

Prevalence vrožených trombofilií u pacientek s těžkou formou ovariálního hyperstimulačního syndromu

Š. Machač, M. Procházka, M. Lubušký

Souhrn: *Cíl práce:* Stanovit prevalenci markerů vrožených trombofilií u pacientek, jejichž stimulace v programu IVF byla komplikována rozvojem těžké formy ovariálního hyperstimulačního syndromu (OHSS). *Typ práce:* kohortová studie. *Materiál a metodika:* Do sledovaného souboru (skupina A, n = 50) byly zahrnuty pacientky, jejichž stimulace v programu IVF byla komplikována rozvojem těžké formy OHSS. Do 2 skupin kontrolních souborů byly zařazeny jednak sterilní pacientky, jejichž stimulace nebyla komplikována rozvojem OHSS (skupina B, n = 93) a dále zdravé těhotné ženy bez anamnézy sterility (skupina C, n = 196). Krevní vzorky těchto pacientek byly vyšetřeny na přítomnost markerů vrožených trombofilií (mutace faktoru V - Leiden, mutace genu pro methyltetrahydrofolátreduktázu (MTHFR) C677T a mutace protrombinu G20210A a deficit antitrombinu, proteinu C nebo proteinu S. *Výsledky:* Ve sledovaném souboru (skupina A) jsme zjistili u 7 z 50 pacientek pozitivní mutaci faktoru V Leiden ve srovnání s 11 pozitivními pacientkami z 93 ze skupiny B (heterozygot), $p = 0,71$ OR 1,21 (0,39–3,70) a 10 ze 196 ze skupiny C, $p = 0,03$ OR 3,03 (0,97–9,28). Mutaci v genu pro MTHFR C677T jsme zjistili u 17 z 50 pacientek ze skupiny A (heterozygot) u 36 pacientek z 93 ze skupiny B (35 heterozygotů a 1 homozygot) a u 93 pacientek z 196 ze skupiny C (86 heterozygotů a 7 homozygotů) bez statistické významnosti. U 1 pacientky ze skupiny A a u 1 ze skupiny B jsme zjistili deficit proteinu S. U žádné pacientky ve sledovaném souboru jsme nezjistili deficit proteinu C nebo mutaci protrombinu. *Závěr:* Zjistili jsme vzestup prevalence mutace faktoru V Leiden (heterozygot) u sterilních pacientek. Nosičství této mutace neznamená pro tyto pacientky zvýšené riziko rozvoje OHSS při stimulaci v programu IVF.

Klíčová slova: ovariální hyperstimulační syndrom, trombofilie, mutace faktoru V Leiden

Summary: Prevalence of inherited thrombophilia in patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Objective:* to determine the prevalence of markers of inherited thrombophilia in patients with severe form of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Design:* Cohort study. *Material and methods:* blood samples were analysed for markers of thrombophilias (mutation of factor V - Leiden, mutation of methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T, mutation of prothrombin G20210A and antithrombin, protein C, protein S deficiencies). Study group consist of women who underwent controlled ovarian hyperstimulation for IVF complicated by severe OHSS (group A, n = 50). Results were compared with two controls groups - women who underwent ovarian hyperstimulation for IVF without developing OHSS (group B, n = 93) and healthy pregnant women with no history of infertility (group C, n = 196). *Results:* we found 7 out of 50 patients from group A positive for Leiden mutation (heterozygots) in comparison with 11 out of 93 from group B (heterozygots), $p = 0,71$ OR 1,21 (0,39 - 3,70) and 10 out of 196 from group C (heterozygots), $p = 0,03$ OR 3,03 (0,97–9,28). The polymorphism of MTHFR 677T gene was detected in 17 out of 50 patients (heterozygots) from group A, in 36 out of 93 patients from group B (35 heterozygots, 1 homozygot) and in 93 out of 196 patients from group C (86 heterozygots, 7 homozygots) with no statistical significance. One patient from group A and one patient from group B had protein S deficiency, we did not find any protein C or antithrombin deficiencies. *Conclusion:* we found increased prevalence of factor V Leiden mutation in Czech infertile women. Carriers of Leiden mutation had no enhanced risk of development severe form of OHSS during stimulation.

