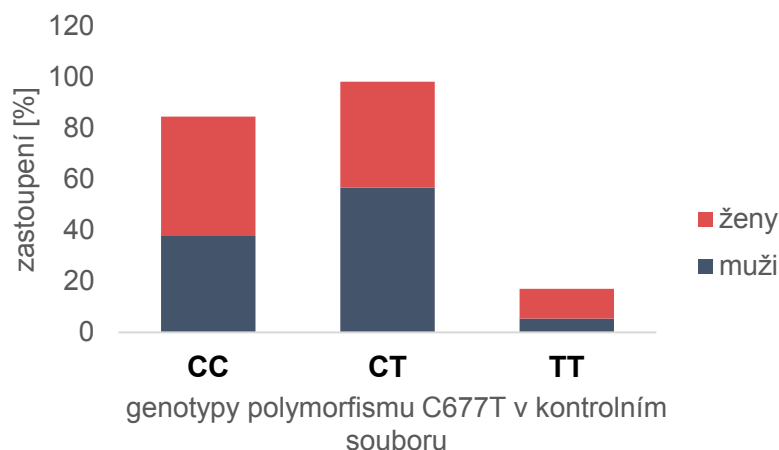
### 5.2.2 VÝSKYT GENOTYPŮ POLYMORFISMŮ MTHFR

#### MTHFR C677T

Pro českou populaci bylo ve zkoumaném souboru nalezeno 36 žen (46,75 %) a 14 mužů (37,84 %) s wild-type genotypem 677CC. Nositeli heterozygotního genotypu 677CT bylo 32 žen (41,56 %) a 21 mužů (56,76 %) a variantní genotyp 677TT byl zjištěn u 9 žen (11,69 %) a 2 mužů (5,41 %), (Obr. 5.11).

Celkově byl genotyp 677CC v kontrolním souboru nalezen u 50 osob (43,86 %), genotyp 677CT u 53 osob (46,49 %) a 677TT u 11 osob (9,65 %).



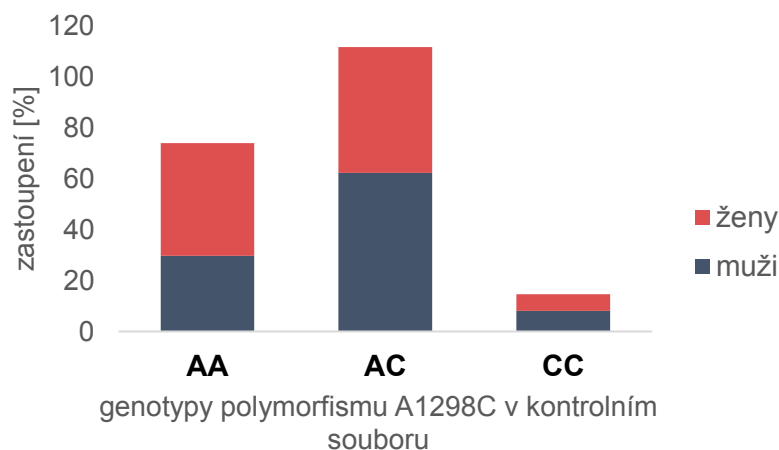


**Obr. 5.11: Procentuální zastoupení detekovaných genotypů polymorfismů C677T u žen a mužů z kontrolní skupiny**

### MTHFR A1298C

Konstituce 1298AA byla nalezena u 34 žen (44,16 %) a 11 mužů (29,73 %). Nositeli heterozygotního genotypu 1298AC bylo 38 žen (49,35 %) a 23 mužů (62,16 %). Variantní genotyp 1298CC byl zjištěn u 5 žen (6,49 %) a 3 mužů (8,11 %).

Celkově byly genotypy polymorfismu A1298C v kontrolním souboru zastoupeny následovně: 1298AA u 45 osob (39,48 %), 1298AC u 61 osob (53,51 %) a 1298CC u 8 osob (7,02 %), (Obr. 5.12).



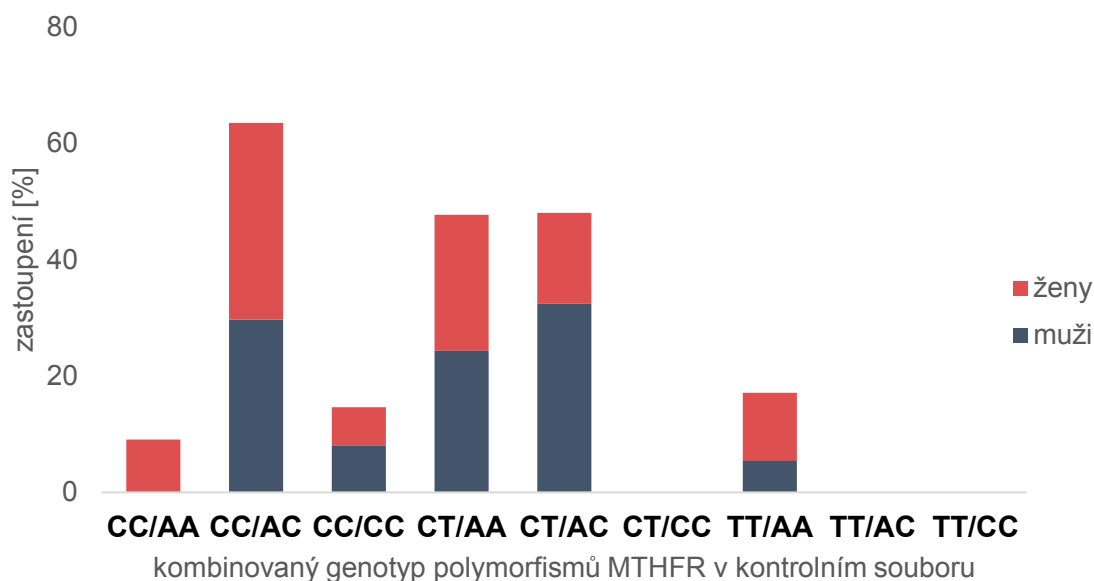
**Obr. 5.12: Procentuální zastoupení detekovaných genotypů polymorfismů A1298C u žen a mužů z kontrolní skupiny**

### KOMBINOVANÝ GENOTYP POLYMORFISMŮ C677T A A1298C

Kombinovaný *trans* genotyp CC/AA byl detekován pouze u 7 žen (9,09 %), genotyp CC/AC u 26 žen (33,77 %) a 11 mužů (29,73 %), genotyp CC/CC u 5 žen (6,5 %) a 3 mužů (8,11 %), CT/AA u 18 žen (23,38 %) a 9 mužů (24,32 %). Nadále byl nalezen kombinovaný

heterozygotní genotyp CT/AC shodně u 12 žen (15,58 %) a 12 mužů (32,43 %) a genotyp TT/AA u 9 žen (11,69 %) a 2 mužů (5,41 %). *Cis* konstituce (TT/AC, CT/CC, TT/CC) nebyly nalezeny u žádné ženy ani muže (Obr. 5.13).

Celkově bylo v kontrolním souboru nalezeno 7 jedinců (6,14 %) s kombinovaným genotypem CC/AA, 37 jedinců (32,46 %) s CC/AC, 8 jedinců (7,02 %) s genotypem CC/CC, 17 jedinců (14,91 %) s CT/AA, 24 jedinců (21,05 %) s kombinovaným heterozygotním genotypem CT/AC a 11 jedinců (9,65 %) s genotypem TT/AA.



**Obr. 5.13: Výskyt kombinovaných genotypů polymorfismů MTHFR C677T a A1298C u žen a mužů z kontrolního souboru**

### 5.3 POROVNÁNÍ VÝZKUMNÉ A KONTROLNÍ SKUPINY

Ze získaných absolutních frekvencí genotypů byly vypočítány hodnoty relativní, a to jak v případě genotypů (Tab. XXII), tak v případě alel (Tab. XXIII).

Z vypočítaných hodnot nejsou patrné žádné velké výkyvy v rozložení jednotlivých genotypů či alel ve výzkumné a kontrolní skupině, které by byly statisticky signifikantní na 95% hladině významnosti.

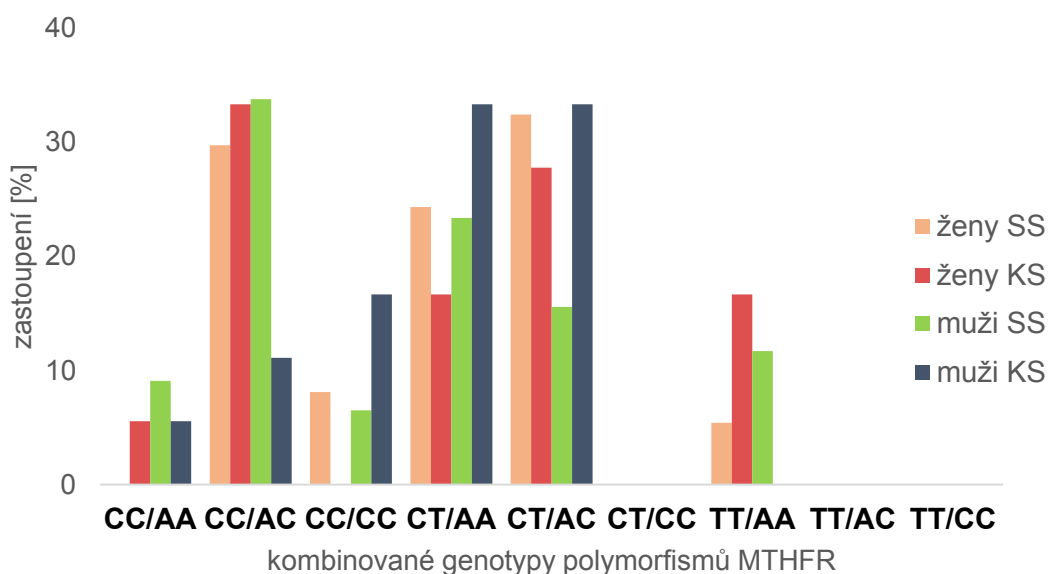
**Tab. XXII: Frekvence genotypů polymorfismů MTHFR pro výzkumnou a kontrolní skupinu**

FREKVENCE GENOTYPŮ						
	výzkumná skupina			kontrolní skupina		
	F	M	Celkem	F	M	Celkem
	<i>n</i> = 18	<i>n</i> = 18	<i>n</i> = 36	<i>n</i> = 77	<i>n</i> = 37	<i>n</i> = 114
<b>677CC</b>	0,389	0,333	0,361	0,468	0,378	0,439
<b>677CT</b>	0,444	0,667	0,556	0,416	0,568	0,465
<b>677TT</b>	0,167	0,000	0,083	0,117	0,054	0,096
<b>1298AA</b>	0,389	0,389	0,389	0,442	0,297	0,395
<b>1298AC</b>	0,611	0,444	0,528	0,494	0,622	0,535
<b>1298CC</b>	0,000	0,167	0,083	0,065	0,081	0,070

**Tab. XXIII: Frekvence alel polymorfismů MTHFR pro výzkumnou a kontrolní skupinu**

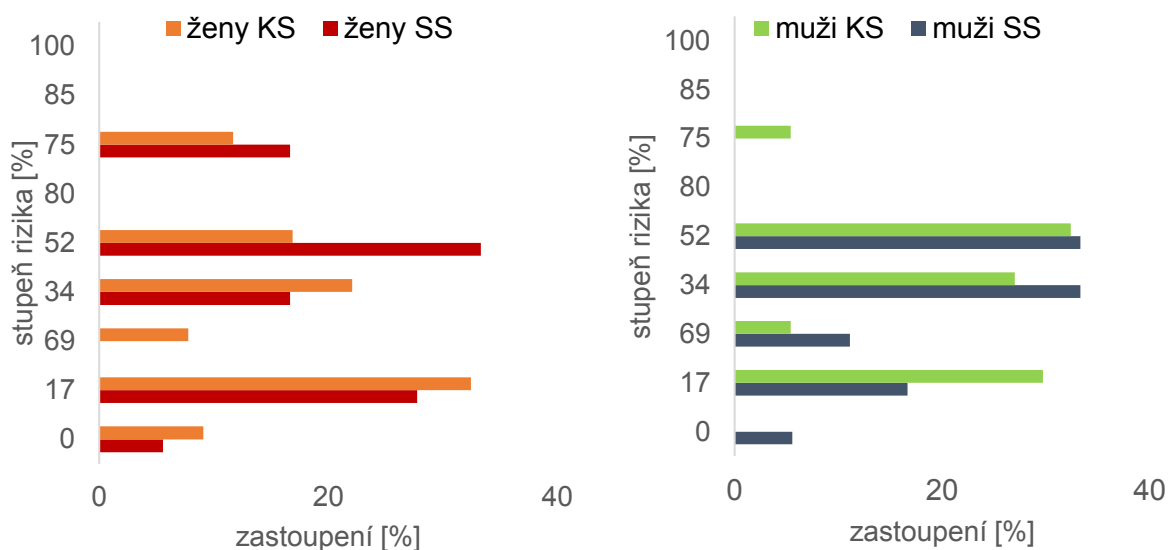
FREKVENCE ALEL						
	výzkumná skupina			kontrolní skupina		
	F	M	Celkem	F	M	Celkem
	<i>n</i> = 18	<i>n</i> = 18	<i>n</i> = 36	<i>n</i> = 77	<i>n</i> = 37	<i>n</i> = 114
<b>677C</b>	0,611	0,667	0,639	0,688	0,608	0,671
<b>677T</b>	0,389	0,333	0,361	0,312	0,392	0,329
<b>1298A</b>	0,694	0,611	0,653	0,675	0,662	0,662
<b>1298C</b>	0,306	0,389	0,347	0,325	0,338	0,338

Pro lepší představu o rozdílnosti obou skupin shrnuje následující graf (Obr. 5.14) zjištěné kombinované genotypy jak pro ženy studijní a kontrolní skupiny, tak také pro muže.



