

**UNIWERSYTET MEDYCZNY W POZNANIU
WYDZIAŁ LEKARSKI II**

**ZNACZENIE POLIMORFIZMU WYBRANYCH GENÓW ZWIĄZANYCH
Z METABOLIZMEM FOLIANÓW W ROZWOJU HIPOTROFII PŁODU**

LEK. MED. ANNA LORENC

**KLINIKA PERINATOLOGII I CHORÓB KOBIECYCH
UNIWERSYTET MEDYCZNY W POZNANIU**

**PROMOTOR:
PROF. DR HAB. AGNIESZKA SEREMAK-MROZIKIEWICZ
KLINIKA PERINATOLOGII I CHORÓB KOBIECYCH
UNIWERSYTET MEDYCZNY W POZNANIU**

POZNAŃ 2013

***SKŁADAM SERDECZNE PODZIĘKOWANIA
PROMOTOROWI MOJEJ PRACY – PANI PROFESOR
AGNIESZCE SEREMAK-MROZIKIEWICZ
ZA OPIEKĘ, ZAANGAŻOWANIE,
NIEUSTANNĄ MOBILIZACJĘ DO PRACY,
A TAKŻE ZA ŻYCZLIWĄ ATMOSFERĘ
SPRZYJAJĄCĄ PRACY NAUKOWEJ***

SPIS TRESCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	4
1. WSTĘP	6
1.1. HIPOTROFIA PŁODU - RYS HISTORYCZNY	6
1.2. HIPOTROFIA PŁODU - DEFINICJA, EPIDEMIOLOGIA	7
1.3. KLASYFIKACJA HIPOTROFII PŁODU	8
1.4. CZYNNIKI RYZYKA HIPOTROFII	12
1.5. POLIMORFIZM GENÓW ZWIĄZANYCH Z METABOLIZMEM FOLIANÓW JAKO CZYNNIK ROZWOJU HIPOTROFII	15
1.6. FOLIANY - DEFINICJA, ŹRÓDŁA	16
1.7. METABOLIZM FOLIANÓW	18
1.8. POLIMORFIZMY GENÓW ZWIĄZANYCH Z METABOLIZMEM FOLIANÓW	26
1.8.1. REDUKTAZA METYLENOTETRAHYDROFOLIANU (MTHFR)	26
1.8.1.1. POLIMORFIZM <i>677C>T</i> GENU <i>MTHFR</i>	28
1.8.1.2. POLIMORFIZM <i>1298A>C</i> GENU <i>MTHFR</i>	29
1.8.1.3. POLIMORFIZM <i>1793G>A</i> GENU <i>MTHFR</i>	29
1.8.2. DEHYDROGENAZA METYLENOTETRAHYDROFOLIANU (MTHFD)	30
1.8.2.1. POLIMORFIZM <i>1958G>A (R 653Q)</i> GENU <i>MTHFD1</i>	31
1.8.2.2. POLIMORFIZM <i>401G>A (R134K)</i> GENU <i>MTHFD1</i>	32
1.8.3. SYNTAZA METIONINY (MTR)	32
1.8.3.1. POLIMORFIZM <i>2756A>G</i> GENU <i>MTR</i>	34
1.8.4. REDUKTAZA SYNTAZY METIONINY (MTRR)	34
1.8.4.1. POLIMORFIZM <i>66A>G</i> GENU <i>MTRR</i>	35
1.8.5. TRANSKOBALAMINA II (TC II)	35
1.8.5.1. POLIMORFIZM <i>776C>G</i> GENU <i>TC II</i>	36
2. CEL PRACY	37
3. MATERIAŁ I METODYKA	38
3.1. MATERIAŁ	38
3.1.1. CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ	38
3.1.2. CHARAKTERYSTYKA GRUPY KONTROLNEJ	39
3.2. METODYKA	41
3.2.1. MATERIAŁ BADAWCZY	41
3.2.2. ANALIZA GENETYCZNA	42
3.2.2.1. IZOLACJA DNA	42
3.2.2.2. OZNACZANIE JAKOŚCI I STĘŻENIA PREPARATÓW DNA	43
3.2.2.3. ANALIZA DŁUGOŚCI FRAGMENTÓW RESTRYKCYJNYCH	43
3.2.2.4. POLIMORFIZM <i>677C>T (A222V)</i> GENU <i>MTHFR</i>	45

3.2.2.5. POLIMORFIZM <i>1298A>C (E429A)</i> GENU <i>MTHFR</i>	45
3.2.2.6. POLIMORFIZM <i>1793G>A (R594Q)</i> GENU <i>MTHFR</i>	46
3.2.2.7. POLIMORFIZM <i>1958G>A (R653Q)</i> GENU <i>MTHFD1</i>	46
3.2.2.8. POLIMORFIZM <i>401G>A (R134K)</i> GENU <i>MTHFD1</i>	46
3.2.2.9. POLIMORFIZM <i>2756A>G (D919G)</i> GENU <i>MTR/MS</i>	47
3.2.2.10. POLIMORFIZM <i>66A>G (I22M)</i> GENU <i>MTRR</i>	47
3.2.2.11. POLIMORFIZM <i>776C>G (P259R)</i> GENU <i>TCII</i>	47
3.3. ANALIZA STATYSTYCZNA	50
4. WYNIKI	52
4.1. CHARAKTERYSTYKA PORÓWNAWCZA BADANYCH GRUP PACJENTEK	52
4.2. PODZIAŁ GRUPY BADANEJ	55
4.3. CHARAKTERYSTYKA PORÓWNAWCZA PARAMETRÓW DOTYCZĄCYCH NOWORODKÓW	60
4.4. ANALIZA CZĘSTOŚCI WYSTĘPOWANIA GENOTYPÓW I ALLELI POLIMORFIZMÓW WYBRANYCH GENÓW W GRUPIE MATEK NOWORODKÓW Z HIPOTROFIĄ PŁODU ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ	64
4.5. ANALIZA PORÓWNAWCZA GENOTYPÓW I ALLELI BADANYCH POLIMORFIZMÓW W ZALEŻNOŚCI OD TYGODNIA ZAKOŃCZENIA CIĄŻY (PORÓD ≥ 37 TC. ORAZ < 37 TC.)	80
4.6. ANALIZA PORÓWNAWCZA GENOTYPÓW I ALLELI BADANYCH POLIMORFIZMÓW W ZALEŻNOŚCI OD MASY URODZENIOWEJ NOWORODKA	88
4.7. WSPÓL WYSTĘPOWANIE GENOTYPÓW ANALIZOWANYCH W PRACY POLIMORFIZMÓW W POSZCZEGÓLNYCH BADANYCH GRUPACH	96
5. DYSKUSJA	111
5.1. ZABURZENIA METABOLIZMU FOLIANÓW A HIPOTROFIA PŁODU	112
5.2. ANALIZA BADANYCH POLIMORFIZMY GENÓW BIORĄCYCH UDZIAŁ W METABOLIZMIE FOLIANÓW I WSPÓL WYSTĘPOWANIA GENOTYPÓW W HIPOTROFII PŁODU	116
5.2.1. POLIMORFIZM GENU <i>MTHFR</i>	116
5.2.2. POLIMORFIZM GENU <i>MTHFD1</i>	121
5.2.3. POLIMORFIZM GENU <i>MTR</i>	124
5.2.4. POLIMORFIZM GENU <i>MTRR</i>	126
5.2.5. POLIMORFIZM GENU <i>TC II</i>	127
5.3. IMPLIKACJE KLINICZNE I MOŻLIWOŚCI TERAPII	132
5.4. PODSUMOWANIE	135
6. WNIOSKI	137
7. PIŚMIENNICTWO	138
8. STRESZCZENIE W J. POLSKIM	150
9. STRESZCZENIE W J. ANGIELSKIM	153
10. SPIS TABEL, FOTOGRAFII I RYCIN	156

WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW

- AC** - obwód brzuszka płodu (ang. *abdominal circumference*)
- ACE** - enzym konwertujący angiotensynę (ang. *converting angiotensin enzyme*)
- BMI** - wskaźnik masy ciała (ang. *body mass index*)
- COL1A1** - kolagen typu 1 alfa (ang. *alpha 1 type I collagen preprotein*)
- COL5A2** - kolagen typu 5 alfa (ang. *collagen type 5 alpha 2*)
- COMT** - katecholo-O-metylotransferaza (ang. *catechol-O-methyltransferase*)
- DHFR** - reduktazy dihydrofolianowej (ang. *dihydrofolate reductase*)
- DNA** - kwas deoksyrybonukleinowy (ang. *deoxyribonucleic acid*)
- dTMP** - deoksytymidylomonofosforan (ang. *deoxythymidine monophosphate*)
- dUMP** - deoksyurydynomonofosforan (ang. *deoxyuridine monophosphate*)
- EDTA** - kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. *ethylene diamine tetraacetic acid*)
- EGF** - nablonkowy czynnik wzrostu (ang. *epidermal growth factor*)
- FAD** - dinukleotydyd flawinowadeninowy (ang. *flavin adenine dinucleotide*)
- FTHFD** - dehydrogenaza formylotetrahydrofolianowa (ang. *formyltetrahydrofolate dehydrogenase*)
- HC** - obwód główki płodu (ang. *head circumference*)
- EDTA** - kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. *ethylenediaminetetraacetate*)
- IUGR** - wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu (ang. *intrauterine growth restriction*)
- LBW** - mała masa urodzeniowa (ang. *low birth weight*)
- LPR8** - białko skojarzone z receptorem lipoproteiny o niskiej gęstości-8 (ang. *low-density lipoprotein receptor-related protein 8 ,apoE receptor 2*)
- MBL** - lektyna wiążąca mannozę (ang. *mannose-binding lectin*)
- MS** - syntaza metioniny (ang. *5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase*)
- MTHFD1** - dehydrogenaza metylenotetrahydrofolianowa (ang. *methylenetetrahydrofolate dehydrogenase*)
- MTHFR** - reduktaza metylenotetrahydrofolianowa (ang. *methyletetrahydrofolate reductase*)
- MTR** - syntaza metioniny (ang. *5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase*)

- MTRR** - reduktaza syntazy metioniny (ang. *5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase*)
- NADPH** - fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*)
- OD** - współczynnika gęstości optycznej (ang. *optical density*)
- PABA** - kwas para-aminobenzoowy (ang. *para-aminobenzoic acid*)
- PCFT** - system transportu (ang. *proton-coupled folate transporter*)
- PCFT** - przenośnik folianów sprzężony z protonem (ang. *proton-coupled folate transporter*)
- PCR** - łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polimerase chain reaction*)
- PLAU** - aktywator plazminogenu typu urokinazy (ang. *plasminogen activator urokinase*)
- RFC1** - transporter zredukowanych folianów (ang. *reduces folate carrier*)
- RLFP** - polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragment length polymorphism*)
- SAH** - S-adenosylohomocysteina (ang. *S-Adenosyl-L-homocysteine*)
- SAHH** - hydrolaza S-adenosylohomocysteina (ang. *S-Adenosyl homocysteine hydrolase*)
- SAM** - S-adenozytometionina (ang. *S-adenosylmethionine*)
- SGA** - mała masa w stosunku do wieku ciążowego (ang. *small for gestational age*)
- SNP** - polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*)
- PU** - przedział ufności (ang. *confidence limit*)
- TCII** - transkobalamina II (ang. *transcobalamin II*)
- TIMP2** - tkankowy inhibitor metaloproteinazy 2 (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinase 2*)
- TNF-alpha** - czynnik martwicy nowotworów alfa (ang. *tumor necrosis factor alpha*)
- TNFRSF6** - tkankowy czynnik martwicy nowotworów nadrodziny 6 (ang. *tumor necrosis factor receptor superfamily member 6*)
- TS** - syntaza tymidylanowa (ang. *thymidylate synthase*)
- WR** - współczynnik ryzyka, iloraz szans (ang. *odds ratio, OR*)
- VDR** - receptor witaminy D (ang. *vitamin D receptor*)

1. WSTĘP

1.1. HIPOTROFIA PŁODU - RYS HISTORYCZNY

Problemy hipotrofii wewnątrzmacicznej płodu oraz związanych z tym powikłań u noworodków o małej masie urodzeniowej od dawna są przedmiotem szczególnego zainteresowania położników i neonatologów. W licznych opracowaniach wskazano, że hipotrofia prowadzi w konsekwencji do powikłań w okresie prenatalnym i okołoporodowym, jak również wiąże się z niekorzystnymi implikacjami dla dalszego rozwoju psychofizycznego dzieci [216].

Problem hipotrofii płodu wzbudzał zainteresowanie już w starożytności, kiedy po raz pierwszy wskazywano zarówno na różny czas trwania ciąży, jak też na różną masę urodzeniową noworodków pochodzących z ciąż zakończonych w takim samym tygodniu czasu ich trwania. Rzymski historyk, pisarz i filozof Pliniusz Starszy w swojej *Historii naturalnej* podaje, że wszystkie organizmy mają określony czas zakończenia ciąży. Według wykorzystywanego wówczas prawa dwunastu tablic wskazano, że prawidłowo człowiek rodzi się w dziesiątym miesiącu ciąży [35]. Natomiast obserwowano również zakończenie ciąż w innych terminach: „*jeden w 7. miesiącu, inny w 8. miesiącu, tak do początku 11. miesiąca*” [151]. Pierwsze notatki na piśmie mówiące o normie masy ciała noworodka, która jest wartością graniczną, decydującą o jego szansach dalszego przeżycia oraz pełnowartościowego rozwoju datuje się na szesnasty wiek. Jednakże dopiero w pierwszej dekadzie XX wieku rozpoczął się zwyczaj systematycznego ważenia noworodków po porodzie. Fiński pediatra Ylppo był pierwszym, który zaproponował 2500 g jako normę masy urodzeniowej noworodka. Według niego noworodki o mniejszej masie ciała są niedojrzałe i zagrożone wystąpieniem powikłań. W 1961 roku Warkany i wsp. wprowadzili pojęcie wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu (IUGR – *intrauterine growth restriction*) opisując rozwój ciąży, w której matka z powodu choroby zasadniczej stosowała metotreksat. W swoim artykule oceniając rozwój noworodków zastosowali oni odniesienie do norm: masy i długości ciała oraz obwodu głowy płodu w poszczególnych tygodniach ciąży [208]. Natomiast w 1963 r. Lubchenko i wsp. opublikowali krzywe wzrastania płodu w postaci percentyli, ustanawiając obecnie przyjęty sposób przedstawiania wartości referencyjnych

[107]. W Polsce siatki centylowe dla noworodków poznańskich w roku 1969 opracował Słomko i wsp. [175], natomiast w roku 1973 dla dzieci warszawskich Brzozowska i wsp. [28].

1.2. HIPOTROFIA PŁODU - DEFINICJA, EPIDEMIOLOGIA

Wiele niejasności narosło wokół terminologii związanej ze zjawiskiem małej masy płodu. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO - *World Health Organization*) określenie **mała masa urodzeniowa (LBW - low birth weight)** dotyczy masy płodu poniżej 2500 g niezależnie od wieku ciążowego [124].

Termin **mała masa w stosunku do wieku ciążowego (SGA - small for gestational age)** oznacza, że masa noworodka jest zbyt mała w stosunku do wieku ciążowego. Według najpowszechniejszej definicji znajduje się ona poniżej 10 centyla, dostosowana dla danego tygodnia ciąży i danej populacji [182]. Niektórzy autorzy przyjmują inne wartości graniczne masy np. poniżej 5, 3 a nawet 2 centyla [66, 145, 167], poniżej 2 odchyłeń standardowych [114], bądź obwód brzuszka płodu poniżej 5 lub 2,5 centyla [66, 145, 167]. Mała masa ciała noworodka z rozpoznaniem SGA może być cechą konstytucjonalną lub wynikać z patofizjologicznej przyczyny dotyczącej matki, płodu, bądź łożyska [74].

Określenie **hipotrofia lub ograniczenie wewnątrzmacicznego wzrastania płodu (IUGR - intrauterine growth restriction)** odnosi się do płodu, który nie zdołał wykorzystać swojego potencjału wzrostowego w czasie życia płodowego. Terminem hipotrofii określa się patologiczny proces prowadzący do ograniczenia wzrastania płodu. Hipotrofię płodu można rozpoznać, gdy dwukrotnie wykonane pomiary płodu w łonie matki wykazują zbyt wolne tempo wzrastania i/lub jego masa ciała jest mniejsza niż 2 SD lub 10 percentyl w stosunku do wieku płodowego w danej populacji [71].

Uważa się, że mała urodzeniowa masa ciała u około 70% noworodków z SGA wynika z przyczyn konstytucjonalnych, takich jak masa ciała i wzrost matki, rodność i przynależność do określonej grupy etnicznej, pozostałe 30% to dzieci z rozpoznaniem IUGR [106, 194]. W grupie SGA mogą więc znaleźć się noworodki z hipotrofią, jak i konstytucjonalnie małe. Tak więc pojęcia SGA i IUGR są zbliżone do siebie, ale nie są synonimami [83]. Według niektórych autorów płód, u którego nastąpiło opóźnienie wzrastania, lecz urodził się zanim jego masa obniżyła się poniżej 10 percentyla, powinien być traktowany jak noworodek z hipotrofią, nawet jeśli masa urodzeniowa jest właściwa dla danego wieku ciążowego [64,

113].

Duże znaczenie dla masy urodzeniowej mają czynniki populacyjne np. średnia masa urodzeniowa noworodków w Indiach (2771 g) i Irlandii (3478 g) różni się znacząco, podobnie jak odsetek noworodków LBW (5,9% i 29,0%), mimo podobnego średniego czasu trwania ciąży (40,6 tc. i 40,5 tc.). Może to odzwierciedlać zarówno biologiczne zróżnicowanie ludzkiej populacji, jak i różnice społeczne [211].