Key words: ovarian hyperstimulation syndrome, thrombophilia, factor V Leiden mutation

Úvod

Těžká forma ovariálního hyperstimulačního syndromu s incidencí 0,5–1 % na léčebný cyklus patří k nejzávažnějším komplikacím metod asistované reprodukce. Při charakteristickém masivním úniku intravazální tekutiny do „třetího prostoru“ dochází k hemokoncentraci (která zvyšuje hematokrit až na 55 %), leukocytóze nad 25 000 leukocytů na mm³, oligurii a elektrolytové dysbalanci. Tento klinicky závažný stav může

být komplikován hepatorenálním selháním nebo tromboembolickou nemocí. Patogeneze vzniku těžké formy OHSS není objasněna. Substance vyvolávající arteriální vazodilataci a následný únik tekutiny bohaté na proteiny je pravděpodobně látka produkovaná hyperstimulovanými vaječnými buňkami. Prokázána byla role exogenního nebo endogenního hCG na iniciaci celého procesu [1]. Zvýšení hematokritu a viskozity krve spolu se změnami koagulačních

parametrů jsou udávány jako hlavní faktory vzniku trombózy. Prevalence trombózy u těžké formy OHSS se pohybuje okolo 0,78 % [2].

Trombofilie jsou vrožené nebo získané poruchy hemostatického mechanismu charakterizované zvýšenou tendencí ke krevnímu srážení a následné trombóze. Mezi vrožené formy řadíme rezistenci na aktivovaný protein C (APC rezistenci způsobenou

mutací faktoru V Leiden), hyperhomocysteinemii (způsobenou mutací methylenetrahydrofolát reduktázy MTHFR 677T), mutaci protrombinu (G20210A) a deficit antitrombinu, vrožený deficit proteinu C, vrožený deficit proteinu S a deficit antitrombinu. K získaným trombofiliím patří antifosfolipidový syndrom a získaná APC rezistence.

Není jednotný názor na souvislost mezi trombofilními stavy a rozvojem OHSS. V roce 2002 publikoval Dulitzki studii 20 pacientek s těžkou formou OHSS, u kterých prokázal signifikantně zvýšenou prevalenci trombofilií [3]. Fábregues ve své studii publikované v roce 2004 na stejně velkém souboru pacientek s těžkou formou OHSS zvýšený výskyt vrožených nebo získaných trombofilií neprokázal [4].

Cílem práce bylo zjistit prevalenci vrožených trombofilií - mutace faktoru V Leiden, mutace protrombinu G20210A, mutace MTHFR C677T, deficit proteinu C, deficit proteinu S a deficit antitrombinu u pacientek s těžkou formou OHSS.

Studie se prováděla na Gynekologicko-porodnické klinice LF UP a FN Olomouc od ledna 2003 do podzimu 2006. Bylo vyšetřeno 50 pacientek s těžkou formou OHSS.

Materiál a metodika

Sledovaná skupina A

Do studie bylo zahrnuto 50 sterilních žen (ženy ve věkovém rozmezí 22-40 let, průměrný věk 32,0, medián 33 let), u kterých byla stimulace v programu IVF komplikována rozvojem těžké formy OHSS. Všechny pacientky byly stimulovány dlouhým protokolem s agonisty GnRH. Pro zařazení do studie bylo nutné splnění diagnostických kritérií těžké formy ovarialního hyperstimulačního syndromu podle Navota [2]. Mezi hlavní klinické příznaky sloužící k zahrnutí do studovaného souboru patřila dušnost spojená s bolestmi břicha, způsobená masivním ascitem. Při ultrazvukovém vyšetření ukázal nález zvětšená ovaria nad 10 cm a větší množství ascitické tekutiny v dutině břišní, což vyžadovalo punkci. Laboratorní nález pak prokázal vysokou leukocytózu (více než 20 000 leukocytů na mm³), známky hemokoncentrace (hematokrit nad 40 %), poruchy jaterních nebo ledvinných funkcí. Po stanovení diagnózy těžké formy OHSS

byla pacientkám odebrána krev na vyšetření sledovaných parametrů krevní srážlivostmi a stanovení markerů vrožených trombofilií.

Kontrolní skupiny

Skupina B - kontrolní skupinu B tvořilo 93 sterilních pacientek (ženy ve věkovém rozmezí 22-38 let, průměrný věk 31,1, medián 31 let) z programu asistované reprodukce léčebných metodou IVF, jejichž stimulace nebyla komplikována rozvojem OHSS. Soubory se nelišily ve způsobu a délce stimulace, nebyl rozdíl ani v typu stimulačního protokolu (dlouhý s GnRH analogy). U všech pacientek kontrolní skupiny byla v den punkce ovarialních folikulů odebrána krev na vyšetření koagulačních parametrů a stanovení markerů vrožených trombofilních stavů.