**Obr. 5.14: Výskyt kombinovaných genotypů polymorfismů MTHFR C677T a A1298C u žen a mužů studijní (SS) a kontrolní skupiny (KS)**

Pro porovnání žen a mužů z výzkumné a kontrolní skupiny byly vizualizovány také četnosti jedinců (%) dle jejich stupně rizika (%), (Obr. 5.15). U žen je mezi oběma skupinami okem patrný rozdíl ( $p > 0,05$ ) a dle předpokladů je větší zastoupení u vyšších stupňů rizika. Naproti tomu u mužů není tento trend tak zjevný.



**Obr. 5.15: Procentuální zastoupení jedinců ze studijní skupiny párů (SS) a kontrolní skupiny (KS) dle stupňů rizika (%).** Vlevo četnosti pro ženy a vpravo pro muže.

## 6 DISKUZE

### 6.1 POLYMORFISMY V GENU *MTHFR* V RÁMCI VÝZKUMNÉ

#### SKUPINY PÁRŮ A JEJICH ASOCIACE S RPL A STERILITOU

Po nezdarech s financováním této studie musely být prvotní plány o jejím strukturním rozvržení pozměněny. Záměrem bylo otestovat minimálně 50 párů a k nim odpovídající referenční vzorek, který by se skládal taktéž z párů, ale z takových, které nemají a neměly problém s RPL či samotným početím a nikdy se neléčily v centrech AR (dále „zdravé páry“). Porovnání takových skupin by bylo ve své podstatě přínosnější a výsledky by více vypovídaly o možné asociaci polymorfismů v genu *MTHFR* s touto problematikou, a to už jen z výběru referenční skupiny a velikosti zkoumaného vzorku.

Díky zajištěné přímé účasti dobrovolníků z řad pacientů IVF Centra prof. Zecha Plzeň, bylo možné získat účastníky s ucelenou anamnézou, u kterých bylo ohlédáno splnění selekčních kritérií. Na druhou stranu internetové vyhledávání možných účastníků bylo z celkového hlediska jakýmsi „oříškem“. Ačkoliv se očekávalo, že ne všichni respondenti se po prvotním nadšení nakonec studie aktivně zúčastní, nepočítalo se s tím, že namísto od 26 párů splňujících po Vstupním dotazníku selekční kritéria budou obdrženy vyplněné Cílené dotazníky od 18 z nich (69 %; I. etapa – 12 párů a II. etapa – 6 párů). Těmto párům byly následně zaslány odběrové soupravy a 11 z nich (tedy necelých 43 % z celkového počtu splňujících selekční kritéria) své vzorky DNA zaslalo zpět do laboratoře. Zbylých 7 párů (ve všech případech probíhala komunikace se ženou) bohužel nereagovalo ani na opakované pokusy o komunikaci. Logickým řešením by bylo snížit tuto ‚dotazníkovou zátěž‘ a namísto 2 dotazníků po potenciálních účastnících požadovat rovnou vyplnění Cíleného dotazníku. Tímto krokem by se mohly rovnou eliminovat páry, které nemají o jeho poměrně zdlouhavé vyplnění zájem.

Nevýhodou u této skupiny účastníků byl bezesporu fakt, že u nich nebyla známá celková anamnéza a splnění selekčních kritérií bylo ověřeno pouze na základě jejich subjektivního zhodnocení – otázka v Cíleném dotazníku zněla: „*Domníváte se, že Vás a Vašeho partnera můžeme na základě výlučných kritérií zařadit do naší studie?*“, kdy této otázce předcházela výčet výlučných kritérií doplněný o interpretaci v případě medicínské terminologie. Ani jeden z párů účastnících se studie nezvolil možnosti „Ne“ nebo „Nevím“, proto byli zařazeni do studie.

Co se týče získávání informací o účastnících studie a vyhodnocování Cíleného dotazníku, je na místě sebekriticky zhodnotit, že jejich struktura, především pak pořadí a

způsob, jakým byly otázky položeny, nebyly zvoleny příliš efektivně. Ačkoliv se zpočátku mohlo zdát, že Cílený dotazník je designován tak, aby bylo dosaženo komplexního obrazu o daném páru a aby se co nejvíce ulehčila finální práce při jeho vyhodnocování a porovnávání. Tyto domněnky se ovšem nenaplnily. Asi za největší nedostatek může být považován fakt, že došlo k nepřímému opakování některých otázek, které nebyly logicky poskládané, což mohlo především „internetové“ respondenty zmást. Ti totiž vedle sebe neměli jednu z pracovnic IVF centra, které byly s dotazníkem dopodrobna seznámeny. Například to, že bylo po respondentech nejdříve požadováno, aby vypsali spontánní potraty po IVF (sekce 4), zda podstoupili neúspěšný embryotransfer (sekce 5) a až v 8. sekce byla položena obecná otázka na léčbu neplodnosti, se ukázalo jako nešťastné řešení. U několika online respondentů došlo k tomu, že vypsali podstoupené cykly AR, ale pro otázku v sekci 8 zaškrtnuli možnost „ne“, ačkoliv z předchozích odpovědí bylo patrné, že se na neplodnost léčili. V následující tabulce je vyobrazen možný koncept Cíleného dotazníku, který by byl pro respondenty i následné vyhodnocování přehlednější a logičtější (Tab. XXIV).

**Tab. XXIV: Ideální rozložení výzkumných otázek Cíleného dotazníku**

POŘADÍ SEKCE	VÝZKUMNÁ OTÁZKA
1	Jak dlouho se snažíte otěhotnět?
2	Podstoupila jste někdy umělé ukončení těhotenství?
3	Prodělala jste někdy spontánní potrat po přirozeném početí (PP)?
4	Léčíte se či jste se někdy léčila na neplodnost?
5	Jaké metody jste podstoupila?
6	Podstoupila jste embryotransfer?
7	Máte vyšetřen karyotyp?
8	Prodělala jste potrat po podstoupené metodě AR?
9	Užívala jste někdy hormonální antikoncepci (HAK)?
10	Máte děti počaté přirozenou cestou (i z IVF) se stejným/jiným partnerem?
11	Užíváte v současnosti kyselinu listovou?
	<del>Prodělala jste někdy neúspěšný embryotransfer?</del>
	<del>Prodělala jste někdy spontánní potrat po IVF?</del>

Samotné vyhodnocení dotazníků nepřineslo žádné překvapivé závěry. Pouze údaje udané u otázky „*Jak dlouho se snažíte otěhotnět?*“ se zdály být z pohledu přístupu center AR zajímavé. Až na jedinou respondentku, která udala, že se aktivně o početí nesnaží, byla průměrná doba snahy o početí stanovena na necelé 3 roky. 4 ženy udaly, že svou snahu o

početí odsunuly až na 35. rok života či později a jsou v péči center AR, která je přijela téměř okamžitě na začátku jejich snahy. To odpovídá námětům Řežábka (2014), který se kloní k názoru, že by ženy po 35 letech měly být na neplodnost léčeny okamžitě. Ovšem podíváme-li se na celou problematiku z pohledu fyziologie, po 35. roce života plodnost ženy klesá až o 10 % (viz kapitola 2.3.2 Rizikové faktory poruch plodnosti, str. 14), z čehož logicky vyplývá, že se snižuje i pravděpodobnost otěhotnění. Statisticky vzato je na případné otěhotnění potřeba delší čas aktivní snahy než avizovaný 1 rok pro ženy mladší 35 let. Z pohledu fyziologie by tedy bylo příhodnější umožnit ženám starším 35 let například o rok delší snahu oproti ženám mladším, aby u nich mohla být zahájena léčba neplodnosti. Na druhou stranu ale vezmeme-li v úvahu, že by takto žena „ztratila“ další 2 roky života planou snahou o početí a stejně by nakonec kupříkladu skončila léčená na neplodnost, není snadné rozhodnout, ke kterému z přístupů se přiklonit a balancovat tak možnou ztrátu času, věk ženy a její psychický stav.

Analýza dat probíhala taktéž ve dvou etapách jako samotný sběr, protože dobrovolníkům účastnícím se studie bylo přislíbeno sdělení výsledků analýzy. Jako hlavní detekční metoda obou polymorfismů byla zvolena metoda PCR-RFLP a jako pojistka vybrána i metoda Real-Time PCR. Obě tyto metody jsou rutinně používány v laboratoři GENLABS. Tento krok se ukázal být dobrou taktikou, jelikož se nepodařilo úspěšně analyzovat 3 vzorky z první etapy (MTHFR 14, MTHFR 15 a MTHFR 16) na MTHFR A1298C pomocí metody PCR-RFLP, proto se u těchto problémových vzorků přistoupilo k RT-PCR. Díky této metodě pak bylo možné určit výsledné polymorfismy.

Po odečtení výsledků RFLP byla dokonce u 2 jedinců z II. etapy ze studijní skupiny nalezena *cis* konfigurace CT/CC. Vzhledem k tomu, že se v mnohých studiích uvádí, že je tato kombinace neobvyklá či že se objevuje zřídka či vůbec, byl tento výsledek ověřen pomocí přímé sekvenace PCR produktu použitého pro restrikční štěpení. Sekvenace byla provedena ve spolupráci s externí firmou, a proto tato metoda není uvedena v kapitole 4 – Design experimentů, ačkoliv představuje další možný přístup pro detekci sledovaných polymorfismů a může být považována za nejpřesnější možnou metodu. Nevýhodou je její finanční nákladnost.

Provedená sekvenace PCR produktů nakonec ukázala, že se v obou případech jednalo o konfiguraci CT/AA, proto došlo ke zpětnému ověření výsledků ze všech nafocených gelů. U 3 výsledků byl pak předchozí závěr přehodnocen – mylně odečtený genotyp 1298CC byl ve skutečnosti genotypem 1298AA, a v žádném případě se tedy nejednalo o *cis* konfiguraci. Celá tato problematika ohledně vyhodnocování restrikčního štěpení 2. polymorfismu nejspíše pramenila z rozdílné koncentrace PCR produktu použitého pro restrikční štěpení, k čemuž

došlo v důsledku rozdílných vstupních koncentrací DNA použitých pro amplifikaci a také z intenzity jeho značení pomocí fluorescenční barvičky MidoriGreen Direct. Jde o to, že produkty s vyšší koncentrací DNA naváží více fluorescenční barvičky, mají rozdílnou hustotu a pak putují gelem logicky pomaleji než slabší produkty (ať už po amplifikaci či restrikčním štěpení). V případě, že se výsledné restrikční fragmenty liší ve své délce pouze o 37 bp, může dojít při nedostatečně dlouhé separaci k mylnému odečtení výsledků. Nejlepším řešením by bylo provádět elektroforetickou separaci na polyakrylamidovém gelu, ale tento přístup se v laboratoři nepoužívá.

Jak ale ve své práci uvádí Enciso et al. (2016) i Zetterberg et al. (2002b), vysvětlení této problematiky může ústít z nepřesnosti užití metody pro detekci polymorfismu A1298C. Někteří užití restrikčního enzymu MboII v metodě PCR-RFLP kritizují, a to kvůli možným chybám v odečítání genotypů, které zřejmě způsobuje tichý polymorfismus T1317C. Ten byl poprvé popsán již v roce 1998 (Weisberg et al.) a kromě toho, že se nachází ve stejném exonu enzymu MTHFR jako polymorfismus A1298C a žádným způsobem nepozměňuje výslednou aminokyselinu - tou zůstává fenylalanin, variantní alela 1317C narušuje identifikaci polymorfismu A1298C, a to především v konstitucích 1298AC a 1298CC (van der Put & Blom, 2000).

Ve zmíněné práci z roku 2002 (Zetterberg et al., 2002b), která vyšla jako reakce na závěry studie z roku 2000 (Isotalo et al.), ve které její autoři našli velké množství genotypů v *cis* konfiguraci u potracených embryí, její autoři operovali s nepublikovanými daty, kdy ve vzorku více než 500 švédských jedinců nenašli ani jednu *cis* konfiguraci, a to ani u potracených embryí (n = 80; Zetterberg et al., 2002a). U italské populace (n = 335) objevili pomocí sekvenování 2 jedince s genotypem TT/AC, tudíž se domnívali, že se *cis* konfigurace v populaci (téměř) nevyskytuje a v práci Isotalo et al. (2000) byla nesprávně zvolena detekční metoda. Ve svém shrnutí tedy v případě nálezu *cis* konfigurace doporučují užít jinou z metod detekce – například sekvenaci a ačkoliv nemohou vyvrátit, že se alely v *cis* konfiguraci v populaci vyskytují, předpokládají, že jejich životaschopnost může záviset na perikoncepční suplementaci folátem. Skupina brazilských výzkumníků se proto v roce 2008 (de Alvarenga et al.) zaměřila na porovnání obou zmíněných metod detekce polymorfismu A1298C, kdy i přes rozdíl 8,6 % mezi jednotlivými metodami, neukázal zvolený statistický test porovnávací rozdílnost odchylku. I přesto autoři této studie také doporučují vhodně zvolit detekční metodu s ohledem na tichý polymorfismus T1317C, což se potvrdilo i v případě naší studie. Při nálezu *cis* konfigurace je namístež užít sekvenaci pro ověření výsledků, ovšem po podrobném prozkoumání získaných sekvencí nebyl žádný tichý polymorfismus detekován. Můžeme se



pouze domnívat, zdali šlo o systematickou chybu v užití metodě, anebo chybu při jejím provedení. Pro budoucí výzkum a vyvrácení/potvrzení domněnky, že metoda PCR-RFLP může zkreslovat výsledky, by bylo příhodné užívat jinou detekční metodu.