Trudno jednoznacznie określić jak wiele dzieci rodzi się z wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania. Vandenbosche i Kichner podają, że problem ten dotyczy 4-7% noworodków [200], podczas gdy Brodsky i Cristou podają wartości 5-7% dzieci z IUGR. Według tych ostatnich autorów odsetek ten może sięgać nawet do 15%, gdy nie rozgranicza się noworodków urodzonych z SGA i IUGR [25]. Barut i wsp. podają, że częstość występowania IUGR wynosi około 3-10% w krajach rozwiniętych. W krajach rozwijających się problem hipotrofii sięga 15-20% [15]. Wykazano, że 52% martwych urodzeń jest związanych z IUGR, a 10% umieralności okołoporodowej jest konsekwencją wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu [110].

1.3. KLASYFIKACJA HIPOTROFII PŁODU

Najczęściej wykorzystywanym podziałem hipotrofii jest klasyfikacja oparta na stwierdzeniu Winicka [212], że w rozwoju komórkowym organów płodu i łożyska można wyróżnić trzy główne fazy. Najpierw, w wyniku intensywnej mitoz, dochodzi do zwiększania się liczby komórek, co odbywa się od początku I trymestru do około 20 tc. Później oprócz podziałów komórek (hiperplazja) następuje intensywny wzrost ich wielkości (hipertrofia). Od około 28 tc. aż do terminu porodu dochodzi do gwałtownego wzrostu rozmiarów komórek, co skutkuje m.in. przyrostem tkanki łącznej, tłuszczowej i mięśniowej. Przyrost masy płodu w 15 tc. wynosi około 5 g/24 h, podczas gdy w 24 tc. - 15-20 g/24 h, a w 34 tc. - 30-35 g/24 h. Tak więc, największy przyrost masy ciała płodu dokonuje się w ciągu ostatnich 20 tygodni ciąży [124]. Do ograniczenia wzrastania może dojść w dowolnym okresie ciąży. Jednak czynniki działające we wczesnym okresie ciąży powodują globalne ograniczenie wzrastania płodu, natomiast później dochodzi do wstrzymania rozwoju tylko niektórych tkanek np. tkanki tłuszczowej, mięśniowej, a oszczędzane są inne narządy np. mózg i serce [213].

Klinicznie wyodrębniono 2 podstawowe typy hipotrofii płodu:

1. Typ symetryczny (hipoplastyczny lub głęboki) - występuje w około 25% przypadków i charakteryzuje się wczesnym początkiem zmian we wzrastaniu płodu. W tym typie czynniki patologiczne oddziałują na płód od wczesnego okresu ciąży. Płód ma proporcjonalnie mniejszy obwód brzuszka (AC - *abdominal circumference*) i główki (HC - *head circumference*) oraz wymiary kości długich. U noworodków występują zarówno niedobory masy ciała, jak i długości urodzeniowej. Klinicznie stwierdza się prawidłowo rozwiniętą tkankę tłuszczową i dobrze napiętą skórę. Glikemia, proteinogram i hematokryt są na ogół w normie. Typ ten jest najczęściej związany z nieprawidłowościami chromosomalnymi, wadami genetycznymi, wrodzonymi zaburzeniami metabolizmu. Pourodzeniowe nadrabianie niedoboru wzrostu (*catch-up growth*) w tej grupie jest obserwowane rzadko na skutek trwałego obniżenia potencjału wzrostowego.

2. Typ asymetryczny (hipotroficzny) - ten typ wrodzonej hipotrofii rozpoczyna się w drugiej połowie ciąży. Wartość AC jest bardziej zmniejszona niż wartość HC. Klinicznie stwierdza się małą masę urodzeniową ciała przy względnie prawidłowym obwodzie głowy i długości ciała noworodka. Noworodek przybiera charakterystyczny wygląd, ma nieproporcjonalnie dużą głowę, zapadnięty brzuch, brak tkanki tłuszczowej oraz długie i chude kończyny. Deficyt masy zależy tu od wielkości komórek a nie ich liczby. Jest on związany z zaburzeniem wzrostu komórek, co skutkuje wyraźnym ograniczeniem wzrastania narządów, które intensywnie rozwijają się w tym okresie. U płodu są już wtedy rozwinięte mechanizmy kompensacyjne, pozwalające na redystrybucję krwi do mózgu, serca i nadnerczy oraz ograniczenie przepływu w pozostałych narządach jamy brzusznej, skórze i układzie kostnym. Często stwierdza się hipoglikemię, podwyższony hematokryt i hipoproteinemię. Potencjał wzrostowy jest zwykle prawidłowy. Wśród tych noworodków obserwowane jest często pourodzeniowe nadrabianie niedoboru wzrostu (*catch-up growth*). Do hipotrofii nieproporcjonalnej dochodzi przede wszystkim w przypadku powstawania nasilonych zmian w łożysku, utrudniających łożyskową wymianę gazową. Pojawia się najczęściej w związku z towarzyszącymi chorobami matki - nadciśnieniem tętniczym, wadami serca, chorobami nerek, paleniem papierosów i przewlekłym niedożywieniem matki [83].

3. Typ mieszany hipotrofii - niektórzy autorzy wyróżniają trzeci typ hipotrofii. Dotyczy on noworodków z ciąż o prawidłowym przebiegu, gdzie w końcowym okresie dochodzi do nagłego ograniczenia dopływu substancji odżywczych dla płodu. Noworodki takie rodzą się z

prawidłową długością ciała i obwodem głowy, ale ze znacznym niedoborem masy ciała na skutek ubytku tkanki tłuszczowej [43].

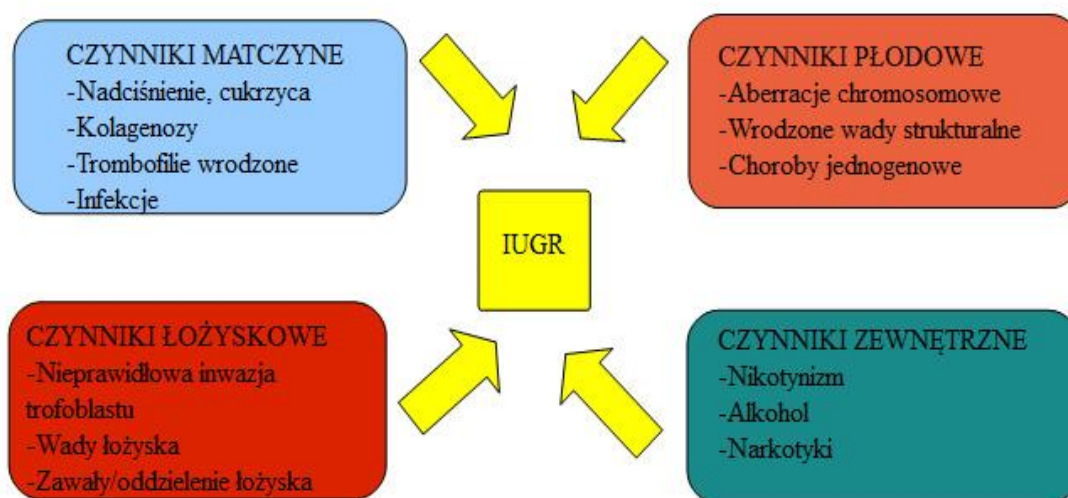
Hipotrofia płodu w poprzedniej ciąży wydaje się zwiększać ryzyko powtórzenia się tego powikłania w następnej ciąży [153] i ryzyko to zwiększa się wraz ze zmniejszeniem wzrostu ciężarnej i wiekiem powyżej 30 rż [34]. Analiza grupy 39 615 pacjentek ze Szwajcarii wykazała korelację częstszego występowania małej masy urodzeniowej noworodka w poprzedniej ciąży u ciężarnych z hipotrofią o niewyjaśnionej etiologii [205].

Wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu zwiększa ryzyko niedotlenienia płodu, zaburzeń ze strony OUN płodu jak krwawienie dokomorowe, leukomalacja okołokomorowa i zawały w obrębie tkanki mózgowej, a także hipoglikemii, zespołu aspiracji smółki, zaburzeń oddychania noworodka [156]. Zachorowalność i umieralność okołoporodowa zależy od stopnia ciężkości hipotrofii, najbardziej zagrożone są noworodki o najmniejszej masie urodzeniowej [111]. McIntire i wsp. wskazują, że współczynniki te są gorsze wśród noworodków urodzonych o czasie, ale z masą poniżej 3 centyla. Analizując grupę noworodków urodzonych w latach 1988-1996 w Parkland Hospital, Dallas, USA wykazali oni aż dziesięciokrotne zwiększenie umieralności wśród noworodków z masą poniżej 3 centyla [117]. Wcześnieaki z towarzyszącym SGA są znacznie bardziej zagrożone [150]. Analiza retrospektywna przeprowadzona przez Garite i wsp., obejmująca noworodki z ciąż pojedynczych urodzonych między 23 a 34 tc. (wyłączając współistniejące duże wady rozwojowe), wskazuje na hipotrofię jako istotny czynnik zwiększonej umieralności i zachorowalności, gdzie każdy przypadek hipotrofii wiązał się z występowaniem martwiczego zapalenia jelit, koniecznością wspomagania oddechu, retinopatią wcześniaków, a w konsekwencji zwiększoną umieralnością [60]. Z kolei praca autorstwa Dasche i wsp. pokazuje, że asymetryczne wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastanie płodu częściej koreluje z wcześniejszym wystąpieniem nadciśnienia ciążowego (<32 tc.) niż symetryczna postać IUGR (7,0 vs. 1,0%), częstszym rozwiązaniem drogą cięcia cesarskiego z powodu zaburzeń czynności serca płodu (15,0 vs. 3,0%) oraz częstszym wystąpieniem ciężkiej zachorowalności noworodków (14,0 vs. 5,0%) [39]. Również Isaksen i wsp. analizując grupę 577 ciężarnych, które urodziły o czasie stwierdzili związek m.in. pomiędzy umieralnością noworodków a małą masą urodzeniową dziecka z poprzedniej ciąży i matczyną masą ciała <50 kg przed zajściem w ciążę [80].

Badanie Markestad i wsp. porównujące dzieci z małą urodzeniową masą ciała z grupą bez tego powikłania, wykazało co prawda częściowe wyrównanie wzrostu w 13-tym miesiącu życia, jednak grupa z SGA nadal prezentowała niższą masę oraz mniejszy obwód głowy. Ponadto noworodki z SGA prezentowały gorsze wyniki w części neurologicznej, choć podobnie w części motorycznej oceny według skali Ballarda [112]. Długotrwałe konsekwencje rozwojowe zależą od przyczyny upośledzonego wzrostu. Większość noworodków z hipotrofią spowodowaną czynnikiem łożyskowym nadrabia niedobór wzrostu do 2 roku życia [2]. Istnieją jednak poglądy, iż dzieci te mogą w późniejszym okresie życia prezentować zaburzenia behawioralne, jak zespół deficytu uwagi i nadreaktywności oraz upośledzenie umiejętności społecznych [181]. Elgen i wsp. zaobserwowali podobną zależność dla występowania zaburzeń psychiatrycznych (np. lękowych) w 11 roku życia [48]. Koncepcja programowania wewnątrzmacicznego jest oparta m.in. na obserwacjach częstszego występowania miażdżycy, nadciśnienia, insulinooporności i cukrzycy typu 2 u kobiet i mężczyzn którzy przyszedli na świat z małą masą urodzeniową, zwłaszcza gdy następnie dochodziło do gwałtownego przyrostu pourodzeniowej masy ciała i otyłości w dzieciństwie [52]. Postuluje się, iż LBW, insulinooporność w późniejszym okresie życia, nietolerancja glukozy, cukrzyca i nadciśnienie tętnicze mogą być odmiennymi fenotypami, jaki prezentuje ten sam insulinooporny genotyp [137]. Natomiast ciekawym spostrzeżeniem związanym z małą masą urodzeniową jest niższa częstość występowania raka piersi u kobiet [71].

Interesujące wydają się dane wynikające z analizy piśmiennictwa pokazujące, że długoterminowe konsekwencje urodzenia dziecka z obniżoną masą ciała dotyczą także matki. Praca Smith i wsp. dowodzi istnienia podwyższonego ryzyka chorób układu naczyniowego i serca u matek noworodków z LBW. Badanie prospektywne 75 640 ciężarnych pierwiastek z Norwegii (*The Norwegian Kidney Biopsy Register*) ujawniło, że urodzenie dziecka o masie 1500-2500 g z ciąż powikłanych preeklampsją wiązało się wystąpieniem przewlekłej choroby nerek i biopsji nerki w późniejszym okresie życia (współczynnik ryzyka RR=4,5), natomiast u pacjentek ze stanem przedrzucawkowym i masą noworodka <1500 g współczynnik ryzyka RR wynosił 17 [177]. Niektóre prace sugerują, że choroby nerek, stan przedrzucawkowy i zaburzenia funkcjonowania łożyska, mają wspólną etiologię związaną z czynnikiem genetycznym [71].

1.4. CZYNNIKI RYZYKA HIPOTROFII



Ryc. 1. Główne grupy czynników ryzyka wewnątrzmacicznego zaburzenia wzrastania płodu [za Baschat i wsp., 2004].

Wśród wielu czynników warunkujących rozwój hipotrofii płodu wskazuje się na niewydolność łożyskową. Jeśli inwazja trofoblastu jest ograniczona tylko do warstwy doczesnej myometrium, maczyne tętnice spiralne i radialne nie przechodzą prawidłowej przemiany do tętnic niskooporowych. Zaburzona ekspresja czynników wazoaktywnych może nasilić reaktywność naczyń i jeśli angiogeneza indukowana hipoksją nie zrównoważy tych zmian, mechanizmy autoregulacji łożyskowej zostają zakłócone. Maczyna powierzchnia łożyska ulega zawałom, ponadto obliteracja naczyń w obrębie kosmków oraz włóknienie nasilają opór w przepływie krwi przez łożysko i pogarszając perfuzję łożyskową obniżają efektywną powierzchnię wymiany. Wraz z nasileniem okluzji naczyniowej, wzrasta opór naczyniowy i zmniejszeniu ulega metabolicznie aktywna masa łożyska. Jeśli mechanizmy adaptacyjne u płodu umożliwią jego dalszy rozwój, dochodzi do wewnątrzmacicznego zaburzenia wrastania. Spektrum zaburzeń zależy od wydolności mechanizmów kompensacyjnych, ich niewydolność może skutkować nawet wewnątrzmacicznym zgonem płodu [1].

Hipotrofia może być wtórna do wad płodu lub może z nimi współistnieć, ze względu na wspólne czynniki etiologiczne. Trisomia 21 współistnieje z hipotrofią najczęściej, rzadziej dotyczy to trisomii 18 i 13 pary chromosomów, delecji autosomów, aberracji chromosomów

pliciowych, osteogenesis imperfecta, zespołu Potter, bądź anencefalii. Rozpoznanie asymetrycznej hipotrofii około 20 tc. ciąży nasuwa podejrzenie trisomii [71].

Niedobory pokarmowe u ciężarnej dotyczące białka, kwasu foliowego, witamin z grup A, B, C, cynku, magnezu, miedzi i selenu mogą prowadzić do rozwoju wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu [71, 132]. Wśród wielu przyczyn niedożywienia m.in. anoreksja jest wiązana z rozwojem hipotrofii płodu. Mała masa ciała matki przed zajściem w ciążę i mały przyrost masy ciała w ciąży są uważane za istotne czynniki ryzyka hipotrofii płodu [40]. Kobieta ważąca przed ciążą poniżej 50 kg jest w grupie znacznego ryzyka urodzenia dziecka ze zbyt małą masą dla wieku ciążowego. Mała masa ciała przed ciążą jest wiązana z wieloma powikłaniami ciąży jak poród przedwczesny, zmniejszony obwód głowy noworodka, hipotrofia, jednakże próg wartości BMI, od którego zwiększa się to ryzyko nie został dokładnie zdefiniowany.

Niepokój i depresja u matki mogą wpływać na obniżenie masy ciała płodu i indukować rozwój hipotrofii współdziałając z czynnikami środowiskowymi takimi jak palenie tytoniu, dieta, bądź infekcja. Masa urodzeniowa <2500 g u 27-30% noworodków jest związana z czynnikami socjoekonomicznymi [183]. Wskazuje się korelację ciężkiej pracy fizycznej, długotrwałej pozycji stojącej, pracy zmianową ze zmniejszoną masą noworodka i wystąpieniem porodu przedwczesnego [184].

Spożywanie alkoholu wywiera najbardziej negatywny wpływ w okresie organogenezy oraz może powodować nasilenie produkcji tromboksanu, uszkodzenie komórek trofoblastu w obrębie kosmówki i zmniejszać przepływ maciczno-łożyskowy. Alkohol może prowadzić do uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego płodu oraz alkoholowego zespołu płodowego charakteryzującego się występowaniem hipotrofii, zaburzeń neurologicznych i anomalii czaszkowo-mózgowych [1, 172]. Zarówno aktywne jak i pasywne palenie papierosów wpływa na rozwój łożyska, działając negatywnie na proliferację i różnicowanie cytotrofoblastu [218]. Palenie papierosów uszkadza komórki śródbłonka, zarówno w łożysku jak i w pępowinie, a także indukuje niekorzystne zjawiska zarówno u matki jak i u płodu, głównie za pośrednictwem substancji toksycznych jak nikotyna, tlenek węgla i kadm [161]. Powoduje również skurcz naczyń, obniża przepływ maciczno-łożyskowy i może prowadzić do martwicy doczesnej, apoptozy komórek łożyska, zawałów łożyska i w konsekwencji wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu [19], a nawet spowodować przedwczesne oddzielenie łożyska lub zgon wewnątrzmaciczny płodu [136]. Zażywanie narkotyków może indukować powstawanie hipotrofii bezpośrednio, bądź działać poprzez

nieodpowiednią dietę, brak opieki prenatalnej i inne czynniki socjoekonomiczne [106], ponadto towarzyszą tutaj też ciężkie infekcje jak HIV, HCV, HBV) [71]. Zażywanie heroiny i kokainy może prowadzić do rozwoju hipotrofii płodu, wad wrodzonych oraz zespołu uzależnienia u płodu [8, 51, 71].