Skupina C - kontrolní skupinu C tvořil soubor 196 zdravých žen s nekomplikovaným těhotenstvím, které porodily na Gynekologicko-porodnické klinice LF UP a FN Olomouc v letech 2000-2004. Pacientky léčené pro sterilitu nebyly do souboru zahrnuty. Věkové rozmezí se opět nelišilo od sledovaného souboru (ženy ve věkovém rozmezí 21-35 let, průměrný věk 28,8, medián 29 let). Krev na molekulárně genetické vyšetření byla odebrána ve 3. trimestru gravidity nebo po porodu.

Laboratorní vyšetření

Byl proveden rozbor venózní krve odebrané z kubitální žíly do odběrové zkumavky s 3,2% citrátu sodného.

Hodnota antitrombinu byla stanovena chromogenní metodou, která je založena na reakci aktivovaného faktoru Xa s antitrombinem. Hladina nadbytečného faktoru Xa po přidání chromogenního substrátu S-2765 je nepřímě úměrná hladině antitrombinu (Instrumentation Laboratory, Itálie). Hodnota proteinu S bylo stanovena testem Test Free Protein S (Instrumentation Laboratory, Itálie). Přítomnost volného proteinu S se stanovuje měřením turbidity vznikající aglutinací dvou latexových reagensů. Čištěná vázaná forma proteinu S absorbovaná na 1. latexové reagensii reaguje s vysokou afinitou s volným proteinem S obsaženým ve vzorcích pacientů v přítomnosti Ca⁺² iontů. Volný protein S absorbovaný na latex s ko-

faktorovou aktivitou vazebného proteinu spouští aglutinační reakci s 2. latexovou reagensií, která obsahuje monoklonální protilátka citlivou na lidský protein S. Stupeň aglutinace je pak přímo úměrný koncentraci volného proteinu S ve vzorku. Stanovení proteinu C bylo provedeno opět chromogenní metodou po přidání substrátu S-2366. Stanovení protrombinu bylo provedeno na základě modifikovaného protrombinového času. Korekce koagulačního času deficitní plazmy je přímo úměrná koncentraci v plazmě pacienta, jež je odečtena z kalibrační křivky.

Rezistence APC byla stanovena za využití modifikované metody s faktor V deficitní plazmou a přímou aktivací faktoru X (APC rezistence kit, Technoclone, Vídeň).

Molekulárně genetické vyšetření

Pro komplexní stanovení mutace faktoru V 1691 G-A (F V Leiden), mutace protrombinu G20210A a termolabilní varianty MTHFR 677 C-T (MTHFR 677) bylo použito multiplicitní alelicky specifické polymerázové řetězové reakce (MS PCR). Pro stanovení jednotlivých specifických alel byla použita elektroforéza na vysocerozlišovacích gelech.

Statistické vyhodnocení bylo provedeno programem Statistica. Pro analýzu kontinuálních proměnných byl použit Studentův t-test a pro analýzu kategoriálních proměnných pak χ^2 test. Za statisticky významné byly považovány hodnoty $p < 0,01$.

Výsledky

Ve sledovaném souboru A (n = 50) pacientek s těžkou formou OHSS molekulárně genetické vyšetření odhalilo 7 pacientek s mutací F V Leiden (heterozygot) a 17 pacientek s mutací MTHFR 677 (heterozygot). U 3 pacientek byla zjištěna jak mutace F V (heterozygot), tak mutace MTHFR 677 (heterozygot). Nejistili jsme žádnou mutaci protrombinu. U 1 pacientky byl prokázán deficit proteinu S. U žádné jsme neprokázali deficit proteinu C a deficit antitrombinu.