Ovšem dle nejnovějších poznatků z populace zdravých čínských žen z různých provincií (n = 13 473) došli Fan et al. (2016) k závěrům, že polymorfismy C677T a A1298C se v *cis* konfiguraci vyskytují, ačkoliv méně často, než je předpokládáno. Pomocí sekvenace zjistili, že se procentuální zastoupení *cis* konstitucí pohybovalo v rozmezí 0–1,6 % (celkově 160/13 473 jedinců), přičemž tato nejvyšší hodnota zahrnovala kombinovaný genotyp TT/AC 2 žen ze souboru čínického 124 žen. Tento nálezn, který vyvrací předpoklady dřívějších studií (například Rady et al., 1999; Stegmann et al., 1999), že polymorfismy v genu *MTHFR* C677T a A1298C koexistují pouze v *trans* konstituci, může mít hned několik příčin. Buďto je vzdálenost obou polymorfismů na chromozomu tak krátká (2,1 kb), že se snižuje pravděpodobnost rekombinace, anebo jak již předeslali van der Put et al. (1998), kombinace 3 variantních alel představuje pro fenotyp jedince selekční nevýhodu. To úplně nekoresponduje s nálezem těchto genotypů u některých jedinců, ale i tak se tato možnost nedá jednoznačně vyloučit, protože většina onemocnění je multifaktoriální záležitostí. Navíc suplementace folátem zřejmě neutralizuje efekt polymorfismů *MTHFR*. Otázkou je také velikost výzkumné skupiny a fakt, že malé počty (řádově stovky) vyšetřených jedinců nám prakticky nedovolí odhalit přítomnost *cis* polymorfismů.

Závěrem lze jen shrnout, že existuje více než stovka polymorfismů v genu *MTHFR* a nikdo se ještě nepokusil podrobně prozkoumat jejich koexistenci a vliv na fenotyp jedince. Je dost dobře možné, že kombinovaný výskyt variantních alel u více polymorfismů *MTHFR*, které kupříkladu negativně ovlivňují metabolismus Hcy a folátu či dokonce dosud neobjevené souvislosti s kterýmkoliv jiným cyklem, je odpovědí na mnohé nevysvětlitelné jevy asociované nejen se sterilitou či RPL. Dosavadní publikace sledují většinou pouze 2 z neznámějších polymorfismů, a proto není jisté, jak vypadá sekvence celého genu *MTHFR*. Taková celková studie by jistě stála mnoho úsilí, ale mohla by vést k lepšímu pochopení významu výskytu polymorfismů *MTHFR*.

Jako kontrolní skupina pro porovnání výskytu genotypů polymorfismů *MTHFR* studijní skupiny párů posloužili klienti genetické laboratoře, kteří se nechali vyšetřit pro oba sledované polymorfismy a mohou být považováni za plodné jedince reprezentující „českou populaci“. Tento soubor čítal 114 osob, z nichž se v 77 případech jednalo o ženu a ve zbylých 37 o muže, z čehož je patrný rozpor mezi velikostí studijní (18 žen a 18 mužů) a referenční skupiny. O té nebyly získány žádné detailnější informace. Můžeme se pouze domnívat, že se

jedná o „zdravé“ jedince, u kterých se nevyskytly či nevyskytnou problémy s plodností a u žen i RPL. U získaných frekvencí genotypů a alel u výzkumné a kontrolní skupiny nebyly shledány žádné statisticky významné odchylky. Pouze u žen byla variantní alela 677T ve studijní skupině zastoupena ve větší míře než v té kontrolní. Na druhou stranu ale nebyl genotyp 1298CC nalezen u žádného muže ze studijní skupiny.

Zajímavé by v případě vyšetření zdravých párů (tedy těch bez výše zmíněných problémů s plodností a početím potomků) jako referenční skupiny bylo porovnat jejich celkové riziko oproti celkovému riziku „neplodných“ párů. To by jistě mělo svou vypovídající hodnotu. V našem případě byla porovnána pouze rizika jedinců, která i tak indikovala rozrůzněnost mezi studijní a kontrolní skupinou.

Statistické hodnocení jednotlivých faktorů, které by mohly ovlivňovat plodnost páru, nebylo průkazné. Jediným průkazným faktorem se stala snaha o početí (roky). Neprůkaznost zbylých proměnných mohla nastat v závislosti na již zmíněné velikosti výzkumné skupiny, která čítala pouze 18 neplodných párů a byla analyzována s relativně velkým množstvím proměnných. Užítý test ovšem ukázal, že se s průměrným rizikem páru zvyšuje i délka snahy o početí (roky), což indikuje, že kombinace genotypů polymorfismů *MTHFR* ženy a muže u vzniklého embrya by mohla ovlivňovat jeho životaschopnost. Takové závěry by ale ke svému potvrzení potřebovaly podpůrné výzkumy.

Páry s nejasnou příčinou sterility a páry s RPL byly zkoumány i v rámci studie provedené Herodež et al. v roce 2013. Dle jejich závěrů mohou být polymorfismy *MTHFR* specifickými rizikovými faktory sterility vázanými na pohlaví. K podobným úsudkům dospěli i jiní (Irfan et al., 2016; Eloualid et al., 2012; Safarinejad et al., 2011). Například ve výzkumné skupině 100 sterilních mužů právě ve studii Herodež et al. (2013) byl shledán nárůst výskytu alely 677T vyšší o 13,2 % ( $p = 0,046$ ) oproti kontrolní skupině ( $n = 111$ ). U polymorfismu A1298C nebyl v této studii zjištěn žádný vliv. K naprosto protikladným výsledkům dospěli Eloualid et al. (2012), kteří neshledali signifikantní vliv polymorfismu C677T ale právě konstituce 1298CC u mužů s oligozoospermií ( $p = 0,014$ ). To indikovala už studie z roku 2010 (Singh et al., 2010) provedená u indických mužů. I v naší studii je patrný nárůst alely 1298C především v konstituci CC u mužů na 16,7 % oproti 8,1 % u kontrolní skupiny, ačkoliv nejsou tato data statisticky významná na 95% hladině významnosti. Přesto existuje celá řada studií vyzdvihujících vliv polymorfismu C677T nad A1298C. Možnou příčinou všech těchto rozporů mezi jednotlivými studiemi může být rozdílný příjem folátu.

Vzhledem k tomu, že sterilita a opakované spontánní potraty postihují velké procento párů, je logické, že se ze snahy o početí potomka staly výdělečným byznysem. V dnešní době

se na pár začíná nahlížet již jako na celek, který dává společně vzniknout novému jedinci. Je tedy patrné, že genetická vyšetření jdou v tomto směru kupředu. Od roku 2016 je i v České republice k dispozici tzv. Carrier test (není proplácen pojišťovnou), díky němuž je možné vyšetřit dědičné vlohy, které mohou ovlivnit plodnost rodičů a zdraví (potenciálních) potomků. Tento test *vyšetřuje skryté přenašečství 861 častých - „klíčových“ - mutací 79 recesivních genů způsobujících více než 60 genetických chorob a stavů, které mohou postihnout potomky zdravých přenašečů*<sup>5</sup>. Součástí široké nabídky genů jsou i 3 z polymorfismů genu *MTHFR* [p.Ala222Val (C677T), p.Arg377Cys a p.Met581Ile], přičemž poslední dva zmiňované polymorfismy nebyly podrobněji zkoumány v souvislosti s žádnými chorobami. Polymorfismus A1298C v této souvislosti testován není, což je vzhledem k závěrům o jistém znevýhodnění *cis* konfigurace polymorfismů C677T a A1298C minimálně překvapující. Například Enciso et al. (2016) ve své práci odhalili silný vliv tohoto polymorfismu na neplodnost, když ve své studijní skupině (n = 92) našli více pacientek s homozygotní konstitucí A1298CC než v té kontrolní, a to především u žen s historií 3 a více neúspěšných implantací embryí (n = 38; nárůst frekvence genotypu z 0.06 u kontrolní skupiny na 0.24 u té výzkumné, p < 0,05). Zároveň ale vyvracejí možnou příčinu na straně embrya, vzhledem k tomu že u neúspěšně implantovaných zárodků nebyl prokázán negativní vliv genotypu 1298CC na jejich životaschopnost. U mužů byla frekvence také zvýšená, ne ale tak významně jako u neplodných žen.

Plošné testování párů snažících se o početí je rozhodně dobrým krokem směrem k lepším zítřkům. Ukazuje se, že se k našemu přístupu posuzování párů jako celků uchylují i v medicínské diagnostice. Díky testování efektivně zvolených genů by se v budoucnu mohly objasnit některé z příčin neplodnosti, které se dnes zařazují do velké skupiny nazvané „idiopatická sterilita“, či příčiny RPL. Jenže právě ty efektivně zvolené geny mohou být kamenem úrazu. Zatím prakticky neexistuje jejich výčet, a proto je přístupováno k celogenomovému testování (WGS) nebo k testování až stovek genů, což přináší problémy s jejich interpretací. Je důležité mít na paměti i fakt, že testované páry mnohdy neznají ani základy genetiky, proto si lékaři a genetici musejí dávat velmi záležet na uchopitelné interpretaci výsledků, aby nedocházelo ke špatnému pochopení celé problematiky.

---

<sup>5</sup> Gennet © 2018. [cit. 2018-0318]. Dostupné z: <https://www.gennet.cz/carriertest>.

## 6.2 VÝSKYT POLYMORFISMŮ V GENU *MTHFR* V RÁMCI KONTROLNÍ SKUPINY

Tato část práce byla zaměřena na statistické zhodnocení dat poskytnutých genetickou laboratoří GENLABS. Vzhledem k tomu, že záměrem této populační studie bylo pracovat s náhodnou populací, bylo třeba ze zkoumaného vzorku vyřadit příbuzné jedince, aby nedošlo ke zkreslení výsledků. Namísto 133 osob, které podstoupily vyšetření polymorfismů v genu *MTHFR*, bylo možné zařadit 114 z nich. Jejich výběr probíhal zcela náhodně za použití funkce „RANDBETWEEN“ v programu Excel 2016, kdy bylo každému rodinnému příslušníkovi náležícímu k jedné z rodin (celkově 9 rodin) přiděleno náhodné číslo. Tato čísla pro jednu rodinu pak byla náhodně generována již zmíněnou funkcí.

U několika desítek vzorků bylo možné osvojit si různé metody detekce polymorfismů enzymu *MTHFR* u vyšetřovaných pacientů, kteří byli zařazeni do populační studie. Ačkoliv větší podíl dat pro tuto část práce byl dodán laboratoří ke statistickému zpracování, byly všechny uvedené metody detekce autorkou práce prakticky vyzkoušeny a osvojeny. Jako nejlepší metoda se zdá být metoda PCR-RFLP, samozřejmě za předpokladu, že výsledky odečítá zkušený genetik. Metodu RT-PCR se vyplatí užívat při větším množství vzorků, jelikož je finančně náročnější. Nicméně pokaždé, dojde-li k hybridizaci DNA na DNA, předpokládáme, že je specifita metody výrazně vyšší než při užití restričních enzymů.

Do dnešního dne neexistují žádné oficiální studie zkoumající četnosti polymorfismů *MTHFR* pro českou populaci, tudíž nebylo možné závěry této části práce konfrontovat s jinou studií. Byly nalezeny pouze údaje z jedné bakalářské práce, kde se podobně jako u Isotalo et al. (2000) objevilo po analýze metodou PCR-RFLP relativně velké množství genotypů v *cis* konstituci (zhruba 10%). Z důvodu toho, že si nemůžeme být jisti, že jsou údaje fakticky správné a zdali by je případná sekvenace potvrdila, nejsou tyto údaje v naší práci užity jako referenční vzorek ani pro výskyt polymorfismu C677T a A1298C.

V jiných případech byly polymorfismy *MTHFR* v české populaci zkoumány především v souvislosti s TEN (tromboembolická nemoc), a to například v diplomové práci Vavruškové (2010). Z jejího výzkumu plyne, že *pacienti mající mutace MTHFR mají větší sklon k IM (infarkt myokardu) a CMP (cévní mozková příhoda). Hůře jsou na tom pacienti mající mutace MTHFR v homozygotním stavu.* O 2 roky později se této problematice věnoval ve své dizertační práci Zapletal (2012). Ten zkoumal trombofilní stavy u dětí v souvislosti například právě s *MTHFR* C677T a na základě závěrů této studie autor tuto spojitost spíše vyvrací, ačkoliv *se nejčastěji (absolutně i relativně) vyskytl polymorfismus v genu pro*

*MTHFR* – přes 60 %. To není vzhledem k jeho častému zastoupení v běžné populaci překvapením (kolem 40 %)“. Pouze u 1,6 % dětí (převážně s přítomností 2 variantních alel 677TT) byla potvrzena hHcy, jež je v souvislosti s *MTHFR* C677T hojně probírána. V roce 2013 (Hickey et al.) vydala American College of Medical Genetics (ACMG) prohlášení, že nedoporučuje testovat polymorfismy *MTHFR* v souvislosti s trombofilními stavy. Na tyto závěry pak v roce 2014 reagovala i Společnost lékařské genetiky a genomiky (SLG), která s těmito závěry souhlasila<sup>6</sup>. Dnes se tedy polymorfismy v genu *MTHFR* v této souvislosti rutinně netestují.