Jednostki chorobowe, w których dochodzi do uszkodzenia naczyń, jak preeklampsja, cukrzyca, choroby nerek, bądź kolagenozy są uważane za jeden z najczęstszych czynników ryzyka wystąpienia hipotrofii płodu [106]. Stwierdzono zwiększenie odsetka występowania IUGR płodu u ciężarnych z chorobami tkanki łącznej (jak toczeń układowy, twardzina, pierwotny zespół Sjogrena). Większym ryzykiem rozwoju hipotrofii płodu cechuje się preeklampsja o wczesnym początku. Przepływ maciczno-łożyskowy jest upośledzony zarówno w preeklampsji jak i hipotrofii, a zmiany fizjologiczne w tętnicach spiralnych są wówczas upośledzone. W przypadku współistnienia palenia papierosów z preeklampsją, działanie obu czynników sumuje się zwiększając ryzyko hipotrofii [71]. Cukrzyca może prowadzić do uszkodzenia naczyń w obrębie łożyska. Ciężarne z cukrzycą z towarzyszącymi powikłaniami nerkowymi, bądź okulistycznymi stanowią grupę zwiększonego ryzyka występowania zarówno hipotrofii jak i preeklampsji, jako skutek niewydolności maciczno-łożyskowej [116].

Kilkanaście rodzajów zakażeń występujących u matki jest uważanych za czynniki ryzyka wystąpienia w 5-10% hipotrofii płodu [86, 106, 200]. Infekcje wirusowe mogą obejmować trofoblast i poprzez indukcję uszkodzeń w obrębie jego genów doprowadzić do apoptozy w obrębie komórek trofoblastu, upośledzenia jego inwazji i funkcji, co w rezultacie prowadzić może do rozwoju hipotrofii [7]. Najczęstszą infekcją wirusową mogącą prowadzić do IUGR jest zakażenie cytomegalią [137]. Wirus *Herpes simplex*, HIV, wirus ospy wietrznej oraz adenowirus mogą uszkadzać trofoblast i prowadzić do rozwoju hipotrofii [7]. Wirus różyczki i parwowirus B19 mogą prowadzić zarówno do IUGR, jak i porodu przedwczesnego [133].

Niektóre doniesienia wykazują na korelację matczynej anemii z niedoboru żelaza z małą urodzeniową masą ciała noworodka. Według niektórych autorów niedokrwistość przed zajściem w ciążę wiąże się z upośledzeniem wzrostu płodu [174]. Matczyzna anemia zwiększa częstość występowania małej masy urodzeniowej i występowania porodu przedwczesnego, prawdopodobnie poprzez zwiększenie produkcji płodowego CRH i kortyzolu, w następstwie czego dochodzi do zwiększenia stresu oksydacyjnego, uszkadzającego erytrocyty prowadząc do upośledzenia wzrastania płodu [5].

Przypadki pojedynczej tętnicy pępowinowej mogą korelować z występowaniem aberracji chromosomalnych, wad płodu, hipotrofii i zwiększonej umieralności płodów [157]. Błoniasty przyczep pępowiny zdarza się w 0,24 - 1,8% ciąży pojedynczych i może być związany z zaburzeniami krążenia oraz rozwojem hipotrofii płodu [171].

Ciąże bliźniacze w 15-30% związane są z wystąpieniem IUGR i porodem przedwczesnym [106]. W ciąży jednokosmówkowej anastomozy łożyskowe mogą prowadzić do powstania zespołu przetoczenia pomiędzy płodami, którego składowym jest hipotrofia występująca u płodu dawcy [195].

1.5. POLIMORFIZM GENÓW ZWIĄZANYCH Z METABOLIZMEM FOLIANÓW JAKO CZYNNIK ROZWOJU HIPOTROFII

Znanych jest wiele czynników ryzyka wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu, jednakże nadal często nie udaje się przewidzieć jego wystąpienia oraz określić etiologii [123]. Około 30% noworodków urodzonych przedwcześnie drogami natury ma masę ciała poniżej 10 centyla [65].

Prawidłowe wewnątrzmaciczne wzrastanie płodu zależy od czterech podstawowych zmiennych. Każdy płód ma określony genetycznie zdeterminowany potencjał wzrostowy, który dziedziczy po rodzicach. Ten potencjał może być następnie modulowany przez schorzenia dotyczące samego płodu, stan zdrowia matki, a także funkcję łożyska. Jeśli wszystkie wymienione czynniki funkcjonują prawidłowo, proces wzrostowy płodu pozostaje niezaburzony. W przeciwnym razie dochodzi do rozwoju IUGR. Nieprawidłowości dotyczące płodu (zarówno zaburzenia chromosomalne jak i wady anatomiczne), a także nieprawidłowości łożyska stanowią najczęstszą przyczynę hipotrofii płodu w ciąży pojedynczej [179].

Uważa się, że trombofilia zwiększa ryzyko wystąpienia wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu, poronień, porodu przedwczesnego i zgonu wewnątrzmacicznego płodu [4, 50, 97]. Pileri i wsp. wskazali na możliwy związek hipotrofii i trombofilii, który można wytłumaczyć przyjmując za przyczynę IUGR ograniczenie przepływu łożyskowego, a więc jego zdolności do transportu tlenu i substancji odżywczych od matki do płodu. Zmiany zakrzepowe w obrębie krążenia łożyskowego, przypuszczalnie wynikające z trombofilii, mogą zmniejszać przepływ łożyskowy sprzyjając rozwojowi hipotrofii płodu [149]. Autorzy w swoim badaniu stwierdzili statystycznie istotny związek trombofilii z IUGR (WR=2,09). Yassae i wsp. szacują, że około 35% przypadków hipotrofii

płodu może być spowodowane trombofilią [217]. Również niektóre wcześniejsze prace, jak np. autorstwa Brenner i wsp. ukazują asocjację pomiędzy IUGR a mutacją genu protrombiny oraz mutacją Leiden czynnika V krzepnięcia [24].

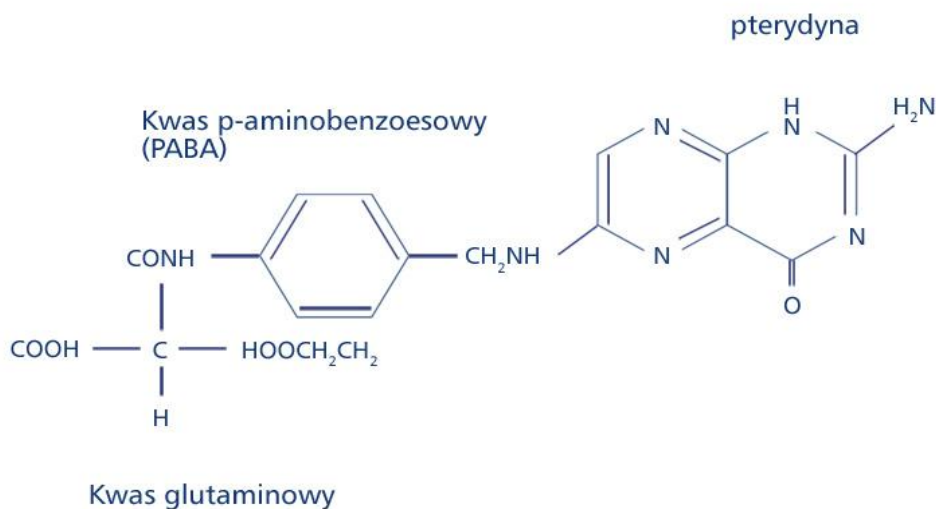
Obok wymienionych powyżej różnorodnych czynników ryzyka wystąpienia hipotrofii w przebiegu ciąży, w ostatnim czasie intensywnie badany jest udział czynników genetycznych, w tym również polimorfizmów genów biorących udział w metabolizmie folianów, które mogą być włączone w etiologię hipotrofii płodu.

1.6. FOLIANY - DEFINICJA, ŹRÓDŁA

Nazwa foliany obejmuje bardzo liczną grupę związków zaliczanych do witamin grupy B, różniących się między sobą stanem utlenienia pierścienia pirazynowego, rodzajem jednowęglowych fragmentów (metylowy, formylowy, formiminowy, metylenowy, metenowy) oraz ilością reszt kwasu glutaminowego.

Kwas foliowy (ryc. 2) (kwas pteroilomonoglutaminowy) jest najbardziej utlenionym stałym związkiem folianów występującym w niewielkiej ilości w żywności, stosowanym w suplementach witaminowych oraz do wzbogacania produktów żywnościowych. Zawiera on w cząsteczce trzy elementy: pochodną pterydynową (2-amino-4-hydroxy-6-metylopterydynę), kwas p-aminobenzoowy (PABA) i kwas glutaminowy. Po raz pierwszy wyizolowany został w 1941 r. Większość folianów w żywności (około 80%) stanowią zredukowane związki pteroilowieloglutaminowe, tetrahydrofolianowe (FH4) lub dihydrofolianowe (FH2), zawierające do 9 reszt kwasu glutaminowego w wiązaniu γ -peptydowym. Kwas foliowy i jego pochodne (wieloglutaminowe pochodne kwasu pteroilowego) ulegają w organizmie przekształceniu w biologicznie aktywną formę – kwas czterohydrofoliowy, który jest koenzymem w przemianach metabolicznych z przenoszeniem grup formylowych i hydroksymetylowych. Pełni on istotną funkcję w syntezie zasad purynowych i pirymidynowych będących składnikami kwasów nukleinowych [91]. Obserwowane w niedoborze folianów zmniejszenie metylacji DNA, osłabienie odporności, uszkodzenia chromosomalne i zaburzenia naprawy DNA sprzyjają powstawaniu procesów nowotworowych poprzez zmianę ekspresji krytycznych genów supresyjnych i protoonkogenów [39]. Poziom homocysteiny całkowitej w surowicy jest czułym markerem niedoboru kwasu foliowego i witaminy B12. Jest nie tylko czynnikiem ryzyka miażdżycy naczyń połączonym z trzykrotnym wzrostem ryzyka zawału serca [75,153,166], ale także

predyktorem zespołów otępiennych u starszych pacjentów. Obserwowano również wpływ hiperhomocysteinemii na wyniki położnicze m.in. zwiększoną częstość poronień, wad cewy nerwowej i występowanie zespołu Downa [75].



Ryc. 2. Wzór strukturalny kwasu foliowego (C₁₉H₁₉O₆N₇, m.c.z. 441,4).

Głównym źródłem kwasu foliowego i jego pochodnych (poliglutaminowe pochodne kwasu pteroilowego) dla człowieka jest pokarm. Niewielkie jego ilości syntetyzuje mikroflora jelitowa [94, 209]. Foliiany występują w różnych produktach – zarówno roślinnych, jak i zwierzęcych – w postaci zredukowanych wieloglutaminowych pochodnych kwasu tetrahydrofoliowego, głównie jako 5-metylo-FH₄ i 10-formylo-FH₄. Bogate ich źródło to wątroba oraz ciemnozielone warzywa liściaste (surowe lub krótko gotowane), zwłaszcza brukselka, szpinak, bób, zielony groszek, kalafior i brokuły. Znaczne ilości folianów występują także w kielkach zbóż, soi i jajkach. Duże straty folianów następują wskutek wypłukiwania podczas gotowania (np. 22% w czasie gotowania szparagów, 84% w czasie gotowania kalafiora), jak również w wyniku utleniania. W przetworzonej żywności witamina ta może zostać zniszczona w 50-80% wyjściowych surowców [91, 118].

U człowieka ustrojowe zapasy kwasu foliowego wynoszą 5-10 mg, z czego około połowa znajduje się w wątrobie. Przy prawidłowym odżywieniu zawartość kwasu foliowego w

surowicy waha się w granicach 6-20 ng/ml, a w erytrocytach 160-640 ng/ml. Objawy kliniczne jego niedoboru występują, gdy poziom w surowicy wynosi poniżej 3 ng/ml, a w erytrocytach poniżej 140 ng/ml. Dobrym wskaźnikiem aktualnego spożycia tej witaminy jest ilość kwasu foliowego w surowicy krwi. Stężenie poniżej 3-5 ng/ml wskazuje na niedostateczne pokrycie zapotrzebowania organizmu na tę witaminę. Natomiast jego poziom w erytrocytach wskazuje na zapasy ustrojowe w nich magazynowane przez 120 dni (okres życia erytrocytów). Okres wyczerpywania się zapasów ustrojowych kwasu foliowego wynosi 3-4 miesiące [122, 209]. Najistotniejsze przyczyny niedoborów folianów opisano poniżej.

Przyczyny niedoborów kwasu foliowego [źródła: 10, 188]:

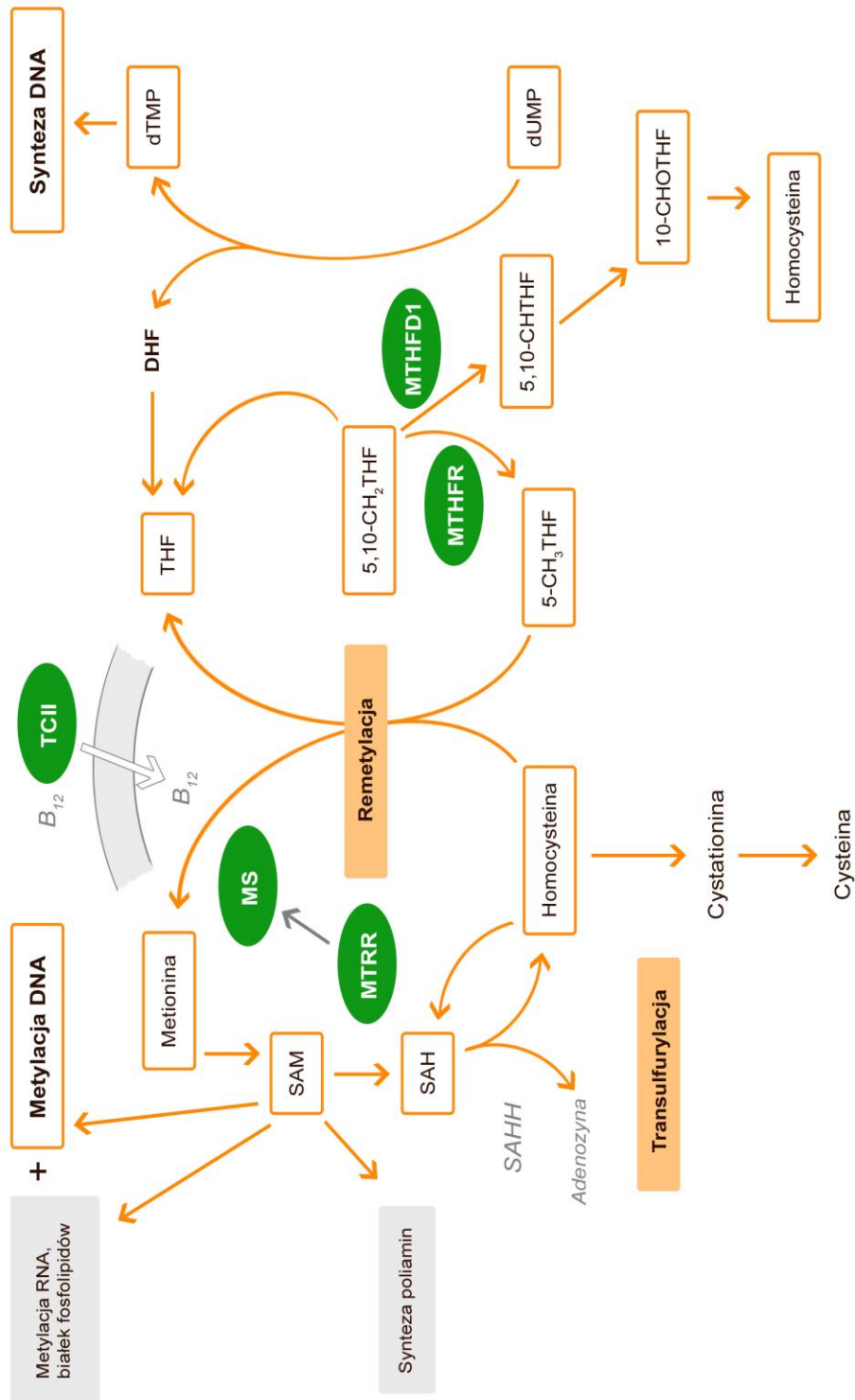
Przyczyny upośledzające wchłanianie folianów: stany zapalne żołądka i jelita cienkiego, zaburzenia czynnościowe i anatomiczne przewodu pokarmowego
Choroby wątroby
Niedobory dekoniugaz rozkładających związki poliglutaminowe folianów
Leki: przeciwzapalne (aspiryna), bakteriostatyczne (sulfasalazyna), przeciwpadaczkowe, antagoniści folianów (metotreksat), barbiturany, niektóre środki antykoncepcyjne
Styl życia: palenie tytoniu i przewlekłe spożywanie alkoholu

1.7. METABOLIZM FOLIANÓW

Monoglutamylofoliany, po wchłonięciu w układzie pokarmowym, są transportowane do tkanek, w których ulegają przemianie do poliglutaminylofolianów. Podczas gdy w osoczu przeważają postacie monoglutaminianowe kwasu foliowego, a przede wszystkim N5-metylo-TH4-folian, to dominującą wewnątrzkomórkową formą jest zazwyczaj pochodna poliglutaminianowa. Wątroba jest miejscem magazynowania kwasu foliowego (w postaci koniugatu pentaglutaminowego), skąd po redukcji jako N5-metylo-TH4-folian i w mniejszych ilościach jako N10-formylo-TH4-folian trafia on do krążenia wątrobowo-jelitowego i tkanek. Stwierdzono obecność obu tych postaci również w płynie mózgowo-rdzeniowym [122]. Jako że foliany są cząsteczkami wysoce hydrofilnymi, nie mogą one przenikać przez błony

komórkowe na drodze samoistnej dyfuzji, tak więc niezbędne było powstanie systemu transportującego je do wnętrza komórek [36]. Smulders i wsp. zasugerowali, że transport folianów do wnętrza komórek odbywa się na drodze pinocytozy, w czym uczestniczą kaweole, które mają w swoich błonach zakotwiczone receptory wiążące głównie N5-metylo-TH4-folian. Po związaniu N5-metylo-TH4-folianu z receptorem część błony uwypukla się i tworzy pęcherzyk, którego wnętrze dzięki pracy pompy protonowej ulega zakwaszeniu co sprawia, że folian oddysocjowuje od receptora. Transport ten jest zgodny z gradientem pH i odbywa się bez udziału ATP [178]. Ważną rolę w transporcie folianów odgrywa przenośnik zredukowanych folianów (RFC1 - *reduces folate carrier*), który wykazuje ekspresję w większości tkanek ustroju. Ponadto znane są inne systemy transportu, jak przenośnik folianów sprzężony z protonem (PCFT - *proton-coupled folate transporter*) [36].