V kontrolní skupině B (n = 93) byla u 11 pacientek zjištěna mutace F V Leiden (heterozygot) a u 36 mutací MTHFR 677 (heterozygot) a u jedné pacientky mutace MTHFR 677 (homozygot). U všech byly

Tab. 1. Srovnání prevalence trombofilií u pacientek s OHSS a u pacientek léčených metodou IVF.

	sledovaný soubor A (n = 50)	kontrolní soubor B (n = 93)	p	odds ratio
mutace F V Leiden	7	11	0,71	1,21 (0,39-3,7)
mutace MTHFR 677 (heterozygot)	17	36	0,58	0,82 (0,37-1,78)
mutace MTHFR 677 (homozygot)	0	1	0,66	1,84 (0,0-69,1)

Tab. 2. Srovnání prevalence trombofilií u pacientek s OHSS a u zdravých nesterilních žen.

	sledovaný soubor A (n = 50)	kontrolní soubor C (n = 196)	p	odds ratio
mutace F V Leiden	7	10	0,03	3,03 (0,97-9,28)
mutace MTHFR 677 (heterozygot)	17	86	0,21	0,66 (0,33-1,32)
mutace MTHFR 677 (homozygot)	0	7	0,56	0,54 (0,02-4,53)

Tab. 3. Srovnání prevalence trombofilií u sterilních pacientek bez OHSS a u zdravých nesterilních žen.

	sledovaný soubor B (n = 93)	kontrolní soubor C (n = 196)	p	odds ratio
mutace F V Leiden	11	10	0,03	2,50 (0,94-6,65)
mutace MTHFR 677 (heterozygot)	36	86	0,41	0,81 (0,47-1,38)
mutace MTHFR 677 (homozygot)	1	7	0,23	0,29 (0,01-2,42)

zjištěny fyziologické hodnoty antitrombinu a proteinu C, u 1 pacientky byl diagnostikován deficit proteinu S. Nejistili jsme žádnou mutaci protrombinu.

U 10 pacientek z kontrolní skupiny C (196 zdravých těhotných pacientek) prokázalo molekulárně genetické vyšetření mutaci F V (heterozygot), u 84 mutaci MTHFR 677 (heterozygot) a u 7 mutaci MTHFR 677 (homozygot). U 2 pacientek byla prokázána mutace protrombinu G20210A (heterozygot).

Statistické vyhodnocení

Hladiny antitrombinu a proteinu C byly u všech pacientek ve sledovaném souboru (A) i v kontrolním souboru (B) fyziologické, proto nebylo statistické vyhodnocení provedeno. U 1 pacientky ze sledovaného souboru (A) a u 1 z kontrolní skupiny (B) byl zaznamenán deficit proteinu S, rovněž bez statistického vyhodnocení.

Statistické výsledky prevalence APC rezistence, mutace F V Leiden a mutace MTHFR 677 (tab. 1, 2, 3).

Diskuse

Trombózy a tromboembolická nemoc patří k nejzávažnějším komplikacím stimulace v programu asistované reprodukce. Nejčastěji k nim dochází v rámci rozvoje těžké

formy ovariálního hyperstimulačního syndromu (OHSS). Není objasněno, jakým způsobem těžká forma OHSS zvyšuje riziko trombózy. Při podobném vážném klinickém stavu se trombózy vyskytují pouze u malé části postižených pacientek. Zvýšení hematokritu při rozvoji OHSS může určitým způsobem přispívat ke zvýšení rizika vzniku trombózy, ale není to příčina jediná [4]. V těhotenství a u uživatelů orálních kontraceptiv byla prokázána protrombotická role vysokých hladin estrogenů [5]. Biron ve své práci zabývající se korelací mezi výškou hladiny estrogenů a změnami v koagulačních parametrech pozorovaných v průběhu ovariálního hyperstimulačního syndromu tuto souvislost nepotvrdil [6].

Kodama uvádí u pacientek s těžkou formou OHSS statisticky významný nárůst hladiny fibrinogenu. Uvádí rovněž i statisticky významný pokles antitrombinu a pokles hladiny alfa 2 antiplasminu. V jeho souboru pacientek byly prokázány i vysoké hladiny D-dimerů a komplexů trombin - antitrombin, které odrážejí aktivaci koagulační kaskády [7]. Naproti tomu Delvigne na svém souboru 25 pacientek s těžkou formou OHSS změny v koagulačních parametrech s výjimkou růstu hladiny fibrinogenu neprokázal [8].