Vavrušková (2010) ve své práci nadále zkoumala spojitost polymorfismů *MTHFR* se spontánními potraty. Ve zkoumaném souboru, který činil 51 pacientek, potratilo 14 pacientek s konstitucí 1298CC (27,5 %) a 21 pacientek s konstitucí 677TT (41,2 %), u jejichž plodů byl také zaznamenán výskyt rozštěpových vad. Tuto asociaci polymorfismu *MTHFR* C677T sledovala ve své dizertační práci z roku 2006 také Gaillyová. V jejím souboru o 40 pacientkách s historií 3 a více RPL našla zvýšenou frekvenci konstituce 677TT (7,5 %). Záchyt heterozygotů byl v této skupině 677CT byl 50 %. I naše výsledky ukazují mírně zvýšenou frekvenci genotypů 677TT a 677CT u žen ze studijní skupiny s frekvencí alely T 0,389 oproti frekvenci 0,312 u té kontrolní. Ačkoliv nejsou tyto výsledky statisticky signifikantní na 95% hladině významnosti, může tento trend, bude-li pozorován i v budoucích studiích s rozšířenou výzkumnou skupinou, stěžejní pro další pochopení této problematiky.

V roce 2003 vznikla meta-analýza zkoumající prevalenci genotypů *MTHFR* C677T u více než 7 000 novorozenců z 16 oblastí světa. Distribuce alel ukázala etnickou i geografickou varianci v jejich rozložení. Genotyp TT byl rozšířen především v severní Číně (20 %), jižní Itálii (26 %) a nejvíce v Mexiku (32 %). Napříč Evropou byl pozorován gradient, kdy ze severu k jihu stoupalo zastoupení tohoto genotypu, zatímco v Číně byl tento trend opačný. U oblastí s vysokou frekvencí genotypu TT byly prokázány odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Mezi tyto oblasti patřily Helsinky, Finsko, jižní Itálie a jižní Čína. Pro ruskou populaci bylo rozložení stanoveno následovně – genotyp CC v 53 % případů, CT v 40 % a TT v 7 %. Pro maďarskou populaci byl genotyp CC přítomen ve 44 % případů, CT ve 45 % a TT v 11 % (Wilcken et al., 2003). Naše poznatky se s těmi pro Maďarsko téměř shodují.

---

<sup>6</sup> Společnost lékařské genetiky a genomiky [cit. 2018-04-07]. Dostupné z <https://www.slg.cz/2014/testovani-polymorfismu-mthfr>

I v populaci zdravých čínských žen z různých provincií (n = 13 473) došli Fan et al. (2016) k závěrům, že polymorfismy C677T a A1298C se v *cis* konfiguraci téměř nevyskytují, ačkoliv u některých žen byly sekvenací odhaleny. Jejich procentuální zastoupení se pohybovalo od 0–1,6 %, přičemž tato nejvyšší hodnota zahrnovala kombinovaný genotyp TT/AC 2 žen ze souboru čítajícího 124 žen. I tak tyto výsledky indikují nižší výskyt *cis* konfigurací, než by se dalo v tak velké výzkumné skupině předpokládat.

Ačkoliv se může zdát, že tato práce nevnáší nové poznatky do asociace polymorfismů MTHFR s neplodností či RPL, a to především vzhledem k malému počtu vyšetřených ze studijní skupiny a struktuře užití kontrolní skupiny, výsledky přesto ukazují na možné rozdíly ve skupině neplodných a plodných jedinců. Použité rozložení výskytu polymorfismů MTHFR jedinců vyšetřených v genetické laboratoři může odrážet jejich možné rozložení napříč celou českou populací. Její podrobnější a rozsáhlejší studie by však byla určitě přínosná.

## 7 ZÁVĚR

Literární přehled shrnuje dosavadní poznatky o úloze enzymu MTHFR a jeho polymorfismech v metabolismu homocysteinu a folátů, což je klíčové pro pochopení možné souvislosti se sterilitou a problematikou opakovaných spontánních potratů.

V experimentální části práce bylo vyzkoušeno několik možných metod pro detekci polymorfismů C677T a A1298C v genu *MTHFR*. Četnosti genotypů vyskytujících se ve studijní skupině párů a kontrolní skupině reprezentující českou populaci byly vzájemně porovnány. Ačkoliv nebyly získané rozdíly statisticky signifikantní, budoucí výzkum, který by splňoval strukturní náležitosti jako velikost studijních skupin a výběr odpovídající kontrolní skupiny, by mohl vnést do této problematiky nové poznatky.

Zjištěné rozložení výskytu polymorfismů MTHFR u jedinců vyšetřených v genetické laboratoři může odrážet jejich možné rozložení napříč celou českou populací, a to následovně: 677CC u 44 % jedinců, genotyp 677CT u 47 % jedinců a 677TT u 10 % jedinců; 1298AA u 40 % jedinců, 1298AC u 54 % jedinců a 1298CC u 7 % jedinců. Kombinované genotypy pro oba zmíněné polymorfismy byly zastoupeny takto: CC/AA u 6 % jedinců, CC/AC u 32 % jedinců, genotyp CC/CC u 7 % jedinců, CT/AA u 14,91 % jedinců, kombinovaný heterozygotní genotyp CT/AC u 21,05 % jedinců a genotyp TT/AA u 9,65 % jedinců. Ani v jedné skupině nebyly nalezeny žádné genotypy s *cis* konstitucí.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abhinand, P. A., Manikandan, M., Mahalakshmi, R., & Ragunath, P. K. (2017): Meta-analysis study to evaluate the association of MTHFR C677T polymorphism with risk of ischemic stroke. *Bioinformation*, 13(6), 214–219. <https://doi.org/10.6026/97320630013214>.
- Annan, J. J. K., Gudi, A., Bhide, P., Shah, A., & Homburg, R. (2013): Biochemical pregnancy during assisted conception: a little bit pregnant. *Journal of Clinical Medicine Research*, 5(4), 269–274. <https://doi.org/10.4021/jocmr1008w>.
- Atta, C. A. M., Fiest, K. M., Frolkis, A. D., Jette, N., Pringsheim, T., St Germaine-Smith, C., ... Metcalfe, A. (2016): Global birth prevalence of spina bifida by folic acid fortification status: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Public Health*, 106(1), e24–e34. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2015.302902>.
- Boivin, J., Bunting, L., Collins, J. A., & Nygren, K. G. (2007): International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: Potential need and demand for infertility medical care. *Human Reproduction*, 22(6), p. 1506–1512. <https://doi.org/10.1093/humrep/dem046>
- Burda, P., Schäfer, A., Suormala, T., Rummel, T., Bürer, C., Heuberger, D., ... Baumgartner, M. R. (2015): Insights into Severe 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency: Molecular Genetic and Enzymatic Characterization of 76 Patients. *Human Mutation*, 36(6), 611–621. <https://doi.org/10.1002/humu.22779>.
- Butz, L. W., & Du Vigneaud, V. (1932): The formation of a homologue of Cystine by the decomposition of Methionine with Sulfuric acid. *Journal of Biological Chemistry*. 99, 135-.
- Carp, H. J. A. (2014). *Recurrent Pregnancy Loss: Causes, Controversies, and Treatment* (2. Edition), Boca Raton (Florida): CRC Press. ISBN 9781482216141.
- de Alvarenga, M. P. S., Pavarino-Bertelli, É. C., & Goloni-Bertollo, E. M. (2008): Comparing techniques for the identification of the MTHFR A1298C polymorphism. *Journal of Biomolecular Techniques*, 19(2), 103–105.
- Devlin, A. M., Brain, U., Austin, J., & Oberlander, T. F. (2010): Prenatal exposure to maternal depressed mood and the MTHFR C677T variant affect SLC6A4 methylation in infants at birth. *PLoS ONE*, 5(8), 2–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012201>
- Doherty, C. M., & Clark, M. M. (2006). *Léčba neplodnosti*. Brno: Computer Press. ISBN 80-251-0771-X.
- Dunstan, J. A., West, C., McCarthy, S., Metcalfe, J., Meldrum, S., Oddy, W. H., ... Prescott, S. L. (2012): The relationship between maternal folate status in pregnancy, cord blood folate levels, and allergic outcomes in early childhood. *Allergy. European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 67(1), 50–57. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02714.x>.
- Ebara, S. (2017): Nutritional role of folate. *Congenital Anomalies*, 57(5), 138–141. <https://doi.org/10.1111/cga.12233>.
- Ebbing, M., Bønaa, K. H., Nygård, O., Arnesen, E., Ueland, P. M., Nordrehaug, J. E., ... Vollset, S. E. (2009): Cancer Incidence and Mortality After Treatment With Folic Acid and Vitamin B12. *JAMA*, 302(19), 2119–2126. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1622>.



- Eloualid, A., Abidi, O., Charif, M., El houate, B., Benrahma, H., Louanjli, N., ... Rouba, H. (2012): Association of the MTHFR A1298C variant with unexplained severe male infertility. *PLoS ONE*, 7(3), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034111>.
- Enciso, M., Sarasa, J., Xanthopoulou, L., Bristow, S., Bowles, M., Fragouli, E., ... Wells, D. (2016): Polymorphisms in the MTHFR gene influence embryo viability and the incidence of aneuploidy. *Human Genetics*, 135(5), 555–568. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1652-z>
- Erben, K. (2016). *Jak pomoci tělu, aby se vyléčilo samo* (1. vydání). Praha: Nakladatelství BVD, s.r.o. ISBN 978-80-905866-7-3.
- ESHRE. (2017). *Recurrent Pregnancy Loss*. Guideline of the European Society of Human Reproduction and Embryology, (11). ISBN 978-3-319-27450-8. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-27452-2>.
- Fan, S., Yang, B., Zhi, X., Wang, Y., Zheng, Q., & Sun, G. (2016): Combined genotype and haplotype distributions of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms: A cross-sectional descriptive study of 13,473 Chinese adult women. *Medicine*, 95(48), e5355. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000005355>.
- Figueiredo, J. C., Grau, M. V., Haile, R. W., Sandler, R. S., Summers, R. W., Bresalier, R. S., ... Baron, J. A. (2009). Folic acid and risk of prostate cancer: Results from a randomized clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(6), 432–435. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp019>.
- Foka, Z., Lambropoulos, A., Saravelos, H., Karas, G., Karavida, A., Agorastos, T., ... Kotsis, A. (2000): Factor V leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Human Reproduction*, 15(2), 458–462.
- Ford, H. B., & Schust, D. J. (2009): Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Reviews in Obstetrics & Gynecology*, 2(2), 76–83.
- Forges, T., Monnier-Barbarino, P., Alberto, J. M., Gueant-Rodriguez, R. M., Daval, J. L., & Gueant, J. L. (2007): Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Human Reproduction Update*, 13(3), 225–238. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml063>.
- Froese, D. S., Huemer, M., Suormala, T., Burda, P., Coelho, D., Guéant, J. L., ... Baumgartner, M. R. (2016): Mutation Update and Review of Severe Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency. *Human Mutation*, 37(5), 427–438. <https://doi.org/10.1002/humu.22970>.
- Frosst, P., Blom, H. J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C. A., Matthews, R. G., ... Rozen, R. (1995): A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, *National Genetics*, 10(1), 111–113. <http://dx.doi.org/10.1038/ng0595-111>.
- Gaillyová, R. (2006): *Genetické příčiny poruch reprodukce. Vyšetření párů s opakovanými fetálními ztrátami*. Dizertační práce. Lékařská fakulta Masarykovy univerzity v Brně.
- Goodman, C. S., Coulam, C. B., Jeyendran, R. S., Acosta, V. A., & Rousev, R. (2006): Which thrombophilic gene mutations are risk factors for recurrent pregnancy loss? *American Journal of Reproductive Immunology*, 56(4), 230–236. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2006.00419.x>.

- Herodež, S. Š., Zagradišnik, B., Erjavec Škerget, A., Zagorac, A., Takač, I., Vlasisavljević, V., ... Kokalj Vokā, N. (2013): MTHFR C677T and A1298C genotypes and haplotypes in slovenian couples with unexplained infertility problems and in embryonic tissues from spontaneous abortions. *Balkan Journal of Medical Genetics*, 16(1), 31–40. <https://doi.org/10.2478/bjmg-2013-0015>.
- Hickey, S. E., Curry, C. J., & Toriello, H. V. (2013): ACMG practice guideline: Lack of evidence for MTHFR polymorphism testing. *Genetics in Medicine*, 15(2), 153–156. <https://doi.org/10.1038/gim.2012.165>.
- Hodgetts, V. A., Morris, R. K., Francis, A., Gardosi, J., & Ismail, K. M. (2015): Effectiveness of folic acid supplementation in pregnancy on reducing the risk of small-for-gestational age neonates: A population study, systematic review and meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 122(4), 478–490. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.13202>.
- Chambers, J. C., Ueland, P. M., Wright, M., Dore, C. J., Refsum, H., & Kooner, J. S. (2001): Investigation of relationship between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and vascular endothelial function in healthy human subjects. *Circulation Research*, 89(2), 187–192. <https://doi.org/10.1161/hh1401.093459>.
- Christensen, B., Arbour, L., Tran, P., Leclerc, D., Sabbaghian, N., Platt, R., ... Rozen, R. (1999): Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *American Journal of Medical Genetics*, 84(2), 151–157.
- Irfan, M., Ismail, M., Azhar Beg, M., Shabbir, A., Rashid Kayani, A., & Kaukab Raja, G. (2016): Association of the MTHFR C677T (rs1801133) polymorphism with idiopathic male infertility in a local Pakistani population. *Balkan Journal of Medical Genetics*, 19(1), 51–62. <https://doi.org/10.1515/bjmg-2016-0007>.
- Isotalo, P. A., Wells, G. A., & Donnelly, J. G. (2000): Neonatal and Fetal Methylenetetrahydrofolate Reductase Genetic Polymorphisms: An Examination of C677T and A1298C Mutations. *The American Journal of Human Genetics*, 67(4), 986–990. <https://doi.org/10.1086/303082>.
- Jacobsen, D. W. (1998). Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clinical Chemistry*, 44(8 II), 1833–1843. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.98.3.196>.
- Jacques, P. F., Bostom, A. G., Williams, R. R., Ellison, R. C., Eckfeldt, J. H., Rosenberg, I. H., ... Rozen, R. (1996): Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase, and plasma homocysteine concentrations. *Circulation*, 93(1), 7 LP-9. Retrieved from <http://circ.ahajournals.org/content/93/1/7.abstract>.
- Kelly, P., McPartlin, J., Goggins, M., Weir, D. G. W., & Scott, J. M. (1997): Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65(4), 1790–1795. Retrieved from <http://web.a.ebscohost.com.buproxy.bastyr.edu:2048/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=66d24fe9-a997-413c-a94c-46ccd26636c1@sessionmgr4003&vid=1&hid=4101>.
- Kiefte-de Jong, J. C., Timmermans, S., Jaddoe, V. W., Hofman, A., Tiemeier, H., Steegers, E. A., ... Moll, H. A. (2012): High circulating folate and vitamin B-12 concentrations in women during pregnancy are associated with increased prevalence of atopic dermatitis in their offspring. *The Journal of Nutrition*, 142(4), 731–738. <https://doi.org/10.3945/jn.111.154948>.