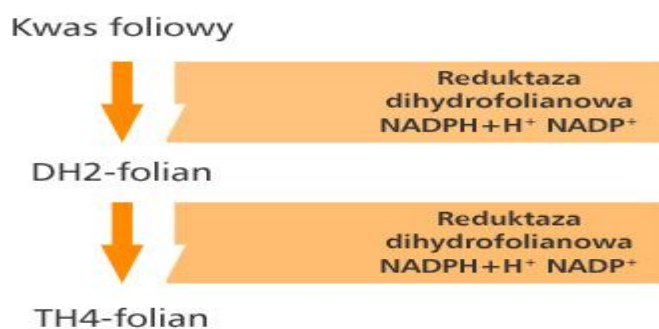
Wewnątrz komórek syntetaza folipoli-g-glutaminowa przy udziale ATP powoduje przekształcenie pochodnych kwasu foliowego ponownie w ujemnie naładowane koniugaty poliglutaminowe, które nie mogą przedostawać się przez błonę komórkową na zewnątrz [125]. Foliany wewnątrzkomórkowo mogą być wykorzystywane w procesie metylacji DNA, bądź w procesie syntezy prekursorów kwasów nukleinowych oraz w syntezie poliamin, co ilustruje rycina 3.



REAKCJE BIOSYNTETY NUKLEOTYDÓW

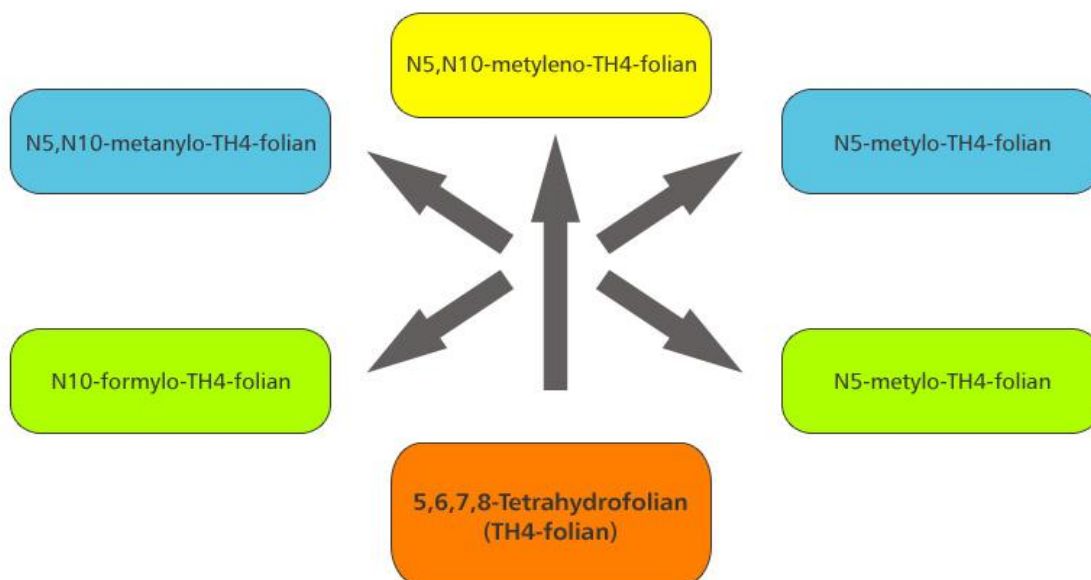
REAKCJE METYLACJI

W komórkach kwas foliowy najpierw jest przekształcany przy udziale reduktazy dihydrofolianowej i NADP do DH2-folianu, a następnie do TH4-folianu, który jest najważniejszym związkiem w przemianach kwasu foliowego (ryc. 4).



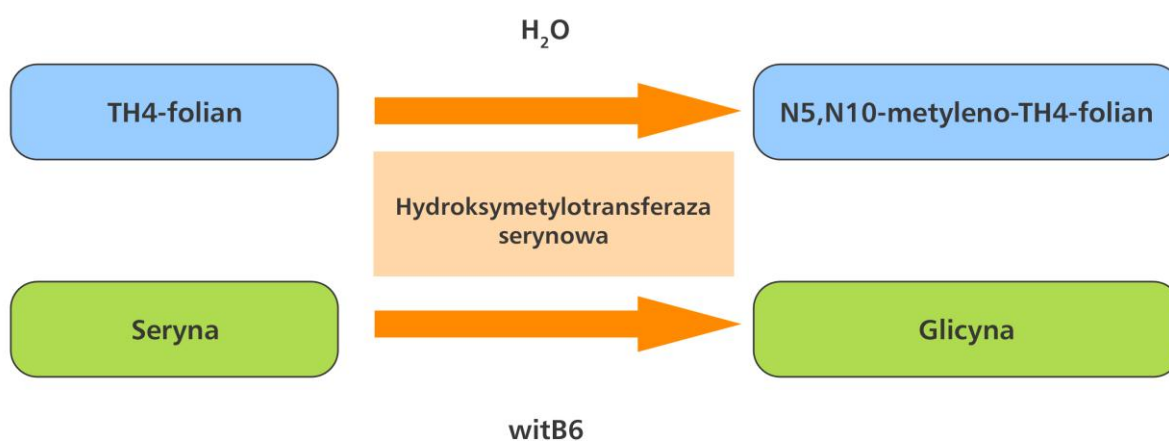
Ryc. 4. Dwuetapowa przemiana kwasu foliowego do TH4 folianu.

Reduktaza dihydrofolianowa jest szczególnym enzymem w przemianach kwasu foliowego, ponieważ dzięki jej aktywności wszystkie komórki organizmu są zaopatrywane w TH4-folian. Jej aktywność jest hamowana m.in. przez metotreksat stosowany jako lek przeciwnowotworowy, trimetoprim wykazujący działanie bakteriobójcze i pirymetaminę działającą przeciwmalarycznie [10]. Głównym zadaniem TH4-folianu w komórkach jest przenoszenie aktywnych grup jednowęglowych: metylowej (–CH₃), metylenowej (–CH₂–), metenylowej (–CH=), formylowej (–CH=O) i formiminowej (=CH=NH). Są one dołączone do atomów azotu N-5 lub N-10 TH4-folianu i mogą przekształcać się z jednej postaci w drugą [11]. Związki te pełnią funkcję koenzymów podczas syntezy puryn i pirymidyn, w przemianach homocysteiny, metioniny, seryny i glicyny oraz katabolizmie histydyny do kwasu glutaminowego [166] (ryc. 5).



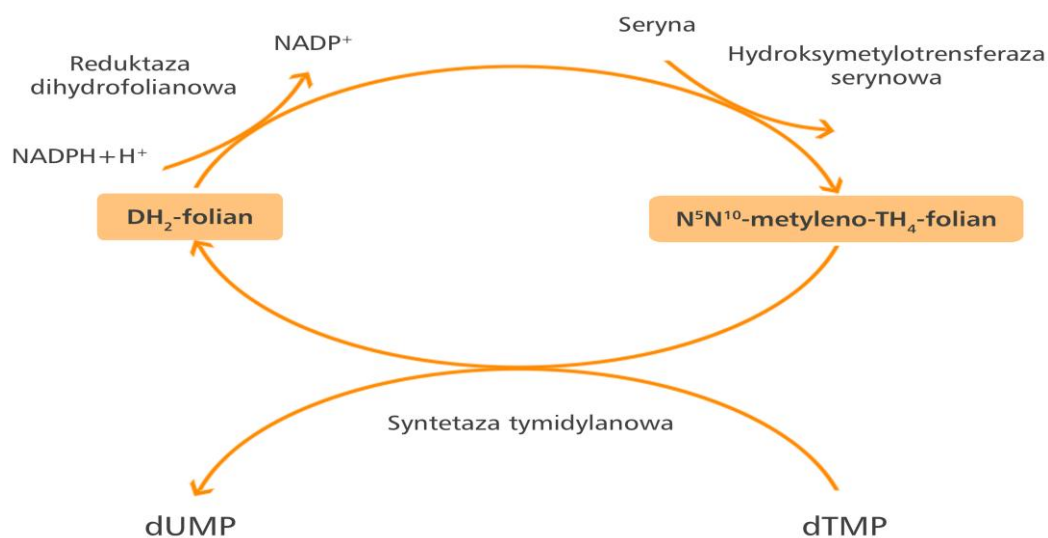
Ryc. 5. Pochodne TH4-folianu pełniące rolę koenzymów w wielu w reakcjach ustrojowych.

N5,N10-metyleno-TH4-folian powstaje głównie na drodze przeniesienia grupy metylenowej z łańcucha bocznego seryny na TH4-folian (seryna przekształca się w glicynę). Kofaktorem tej reakcji jest fosforan pirydoksalu (witamina B6) [10] (ryc. 6).



Ryc. 6. Przemiana TH4-folianu do N5,N10 metyleno-TH4 folianu.

N⁵,N¹⁰-metyleno-TH₄-folian uczestniczy w przekształcaniu 2-deoksyurydynomonofosforanu (dUMP) do 2-deoksytymidynomonofosforanu (dTMP), przy udziale syntazy tymidylanowej. Reakcja ta ma ogromne znaczenie podczas syntezy DNA w szybko dzielących się komórkach organizmu. N⁵,N¹⁰-metyleno-TH₄-folian jest dawcą atomu węgla w pozycji C-2 i C-8, poza glicyną, asparaginianem, glutaminą i CO₂, pozostałymi substratami. Grupa metylowa pochodząca z N⁵,N¹⁰-metyleno-TH₄-folianu zostaje przyłączona do atomu węgla C-5 pierścienia aromatycznego dUMP (deoksyurydynomonofosforan) i powstaje dTMP (deoksytymidynomonofosforan) oraz DH₂-folian. Powstały w wyniku syntezy dTMP DH₂-folian w obecności reduktazy dihydrofolianowej i NADPH jest przekształcany do TH₄-folianu. Zregenerowany w ten sposób TH₄-folian pozwala rozpocząć syntezę kolejnej cząsteczki dTMP (ryc. 7). Inhibitory zarówno syntazy tymidylanowej (np. fluorouracyl), jak i reduktazy folianowej (np. aminopteryna, metotreksat), mogą blokować ten proces, co znajduje wykorzystanie m.in. w chemioterapii pozbawiając komórki nowotworowe prekursorów niezbędnych do syntezy DNA [10, 188].

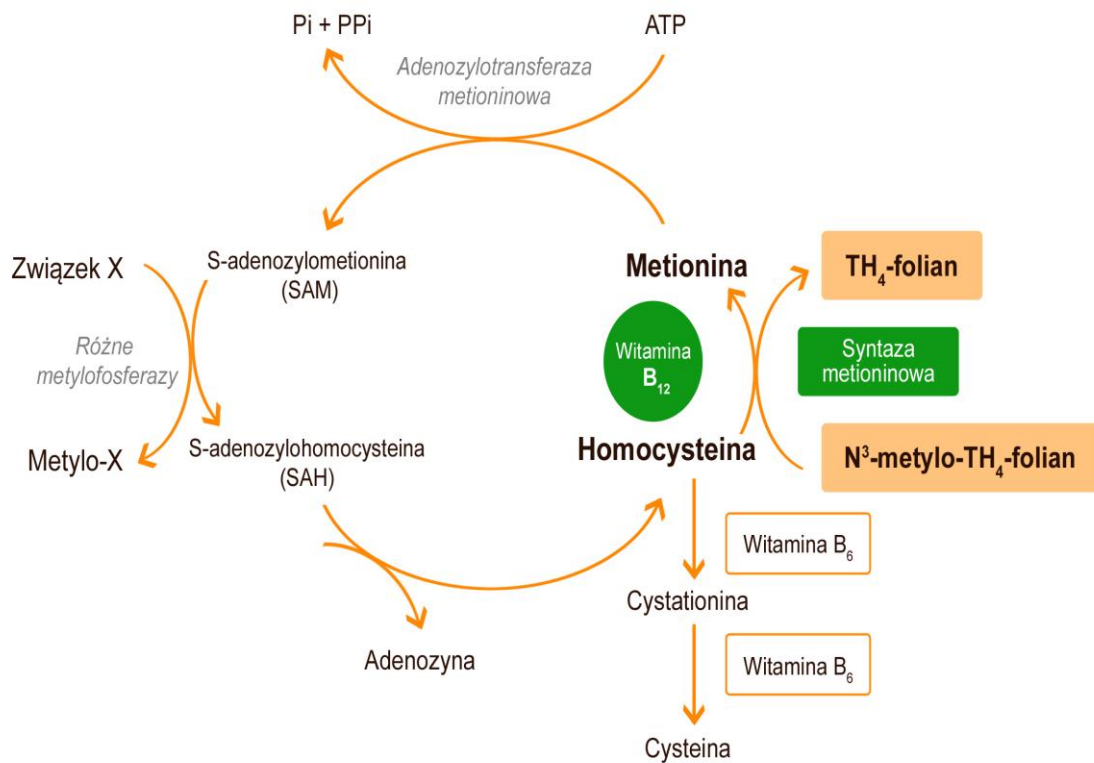


Ryc. 7. Udział folianów w syntezie kwasów nukleinowych [wg Czczot 2008].

N5, N10- metyleno-TH4- folian może również brać udział w syntezie DNA na innej drodze, ulegając kilkustopniowej przemianie do N5-formylo-TH4-folianu, który jest kluczowym ogniwem w procesie biosyntezy puryn i pirymidyn [26]. Enzymem katalizującym tą przemianę jest dehydrogenaza metylenotetrahydrofolianowa (MTHFD1 - *methylenetetrahydrofolate dehydrogenase*), której istotne znaczenie zostanie szczegółowo omówione później.

N5, N10-metyleno-TH4-folian może też być zredukowany do N5-metylo-TH4-folianu przy udziale reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR - *methylene tetrahydrofolate reductase*). N5-metylo-TH4-folian jest jedną z ważniejszych form kwasu foliowego w organizmie, stąd istotna rola reduktazy MTHFR, która zostanie szczegółowo opisana później [199]. N5-metylo-TH4-folian jest z kolei dawcą grupy metylowej w procesie przekształcania homocysteiny do metioniny, katalizowanym przez syntazę metioninową (metylotransferazę tetrahydropteroyloglutaminową homocysteiny), gdzie kofaktorem jest kobalamina (witamina B12). Jest to niezwykle istotny proces z dwóch względów: po pierwsze powstała w tej reakcji metionina może następnie być wykorzystywana bezpośrednio do syntezy protein lub być przekształcana do S-adenozylometioniny (SAM - *S-adenosylmethionine*) biorącej udział w procesie metylacji DNA i syntezy poliamidów. Natomiast odzyskany w tej reakcji TH4-folian może być wykorzystany do syntezy DNA [120, 128, 199]. SAM powstaje z przeniesienia grupy adenozylowej z ATP na atom siarki metioniny przy udziale syntazy S-adenozylometioniny (MS - *methionine synthase*) i uczestniczy w metylacji takich związków jak DNA, adrenalina, melatonina, kreatyna, białka, fosfolipidy oraz w syntezie poliamin (sperminy i spermidyny) [128]. Synteza poliamin jest jedną z pierwszych reakcji zachodzących w proliferujących komórkach organizmu, która poprzedza syntezę kwasów nukleinowych. Poliaminy (spermina i spermidyna) powstają na drodze przeniesienia dwóch grup aminopropylowych z dekarboksylowanej SAM [144]. Spermidyna jest prekursorem hypusiny, które jest składnikiem czynnika inicjującego translację, niezbędnym w procesie replikacji komórkowej [139]. W procesie metylacji SAM oddając grupę metylenową przechodzi w S-adenozylhomocysteinę (SAH - *S-adenosylhomocysteine*), która następnie może ulec konwersji do homocysteiny przez hydrolazę S-adenozylhomocysteiny (SAHH - *S-adenosylhomocysteine hydrolase*), co zamyka cykl metioninowy, prezentowany na ryc. 8.

Homocysteina może być ponownie remetylowana do metioniny lub, w warunkach wysycenia szlaku remetylacji, może ulec transsulfurylacji do cysteiny, za pomocą enzymu syntazy- β -cystationiny przy udziale witaminy B6 (fosforanu pirydoksalu) [120, 199].



Ryc. 8. Udział folianów w cyklu przemian homocysteiny w organizmie [wg Czeczot 2008].