Trombofilní stavy jsou skupinou vrozených nebo získaných poruch krevní koagulace, které rovněž zvyšují riziko vzniku trombózy. Je pro ně charakteristický výskyt žilních trombóz před 45. rokem života, výskyt trombóz v netypických lokalizacích, jejich opakování a jejich výskyt přes užívání antikoagulační léčby. Prevalence geneticky podmíněné APC rezistence (mutace F V Leiden - heterozygot) je rozdílná v jednotlivých evropských zemích a pohybuje se od 2 % v jižních zemích oproti 10 % v zemích severovýchodních. Tato mutace zvyšuje riziko vzniku žilní trombózy 8krát, zatímco riziko arteriálních trombóz zvýšeno není. Prevalence mutace MTHFR 677 (heterozygot) je v evropské populaci udávána mezi 30-40 % a prevalence mutace protrombinu G20210A mezi 2-2,8 % [9]. Mezi obyvateli Afriky a Asie je nález těchto mutací velmi řídký [4]. U pacientek s těmito změnami byl prokázán statisticky významně zvýšený výskyt žilních trombóz a tromboembolické nemoci v těhotenství [4]. Trombofilie jsou u těhotných žen rovněž dávány do souvislosti s opakovanými těhotenskými ztrátami, preeklampsií, růstovou retardací plodu a abrupcí placenty [4,10-12]. Zvýšená prevalence trombofilních stavů je zmiňována i v souvislosti s opakovanými neúspěchy

léčby sterility metodou IVF. Azem publikoval studii 45 žen se 4 a více neúspěšnými cykly, u nichž byla incidence trombofilií 26,7 %, zatímco v kontrolní skupině zdravých žen (n = 44), u dosahovala incidence trombofilií pouhých 9,1 % [13].

Naše výsledky ukazují na statisticky signifikantní zvýšení prevalence určitých trombofilních stavů (APC rezistence) u sterilních pacientek. Nosičství mutace faktoru V Leiden (heterozygot) však podle našich výsledků neznamena pro pacientku vyšší riziko rozvoje těžké formy OHSS. Nepotvrdili jsme výsledky práce publikované Dulitzkim, který v souboru 20 pacientek s těžkou formou OHSS prokázal některou z trombofilií u 17 z nich [3]. Většinu nálezů v jeho souboru však tvořily deficiency proteinu S a antitrombinu. Tyto patologie jsme v našem souboru zaznamenali jen zcela ojediněle. Na rozdíl od nás našel Dulitzki mutaci faktoru V Leiden (heterozygot) pouze u 1 pacientky. Fábregues v rámci svého souboru 20 pacientek s diagnózou těžké formy OHSS u žádné pacientky trombofilií neprokázal; rovněž v kontrolním souboru 40 pacientek léčených metodou IVF byl záchyt trombofilií minimální (1krát mutace protrombinu G20210A). Na podkladě svých výsledků nedoporučuje Fábregues screeningová vyšetření sterilních pacientek k vyloučení trombofilních mutací [4].

U pacientek našeho souboru nebyl prokázán pokles antitrombinu, proteinu C a proteinu S, které patří k nejdůležitějším inhibitorům koagulace. Během intenzivní léčby našich pacientek ze sledovaného souboru (A) na oddělení JIP nebyl zaznamenán výskyt žilní nebo arteriální trombózy.

V důsledku nízké prevalence trombózy se nejeví rutinní vyšetřování trombofilií u sterilních pacientek jako opodstatněné. Při rozvoji těžké formy OHSS může vrozená trombofilie přispět ke zvýšení rizika rozvoje trombotických komplikací, ale vzhledem k jejich velmi nízké incidenci není ani v případech těžké formy OHSS vyšetření indikováno. Riziko rozvoje klinické trombózy výrazně zvyšuje kombinace trombofilních stavů nebo připojení dalšího rizikového fak-

toru, proto je u těchto pacientek plně indikována léčba nízkomolekulárními hepariny. U pacientek s těžkou formou OHSS, které otěhotní a mají trombofilní mutaci, je doporučena aplikace LMWH po celou dobu těhotenství [14].