- Koucký, M. (2011): Patologie kyseliny listové a těhotenství. *Aktuální Farmakologie*, 7(4), 5–8.
- Kutzbach, C., & Stokstad, E. L. R. (1971): Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 250(3), 459–477. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(71\)90247-6](https://doi.org/10.1016/0005-2744(71)90247-6).
- Mardešić, T., Chládek, D., Kosařová, M., & Lonský, P. (2013): Diagnostika a léčba poruch neplodnosti (1. vydání). Praha: Grada Publishing s.r.o. ISBN 978-80-247-4458-2.
- Matthews, R. G., Sheppard, C., & Goulding, C. (1998): Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase: biochemistry and molecular biology. *European Journal of Pediatrics*, 157 Suppl, S54-9. <https://doi.org/10.1007/PL00014305>.
- McStay, C. L., Prescott, S. L., Bower, C., & Palmer, D. J. (2017): Maternal folic acid supplementation during pregnancy and childhood allergic disease outcomes: A question of timing? *Nutrients*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/nu9020123>.
- Medina, M. A., Urdiales, J. L., & Amores-Sánchez, M. I. (2001): Roles of homocysteine in cell metabolism. *European Journal of Biochemistry*, 268(14), 3871–3882. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02278.x>.
- Medina, & Amores-Sánchez. (2000): Homocysteine: An emergent cardiovascular risk factor? *European Journal of Clinical Investigation*, 30(9), 754–762. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.2000.00691.x>
- Mudd, S. H., Skovby, F., Levy, H. L., Pettigrew, K. D., Wilcken, B., Pyeritz, R. E., ... Cerone, R. (1985): The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 37(1), 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2009.09.009>.
- Murto, T., Skoog Svanberg, A., Yngve, A., Nilsson, T. K., Altmäe, S., Wånggren, K., ... Stavreus-Evers, A. (2014): Folic acid supplementation and IVF pregnancy outcome in women with unexplained infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 28(6), 766–772. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.01.017>.
- Ogino, S., & Wilson, R. (2003): Genotype and haplotype distributions of MTHFR 677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *Journal of Human Genetics*, 48(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s100380300000>.
- Ohrvik, V. E., & Witthoft, C. M. (2011). Human folate bioavailability. *Nutrients*, 3(4), 475–490. <https://doi.org/10.3390/nu3040475>.
- Pokorný, M. M., & Minárik, M. J. (2013). Negativní vliv hyperhomocysteinémie na lidskou reprodukci a možnosti její korekce suplementací vitamíny skupiny B, *New EU Magazine of Medicine*, 1–2, 23–29.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2013): Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: A committee opinion. *Fertility and Sterility*, 99(1), 63. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.09.023>.

- Prinz-Langenohl, R., Brämswig, S., Tobolski, O., Smulders, Y., Smith, D., Finglas, P., & Pietrzik, K. (2009): [6S]-5-methyltetrahydrofolate increases plasma folate more effectively than folic acid in women with the homozygous or wild-type 677C→T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase. *British Journal of Pharmacology*, 158(8), 2014–2021. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00492.x>.
- Přistoupilová, K., Přistoupil, I., & Heyrovský, M. (1999). Homocystein – molekula těšící se rostoucí pozornosti. *Chemické Listy*, 93, 365–374. Retrieved from [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999\\_06\\_365-374.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_06_365-374.pdf).
- Punab, M., Poolamets, O., Paju, P., Vihljajev, V., Pomm, K., Ladva, R., ... Laan, M. (2017): Causes of male infertility: A 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Human Reproduction*, 32(1), 18–31. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew284>.
- Rady, P. L., Tyring, S. K., Hudnall, S. D., Vargas, T., Kellner, L. H., Nitowsky, H., & Matalon, R. K. (1999): Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): the incidence of mutations C677T and A1298C in the Ashkenazi Jewish population. *American Journal of Medical Genetics*, 86(4), 380–384.
- Ren, A., & Wang, J. (2006): Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: A meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 86(6), 1716–1722. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.05.052>.
- Rosenzweig, A., & Watkins, H. (1991). Hyperhomocysteinemia: An Independent Risk Factor for Vascular Disease. *The New England Journal of Medicine*, 324(7), 429–436.
- Řežábek, K. (2008). *Léčba neplodnosti - 4., aktualizované vydání*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-2103-3.
- Řežábek, K. (2014). *Asistovaná reprodukce (2. aktualizované vydání)*. Praha: Maxdorf s.r.o. ISBN 978-80-7345-396-1.
- Safarinejad, M. R., Shafiei, N., & Safarinejad, S. (2011): Relationship between genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (C677T, A1298C, and G1793A) as risk factors for idiopathic male infertility. *Reproductive Sciences*, 18(3), 304–315. <https://doi.org/10.1177/1933719110385135>.
- Singh, K., Singh, S. K., & Raman, R. (2010): MTHFR A1298C polymorphism and idiopathic male infertility. *Journal of Postgraduate Medicine*, 56(4), 267–269. <https://doi.org/10.4103/0022-3859.70935>.
- Stegmann, K., Ziegler, A., Ngo, E. T. K. M., Kohlschmidt, N., Ermert, A., & Koch, M. C. (1999): Linkage Disequilibrium of MTHFR Genotypes., 29(February), 23–29.
- Stránský, M. (2005). Preventivní účinky kyseliny listové. *Interní medicína pro praxi*, 8(1), 36–40.
- Stráská, M. (2015). *Vliv polymorfismů enzymu methylenetetrahydrofolát reduktáza a trombofilních mutací na průběh gravidity*. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta.

- Škovierová, H., Vidomanová, E., Mahmood, S., Sopková, J., Drgová, A., Červeňová, T., ... Lehotský, J. (2016): The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms17101733>.
- Tran, P., Leclerc, D., Chan, M., Pai, A., Hiou-Tim, F., Wu, Q., ... Rozen, R. (2002): Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylenetetrahydrofolate reductase gene result in two enzyme isoforms. *Mammalian Genome*, 13(9), 483–492. <https://doi.org/10.1007/s00335-002-2167-6>.
- ÚZIS ČR. (2016): *Potravy 2014-2015*. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. ISBN 978-80-7472-153-3.
- ÚZIS ČR. (2017): *Asistovaná reprodukce v České republice*. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR. ISBN 978-80-7472-165-6.
- van der Put, N. M. J., & Blom, H. J. (2000): Neural tube defects and a disturbed folate dependent homocysteine metabolism. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 92(1), 57–61. [https://doi.org/10.1016/S0301-2115\(00\)00426-7](https://doi.org/10.1016/S0301-2115(00)00426-7).
- van der Put, N., & Blom, H. J. (2000b): Letters to the Editor Letters to the Editor. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 66, 745–747. <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e3181967b88>.
- van der Put, N. M., Gabreëls, F., Stevens, E. M., Smeitink, J. A., Trijbels, F. J., Eskes, T. K., ... Blom, H. J. (1998): A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *American Journal of Human Genetics*, 62(5), 1044–1051. <https://doi.org/10.1086/301825>.
- Vavrušková, K. (2010): *Význam trombofilních mutací v klinické genetice*. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.
- Vollset, S. E., Clarke, R., Lewington, S., Ebbing, M., Halsey, J., Lonn, E., ... Peto, R. (2013): Effects of folic acid supplementation on overall and site-specific cancer incidence during the randomised trials: Meta-analyses of data on 50 000 individuals. *The Lancet*, 381(9871), 1029–1036. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62001-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62001-7).
- Weisberg, I. S., Jacques, P. F., Selhub, J., Bostom, A. G., Chen, Z., Curtis Ellison, R., ... Rozen, R. (2001): The 1298A → C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): In vitro expression and association with homocysteine. *Atherosclerosis*, 156(2), 409–415. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(00\)00671-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(00)00671-7).
- Weisberg, I., Tran, P., Christensen, B., Sibani, S., & Rozen, R. (1998): A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Molecular Genetics and Metabolism*, 64(3), 169–172. <https://doi.org/10.1006/mgme.1998.2714>.
- Whitehead, A., Gallagher, P., Mills, J., Kirke, P., Burke, H., Molloy, M., ... Scott, J. (1995): A genetic defect in 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase in neural tube defects. *QJM: An International Journal of Medicine*, 88(11), 763–766.
- Wilcken, B., Bamforth, F., Li, Z., Zhu, H., Ritvanen, A., Renlund, M., ... Botto, L. D. (2003): Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *Journal of Medical Genetics*, 40, 619–625.

- Wu, X., Zhao, L., Zhu, H., He, D., Tang, W., & Luo, Y. (2012): Association between the MTHFR C677T polymorphism and recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 16(7), 806–811. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2011.0318>.
- Xuan, C., Li, H., Zhao, J. X., Wang, H. W., Wang, Y., Ning, C. P., ... Lun, L. M. (2014): Association between MTHFR polymorphisms and congenital heart disease: A meta-analysis based on 9,329 cases and 15,076 controls. *Scientific Reports*, 4, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep07311>.
- Yadav, U., Kumar, P., Yadav, S. K., Mishra, O. P., & Rai, V. (2014). Polymorphisms in folate metabolism genes as maternal risk factor for neural tube defects: an updated meta-analysis. *Metabolic Brain Disease*, 30(1), 7–24. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9575-7>.
- Yan, L., Zhao, L., Long, Y., Zou, P., Ji, G., Gu, A., & Zhao, P. (2012): Association of the maternal MTHFR C677T polymorphism with susceptibility to neural tube defects in offsprings: Evidence from 25 case-control studies. *PLoS ONE*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041689>.
- Yang, Y., Chen, J., Wang, B., Ding, C., & Liu, H. (2015): Association between MTHFR C677T polymorphism and neural tube defect risks: A comprehensive evaluation in three groups of NTD patients, mothers, and fathers. *Birth Defects Research Part A – Clinical and Molecular Teratology*, 103(6), 488–500. <https://doi.org/10.1002/bdra.23361>.
- Zapletal, O. (2012). Trombofilní stavy a jejich klinický význam v dětské populaci České republiky. Dizertační práce. Masarykova Univerzita. Lékařská fakulta.
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., ... Vanderpoel, S. (2009): International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertility and Sterility*, 92(5), 1520–1524. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.009>.
- Zetterberg, H., Regland, B., Palmér, M., Ricksten, A., Palmqvist, L., Rymo, L., ... Blennow, K. (2002): Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. *European Journal of Human Genetics*, 10(September 2001), 113–118. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200862>.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

NÁZEV ZKRATKY	VYSVĚTLENÍ
5-methyl-THF	5-methyltetrahydrofolát
5,10-methylen-THF	5,10-methylenetetrahydrofolát
A	adenin
ACMG	American College of Medical Genetics
AR	asistovaná reprodukce
ATP	adenosintrifosfát
B12	kyselina listová
BHMT	betain-homocystein-methyltransferáza
C	cytosin
CBS	cystathionin $\beta$ -syntáza
CL	cystathioninlyáza
CT	Capture Buffer
Cys	cystein
ČR	Česká republika
DHFR	dihydrofolát reduktáza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMSO	dimethylsulfoxid
F	žena
FAD	flavinadenindinukleotid
HAK	hormonální antikoncepce
Hcy	homocystein
hHcy	hyperhomocysteinémie
ICSI	intracytoplasmatická injekce spermií
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
KS	kontrolní skupina
LIČ	laboratorní identifikační číslo
LS	Lysis Buffer
M	muž
MAT	methioninadenosyltransferáza
Met	methionin
MTHFR	methylenetetrahydrofolát reduktáza
MTR	5-methyltetrahydrofolát-homocystein-S-metyltransferáza
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NK	negativní kontrola
NTD	defekty neurální trubice
PCR	polymerázová řetězová reakce
PGA	syntetická kyselina listová
PK	pozitivní kontrola
PP	přirozené početí
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RPL	opakovaný spontánní potrat
RT	pokožková teplota
RT-PCR	Real-Time PCR
SAH	S-adenosylhomocystein
SAM	S-adenosylmethionin

SGA	intrauterinní růstová retardace
SLG	Společnost lékařské genetiky a genomiky
SNP	jednonukleotidový polymorfismus
SS	studijní skupina
T	thymin
TE	Re-hydration Buffer
TEN	tromboembolická nemoc
tHcy	hladinu celkového homocysteinu
THF	tetrahydrofolát
UMFA	nemetabolizovaná kyselina listová
ÚZIS ČR	Ústav zdravotnických informací a statistik České republiky
WGS	celogenomové sekvenování
WHO	Světová zdravotnická organizace