Jako że metabolizm folianów jest nierozdzielnie powiązany z metabolizmem homocysteiny, wszelkie zakłócenia cyklu przemian folianów wynikające z ich niedoborów, czynników jatrogennych lub genetycznych, zaburzają też proces remetylacji homocysteiny, prowadząc do wzrostu jej poziomu w organizmie. Hiperhomocysteinemia jest znanym czynnikiem miażdżycy (a w rezultacie zawału serca i udaru mózgu), zakrzepicy żyłnej, a nawet chorób psychicznych [108]. W rezultacie zaburzonego przekształcania homocysteiny do metioniny zaburzeniu ulega natomiast wiele istotnych procesów metabolicznych jak np.

metylacja DNA i biosynteza poliamin [120]. Hiperhomocysteinemia może też prowadzić do powikłań położniczych, takich jak przedwczesne oddzielenie łożyska, stan przedrzucawkowy, hipotrofia płodu, a nawet wewnątrzmaciczne obumarcie płodu [135].

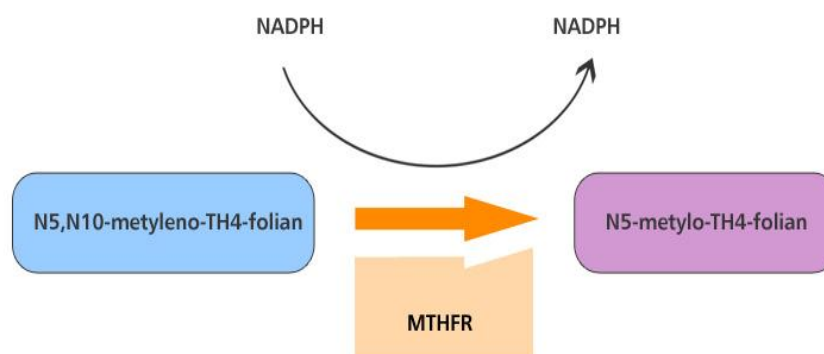
1.8. POLIMORFIZMY GENÓW ZWIĄZANYCH Z METABOLIZMEM FOLIANÓW

Przez pojęcie polimorfizmu genetycznego rozumie się jednoczesne występowanie w populacji różnych form allelicznych danego genotypu z częstością >1%. Polimorfizm jest efektem zmian pojedynczego nukleotydu występujących w sekwencji DNA (SNP - *single nucleotide polymorphism*). Większość wykrywanych polimorfizmów dotyczy niekodujących fragmentów DNA. Jeśli natomiast polimorfizm genu dotyczy fragmentów kodujących (eksony), może on przejawiać się występowaniem zmienionej struktury i funkcji białek. Wiadomo, że obecność polimorfizmów może mieć także wpływ na występowanie pewnych cech fenotypowych, a także zwiększonej predyspozycji do występowania niektórych chorób. Uważa się, że diagnostyka molekularna polegająca na określeniu właściwych dla danej osoby korelacji polimorfizmów SNP może być pomocna w prognozowaniu i ocenie klinicznego obrazu choroby [99, 168, 176].

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie współzależnością między zmianami genetycznymi enzymów odpowiedzialnych za przekształcenia ustrojowych folianów a przemianami metabolicznymi. Potwierdzono udział polimorfizmów genetycznych niektórych enzymów, szczególnie reduktazy metylenotetrahydrofolianu (MTHFR), biorących udział w metabolizmie grup jednowęglowych w niektórych powikłaniach w położnictwie [31, 193].

1.8.1. REDUKTAZA METYLENOTETRAHYDROFOLIANU (MTHFR)

Reduktaza metylenotetrahydrofolianowa (MTHFR - *5,10-methylenetetrahydrofolate reductase*), enzym związany ze szlakiem przemian kwasu foliowego, katalizuje przy udziale fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH - *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*) reakcję redukcji 5,10-metylenotetrahydrofolianu do 5-metylotetrahydrofolianu, który jest substratem w reakcji remetylacji homocysteiny do metioniny, jak przedstawia ryc. 9 [62].



Ryc. 9. Reakcja katalizowana przez reduktazę metylenotetrahydrofolianową.

MTHFR jest homodimerskim białkiem, zbudowanym z dwóch podjednostek o wielkości ok. 77 kDa, występującym w cytoplazmie komórkowej. Wykazuje ona ekspresję w szeregu tkanek m.in. w mózgu, mięśniach, wątrobie i żołądku [62]. Rozen w niektórych tkankach stwierdza występowanie mniejszej izoformy o wielkości 70 kDa [162]. Yamada i wsp. wskazali, że enzym ten posiada domenę katalityczną, zlokalizowaną w pozycji 222 oraz domenę regulatorową w pozycji 429. Domena katalityczna posiada miejsce wiązania folianu oraz dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD - *flavin adenine dinucleotide*) jako kofaktora, natomiast domena regulatorowa wiąże SAM. Autorzy sugerują, że istotne może być wzajemne allosteryczne oddziaływanie obu miejsc wiążących pomiędzy obiema podjednostkami enzymu co wpływa na zdolność wiązania kofaktora. Zaobserwowano utratę aktywności enzymatycznej *MTHFR* w przypadku dysocjacji monomerów pod wpływem działania temperatury lub rozcieńczenia, natomiast fizjologiczne stężenia FAD, folianów i SAM powodowały stabilizację enzymu [198]. Gen *MTHFR* kodujący białko enzymu ma ponad 20 kbp długości i znajduje się na chromosomie 1 (1p36.3) [68]. Niektóre mutacje w tym genie wpływają na obniżenie aktywności enzymu, czego rezultatem jest podwyższenie stężenia homocysteiny w osoczu krwi [62]. Opisywano związek genetycznych wariantów tego genu z występowaniem wielu chorób m.in. raka okrężnicy, chorób naczyń, schizofrenii, migreny z aurą, jaskry, zespołu Downa, a także wad cewy nerwowej [30, 85, 90, 126, 128, 165]. Poza tym Kim i wsp. wykazali, że genetyczne warianty genu *MTHFR* mogą być odpowiedzialne za zmienioną odpowiedź na leki przeciwnowotworowe, jak 5-fluorouracyl i

metotreksat. Sugeruje się, że próby inhibicji MTHFR mogą poprawić odpowiedź na chemioterapię opartą na 5-fluorouracylu [88].

1.8.1.1. POLIMORFIZM 677C>T GENU *MTHFR*

W 1995 roku Frosst i wsp. opisali mutację w domenie regulacyjnej genu *MTHFR* powodującą zmianę w białku – wbudowanie waliny w pozycji 222 w miejsce alaniny (A222V) [57]. Mutacja jest zlokalizowana w eksonie czwartym i spowodowana punktową tranzycją cytozyny w pozycji 677 na tyminę (677C>T). Polimorfizm ten znajduje się w miejscu wiążącym kofaktor MTHFR, którym jest FAD. Guenther i wsp. opisują, iż w wyniku tej mutacji powstaje termolabilny wariant białka MTHFR o obniżonej aktywności u nosicieli genotypu 677TT do około 30%, natomiast u nosicieli genotypu heterozygotycznego 677CT aktywność wynosi ok. 60% aktywności enzymu MTHFR *in vitro* [69]. Całkowity brak aktywności *MTHFR* występuje bardzo rzadko i prowadzi do ciężkiej hiperhomocysteinemii. Niższa aktywność enzymatyczna związana z nosicielstwem wariantu 677TT oraz związane z tym wyższe stężenia homocysteiny w osoczu, zwłaszcza w warunkach niedoborów folianów, wskazuje na mniejszą zdolność adaptacyjną tego genotypu do restrykcji folianów w diecie [70].

Również badania Guenther i wsp. na modelu *Escherichia coli* pokazują, jak fizjologiczne stężenia folianów działają ochronnie przed utratą zdolności wiązania kofaktora FAD przez enzym, natomiast mutacja 677C>T w obrębie genu *MTHFR* powoduje, że potrzebne są wyższe stężenia folianów, celem stabilizacji wiązania FAD [69]. Natomiast McNulty i wsp., zaobserwowali że 12-tygodniowe stosowanie diety bogatej w wysokie stężenia FAD spowodowało obniżenie stężenia homocysteiny w surowicy u zdrowych klinicznie osób o genotypie 677TT *MTHFR*, częściowo korygując negatywny wpływ mutacji [119]. Dowody na kliniczną manifestację obniżonej aktywności MTHFR u heterozygot 677CT są mniej powszechne. James i wsp. donoszą o podwyższonym ryzyku wystąpienia zespołu Downa [82], natomiast Sohda i wsp. o wzroście ryzyka preeklampsji [180]. Większość badań donosi jednak o zwiększonym ryzyku u homozygot 677TT, szczególnie w przypadku współwystępowania dodatkowych czynników ryzyka [22, 72, 82].

Częstość występowania mutacji waha się w zależności od populacji. Botto i wsp. dowodzi, że homozygoty 677TT stanowią ok. 12% w populacji kaukaskiej i azjatyckiej, natomiast heterozygoty 677CT występują aż w około 50% [22]. Mutacja jest bardzo rzadka u Afroamerykanów ($\leq 1\%$), natomiast częsta u Hiszpanów pochodzenia meksykańskiego

(≥20%). W Europie częstość występowania homozygot *677TT* genu *MTHFR* waha się od 8% w Niemczech do 18% we Włoszech [22, 13].

1.8.1.2. POLIMORFIZM *1298A>C* GENU *MTHFR*

Polimorfizm *1298A>C* wynika z punktowej mutacji zmieniającej nukleotyd adeninę na cytozynę w 7 eksonie genu reduktazy metylenotetrahydrofolianowej, co powoduje zamianę aminokwasu glutaminy zamiast alaniny w łańcuchu białkowym tego enzymu. Zamiana ta znajduje się w obrębie domeny regulatorowej w miejscu odpowiedzialnym za przyłączanie S-adenozylometioniny [201, 210]. Piśmiennictwo dostarcza mniej danych na temat tej mutacji. Częstość występowania homozygot *1298CC* wg danych holenderskich i kanadyjskich wynosi około 9% [201, 210]. Częstsza jest natomiast koincydencja heterozygotyczności wobec *677TT* i *1298CC*, która wynosi ok. 17% wg danych Trembath i wsp. W Stanach Zjednoczonych ok. 15% w badaniu Weisberg i wsp. z Kanady i ok. 20% w badaniu holenderskim van der Put i wsp. [201, 196, 210]. Mutacja ta powoduje zmniejszenie aktywności enzymu podobnie jak w przypadku genotypu *677TT* [204, 210]. Homozygoty *1298CC* nie wykazują podwyższonego poziomu homocysteiny we krwi, natomiast heterozygoty jednocześnie pod względem *1298AC* jak i *677CT* wydają się mieć profil biochemiczny zbliżony do homozygot *677TT*, czemu towarzyszy obniżone osoczowe stężenia folianów i podwyższone poziomy homocysteiny [201, 210].

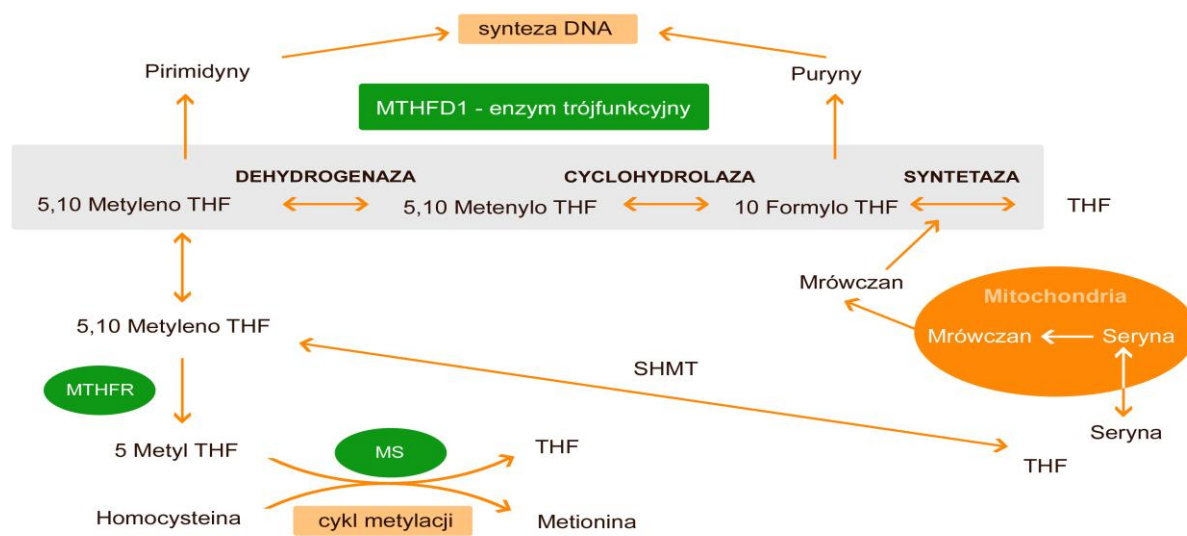
1.8.1.3. POLIMORFIZM *1793G>A* GENU *MTHFR*

Polimorfizm *1793G>A* genu *MTHFR* został opisany po raz pierwszy przez Rady i wsp. w 2007 roku. Polega on na zamianie guaniny na adeninę w 11 eksonie kodonu 549, co powoduje zamianę aminokwasu glutaminy w miejsce argininy w łańcuchu białkowym *MTHFR* [152]. Polimorfizm ten występuje znacznie rzadziej wśród osób rasy białej (0,07%) niż poprzednie dwa polimorfizmy. Praca Mahdi i wsp. zwraca uwagę na ochronny wpływ mutacji *1793G>A* genu *MTHFR* w stosunku do wystąpienia raka okrężnicy i odbytnicy. Ponadto autorzy stwierdzili istotną statystycznie redukcję ryzyka zachorowania u heterozygot *1793GA* otrzymujących właściwą podaż folianów [109]. Z kolei Jang i wsp. badali związek tego polimorfizmu z występowaniem wrzodziejącego zapalenia jelita w populacji osób zamieszkujących centralny region Chin. Autorzy stwierdzili pozytywną korelację pomiędzy badanym polimorfizmem a zachorowalnością na wrzodziejące zapalenie jelit, a także

występowaniem hiperhomocysteinemii i obniżonego poziomu ustrojowego folianów i witaminy B12 [84]. Piśmiennictwo donosi również o powiązaniu tego polimorfizmu z powikłaniami występującymi w położnictwie. Praca Seremak-Mrozikiewicz i wsp. wskazuje na znaczący wzrost częstości nawracających poronień u pacjentek będących heterozygotami 1793GA [169].

1.8.2. DEHYDROGENAZA METYLENOTETRAHYDROFOLIANU (MTHFD)

Dehydrogenaza metylenotetrahydrofolianowa (MTHFD1 – *methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1*) jest trójfunkcyjnym enzymem, zależnym od NADP. Enzym ten zlokalizowany jest w cytoplazmie komórkowej, gdzie katalizuje kolejne trzy reakcje konwersji tetrahydrofolianu do pochodnych takich jak: 10-formylo-tetrahydrofolian, 5,10-metylenotetrahydrofolian oraz 5,10-metyltetrahydrofolian, co zilustrowano na rycinie 10. Dwie z tych pochodnych, 10-formylo-tetrahydrofolian, i 5,10-metylenotetrahydrofolian, pełnią istotną rolę w cyklu komórkowym, będąc kofaktorami do biosyntezy *de novo* puryn i pirymidyn [26].



Ryc. 10. Reakcje katalizowane przez enzym MTHFD1 [wg Brody i wsp. 2002].

Hum i wsp. wykazali, że enzym jest zbudowany z dwóch identycznych podjednostek o sumarycznej masie ok. 100 kD i posiada dwie funkcjonalne domeny. Koniec aminopeptydowy posiada aktywność dehydrogenazy i cyklohydrolazy zależnej od NADP. Natomiast karboksypeptydowy koniec ma aktywność syntetazy formyltetrahydrofolianu [78]. Barlowe i wsp. potwierdzili, że syntetaza może również pełnić niekatalityczną rolę w syntezie puryn jako składowa kompleksu multienzymatycznego [14]. Syntetaza zamyka szlak syntezy reszt formylowych z formylotetrahydrofolianu w mitochondriach komórkowych. Gen kodujący enzym jest położony na chromosomie 14 (14q24). Z piśmiennictwa wynika, że polimorfizmy pojedynczego nukleotydu w obrębie genu *MTHFD* współwystępują z zaburzeniami stężenia folianów i homocysteiny w rodzinach z wrodzonymi wadami serca [32]. Wang i wsp. zasugerowali rolę niektórych wariantów genetycznych tego enzymu w zwiększaniu ryzyka wystąpienia raka żołądka [207]. Ponadto stwierdzano związek polimorfizmów genu *MTHFD* z wadami cewy nerwowej, utratami ciąży w II trymestrze oraz przedwczesnym oddzieleniem łożyska [26, 140, 141].

1.8.2.1. POLIMORFIZM 1958G>A (R 653Q) GENU *MTHFD1*

Najczęściej analizowanym polimorfizmem genu *MTHFD1* jest polimorfizm 1958G>A (R653Q). Zlokalizowany jest on w obrębie domeny syntetazy i prowadzi do substytucji glicyny przez alaninę w kodonie 653 enzymu MTHFD1. Brody i wsp. oraz Parle McDermott i wsp. wskazują, że allel 1958A częściej występuje wśród dzieci z wadami cewy nerwowej oraz u ich matek [26, 142]. Homozygotyczność wobec tej mutacji predysponuje też do częstszej utraty ciąży [141]. Z kolei Kempisty i wsp. zauważyli większą predyspozycję genotypów 1958AA i 1958AG do wystąpienia choroby dwubiegunowej i schizofrenii [87]. Li i wsp. stwierdzili u homozygot 1958AA zwiększoną częstość hipermetylacji wysp CpG w komórkach raka piersi [105]. Ponadto obserwowano związek tej mutacji z częstszym występowaniem migreny [138]. Inna praca podkreśla rolę polimorfizmu 1985A>G, który współistniejąc z homozygotycznym genotypem zmutowanym syntazy tymidylanowej (TS - *thymidylate synthase*), powoduje skrócenie okresu remisji u pacjentów z ostrą białaczką limfoblastyczną, co było niezależne od innych prognostycznych czynników ryzyka [95]. Z kolei Cheng i wsp. wykazali, że nosicielstwo polimorfizmu 1958G>A u rodziców (w szczególności u matki) może zmniejszać ryzyko wady przegrody serca u potomstwa.