Otázkou zůstává, zda zvýšená prevalence trombofilních mutací u sterilních pacientek může být příčinou jejich snížené plodnosti. Martinelli ve své studii porovnával prevalence trombofilních markerů u sterilních pacientek s neúspěšným cyklem IVF (n = 234) a u pacientek kontrolního souboru, tj. u pacientek, které otěhotněly spontánně (n = 234). Prevalence mutace faktoru V Leiden byla 5% ve srovnání s 2% pro mutaci protrombinu G20210A, 3% pak ve srovnání s 6% a souvislost mezi neúspěšným IVF a zvýšeným počtem trombofilních stavů nebyla prokázána [15]. Vaquero hodnotil prevalenci trombofilií u 51 sterilních pacientek s alespoň 1 neúspěšným cyklem IVF, což porovnával s 20 zdravými ženami, a žádné zvýšení nezaznamenal [16]. Jednoznačné ovlivnění plodnosti nosiček trombofilních stavů tedy prokázáno nebylo.

Závěr

Na souboru 50 sterilních pacientek se stimulací v programu IVF, která byla komplikována rozvojem těžké formy OHSS, jsme neprokázali vyšší prevalenci mutace faktoru V Leiden než u sterilních pacientek bez OHSS v kontrolní skupině. Nosičství této mutace neznamena zvýšené riziko rozvoje OHSS při stimulaci v programu IVF. Při porovnání souborů sterilních pacientek se zdravou populací jsme prokázali vyšší prevalenci mutace faktoru V Leiden, která naznačuje možnou souvislost mezi sterilitou a určitým typem trombofilie.

Literatura

1. Brinsden PR, Wada I, Tan SL et al. Diagnosis, prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Brit J Obstet Gynecol* 1995; 102: 767-772.
2. Navot D, Bergh P, Leufer N. Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and treatment. *Fertil Steril* 1992; 58: 249-261.

3. Dulitzki M, Cohen SB, Inbal A et al. Increased prevalence of thrombophilia among women with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2002; 77: 463-467.
4. Fabregues F, Tassies D, Reverte JC et al. Prevalence of thrombophilia in women with severe ovarian hyperstimulation syndrome and cost-effectiveness of screening. *Fertil Steril* 2004; 81: 989-995.
5. Paseka J, Unzeitig V, Cibula D et al. Mutace faktoru V Leiden u uživatelů hormonální antikoncepce. *Čes Gynek* 2000; 65: 156-159.
6. Biron CH, Galtier-Dereure F, Robesandratena H et al. Hemostasis parameters during ovarian stimulation for in vitro fertilisation: results of a prospective study. *Fertil Steril* 1997; 67: 104-109.
7. Kodama H, Fukada J, Karube H et al. Characteristics of blood hemostatic markers in a patient with ovarian hyperstimulation syndrome who actually developed thromboembolism. *Fertil Steril* 1995; 64: 1207-1209.
8. Delvigne A, Kostyla K, De Leener A et al. Metabolic characteristics of women who developed ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Repr* 2002; 17: 1994-1996.
9. Tsanadis G, Vartholomatos G, Korkontzelos I et al. Polycystic ovarian syndrome and thrombophilia. *Hum Repr* 2002; 17: 314-319.
10. Alfírevic Z, Mousa HA, Martlew V et al. Postnatal screening for thrombophilia in women with severe pregnancy complications. *Obstet Gynecol* 2001; 97: 753-759.
11. Alfírevic Z, Roberts D, Martlew V et al. How strong is the association between maternal thrombophilia and reverse pregnancy outcome? A systematic review. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol* 2002; 101: 6-14.
12. Lindquist P, Dählback B, Marsal K. Thrombotic risk during pregnancy: A population study. *Obstet Gynecol* 1999; 94: 595-599.
13. Azem F, Many A, Ben Ami I et al. Increased rates of thrombophilia in women with repeated IVF failures. *Hum Reprod* 2004; 19: 368-370.
14. Mára M, Koryntová D, Řežábek K et al. Thrombotic complications in patients undergoing in vitro fertilization: Retrospective clinical study. *Čes Gynek* 2004; 69: 312-316.
15. Martinelli I, Taioli E, Ragni G et al. Embryo implantation after assisted reproduction procedures and maternal thrombophilia. *Haematologica* 2003; 88: 789-793.
16. Vaquero E, Lazzarin N, Caserta D et al. Diagnostic evaluation of women experiencing repeated in vitro fertilisation failure. *Eur J Gynecol Reprod Biol* 2005; 10: 1253-1255.

MUDr. Štěpán Machač, Ph.D.¹
MUDr. Martin Procházka, Ph.D.²
MUDr. Marek Lubušský, Ph.D.²

¹Reprofit International, Brno

²Porodnicko-gynekologická klinika
 LF UP a FN Olomouc