## 10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 2.1: Chemická struktura homocysteinu.....	2
Obr. 2.2: Zjednodušené schéma metabolismu homocysteinu. ....	3
Obr. 2.3: Metabolismus homocysteinu .....	5
Obr. 2.4: Chemická struktura kyseliny listové.....	6
Obr. 2.5: Proces přeměny kyseliny listové a folátů v lidském těle. ....	8
Obr. 2.6: Lokalizace genu <i>MTHFR</i> .....	11
Obr. 2.7: Etiologie opakovaných spontánních potratů.....	17
Obr. 4.1: Restrikční místa pro endonukleázy <i>HinfI</i> a <i>MboII</i> . ....	29
Obr. 4.2: Grafická vizualizace výsledných fragmentů po restrikčním štěpení metodou PCR-RFLP pro polymorfismy enzymu <i>MTHFR</i> C677T (A) a A1298C (B).....	30
Obr. 4.3: Vizualizace vyhodnocování amplifikačních křivek v kanálech 530 nm a 560 nm.....	32
Obr. 4.4: Vzorové uspořádání testovacího proužku z metody reverzí hybridizace na stripu (CVD Strip Assay, ViennaLab).....	39
Obr. 5.1: Interval užívání HAK u účastnic studie.....	43
Obr. 5.2: Výsledné gely po metodě PCR-RFLP. ....	44
Obr. 5.3: Výsledné zlogaritmované křivky získané metodou RT-PCR v kanálech FAM (vlevo) a HEX (vpravo).....	45
Obr. 5.4: Procentuální zastoupení detekovaných genotypů polymorfismů C677T u žen a mužů ze studijní skupiny .....	46
Obr. 5.5: Procentuální zastoupení detekovaných genotypů polymorfismů A1298C u žen a mužů ze studijní skupiny .....	47
Obr. 5.6: Výskyt kombinovaných genotypů polymorfismů <i>MTHFR</i> C677T a A1298C u žen a mužů ze studijní skupiny párů.....	48
Obr. 5.7: Průměrná rizika párů ze studijní skupiny.....	48
Obr. 5.8: Korelační vztah mezi průměrným rizikem páru a dobou snahy o početí.....	49
Obr. 5.9: Ukázka získaných genotypů polymorfismů C677T a A1298C v genu <i>MTHFR</i> pomocí reverzní hybridizace na stripu (CVD Strip Assay, ViennaLab).....	50
Obr. 5.10: Věkové rozložení zkoumaného souboru z české populace pro jednotlivá pohlaví.....	51
Obr. 5.11: Procentuální zastoupení detekovaných genotypů polymorfismů C677T u žen a mužů z české populace .....	52
Obr. 5.12: Procentuální zastoupení detekovaných genotypů polymorfismů A1298C u žen a mužů české populace .....	52
Obr. 5.13: Výskyt kombinovaných genotypů polymorfismů <i>MTHFR</i> C677T a A1298C u žen a mužů české populace .....	53

Obr. 5.14: Výskyt kombinovaných genotypů polymorfismů MTHFR C677T a A1298C u žen a mužů studijní (SS) a kontrolní skupiny (KS).....	54
Obr. 5.15: Procentuální zastoupení jedinců ze studijní skupiny párů (SS) a kontrolní skupiny (KS) dle stupňů rizika (%). .....	55

## 11 SEZNAM TABULEK

Tab. I: Rozmezí koncentrací tHcy ( $\mu\text{mol/l}$ ) pro jednotlivé stupně hyperhomocsteinémie (údaje převzaty z Medina et al., 2001).....	10
Tab. II: Procentuální aktivita enzymu MTHFR vycházející ze vztahů mezi jednotlivými genotypy (údaje převzaty z van der Put et al., 1998).....	12
Tab. III: Ukázka hlavních výzkumných otázek z dotazníkového šetření.....	23
Tab. IV: Použité reagensie a jejich objemy pro izolace DNA z plné krve za použití DDK DNA Isolation Kit DDK-50 (Isohelix).....	24
Tab. V: Sekvence primerů použitých pro analýzu.....	26
Tab. VI: Reakční mix pro metodu PCR-RFLP.....	26
Tab. VII: Amplifikační profil metody PCR-RFLP pro detekci polymorfismu MTHFR C677T.....	27
Tab. VIII: Amplifikační profil metody PCR-RFLP pro detekci polymorfismu MTHFR A1298C.....	27
Tab. IX: Výsledné fragmenty vznikající po restrikčním štěpení metodou PCR-RFLP.....	29
Tab. X: Složení reakčního MasterMixu užitého v metodě RT-PCR.....	31
Tab. XI: Amplifikační program metod RT-PCR pro MTHFR A1298C a C677T.....	32
Tab. XII: Kritéria definující stupně rizika (v %) užitých ke statistickému zpracování dat. Údaje vychází z procentuální aktivity enzymu z Tab. II.....	33
Tab. XIII: Použité reagensie a jejich objemy pro izolace DNA z plné krve za použití Genomic DNA Mini Kit.....	34
Tab. XIV: Použité reagensie a jejich objemy PCR pro metodu reverzní hybridizace na stripu (CVD Strip Assay, ViennaLab).....	37
Tab. XV: Amplifikační profil pro metodu reverzní hybridizace na stripu (CVD Strip Assay, ViennaLab).....	37
Tab. XVI: Výsledné fragmenty PCR produktů pro metodu reverzní hybridizace na stripu.....	37
Tab. XVII: Použité reagensie a jejich objemy použité pro hybridizaci metodou reverzní hybridizace na stripu (CVD Strip Assay, ViennaLab).....	38
Tab. XVIII: Souhrnné zastoupení žen, které podstoupily umělé ukončení těhotenství.....	41
Tab. XIX: Souhrnné zastoupení žen, které prodělaly spontánní potrat po přirozeném početí.....	41
Tab. XX: Souhrnné zastoupení podstoupených metod AR u jednotlivých párů.....	42
Tab. XXI: Vliv faktorů na stupeň rizika (Mann-Whitney U test).....	49
Tab. XXII: Frekvence genotypů polymorfismů MTHFR pro výzkumnou a kontrolní skupinu.....	54
Tab. XXIII: Frekvence alel polymorfismů MTHFR pro výzkumnou a kontrolní skupinu.....	54
Tab. XXIV: Ideální rozložení výzkumných otázek Cíleného dotazníku.....	57

# 12 PŘÍLOHA

## Příloha 1: Vyjádření etické komise ZSF JU.



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Studies

**Etická komise**  
Ethics Committee

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

## VYJÁDŘENÍ ETICKÉ KOMISE ZSF JU

V Českých Budějovicích 29.3.2016.

Jméno předkladatele projektu: **Mgr. Dagmar Bystřická, Ph.D.**, vedoucí Genetické laboratoře GENNLABS s.r.o.

Název projektu: **Výskyt polymorfismů v MTHFR genu a jejich možná asociace s problematikou opakovaných spontánních potratů a mužskou infertilitou v České populaci**

Dne 29.3.2016 etická komise ZSF JU projednala návrh projektu včetně připraveného informovaného souhlasu a souhlasí s podáním projektu a s provedením navržené studie.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZDRAVOTNĚ SOCIÁLNÍ FAKULTA  
ETICKÁ KOMISE  
(2)

.....  
doc. MUDr. Jiří ŠIMEK, CSc.  
předseda etické komise ZSF JU

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Zdravotně sociální fakulta  
Etická komise Zdravotně sociální fakulty  
Jírovcova 1347/24  
CZ – 370 04 České Budějovice

Vyřizuje:  
Doc. MUDr. Jiří Šimek, CSc.  
jr.simek@volny.cz  
Pracoviště: J. Boreckého 27  
370 11 České Budějovice

+420 389 037 650  
www.zsf.jcu.cz  
www.jcu.cz

Genlabs s.r.o.  
Poliklinika Medipont  
Matice školské 1786/17  
370 01 České Budějovice



## Souhlas s účastí na vědeckém projektu týkajícího se výskytu polymorfismů v MTHFR genu a jejich možná asociace s problematikou opakovaných spontánních potratů a mužskou infertilitou v České populaci

Projekt je zaměřen na vyšetření genu MTHFR a jeho možné příčinné souvislosti s neplodností v České populaci. Recentní vědecká literatura popisuje průkaznou souvislost genetického polymorfismu v MTHFR genu se zvýšeným rizikem mužské infertility a také se zvýšeným výskytem opakujících se spontánních potratů. Studie bude mít spíše vědecký přínos. Výskyt vybraných polymorfismů u neplodných párů či infertilních mužů v České populaci v souvislosti s problematikou neplodnosti nebyl dosud publikován. Pro neplodné páry bude znamenat vyšetření těchto polymorfismů určitý posun pro lepší pochopení nebo vyvrácení této možné příčiny jejich problému. Získaná data budou v anonymní podobě statisticky zpracována pro publikaci v odborném časopise.

Jméno a příjmení vyšetřované/ho: .....

Rodné číslo: .....

Kontaktní adresa/email/telefon: .....

### A. Účel genetického laboratorního vyšetření

Zjištění polymorfismů v MTHFR genu: MTHFR C677T a MTHFR A1298C.

Alternativy navrhovaného genetického vyšetření (jejich vhodnost, přínos a rizika):  
Sekvenace genu MTHFR.

### B. PROHLÁŠENÍ VYŠETŘOVANÉ OSOBY

**B. 1. Za výše uvedeným účelem souhlasím s poskytnutím bukalního stěru, který si provedu sám pomocí poskytnuté odběrové soupravy dle přiloženého návodu a s provedením níže uvedeného molekulárně genetického vyšetření:**

**Vyšetření polymorfismů v MTHFR genu: MTHFR C677T a MTHFR A1298C metodou RFLP PCR nebo PCR ARMS.**

#### B. 2. Souhlas vyšetřované osoby s účastí na projektu:

Potvrzuji, že mi bylo poskytnuto řádné vysvětlení k tomuto genetickému laboratornímu vyšetření a že jsem poskytnuté informace porozuměl/a.

#### B. 3. Rozhodl/a jsem, že se vzorkem bude po ukončení testování naloženo takto:

##### Souhlas se skladováním

Pokud to bude možné a/nebo účelné, bude můj vzorek skladován pro další vyšetření provedená k mému prospěchu a prospěchu mých příbuzných. Před genetickým vyšetřením, které by se provádělo za jinými účely než uvedeno v části A., budu řádně poučen/a a toto vyšetření bude vždy provedeno až s novým informovaným souhlasem. Vzorek bude skladován u poskytovatele zdravotních služeb uvedeného v záhlaví nebo v laboratoři spolupracujícího poskytovatele a to nejvýše po dobu 5 let.

- Jestliže bude vzorek mého biologického materiálu dále skladován, **souhlasím/nesouhlasím** s jeho využitím ke kontrole kvality DNA diagnostiky (vzorek je zcela anonymně použit jako kontrola pro vyšetření jiného pacienta).
- **Souhlasím/nesouhlasím\*** s tím, že mohu být znovu kontaktován/a, na uvedené adrese, za účelem souhlasu s využitím mého skladovaného biologického materiálu v konkrétním výzkumném projektu.

## Informovaný souhlas účastníků studie – 2. strana

### Nesouhlas se skladováním

Můj vzorek bude po provedení genetického laboratorního vyšetření zlikvidován s tím rizikem, že nebude již možné v budoucnosti výsledek vyšetření v případě potřeby znovu ověřit a že zlikvidování vzorku může vést ke zhoršení dostupnosti diagnostiky u rodinných příslušníků. Dále jsem si vědom/vědoma, že pro další genetické testování bude nutný nový odběr materiálu.

### B. 4. Dále si přeji následující:

- Abych s výsledky genetického laboratorního vyšetření byl(a) / nebyl(a) seznámen(a)\*
- Souhlasím/nesouhlasím\* s využitím výsledků genetického laboratorního vyšetření a relevantních informací o mém zdravotním stavu, k vědeckým a výukovým účelům za podmínky, že tyto údaje budou prezentovány a publikovány pouze v anonymní formě.

Souhlasím s účastí na projektu týkajícího se výskytu polymorfismů v MTHFR genu a jejich možné asociace s problematikou opakovaných spontánních potratů a mužskou infertilitou v České populaci.

Na základě tohoto poučení prohlašuji, že souhlasím s odběrem příslušného vzorku z mého těla a s provedením výše popsaného genetického laboratorního vyšetření s podmínkami uvedenými výše. Jsem si vědom/a, že svůj souhlas mohu kdykoliv písemně odvolat.

Podpis vyšetřované osoby .....

V .....

Dne .....

Podpis: .....

\* vybranou variantu označte

## Příloha 3: Vstupní dotazník

### genetická laboratoř GENLABS: PILOTNÍ STUDIE

Dobrý den,  
naše akreditovaná genetická laboratoř právě provádí pilotní studii založenou na genetickém vyšetření genu pro methylenetrahydrofolát reduktázu (MTHFR) a shání dobrovolníky - PÁRY, které nemohou dlouhodobě otěhotnět či u nich došlo k opakovaným spontánním potratům (2 a více!!!). ZDARMA vyšetříme oběma z páru (muž i žena) možnou mutaci v genu pro MTHFR.  
Co pro to musíte udělat? Stačí pouze vyplnit náš online dotazník, na jehož základě proběhne výběr vhodných párů. Vyšetření bude ANONYMNÍ (práce respektuje vědecké etické standardy) a informace o Vaší osobě nebudou NIKDE a NIKDY zveřejněny!!!  
Vyšetření bude provedeno na základě buklíčního stěru s příloženým informovaným souhlasem, který Vám zašleme poštou - NEMUSÍTE SE Tedy OSOBNĚ DOSTAVIT! Ovšem vzhledem k negativním zkušenostem s předchozími respondenty, kteří se naší studii měli účastnit a byly jim proto zaslány odběrové soupravy, které se nám již nevrátili, o účast žádáme pouze OPRAVDOVĚ ZÁJEMCE, KTERÍ NÁM SVÉ VZORKY PO ZASLÁNÍ SOUPRAV ZAŠLOU ZPĚT!!!! Děkujeme za pochopení.