Hipotetyczny mechanizm ochronny tej mutacji według autorów może polegać na zwiększeniu aktywności enzymu MTHFD 1, a zatem metabolizmu kwasu foliowego i remetylacji homocysteiny, skutkując w rezultacie zmniejszeniem osoczowego poziomu homocysteiny [32]. Wykazano, że częstość tej mutacji w populacji duńskiej oraz tureckiej jest zbliżona i wynosi około 0,55 dla allele *R* i 0,45 dla allele *Q* [3].

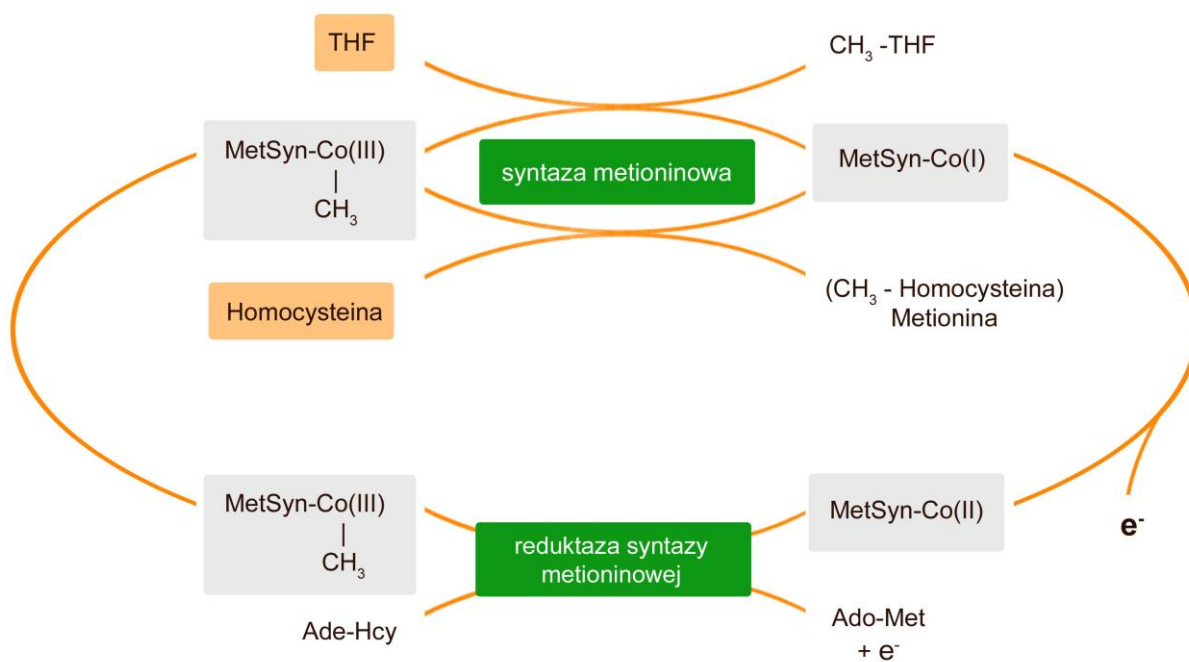
1.8.2.2. POLIMORFIZM 401G>A (R134K) GENU *MTHFD1*

Polimorfizm 401G>A genu *MTHFD1* stanowi zamiana nukleotydu guaniny na adeninę, co skutkuje substytucją aminokwasu argininy na lizynę w łańcuchu białkowym dehydrogenazy metylenotetrahydrofolianowej. Mutacja ta umiejscowiona jest w domenie o aktywności dehydrogenazy i hydrolazy stąd może mieć wpływ na funkcję enzymu [26]. Brody i wsp. badali związek tego polimorfizmu z wystąpieniem wady cewy nerwowej. Badanie pokazało przewagę występowania allele 401A wśród dzieci z wadą cewy nerwowej w porównaniu z grupą kontrolną, lecz różnica nie była statystycznie istotna [26]. W badaniu Stevens i wsp. zauważono natomiast korelację tego polimorfizmu ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka piersi, gdzie dla genotypu 401GA wobec polimorfizmu 401G>A genu *MTHFD1* będącej jednocześnie homozygotą *CC* wobec polimorfizmu rs2276731 genu dehydrogenazy formylotetrahydrofolianowej (FTHFD - *formyltetrahydrofolate dehydrogenase*) iloraz szans zachorowania na ten nowotwór wynosił 1,40 (95%CI 1,06-1,85) [187]. Z kolei Curtin i wsp. zaobserwowali związek tego polimorfizmu ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia raka odbytnicy [39].

1.8.3. SYNTAZA METIONINY (MTR)

Syntaza metioniny (MTR - *5-methyltetrahydrofolate-homocysteine S-methyltransferase*, MS - *metionine synthase*) katalizuje reakcję transmetylacji homocysteiny do metioniny. Gen kodujący ten enzym u człowieka zajmuje pozycję 1q43, w pobliżu regionu telomerycznego długiego ramienia chromosomu 1. Po raz pierwszy gen został sklonowany przez Leclerc i wsp. w 1996 roku. Fragment kodujący genu ludzkiej syntazy metioniny składa się z 3795 par zasad [100]. Enzym zbudowany jest z 1265 aminokwasów i posiada 4 miejsca wiążące, do których mogą przyłączać się: homocysteina, 5-methyltetrahydrofolian, kobalamina i SAM (S-adenozylometionina) w kolejności rozmieszczenia od końca

aminowego. Koniec karboksylowy posiada miejsce interakcji z innym enzymem reduktazą syntazy metioniny. Najpierw grupa metylowa zostaje przeniesiona z methyl-TH4folianu na kobalaminę, tworząc metylokobalaminę i TH4-folian, następnie MTR powoduje przeniesienie grupy metylowej z metylokobalaminą na homocysteinę, tworząc metioninę [100, 102] (ryc. 11).



Ryc. 11. Cykl przemian metioniny przy udziale enzymów MTR i MTRR [wg Leclerc 1998].

Nieprawidłowa funkcja syntazy metioniny może być powodem hiperhomocysteinemii, homocysteinurii oraz anemii megaloblastycznej [55]. Komórki dzielące się najbardziej intensywnie, jak np. należące do układu hematopoetycznego są najbardziej wrażliwe na zakłócenia w syntezie DNA. Stąd jedną z pierwszych manifestacji klinicznych niedoborów folianów jest hipersegmentacja neutrofilii, a następnie pojawienie się przemiany megaloblastycznej komórek szpiku i makrocytarnych erytrocytów, a ostatecznie anemii makrocytarnej. W następnej w kolejności dochodzi do zaburzenia podziałów w komórkach nabłonkowych i gonadalnych. Analizując dalszą przemianę metioniny do SAM, można powiedzieć, że syntaza metioniny pełni kluczową rolę w zapewnieniu odpowiedniego wewnątrzkomórkowego poziomu S-adenozylometioniny, niezbędnego w procesie metylacji DNA. Zaburzona metylacja DNA jest jednym z mechanizmów kandydujących do bycia odpowiedzialnym za proces karcinogenezy [186].

1.8.3.1. POLIMORFIZM 2756A>G GENU *MTR*

Polimorfizm 2756A>G genu syntazy metioniny wynika z substytucji nukleotydu adeniny guaniną w kodonie 2756 prowadząc w rezultacie do zmiany kwasu asparaginowego na glicynę w łańcuchu białkowym MTR, co może zmniejszać aktywność enzymatyczną i wpływać na proces metylacji DNA [173]. W piśmiennictwie istnieją doniesienia na temat związku tego polimorfizmu u matki z występowaniem wad u potomstwa. Mostowska i wsp. zaobserwowali ponad 2-krotny wzrost ryzyka rozszczepu wargi/podniebienia u potomstwa matek o genotypie 2756AG oraz 2756GG. Dokładne wyjaśnienie tego mechanizmu nie zostało poznane. Autorzy sugerują, że może ono wynikać z istotnej roli cyklu metioninowego w kształtowaniu się struktur twarzoczaszki w procesie embriogenezy [127]. Z kolei Coppede i wsp. podczas analizy sześciu najczęstszych polimorfizmów związanych z metabolizmem folianów jako czynników ryzyka urodzenia dziecka z zespołem Downa, stwierdzili że współwystępowanie polimorfizmów 2756AA *MTR* oraz 677TT *MTHFR* zwiększa to ryzyko w sposób statystycznie istotny ($p=0,034$) [36].

1.8.4. REDUKTAZA SYNTAZY METIONINY (*MTRR*)

Enzym reduktaza syntazy metioniny (*MTRR* - *methionine synthase reductase*) uczestniczy w regeneracji syntazy metioniny poprzez metylację, w której SAM jest używany jako donor grupy metylowej. Gen kodujący enzym reduktazę syntazy metioniny został po raz pierwszy sklonowany u człowieka, a następnie opisany przez Leclerc i wsp. w 1998 r. Gen ten o długości 34 kb, zlokalizowany jest na chromosomie piątym w pozycji 5p15.2-15.3, posiada 15 eksonów i 14 intronów i koduje białko złożone z 698 aminokwasów o masie cząsteczkowej 77700 kD [101, 102]. Enzym syntaza reduktazy katalizuje reakcję regeneracji metylokabalaminy, będącej kofaktorem dla enzymu syntazy metioniny, utrzymując ta ostatnią w stanie aktywnym, umożliwiając ponowną reakcję metylacji homocysteiny do metioniny [81]. Z kolei za syntezę donora grupy metylowej niezbędnej w reakcji remetylacji metylenotetrahydrofolianu, odpowiedzialny jest enzym *MTHFR*. Cykl przemian katalizowanych przez enzym reduktazę syntazy metioniny ilustruje wcześniej zamieszczona ryc. 11.

1.8.4.1. POLIMORFIZM 66A>G GENU *MTRR*

Polimorfizm 66A>G polega na zamianie adeniny na guaninę w kodonie 66 sekwencji cDNA genu *MTRR*. Zmutowany allel występuje z częstością ok. 0,50 w populacji ogólnej [81]. Ze względu na znaczący udział reduktazy syntazy metioniny w cyklu przemian homocysteiny w organizmie, również ten polimorfizm mógłby być potencjalnym czynnikiem wpływającym na podwyższony poziom osoczowy homocysteiny. Dwie kolejne prace autorstwa Wilson i wsp. oraz Brown i wsp. nie potwierdziły korelacji pomiędzy występowaniem polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* z poziomem osoczowym homocysteiny na czczo [27, 215]. Interesujące wydają się natomiast spostrzeżenia autorów dotyczące genotypu 66GG genu *MTRR* będącego ich zdaniem znaczącym czynnikiem ryzyka wczesnie występującej choroby wieńcowej w mechanizmie niezależnym od hiperhomocysteinemii [27]. Inne doniesienie pokazuje korelację pomiędzy genotypem 66GG *MTRR* a zwiększonym ryzykiem wystąpienia wady cewy nerwowej u potomstwa matek, w sytuacji gdy osoczowy poziom witaminy B12 był obniżony [114].

1.8.5. TRANSKOBALAMINA II (TCII, TC2)

Transkobalamina (TCII, TCN2 - *transcobalamin II*) jest β -globuliną należącą do białek transportujących witaminę B12 we krwi i umożliwiającą jej transport do komórki. TCII jest kluczowym czynnikiem dla enzymu syntazy metioninowej, niezbędnym dla jej prawidłowej aktywności, czyli reakcji przekształcania homocysteiny w metioninę. Tak więc zaburzenia wynikające z nieprawidłowego funkcjonowania transkobalaminy II dostarczającej niezbędnego kofaktora dla syntazy metioninowej mogą mieć podobne implikacje jak opisywane wcześniej przy zaburzeniach funkcjonowania MTR.

Gen kodujący transkobalaminę II zbudowany jest z 20 kb, zawiera 9 eksonów i 8 intronów, zlokalizowany jest na chromosomie 22 w miejscu 22q 11.2-qter. Jego produktem jest enzym transkobalamina II zbudowany z 409 aminokwasów o masie cząsteczkowej 45 kD, która jest jedną z trzech znanych globulin wiążących witaminę B12 w surowicy u człowieka [131, 190]. Transkobalamina ma wysokie powinowactwo do witaminy B12, szybko ją wiąże i usuwa z surowicy. Transport witaminy B12 do wnętrza komórki odbywa się na drodze endocytozy zależnej od receptora [131].

1.8.5.1. POLIMORFIZM 776C>G GENU *TCII*

Najczęściej występującym polimorfizmem genu *TCII* jest substytucja cytozyny na guaninę w pozycji 776, opisana przez Namour i wsp. w 1998 roku. Zmiana ta powoduje zamianę aminokwasu argininy na prolinę w pozycji 259 sekwencji białkowej *TCII* [130]. Zmiany w obrębie sekwencji białkowej transkobalaminy II wpływają na zdolność jej wiązania z witaminą B12 lub zaburzają wiązanie kompleksu transkobalamina-witamina B12 do receptora. Mogą mieć również wpływ na dostępność tej witaminy dla przemian wewnątrzkomórkowych. Warianty genetyczne w obrębie genu dla transkobalaminy II mogą też pośrednio, poprzez cykl przemian folianów, wpływać na poziom osoczowej koncentracji homocysteiny oraz ryzyko wystąpienia chorób układu krążenia [61, 190].

Częstość występowania homozygot 776GG tego polimorfizmu jest stosunkowo wysoka, wahając się pomiędzy 3-42% w różnych populacjach [61]. W badaniu Bowen i wsp. częstość występowania allele 259C wynosiła 0,439 w populacji kaukaskiej, 0,558 w azjatyckiej i 0,363 w afrykańskiej ($p=0,002$). Najczęściej wariant ten występował w populacji azjatyckiej, co istotnie statystycznie różniło się od populacji kaukaskiej ($p=0,003$) oraz afrykańskiej ($p=0,006$) [23].

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie badaniami nad genami kandydującymi i ich udziału w rozwoju niektórych powikłań w wielu dyscyplinach medycznych. Wydaje się, że badania nad udziałem genów kandydujących w patofizjologii powikłań położniczych jest jednym z najistotniejszych problemów z tego zakresu.

Cykl przemian folianów jest związany z obecnością wielu kofaktorów, jak również z prawidłową aktywnością, działaniem i stężeniem wielu enzymów uczestniczących w reakcjach biochemicznych. Jedną z ważniejszych jest prawidłowa aktywność enzymów biorących udział w kolejnych reakcjach cyklu folianowego. Z kolei aktywność enzymatyczna jest ściśle uwarunkowana genetycznie, poprzez wpływ wariantów w genach kodujących białka enzymatyczne. Geny kodujące poszczególne enzymy są genami kandydującymi do udziału w zaburzeniach cyklu folianów i w powstawaniu szeregu powikłań u kobiety ciężarnej m. in. hipotrofii płodu.

2. CEL PRACY

Celem pracy była ocena związku polimorfizmów wybranych genów metabolizmu folianów ze wzrostem ryzyka rozwoju hipotrofii płodu.

Cel ten realizowany był poprzez analizę w grupie badanej kobiet z hipotrofią płodu oraz w grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych:

1. danych klinicznych pacjentek z grupy badanej kobiet z hipotrofią płodu oraz grupy kontrolnej zdrowych ciężarnych
2. parametrów urodzeniowych noworodków z grupy badanej i kontrolnej
3. częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmów:
 - 677C>T (A222V), 1298A>C (E429A), 1793G>A (R594Q) genu reduktazy 5,10-metylenotetrahydrofolianu (*MTHFR*)
 - 1958G>A (R653Q), 401G>A (R134K) genu dehydrogenazy metylenotetrahydrofolianu (*MTHFD1*)
 - 2756A>G (D919G) genu syntazy metioniny (*MTR/MS*)
 - 66A>G (I22M) genu reduktazy syntazy metioninowej (*MTRR/MSR*)
 - 776C>G (P259R) genu transkobalaminy II (*TCII, TC2*)
4. częstości występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów genetycznych w zależności od masy urodzeniowej noworodków oraz czasu zakończenia ciąży w grupie badanej
5. częstości współwystępowania genotypów poszczególnych polimorfizmów w obydwu badanych grupach kobiet.

3. MATERIAŁ I METODYKA

3.1. MATERIAŁ

Badanie przeprowadzono w 2 grupach kobiet: 120 pacjentek, które urodziły dziecko z hipotrofią płodu (masa noworodka <2 SD lub <10 percentyla od należnej dla danego wieku ciążowego i płci) oraz w grupie kontrolnej 120 zdrowych ciężarnych, które urodziły noworodka z prawidłową masą ciała. Pacjentki kwalifikowano do badań w obrębie Kliniki Perinatologii i Chorób Kobietych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w obrębie sali porodowej Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego. Badania przeprowadzono od stycznia 2011 do marca 2013 roku. Wszystkie pacjentki były poinformowane o celu i zakresie badań i wyraziły na nie pisemną zgodę. Na przeprowadzenie badań uzyskano również zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu nr 423/11.

3.1.1. CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ

Grupę badaną stanowiło 120 matek noworodków z hipotrofią płodu. Hipotrofię oceniano po urodzeniu dziecka na podstawie jego masy ciała, przyjmując za wyznacznik hipotrofii niedobór masy noworodka poniżej dwukrotnej wartości odchylenia standardowego (<2 SD) lub poniżej 10 percentyla od należnej dla danego wieku ciążowego i płci. Każdorazowo poprawność oceny sprawdzano odnosząc dane dotyczące masy do siatek centylowych opracowanych dla populacji Wielkopolskiej i Lubuskiej [59]. Średnia wieku pacjentek wynosiła $29,3 \pm 5,8$ lat, średni czas zakończenia ciąży $35,0 \pm 3,2$ tc. W grupie badanej znalazło się 67 pierwiastek i 53 wieloródki (tab. 1).

Dane dotyczące wieku ciążowego uzyskano dzięki zastosowaniu reguły Negelego, biorąc pod uwagę datę ostatniej miesiączki, uwzględniając regularność cykli oraz dane uzyskane podczas badania ultrasonograficznego wykonanego w I trymestrze ciąży. U wszystkich pacjentek zanotowano wartości ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego, wzrost, masę ciała przed i pod koniec ciąży, dzięki czemu obliczono przyrost masy ciała w trakcie ciąży oraz przyrost wskaźnika masy ciała (BMI - *body mass index*),

obliczanego według standardowego wzoru ($BMI = \text{masa ciała (kg)}/\text{wzrost}^2(\text{m}^2)$). Odnotowano również sposób zakończenia ciąży, dane dotyczące noworodka, a także dane matki dotyczące wykształcenia i zamieszkania. Analizowano również fakt palenia papierosów przez pacjentki (przed ciążą i w ciąży), spożywanie alkoholu oraz stosowanie (w ciąży oraz wcześniej) preparatów kwasu foliowego, bądź preparatów witamin. Wszystkie pacjentki analizowane były w ciąży pojedynczej. Wszystkie pacjentki należały rasy kaukaskiej, były narodowości polskiej i pochodziły z regionu Wielkopolski.

Kryteria wyłączenia: Pacjentki z tej grupy nie były obciążone poważnymi chorobami ogólnoustrojowymi mogącymi mieć wpływ na proces wzrastania płodu. Z grupy badanej wykluczono matki noworodków z ciężkimi wadami wrodzonymi oraz zespołami genetycznymi mogącymi mieć wpływ na wystąpienie nieprawidłowego wzrastania, a także matki noworodków z ciąż wielopłodowych.

Grupę badaną podzielono na 2 podgrupy w zależności od:

1. tygodnia zakończenia ciąży (68 pacjentek ≥ 37 tc., 52 pacjentki < 37 tc.)
2. masy urodzeniowej noworodka (89 matek noworodków z masą ciała ≥ 1500 g, 31 matek dzieci < 1500 g).

3.1.2. CHARAKTERYSTYKA GRUPY KONTROLNEJ

Grupę kontrolną stanowiło 120 kobiet, które urodziły noworodki bez cech hipotrofii (z masą ciała noworodka > 2 SD lub > 10 percentyla od należnej dla danego wieku ciążowego). Średnia wieku pacjentek wynosiła $30,3 \pm 4,6$ lat, średni czas zakończenia ciąży $39,2 \pm 1,3$ tc. W grupie kontrolnej znalazło się 57 pierwiastek i 63 wieloródki. Wszystkie pacjentki z grupy badanej również należały do rasy kaukaskiej, narodowości polskiej, pochodziły z regionu Wielkopolski. U wszystkich pacjentek z grupy kontrolnej potwierdzono ciążę pojedynczą. W grupie tej nie obserwowano współistniejących poważnych chorób ogólnoustrojowych. Z grupy kontrolnej wykluczono matki noworodków z ciężkimi wadami wrodzonymi oraz zespołami genetycznymi, a także matki noworodków z ciąż wielopłodowych. Również w grupie kontrolnej odnotowano: wiek pacjentek, czas zakończenia ciąży, wartości ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego, przyrost BMI, a także dane socjoekonomiczne (wykształcenie, zamieszkanie) oraz informacje dotyczące stanu urodzeniowego noworodka. Odnotowano również czy pacjentka spożywała kwas foliowy i witaminy, bądź stosowała używki przed i podczas ciąży. Wybrane parametry charakteryzujące grupę kontrolną przedstawia tabela 1.

Tab. 1. Charakterystyka porównawcza kobiet z grupy z hipotrofią płodu i pacjentek z grupy kontrolnej.

	Grupa badana 120	Grupa kontrolna 120	<i>p</i>
Wiek (lata) Średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	29,3 \pm 5,8 29,0 18/44	30,3 \pm 4,6 30,0 16/48	ns
Czas zakończenia ciąży (tydzień) średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	35,0 \pm 3,2 37,0 26/40	39,2 \pm 1,3 39,0 37/42	<0,0001
Pierwiastki Wieloródki	67 (55,8) 53 (44,2)	57 (47,5) 63 (52,5)	ns
RR skurczowe (mmHg) średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	113,9 \pm 12,3 115,0 80/130	108,7 \pm 11,0 110,0 80/130	ns
RR rozkurczowe (mmHg) średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	70,7 \pm 8,2 70,0 50/80	67,0 \pm 8,5 70,0 50/80	ns

3.2. METODYKA

3.2.1. MATERIAŁ BADAWCZY

Celem oznaczenia genotypów i alleli wybranych polimorfizmów biorących udział w przemianie folianów od każdej pacjentki jednorazowo pobrano krew z żyły odłokciowej w trakcie rutynowych badań. Krew pobierano w ilości około 5 ml do probówki S-Movette (Starstedt, Niemcy) zawierającej antykoagulant kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA - *ethylene diamine tetraacetic acid*). Pobrana w ten sposób krew była następnie przechowywana w temperaturze minus 20°C do czasu kolejnego etapu badań, jakim była izolacja DNA. Pacjentki do grupy badanej i kontrolnej zakwalifikowane zostały w Klinice Perinatologii i Chorób Kobięcych UM w Poznaniu oraz w obrębie Sali Porodowej SPZOZ Ginekologiczno-Położniczego Szpitala ul. Polna 33 w Poznaniu. Dalszą analizę prowadzono w Pracowni Biologii Molekularnej w Klinice Perinatologii i Chorób Kobięcych UM w Poznaniu. Z krwi izolowano DNA wykorzystując komercyjny zestaw do izolacji genomowego DNA. Na dalszym etapie badań do oznaczenia wybranych polimorfizmów zastosowano łańcuchową reakcję polimerazy (PCR - *polimerase chain reaction*), a następnie produkty PCR poddawano działaniu enzymów restrykcyjnych, a otrzymane fragmenty elektroforezie na żelu agarozowym (RLFP - *restriction fragment length polymorphism*).

Z próbki krwi pobranej od każdej ciężarnej oznaczono częstość występowania następujących ośmiu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP - *single nucleotide polymorphism*) pięciu genów biorących udział w przemianie folianów:

Reduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolianowa (MTHFR):	677C>T (A222V) 1298A>C (E429A) 1793G>A (R594Q)
Dehydrogenaza metylenotetrahydrofolianowa (MTHFD1):	1958G>A (R653Q), 401G>A (R134K)
Syntaza metioniny (MTR/MS):	2756A>G (D919G)
Reduktaza syntazy metioninowej (MTRR/MSR):	66A>G (I22M)
Transkobalamina II (TCII, TC2):	776C>G (P259R)

Charakterystyka powyżej wymienionych polimorfizmów zawarta została w tabeli 2.

Tab. 2. Charakterystyka polimorfizmów genów biorących udział w przemianie folianów.

<i>Gen</i>	<i>Pozycja genu na chromosomie</i>	<i>Zmiana nukleotydu</i>	<i>Zmiana sekwencji białka</i>	<i>dbSNP</i>
<i>MTHFR</i>	1p36.3	667C>T	A222V	rs1801133
<i>MTHFR</i>	1p36.3	1298A>C	E429A	rs1801131
<i>MTHFR</i>	1p36.3	1793G>A	R594Q	rs2274976
<i>MTHFD1</i>	14q24	1958G>A	R653Q	rs2236225
<i>MTHFD1</i>	14q24	401G>A	R134K	rs1950902
<i>MTR (MS)</i>	1q43	2756A>G	D919G	rs1805087
<i>MTRR (MSR)</i>	5p15.31	66A>G	I22M	rs1801394
<i>TCII (TC2)</i>	22q12.2	776C>G	R259P	rs1801198

3.2.2. ANALIZA GENETYCZNA

3.2.2.1. IZOLACJA DNA

DNA do badań molekularnych izolowano z leukocytów krwi obwodowej. Do izolacji DNA użyto zestawu komercyjnego QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN inc., Niemcy). Do izolacji materiału genetycznego wykorzystywano krew pacjentki w ilości ok. 5 ml pobranej do probówek z EDTA (zastosowany jako antykoagulant). W początkowym etapie celem rozbicia błony komórkowej leukocytów i uwolnienia DNA do próbki krwi dodawano enzym proteinazę K w ilości 20 ul oraz 200 ul buforu do lizy (oznaczonego przez firmę symbolem AL). Całość poddawano następnie działaniu temperatury 56°C przez 10 minut, a następnie przenoszono do kolumny zawierającej żel krzemionkowy i wirowano z prędkością 8000 obrotów na minutę (rpm). Następnie kolumnę przenoszono do nowej probówki, odrzucając powstały przesącz. Dalsze działania polegające na dwukrotnym przemyciu z zastosowaniem 500 µl buforów oznaczonych przez firmę jako A1 i A2 oraz dwukrotnym odwirowaniu (1 minutę 8000 obrotów/min oraz 3 minuty 14000 obrotów/min) miały na celu oczyszczenie uzyskanego DNA. Ostatecznie po nałożeniu na kolumnę 200 µl

buforu do elucji (bufor AE), pięciominutowej inkubacji w temperaturze pokojowej i odwirowaniu w 8000 obrotów/min otrzymywano oczyszczone DNA, które poddawano dalszej analizie genetycznej.

3.2.2.2. OZNACZANIE JAKOŚCI I STĘŻENIA PREPARATÓW DNA

Kolejnym istotnym krokiem przed przystąpieniem do analizy genetycznej była weryfikacja jakości i stężenia otrzymanego DNA z zastosowaniem metody spektrofotometrycznej oraz elektroforezy na żelu agarozowym. Jakość preparatu jak również stężenie DNA w preparacie mogą podlegać ocenie za pomocą pomiaru absorbancji (A) przy długościach fali 260 nm oraz 280 nm, a następnie wyznaczeniu współczynnika gęstości optycznej (OD - *optical density*) A_{260}/A_{280} . Preparat DNA wolny od domieszek, jakimi są najczęściej białka, posiada współczynnik A_{260}/A_{280} w przedziale wartości 1,8-2,0. W przypadku gdy otrzymywano współczynnik wykraczający poza te granice, ponownie izolowano DNA. Do weryfikacji jakości DNA znalazła zastosowanie także zasada, twierdząca iż dobrej jakości genomowy DNA po elektroforezie na 0,8% żelu agarozowym widoczny jest w postaci pojedynczego prążka.

Celem określenia stężenia otrzymanego preparatu DNA mierzono jego absorbancję przy długości fali 260 nm i przyjmując za Słomskim i wsp. że stężenie wynosi 50 µg/ml jeśli absorbancja A_{260} wynosi 1 [176]. W ten sposób można obliczyć stężenie DNA korzystając ze wzoru:

$$\text{Stężenie DNA} = \text{absorbancja przy 260 nm} \times \text{rozcieńczenie} \times 50$$

Kolejnym krokiem po ocenie ilościowej, było poddanie wyizolowanej, właściwie oczyszczonej matrycy dalszej analizie metodą PCR/RFLP celem oznaczenia genotypów.

3.2.2.3. ANALIZA DŁUGOŚCI FRAGMENTÓW RESTRYKCYJNYCH

Metoda PCR/RFLP polega na amplifikacji fragmentu, w obrębie którego występuje miejsce wiążące enzym restrykcyjny (tzw. miejsce restrykcyjne) za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), a następnie poddanie produktu PCR działaniu enzymu. W rezultacie powstają mniejsze odcinki, które następnie mogą być rozdzielane na żelu agarozowym metodą elektroforezy. Metoda ta znajduje zastosowanie do identyfikacji

punktowych mutacji, jakimi były w tym przypadku badane polimorfizmy genów biorących udział w przemianie folianów.

Reakcja PCR polega na powieleniu wybranego fragmentu o znanych sekwencjach początkowej i końcowej, przez enzym polimerazę, co stanowiło kolejny etap pracy. W tym celu do mieszaniny zawierającej wyizolowany i oczyszczony DNA stanowiący matrycę dodawano następujące składniki:

1. startery komplementarne do końców 3' i 5' odcinka DNA, który ma zostać powielony dezoksynukleotydy (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
2. enzym termostabilną polimerazę, która z wykorzystaniem wolnych dezoksynukleotydów z mieszaniny dokonuje syntezy fragmentu wyznaczonego przez przyłączone startery
3. bufor zapewniający optymalne dla danego enzymu środowisko reakcji.

Synteza określonego fragmentu zachodzi w wyniku powtarzających się cykli reakcji zachodzących w różnej temperaturze, na które składają się trzy etapy:

Etap pierwszy - denaturacja

Na tym etapie dochodzi do rozplecenia podwójnie zwiniętej helisy DNA w rezultacie poddania jej działaniu temperatury 90-95°C. W efekcie powstają dwie pojedyncze nici, które mogą stanowić wzór do syntezy wybranych fragmentów zawierających badany gen.

Etap drugi - hybrydyzacja starterów (annealing)

Podczas tego etapu dochodzi do związania starterów z odcinkami początkowym i końcowym matrycy, wyznaczającymi dany fragment, który ma ulec powieleniu. Reakcja ta zachodzi w temperaturze, która jest swoista dla danych starterów (40-65°C), lecz zawsze niższa niż na etapie denaturacji.

Etap trzeci - wydłużanie starterów (elongacja)

Temperatura reakcji na tym etapie jest uzależniona od danej polimerazy i zapewnia jej optymalną wydajność w powielaniu określonego odcinka rozpoczynając od startera początkowego. Dla większości znanych polimeraz temperatura ta wynosi 72°C. Do utworzenia nowego fragmentu jako elementy budulcowe wykorzystywane są dezoksynukleotydy z mieszaniny. Czas reakcji wynosi 30 sekund.

Cykl powtarza się od 15 do 40 razy, uzyskując właściwe namnożenie pożądanego odcinka, którego ilość narasta w mieszaninie wykładniczo, dzięki możliwości wykorzystywania jako matrycy również nowo powstałych fragmentów. W pracy do przeprowadzenia reakcji PCR zastosowano termocykler Dyad DNA Engine (BioRad, USA).

Uzyskane na tym etapie pracy fragmenty zawierające dany polimorfizm badanego

geny były następnie poddane działaniu enzymów restrykcyjnych, które przecinają wiązania diestrowe nici DNA w ściśle określonych swoistych dla nich punktach, nazywanych miejscem restrykcyjnym. Różnice w długości otrzymywanych fragmentów uzależniona jest od obecności mutacji, które tworzą bądź eliminują miejsce rozpoznawane przez enzym. Uzyskane w ten sposób docelowe odcinki poddawano elektroforezie na 2-3% żelach agarozowych. Po wybarwieniu bromkiem etydyny i wizualizacji w świetle UV pozwoliło to na zobrazowanie otrzymanych fragmentów w postaci prążków, układ których uzależniony jest od wielkości fragmentu. Badanie to umożliwiło określenie genotypu pacjentek pod względem badanych genów biorących udział w metabolizmie folianów.

3.2.2.4. POLIMORFIZM 677C>T (A222V) GENU *MTHFR*

Celem oceny genotypów w zakresie polimorfizmu 677C>T (A222V) genu *MTHFR* podczas reakcji PCR zastosowano startery : 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' oraz 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3' (TibMolbiol, Niemcy). Skład mieszaniny jak również warunki reakcji PCR, którą przeprowadzono z zastosowaniem termocyklera Dyad DNA Engine (BioRad, Stany Zjednoczone), przedstawiono w tabelach 3 oraz 4. W rezultacie otrzymano produkt wielkości 198 pz, który poddano działaniu endonukleazy *HinfI* (Eurx, Polska) oraz inkubacji przez 16 godzin w temperaturze 37°C w cieplarni (Memmert, Niemcy). Uzyskano następujące fragmenty DNA o wielkości 198, 175 oraz 23 pz, które w wyniku elektroforezy na 2% żelu agarozowym pozwoliły uzyskać trzy genotypy: homozygota typu dzikiego 677CC 198 pz, heterozygota 677CT 198, 175, 23 pz oraz heterozygota zmutowana 677TT 175, 23 pz.

3.2.2.5. POLIMORFIZM 1298A>C (E429A) GENU *MTHFR*

Polimorfizm 1298A>C (E429A) genu *MTHFR* identyfikowano po amplifikacji metodą PCR przy użyciu starterów: 5'-CTT CTA CCT GAA GAG CAA GTC-3' oraz 5'-CAT GTC CAC AGC ATG GAG-3' (TibMolbiol, Niemcy). Skład mieszaniny oraz warunki reakcji przedstawiono w tabeli 3 oraz 4. Uzyskany produkt o wielkości 256 pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego *MboII* (Fermentas, Litwa) i inkubowano w 37°C przez 16 godzin. Po procesie elektroforezy odczytywano następujące genotypy: homozygota niezmutowana 1298AA 176, 30, 28, 22 pz, heterozygota 1298AC 204, 30, 28, 22 pz, homozygota zmutowana 1298CC 204, 30, 22 pz.