Na základě vyhodnocení dotazníku vybereme vhodné osoby nejprve k vyplnění cílenějšího dotazníku, který poslouží jako odrazový můstek k následnému testování. V případě, že si vybereme právě Vás a Vašeho partnera, se Vám ozveme na Vámi uvedenou emailovou adresu.

KAPACITA JE OMEZENÁ! Uzavření dotazníků a následný výběr proběhne 10.09.2017.

Pro přikročení k dotazníku zmáčkněte tlačítko "NEXT".

za genetickou laboratoř Genlabs, [www.genlabs.cz](http://www.genlabs.cz)  
Bc. Markéta Stráská, studentka Přírodovědecké fakulty Jihočeská univerzity v Českých Budějovicích  
[marketa.straska@gmail.com](mailto:marketa.straska@gmail.com)

\*Required

#### 1. Email address \*



### POKYNY K VYPLNĚNÍ DOTAZNÍKU

Dotazník je složen z několika sekcí. Tyto jednotlivé sekce jsou primárně rozděleny na 2 části - v 1. části naleznete hlavní otázku, která na základě Vaší odpovědi určí, zdali budete pokračovat vyplňováním podotázek k danému tématu (tedy zdali postoupíte do 2. části této sekce), anebo začnete-li vyplňovat hlavní otázku ze sekce další.

Ke svým odpovědím se můžete v průběhu vyplňování vracet a upravovat je za pomoci tlačítka "BACK", zatímco tlačítko "NEXT" slouží k postupu do dalších sekcí/částí tohoto dotazníku. Ukazatel, který naleznete v pravém dolním rohu, Vás informuje o vyplněnosti dotazníku.

Otázky označené symbolem \* jsou povinné a ke zdárnému vyplnění dotazníku je nutné na všechny takto označené otázky odpovědět!

Předem mnohokrát děkujeme za vyplnění našeho dotazníku a možnou účast v naší studii.

## POŘADÍ

### SEKCE

### VÝZKUMNÁ OTÁZKA

- | POŘADÍ | VÝZKUMNÁ OTÁZKA                                                          |
|--------|--------------------------------------------------------------------------|
| 1      | Obecné informace o respondentech (datum narození, e-mail)                |
| 2      | Jak dlouho se snažíte otěhotnět?                                         |
| 3      | Je u Vás přítomna ovulace?                                               |
| 4      | Podstoupila jste někdy umělé ukončení těhotenství?                       |
| 5      | Prodělala jste někdy spontánní potrat po přirozeném početí (PP)?         |
| 6      | Prodělala jste někdy potrat po IVF?                                      |
| 7      | Prodělala jste potrat po léčbě neplodnosti?                              |
| 8      | Jaké metody jste podstoupila?                                            |
| 9      | Užívala jste někdy hormonální antikoncepci (HAK)?                        |
| 10     | Máte děti počaté přirozenou cestou (i z IVF) se stejným/jiným partnerem? |
| 11     | Užíváte v současnosti kyselinu listovou?                                 |



#### Příloha 4: Cílený dotazník

	Indikační skupina:	Datum:		
1	Jméno partnerky:	Datum narození:		
2	Jméno partnera:	Datum narození:		
3	Jak dlouho se snažíte otěhotnět?			
4	Prodělala jste někdy umělé ukončení těhotenství?  ANO/NE	Datum (měsíc/rok): 1. 2. 3. 4. 5.	Stáří gravidity v týd.: 1. 2. 3. 4. 5.	Důvod/komplikace: 1. 2. 3. 4. 5.
5	Prodělala jste někdy spontánní potrat, po přirozeném početí (PP), pokud ano, kolikrát a kdy?  ANO/NE Počet:	Datum (měsíc/rok): 1. 2. 3. 4. 5.	Stáří gravidity v týd.: 1. 2. 3. 4. 5.	Důvod/komplikace: 1. 2. 3. 4. 5.
6	Prodělala jste někdy spontánní potrat po IVF, pokud ano kolikrát a kdy?  ANO/NE Počet:	Datum (měsíc/rok): 1. 2. 3. 4. 5. 6.	Stáří gravidity v týd.: 1. 2. 3. 4. 5. 6.	Důvod/komplikace: 1. 2. 3. 4. 5. 6.
7	Prodělala jste někdy neúspěšný embryotransfer?  ANO/NE Počet:	Datum (měsíc/rok): 1. 2. 3. 4. 5.	Počet embryí/stáří embryí: 1. 2. 3. 4. 5.	
8	Prodělala jste potrat po léčbě neplodnosti? ANO/NE	Datum: 1. 2.	Druh léčby: 1. 2.	Stáří gravidity v době potratu: v týdnech: 1. 2.



		3. 4. 5.	3. 4. 5.	3. 4. 5.
9	Užívala jste někdy hormonální antikoncepci (HAK)?	ANO/NE	Datum, od kdy byla užívána HAK:	Datum vysazení HAK:
10	Máte děti počaté přirozenou cestou (i z IVF) s jiným partnerem, uveďte jejich stáří a způsob početí?	Počet dětí:	Stáří dětí:	Počet početí přirozenou cestou:  Počet početí pomocí IVF:
11	Užíváte v současnosti kyselinu listovou?	Žena ANO/NE Od kdy:	Muž ANO/NE Od kdy:	Pozn.:
12	Máte vyšetřen karyotyp, pokud ano uveďte jej?	Žena ANO/NE Karyotyp:	Muž ANO/NE Karyotyp:	Metoda: G-banding Jiné:
13	Léčíte se na neplodnost?  ANO/NE	IUI: ANO/NE IVF/ICSI: ANO/NE Jiné:	Od kdy?	Důvod neplodnosti:
14	Dosud prodělaná léčba neplodnosti:	IUI 1. Datum (měsíc/rok):  Způsob léčby:  Výsledek gravidita: ANO/NE 2. Datum (měsíc/rok):  Způsob léčby:  Výsledek gravidita: ANO/NE	IVF/ICSI 1. Datum (měsíc/rok):  Způsob léčby:  Výsledek gravidita: ANO/NE 2. Datum (měsíc/rok):  Způsob léčby:	Jiné: 1. Datum (měsíc/rok):  Způsob léčby:  Výsledek gravidita: ANO/NE 2. Datum (měsíc/rok):  Způsob léčby:  Výsledek gravidita:

		<p>3. Datum (měsíc/rok):</p> <p>Způsob léčby:</p> <p>Výsledek gravidita: ANO/NE</p> <p>4. Datum (měsíc/rok):</p> <p>Způsob léčby:</p> <p>Výsledek gravidita: ANO/NE</p> <p>5. Datum (měsíc/rok):</p> <p>Způsob léčby:</p> <p>Výsledek gravidita: ANO/NE</p>	<p>Výsledek gravidita: ANO/NE</p> <p>3. Datum (měsíc/rok):</p> <p>Způsob léčby:</p> <p>Výsledek gravidita: ANO/NE</p> <p>4. Datum (měsíc/rok):</p> <p>Způsob léčby:</p> <p>Výsledek gravidita: ANO/NE</p> <p>5. Datum (měsíc/rok):</p> <p>Způsob léčby:</p> <p>Výsledek gravidita: ANO/NE</p>	<p>ANO/NE</p> <p>3. Datum (měsíc/rok):</p> <p>Způsob léčby:</p> <p>Výsledek gravidita: ANO/NE</p> <p>4. Datum (měsíc/rok):</p> <p>Způsob léčby:</p> <p>Výsledek gravidita: ANO/NE</p> <p>5. Datum (měsíc/rok):</p> <p>Způsob léčby:</p> <p>Výsledek gravidita: ANO/NE</p>
--	--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Příloha 5: Ilustrační leták k oslovení potenciálních účastníků studie – I. etapa.



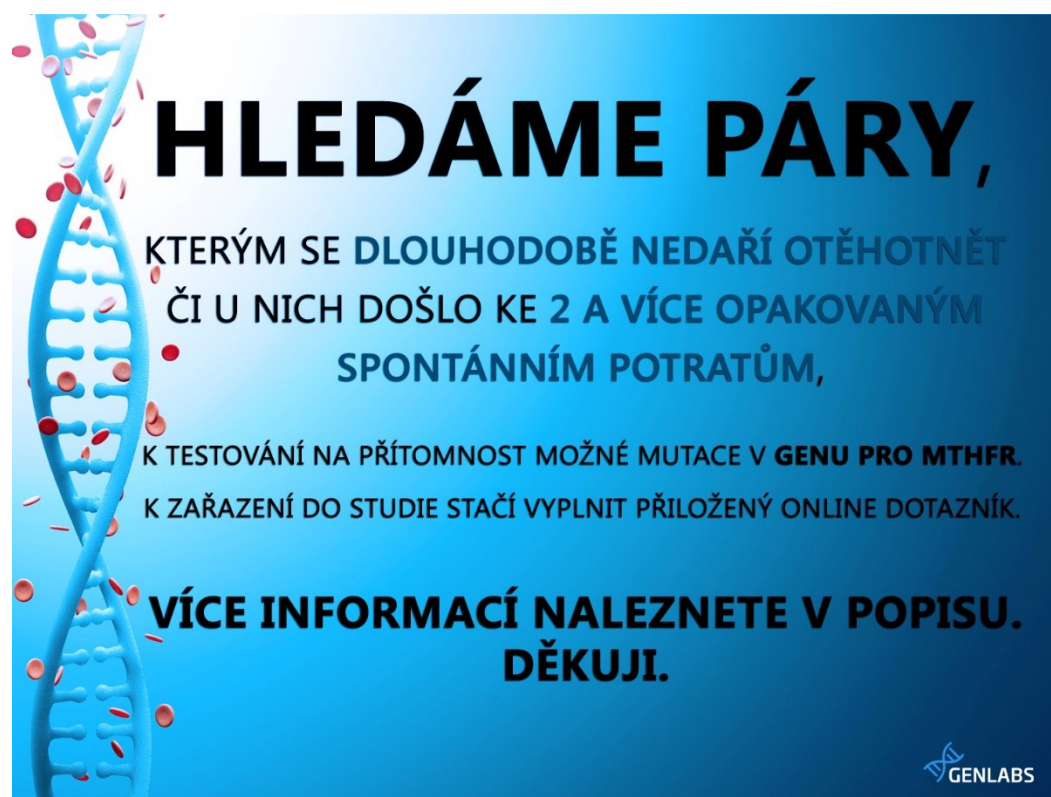
**HLEDÁME PÁRY,**  
KTERÝM SE DLOUHODOBĚ NEDAŘÍ OTĚHOTNĚT  
ČI U NICH DOŠLO KE 2 A VÍCE OPAKOVANÝM  
SPONTÁNNÍM POTRATŮM,

K TESTOVÁNÍ NA PŘÍTOMNOST MOŽNÉ MUTACE V GENU PRO MTHFR.  
K ZAŘAZENÍ DO STUDIE STAČÍ VYPLNIT PŘILOŽENÝ ONLINE DOTAZNÍK.

**VÍCE INFORMACÍ NALEZNETE V POPISU.  
DĚKUJI.**

GENLABS

Příloha 6: Ilustrační leták k oslovení potenciálních účastníků studie – II. etapa.



**HLEDÁME PÁRY,**  
KTERÝM SE DLOUHODOBĚ NEDAŘÍ OTĚHOTNĚT  
ČI U NICH DOŠLO KE 2 A VÍCE OPAKOVANÝM  
SPONTÁNNÍM POTRATŮM,

K TESTOVÁNÍ NA PŘÍTOMNOST MOŽNÉ MUTACE V GENU PRO MTHFR.  
K ZAŘAZENÍ DO STUDIE STAČÍ VYPLNIT PŘILOŽENÝ ONLINE DOTAZNÍK.

**VÍCE INFORMACÍ NALEZNETE V POPISU.  
DĚKUJI.**

GENLABS

**Příloha 7: Podrobný přehled naměřených koncentrací (ng/μl) vzorků studijní skupiny párů.**

<b>OZNAČENÍ VZORKU</b>	<b>KONCENTRACE (ng/μl)</b>	<b>OZNAČENÍ VZORKU</b>	<b>KONCENTRACE (ng/μl)</b>	<b>OZNAČENÍ VZORKU</b>	<b>KONCENTRACE DNA (ng/μl)</b>
MTHFR 3	14,10	MTHFR 15	4,37	MTHFR 27	57,50
MTHFR 4	4,16	MTHFR 16	33,70	MTHFR 28	43,20
MTHFR 5	16,60	MTHFR 17	27,40	MTHFR 29	5,34
MTHFR 6	48,00	MTHFR 18	32,50	MTHFR 30	33,90
MTHFR 7	116,00	MTHFR 19	83,40	MTHFR 31	101,00
MTHFR 8	83,20	MTHFR 20	46,70	MTHFR 32	299,00
MTHFR 9	39,30	MTHFR 21	26,60	MTHFR 33	8,37
MTHFR 10	28,80	MTHFR 22	13,10	MTHFR 34	168,00
MTHFR 11	40,40	MTHFR 23	26,00	MTHFR 35	161,00
MTHFR 12	48,00	MTHFR 24	115,00	MTHFR 36	143,00
MTHFR 13	42,40	MTHFR 25	113,00	MTHFR 37	274,00
MTHFR 14	7,36	MTHFR 26	59,60	MTHFR 38	93,80

**Příloha 8: Souhrnné informace o účastnících získaných vyhodnocením Cílových dotazníků (páry 1-9)**

PÁR		1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>VĚK</b>	F	34	30	33	34	36	38	40	38	31
<b>(roky)</b>	M	43	38	38	43	34	36	32	37	29
<b>SNAHA</b>	(roky)	1	1,5	3	2	4	1,5	4	3	0,5
	počet									<b>2</b>
<b>INTERRUPCE</b>	mm/rr	x	x	x	x	x	x	x	x	05/13 10/16
	stáří (tt)									10
	počet	<b>2</b>	<b>2</b>					<b>2</b>	<b>1</b>	
<b>SPPP</b>	datum	07/15 01/16	07/15 11/15	x	x	x	x	11/14 02/15	10/16	x
	stáří (tt)	x						8 / 9	7	
<b>KARYOTYP</b>	F	x	x	x	x	46XX	x	x	46XX	x
	M	x	x	x	x	46XY	x	x	46XY	x
<b>LN</b>	od kdy	x	x	12/16	12/12	x/13	10/16		12/16	x
	počet				<b>2</b>	<b>1</b>		<b>1</b>		
<b>IVF</b>	mm/rr	x	x	x	12/12 1/17	11/15		05/16	x	x
	počet			<b>3</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>5</b>		<b>2</b>	
	mm/rr			12/16		x/14 x/14	10/14 <sup>1</sup> 10/16		02/17	
<b>IUI</b>		x	x	01/17	12/12	x/14 x/15	11/16 12/16	x		x
				02/17	1/17	01/17	2/17		04/17	
<b>ET</b>	počet	x	x	x	x	x	x	<b>1</b>	x	x
	mm/rr							10/15		
	počet				<b>4</b>					
	mm/rr				01/13 04/13 09/13 <sup>1</sup> 01/17		x	x	x	x
<b>KET</b>		x	x	x						
<b>DŮVOD LN</b>		x	x	IS	IS/SS	IS	IS/SS	x	IS/SS	x
	<b>IVF</b>							<b>2</b>		
	mm/rr	x	x	x	x	x	x	12/15 07/16	x	x
<b>SPLN</b>	stáří (tt)							9,10		
	<b>IUI</b>									
	mm/rr	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	stáří (tt)									
<b>HAK</b>	od	98		08		02/08	09	96	00	03
	do	10	x	13	x	09/12	11	06	10	12
	F	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano
<b>B<sub>9</sub></b>	M	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>DĚTI S JINÝM</b>	PP	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>PARTNEREM</b>	AR	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>SE STEJNÝM</b>	PP	1	x	x	x	x	x	x	1	x
<b>PARNEREM</b>	AR	x	x	x	1	x	1	x	x	x

<sup>1</sup> – výsledkem úspěšná gravidita, F – žena; M – muž; mm/rr – měsíc a rok; UUT – umělé ukončení těhotenství; tt – stáří v těhotenských týdnech; SPPP – spontánní potrat po přirozeném početí; IVF – *in vitro* fertilizace; IUI – intrauterinní inseminace; ICSI – intracytoplasmatická injekce spermií; ET – embryotransfer; KET – kryoembryotransfer; LN – léčba neplodnosti; SPLN – spontánní potrat po léčbě neplodnosti; HAK – hormonální antikoncepce; B<sub>9</sub> – kyselina listová; PP – přirozené početí; AR – asistovaná reprodukce, END – endometrióza; NV – neprůchodné vaječníky; IS – idiopatická sterilita; SS – sekundární sterilita; ZT – zamlklé těhotenství

**Příloha 9: Souhrnné informace o účastnících získaných vyhodnocením Cílových dotazníků (páry 10-18)**

PÁR		10	11	12	13	14	15	16	17	18
<b>VĚK</b>	F	34	47	28	27	27	39	37	23	38
	M	36	47	34	29	29	36	39	24	39
<b>SNAHA</b>	roky	1,5	5	2	0	3 <sup>1</sup>	6	7	4	1 <sup>2</sup>
	počet		<b>2</b>		<b>1<sup>3</sup></b>	<b>1<sup>4</sup></b>	<b>1<sup>5</sup></b>			<b>3</b>
<b>INTERRUPCE</b>	datum	x	09/05	x	09/12	x/05	02/14	x	x	08/06 03/08 11/08
	stáří		7		12	8	19			8,?,20
	počet		2		2	1	3			<b>1</b>
<b>SPPP</b>	mm/rr	x	11/90	x	08/13	03/05	08/15 07/16	x	x	07/09
	stáří		08/13 23 13		02/14 8 8	6	05/17 10,8,6			8
<b>KARYOTYP</b>	F	x	x	46XX	x	x	?	x	x	x
	M	x	x	46XY	x	x	?	x	x	x
<b>LN</b>	od kdy	x	04/15	09/16	x	x/13	x	02/17	x	x
	počet		1	1		3				
<b>IVF</b>	mm/rr	x	12/15	09/16	x	03/13 <sup>6</sup> 09/13 03/14	x	x	x	x
	počet		1							
<b>IUI</b>	mm/rr	x	04/15	x	x	x	x	x	x	x
	počet		<b>1</b>	<b>1</b>				<b>1</b>		
<b>ET</b>	mm/rr	x	12/15	9/16	x	x	x	03/17	x	x
	počet			<b>2</b>		<b>2</b>		<b>1</b>		
<b>KET</b>	mm/rr	x	x	11/16 12/16	x	05/13 07/13	x	08/17	x	x
	<b>DŮVOD LN</b>	x	x	END, NV	x	x	x	x	x	x
<b>SPLN</b>	mm/rr	x	x	x	x	x/12 04/13	x	x	x	x
	stáří					6 6				
<b>IUI</b>	mm/rr	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	stáří									
<b>HAK</b>	od	99	92	06	07	05 08	96	96	09	x
	do	11	00	10	12	06 09	10	10	13	x
<b>B<sub>9</sub></b>	F	x	ano	ano	x	ano	ano	x	x	ano
	M	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>DĚTI S JINÝM PARTNEREM</b>	PP	x	x	x	x	1	x	x	x	1
<b>SE STEJNÝM PARTNEREM</b>	AR	1	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>SE STEJNÝM PARTNEREM</b>	PP	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>PARNEREM</b>	AR	x	x	x	x	x	x	x	x	x

<sup>1</sup> – 5 let s exmanželem a 3 roky s nynějším přítelem; <sup>2</sup> – v tuto chvíli; 3 - *mola hydatinosa*; <sup>4</sup> – osobní důvody; <sup>5</sup> – genetická vada plodu; <sup>6</sup> – biochemická gravidita; F – žena; M – muž; mm/rr – měsíc a rok; UUT – umělé ukončení těhotenství; tt – stáří v těhotenských týdnech; SPPP – spontánní potrat po přirozeném početí; IVF – *in vitro* fertilizace; IUI – intrauterinní inseminace; ICSI – intracytoplasmatická injekce spermií; ET – embryotransfer; KET – kryoembryotransfer; LN – léčba neplodnosti; SPLN – spontánní potrat po léčbě neplodnosti; HAK – hormonální antikoncepce; B<sub>9</sub> – kyselina listová; PP – přirozené početí; AR – asistovaná reprodukce; END – endometrióza; NV – neprůchodné vaječníky

**Příloha 10: Absolutní a relativní zastoupení detekovaných genotypů polymorfismu C677T u žen a mužů ze studijní skupiny**

GENOTYP C677T	677CC		677CT		677TT	
	F	M	F	M	F	M
CELKOVÝ POČET	7	6	8	12	3	0
PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ	<b>38,89 %</b>	<b>33,33 %</b>	<b>44,44 %</b>	<b>66,67 %</b>	<b>16,67 %</b>	<b>0 %</b>

pozn.: ,F' značí ženy, ,M' muže

**Příloha 11: Absolutní a relativní zastoupení detekovaných genotypů polymorfismu A1298C u žen a mužů ze studijní skupiny**

GENOTYP A1298C	1298AA		1298AC		1298CC	
	F	M	F	M	F	M
CELKOVÝ POČET	7	7	11	8	0	3
PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ	<b>38,89 %</b>	<b>38,89 %</b>	<b>61,11 %</b>	<b>44,44 %</b>	<b>0 %</b>	<b>16,67 %</b>

pozn.: ,F' značí ženy, ,M' muže

**Příloha 12: Absolutní a relativní zastoupení kombinovaných genotypů polymorfismů C677T a A1298C u žen a mužů ze studijní skupiny**

KOMBINOVANÝ GENOTYP	CC/AA		CC/AC		CC/CC	
	F	M	F	M	F	M
CELKOVÝ POČET	1	1	6	2	0	3
PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ	<b>5,56 %</b>	<b>5,56 %</b>	<b>33,33 %</b>	<b>11,11 %</b>	<b>0 %</b>	<b>16,67 %</b>
KOMBINOVANÝ GENOTYP	CT/AA		CT/AC		CT/CC	
	F	M	F	M	F	M
CELKOVÝ POČET	3	6	5	6	0	0
PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ	<b>16,67 %</b>	<b>33,33 %</b>	<b>27,78 %</b>	<b>33,33 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>
KOMBINOVANÝ GENOTYP	TT/AA		TT/AC		TT/CC	
	F	M	F	M	F	M
CELKOVÝ POČET	3	0	0	0	0	0
PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ	<b>16,67 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>

pozn.: ,F' značí ženy, ,M' muže

**Příloha 13: Detailně zpracované výsledné kombinace genotypů polymorfismů v genu *MTHFR* u žen a mužů ze studijní skupiny**

LIČ	PÁR	POHLAVÍ	VÝSLEDNÝ KOMBINOVANÝ GENOTYP C677T / A1298C	RIZIKO PÁRU [%]	LIČ	PÁR	POHLAVÍ	VÝSLEDNÝ KOMBINOVANÝ GENOTYP C677T / A1298C	RIZIKO PÁRU [%]
MTHFR 03	1	F	CC/AC	52	MTHFR 21	10	F	CT/AA	17
MTHFR 04	1	M	CT/AC		MTHFR 22	10	M	CC/AA	
MTHFR 05	2	F	TT/AA	63,5	MTHFR 23	11	F	CT/AC	60,5
MTHFR 06	2	M	CT/AC		MTHFR 24	11	M	CC/CC	
MTHFR 07	3	F	CT/CC	43	MTHFR 25	12	F	CC/AC	25,5
MTHFR 08	3	M	CT/AC		MTHFR 26	12	M	CT/AA	
MTHFR 09	4	F	CT/AC	34,5	MTHFR 27	13	F	CC/AC	25,5
MTHFR 10	4	M	CC/AC		MTHFR 28	13	M	CT/AA	
MTHFR 11	5	F	TT/AA	63,5	MTHFR 29	14	F	CT/AC	34,5
MTHFR 12	5	M	CT/AC		MTHFR 30	14	M	CC/AC	
MTHFR 13	6	F	CT/AC	43	MTHFR 31	15	F	TT/AA	54,5
MTHFR 14	6	M	CT/AA		MTHFR 32	15	M	CT/AA	
MTHFR 15	7	F	CC/AC	17	MTHFR 33	16	F	CT/AC	52
MTHFR 16	7	M	CC/CC		MTHFR 34	16	M	CT/AC	
MTHFR 17	8	F	CC/AC	34,5	MTHFR 35	17	F	CC/AC	43
MTHFR 18	8	M	CT/AC		MTHFR 36	17	M	CC/CC	
MTHFR 19	9	F	CC/AA	17	MTHFR 37	18	F	CT/AA	34
MTHFR 20	9	M	CT/AA		MTHFR 38	18	M	CT/AA	

pozn.: ‚LIČ‘ značí laboratorní identifikační číslo; ‚F‘ značí ženu a ‚M‘ muže

**Příloha 14: Absolutní a relativní zastoupení genotypů polymorfismu C677T u žen a mužů z kontrolní skupiny zástupců české populace**

GENOTYP	677CC		677CT		677TT	
	F	M	F	M	F	M
CELKOVÝ POČET	36	14	32	21	9	2
PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ	<b>46,75 %</b>	<b>37,84 %</b>	<b>41,56 %</b>	<b>56,76 %</b>	<b>11,69 %</b>	<b>5,41 %</b>

pozn.: ‚F‘ značí ženy, ‚M‘ muže



**Příloha 15: Absolutní a relativní zastoupení genotypů polymorfismu A1298C u žen a mužů z kontrolní skupiny zástupců české populace**

GENOTYP	1298AA		1298AC		1298CC	
	F	M	F	M	F	M
CELKOVÝ POČET	34	11	38	23	5	3
PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ	<b>44,16 %</b>	<b>29,73 %</b>	<b>49,35 %</b>	<b>62,16 %</b>	<b>6,49 %</b>	<b>8,11 %</b>

pozn.: ,F' značí ženy, ,M' muže

**Příloha 16: Absolutní a relativní zastoupení genotypů polymorfismů C677T a A1298C v kontrolní skupině zástupců české populace (celkový soubor)**

	677CC	677CT	677TT	1298AA	1298AC	1298CC
CELKOVÝ POČET	50	53	11	45	61	8
PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ	<b>43,86 %</b>	<b>46,49 %</b>	<b>9,65 %</b>	<b>39,47 %</b>	<b>53,51 %</b>	<b>7,02 %</b>

**Příloha 17: Absolutní a relativní zastoupení kombinovaných genotypů polymorfismů C677T a A1298C v kontrolní skupině zástupců české populace (celkový soubor)**

KOMBINOVANÝ GENOTYP	CC/AA	CC/AC	CC/CC
CELKOVÝ POČET	7	37	8
PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ	<b>6,14 %</b>	<b>32,46 %</b>	<b>7,02 %</b>
KOMBINOVANÝ GENOTYP	CT/AA	CT/AC	CT/CC
CELKOVÝ POČET	27	24	0
PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ	<b>23,68 %</b>	<b>21,05 %</b>	<b>0 %</b>
KOMBINOVANÝ GENOTYP	TT/AA	TT/AC	TT/CC
CELKOVÝ POČET	11	0	0
PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ	<b>9,65 %</b>	<b>0 %</b>	<b>0 %</b>