3.2.2.6. POLIMORFIZM 1793G>A (R594Q) GENU *MTHFR*

Ostatni z polimorfizmów w obrębie genu *MTHFR* badano w wyniku przecięcia przez endonukleazę *MbiI* (*BsrBI*) (Fermentas, Litwa) w obrębie miejsc restrykcyjnych produktu PCR wielkości 310 pz. Startery użyte do reakcji PCR: 5'-CTC TGT GTG TGT GTG CAT GTG TGC G-3' oraz 5'-GGG ACA GGA GTG GCT CCA ACG CAG G-3' (TibMolbiol, Niemcy). Warunki dla tej reakcji, podobnie jak dla pozostałych polimorfizmów, przedstawiono w tabelach 3 oraz 4. Uzyskano genotyp homozygotyczny „dziki” *1793GG* na który składały się dwa odcinki o wielkości 77 i 233 pz, które uwidoczniono po elektroforezie na żelu agarozowym i wybarwieniu bromkiem etydyny. Heterozygoty *1793GA* prezentowały się w postaci trzech prążków odpowiadających fragmentom 310, 233 i 77 pz. Genotyp zmutowany *1793AA* nie wykazywał miejsca restrykcyjnego, stąd nie podlegał hydrolizie przez enzym restrykcyjny.

3.2.2.7. POLIMORFIZM 1958G>A (R653Q) GENU *MTHFDI*

Polimorfizm ten wykrywano za pomocą amplifikacji metodą PCR przy użyciu następujących starterów: 5'-CAC TCC AGT GTT TGT CCA TG-3' i 5'-GCA TCT TGA GAG CCC TGA C-3' (TibMolbiol, Niemcy). Otrzymany produkt o wielkości 330 pz poddawano trawieniu enzymem restrykcyjnym *MspI* (Fermentas, Litwa) przez 16 godzin w temp 37°C. Otrzymano następujące genotypy: homozygota *1958GG* 196, 70, 56 i 8 pz heterozygota *1958GA* 266, 196, 70, 56 i 8 pz oraz homozygota zmutowana *1958AA* 266, 56 i 8 pz.

3.2.2.8. POLIMORFIZM 401G>A (R134K) GENU *MTHFDI*

Celem amplifikacji fragmentu zawierającego miejsce polimorficzne *401G>A (R134K)* zastosowano startery: 5'-TGC ATG CTT TCA TTT ATA ATA TGT TT-3' oraz 5'-AAT GAA ACA GTC ATT GAG GTC AC-3' (TibMolbiol, Niemcy). Produkt tej reakcji wielkości 172 pz poddawano działaniu temperatury 37°C przez 16 godzin, aby umożliwić działanie endonukleazy *BsmAI* (*Alw26I*) (Fermentas, Litwa). Genotyp homozygotyczny zmutowany *401AA* w wyniku zamiany argininy na lizynę, traci miejsce restrykcyjne i nie ulega działaniu enzymu. Genotyp homozygotyczny „dziki” *401GG* stanowiły dwa fragmenty, powstałych w wyniku przecięcia pierwotnego produktu reakcji PCR, o wielkości 130 oraz 42 pz. Homozygota niezmutowana *401GA* dzięki obecności dwóch miejsc restrykcyjnych, po wybarwieniu i elektroforezie uwidoczniona została jako trzy fragmenty 172, 130 i 42 pz.

3.2.2.9. POLIMORFIZM 2756A>G (D919G) GENU *MTR/MS*

Polimorfizm ten oceniano przy użyciu starterów: 5'-TGT TCC CAG CTG TTA GAT GAA AAT C-3' oraz 5'-GAT CCA AAG CCT TTT ACA CTC CTC-3' (TibMolbiol, Niemcy), otrzymując odcinek o wielkości 211pz. Po trawieniu enzymem restrykcyjnym *BsuRI* (Fermentas, Litwa) możliwe było uzyskanie kilku fragmentów: dla obecności genotypu homozygotycznego zmutowanego 2756GG 131 i 80 pz, dla obecności genotypu heterozygotycznego 2756AG 211, 131 oraz 80 pz. Niezmutowany genotyp 2756AA nie podlegał trawieniu przez endonukleazę.

3.2.2.10. POLIMORFIZM 66A>G (I22M) GENU *MTRR*

Podczas analizy genotypów w zakresie polimorfizmu 66A>G (*I22M*) genu *MTRR* zastosowano następujące startery: 5'-CAA AGG CCA TCG CAG AAG ACA T-3', 5'-CCC AAC CAA AAT TCT TCA AAG CA-3' (TibMolBiol, Niemcy) w warunkach przedstawionych w tabeli 3. Uzyskany fragment poddano działaniu endonukleazy *NdeI* (Fermentas, Litwa), co pozwoliło uzyskać następujące genotypy w zakresie polimorfizmu 66A>G (*I22M*) genu *MTRR*: homozygota niezmutowana 66AA 121, 21 pz, heterozygota 66AG 142, 121, 21 pz oraz homozygota zmutowana 66GG 142 pz.

3.2.2.11. POLIMORFIZM 776C>G (P259R) GENU *TCII*

Do oznaczania polimorfizmu 776C>G genu *TCII* zastosowano startery: 5'-GTC AGG TGC TGG AAC ACC TAG-3' oraz 5'-TAG GTC TTG TGG TTC AGA ACG-3' (TibMolbiol, Niemcy). Startery te zastosowano do przeprowadzenia reakcji PCR (warunki podano w tabelach 3 oraz 4) celem uzyskania produktu o wielkości 220 pz. Mutacja punktowa 776C>G powodowała oporność homozygoty zmutowanej 776GG na hydrolizę enzymem restrykcyjnym *MvaI* (Fermentas, Litwa). Heterozygota 776CG w wyniku trawienia poprzez endonukleazę pozwalała uzyskać trzy fragmenty 220, 126 i 94 pz uwidocznione dzięki elektroforezie i wybarwieniu bromkiem etydydy, dla genotypu homozygotycznego typu dzikiego 776CC uzyskiwano fragmenty o wielkości 126 i 94 pz.

Skład mieszaniny w reakcji PCR oraz warunki dla poszczególnych etapów reakcji PCR przedstawiono w tabeli 3 oraz 4.

Tab. 3. Skład mieszaniny w reakcji PCR.

<i>Składnik (stężenie wyjściowe)</i>									
	<i>DNA</i> [μl]	<i>Woda</i> [μl]	<i>Bufor</i> <i>PCR</i> [10x]	<i>MgCl₂</i> [25 mM]	<i>dNTP</i> [2,5 mM]	<i>Starter F</i> [50 pmol/ μl]	<i>Starter R</i> [50 pmol/μl]	<i>Polimeraza</i> [5U/ μl]	<i>Objętość</i> <i>końcowa</i>
<i>Polimorfizm</i>									
<i>667C>T</i>	2	16,0	2,5	1,5	2	0,4	0,4	0,2	25
<i>1298A>C</i>	2	15,0	2,5	2,5	2	0,4	0,4	0,2	25
<i>1793G>A</i>	2	15,0	2,5	2,5	2	0,4	0,4	0,2	25
<i>1958G>A</i>	2	16,0	2,5	1,5	2	0,4	0,4	0,2	25
<i>401G>A</i>	2	15,0	2,5	2,5	2	0,4	0,4	0,2	25
<i>2756A>G</i>	2	15,0	2,5	2,5	2	0,4	0,4	0,2	25
<i>66A>G</i>	2	15,0	2,5	2,5	2	0,4	0,4	0,2	25
<i>776C>G</i>	2	15,0	2,5	2,5	2	0,4	0,4	0,2	25

Tab. 4. Warunki dla poszczególnych etapów reakcji PCR.

<i>Polimorfizm</i>	<i>Denaturacja wstępna</i>		<i>Denaturacja</i>		<i>Wiązanie starterów</i>		<i>Synteza</i>		<i>Synteza końcowa</i>		<i>Ilość cykli</i>
	<i>temp [°C].</i>	<i>czas [sek.]</i>	<i>temp [°C]</i>	<i>czas [sek.]</i>	<i>temp [°C]</i>	<i>czas [sek.]</i>	<i>temp [°C]</i>	<i>czas [sek.]</i>	<i>temp [°C]</i>	<i>czas [sek.]</i>	
<i>667C>T</i>	95	240	95	30	65	30	72	60	72	600	30
<i>1298A>C</i>	95	240	95	30	61	30	72	60	72	600	30
<i>1793G>A</i>	95	240	95	30	69	30	72	60	72	600	30
<i>1958G>A</i>	95	240	95	30	63	30	72	60	72	600	30
<i>401G>A</i>	95	240	95	30	53	30	72	60	72	600	30
<i>2756A>G</i>	95	240	95	30	61	30	72	60	72	600	30
<i>66A>G</i>	95	240	95	30	61	30	72	60	72	600	30
<i>776C>G</i>	95	240	95	30	61	30	72	60	72	600	30

3.3. ANALIZA STATYSTYCZNA

Do analizy statystycznej otrzymanych w rozprawie wyników częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli analizowanych polimorfizmów genetycznych zastosowano program statystyczny SPSS 17.0 PL dla Windows.

W prezentowanej pracy dane kliniczne i laboratoryjne podsumowywano z zastosowaniem średnich arytmetycznych (suma wszystkich wartości dzielonych przez ich liczbę), odchylenia standardowego (\pm SD) (miara rozproszenia wartości indywidualnych wokół średniej próby), mediany (miara tendencji centralnych i obrazu rozkładu zmiennych porządkowych), zakresu wyników ze wskazaniem wartości minimalnej oraz maksymalnej. Wszystkie dane kliniczne, laboratoryjne oraz częstość występowania poszczególnych genotypów danych polimorfizmów dla wszystkich pacjentek gromadzone były w Edytorze Danych SPSS 17.0 PL.

Przeprowadzono również porównanie wartości średnich pomiędzy poszczególnymi badanymi grupami i wydzielonymi podgrupami kobiet, w tym celu zastosowano test U-Manna-Whitney'a oraz test ANOVA.

W analizie genetycznej najpierw arytmetycznie obliczano procentową częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów w poszczególnych grupach kobiet. Następnie wartości obserwowane w grupach kobiet porównywano do wartości oczekiwanych, które obliczano z zastosowaniem prawa Hardy-Weinberga, (obliczenia z częstości występowania alleli badanego polimorfizmu w danej grupie kobiet). Prawo to przedstawiane jest następującym równaniem:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

gdzie litery p oraz q oznaczają częstość występowania poszczególnych alleli danego genu.

W analizie statystycznej dotyczącej części genetycznej przy porównywaniu częstości występowania genotypów i alleli pomiędzy grupami i podgrupami kobiet obliczano współczynnik ryzyka (WR – współczynnik ryzyka, iloraz szans, odds ratio). Otrzymane wyniki przedstawiano łącznie z 95% przedziałem ufności (PU) dla obliczenia częstości genotypów i alleli (95% PU obliczano za pomocą programu Clinical Trials Design Program wersja 1.0). Rozkład genotypów w analizowanych grupach pacjentek porównywano testem chi-kwadrat z poprawką Fishera. Dla oznaczenia wzajemnych korelacji badanych genotypów i alleli badanych polimorfizmów genetycznych porównywano je obliczając współczynnik korelacji Pearsona oraz testem chi-kwadrat. Za wartość znamienne statystyczną uznawano wartość p mniejszą od 0,05.

4. WYNIKI

4.1. CHARAKTERYSTYKA PORÓWNAWCZA BADANYCH GRUP PACJENTEK

W pracy analizowano dane uzyskane od 120 matek noworodków z hipotrofią płodu oraz 120 matek noworodków z prawidłową masą ciała. Wiek badanych pacjentek z obydwu grup nie różnił się istotnie ($29,3 \pm 5,8$ vs. $30,3 \pm 4,6$ lat, $p=0,14$). W grupie badanej zaobserwowano przewagę pierwiastek ($55,8$ vs. $44,2\%$, $p=0,25$), a w grupie kontrolnej wieloródek ($52,5$ vs. $47,5\%$, $p=0,25$). Średni czas zakończenia ciąży był istotnie statystycznie niższy w grupie badanej i wynosił $35,0 \pm 3,2$ tc. w porównaniu do grupy kontrolnej: $39,2 \pm 1,3$ tc. ($p < 0,0001$). Wartości średnie ciśnienia skurczowego w grupie badanej nie różniły się istotnie statystycznie w porównaniu do grupy kontrolnej ($113,9 \pm 12,3$ vs. $108,7 \pm 11,0$ mmHg, *ns*), podobnie jak wartości ciśnienia rozkurczowego ($70,7 \pm 8,2$ vs. $67,0 \pm 8,5$ mmHg, *ns*). U pacjentek z obydwu grup odnotowano porównywalny wzrost oraz masę ciała przed ciążą. Również przyrost masy ciała podczas ciąży oraz przyrost BMI nie różnił się istotnie w obu grupach. W grupie z hipotrofią masa ciała w ciąży, jak i jej przyrost ($12,0$ vs. $14,8$ w grupie kontrolnej, $p < 0,0001$), wyrażony również jako przyrost BMI ($4,4$ vs. $5,3$ w grupie kontrolnej, *ns*) były mniejsze niż w grupie kontrolnej. W grupie z hipotrofią płodu zanotowano statystycznie istotny wyższy odsetek porodów ukończonych drogą cięcia cesarskiego w porównaniu z grupą kontrolną ($54,2$ vs. $14,2\%$, $p < 0,0001$). W grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych zaobserwowano aż $80,8\%$ porodów siłami natury (w grupie badanej tylko $43,3\%$, $p < 0,0001$).

W dalszej kolejności w obydwu grupach porównano parametry socjoekonomiczne, takie jak wykształcenie oraz miejsce zamieszkania pacjentek, a także stosowanie używek przed i w trakcie ciąży. Analiza wykazała, że w grupie badanej z hipotrofią więcej pacjentek posiadało wykształcenie średnie ($40,0$ vs. $34,2\%$ w grupie kontrolnej) i podstawowe ($23,3$ vs. $2,5\%$ w grupie kontrolnej), natomiast w grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych przewagę stanowiło wykształcenie wyższe ($63,3$ vs. $36,7\%$ w grupie badanej), co stanowiło statystycznie istotną różnicę ($p < 0,0001$). W grupie kontrolnej więcej kobiet mieszkało w dużym mieście w porównaniu do grupy badanej z hipotrofią płodu ($54,2$ vs. $43,3\%$, *ns*). Większość pacjentek z obydwu grup podawała, że nie paliła papierosów zarówno przed, jak i w trakcie ciąży, jednak w grupie z hipotrofią płodu odsetek kobiet palących był większy, zwłaszcza w ciąży - paliło 12 kobiet ($10,0\%$) z grupy badanej, a tylko 6 ($5,0\%$) z grupy kontrolnej. Żadna z pacjentek nie podawała spożywania alkoholu i zażywania narkotyków w trakcie ciąży, dlatego parametry te

zostały pominięte w charakterystyce porównawczej. Ciekawą obserwacją było uzyskanie wyższego odsetka narażenia na czynniki szkodliwe w trakcie ciąży, co dotyczyło głównie środków chemicznych (amoniak, chloramfenikol, środki czyszczące) oraz chorób zakaźnych (z grupy zakażeń wirusowych górnych dróg oddechowych) w grupie kontrolnej w porównaniu z grupą badaną (14,2 vs. 5,0% pacjentek, $p=0,03$).

Kolejnym analizowanym parametrem było porównanie stosowania preparatów witamin w ciąży oraz kwasu foliowego przed i w trakcie ciąży. Analiza wykazała, że stosowanie kwasu foliowego przed ciążą było statystycznie wyższe w grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych (59,2 vs. 36,7%, $p=0,007$), nie stosowało kwasu foliowego 40,8% pacjentek z grupy kontrolnej i 63,3% z grupy badanej ($p=0,007$). Natomiast w trakcie ciąży odwrotnie, w grupie badanej kwas foliowy stosowało więcej pacjentek niż w grupie kontrolnej (87,5% vs. 74,2%, $p=0,013$), choć w obydwu grupach pacjentki zażywające ten preparat były w liczebnej przewadze. W obu grupach większość kobiet stosowała witaminy w trakcie ciąży, jednak w grupie kontrolnej nieco częściej niż w grupie badanej (95,8% vs. 90,8 %, *ns*). Wybrane parametry analizowane w obydwu grupach przedstawia tabela 5.

Tab. 5. Charakterystyka porównawcza kobiet z grupy z hipotrofią płodu oraz z grupy kontrolnej.

	Grupa badana Hipotrofia płodu	Grupa kontrolna	<i>p</i>
Liczebność grupy (n)	120	120	
Wiek (lata) Średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	29,3 \pm 5,8 29,0 18/44	30,3 \pm 4,6 30,0 16/48	ns
Czas zakończenia ciąży (tydzień) średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	35,0 \pm 3,2 37,0 26/40	39,2 \pm 1,3 39,0 37/42	<0,0001
Pierwiastki (%) Wieloródki (%)	67 (55,8) 53 (44,2)	57 (47,5) 63 (52,5)	ns
RR skurczowe (mmHg) średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	113,9 \pm 12,3 115,0 80/130	108,7 \pm 11,0 110,0 80/130	ns
RR rozkurczowe (mmHg) średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	70,7 \pm 8,2 70,0 50/80	67,0 \pm 8,5 70,0 50/80	ns
Wzrost (cm) średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	164,7 \pm 6,8 165,0 140/178	167,2 \pm 5,6 168,0 155/180	ns
Masa ciała przed ciążą (kg)			ns

średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	59,2 \pm 11,7 57,0 35/111	61,0 \pm 8,7 60,0 44/95	
Masa ciała w ciąży (kg) średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	71,2 \pm 13,5 69,0 40/121	75,7 \pm 9,9 75,0 54/110	ns
Przyrost masy ciała w ciąży (kg) średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	12,0 \pm 5,6 12,0 0/34	14,8 \pm 5,0 14,5 1/34	ns
BMI przed ciążą średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	21,8 \pm 4,2 20,6 15,6/40,8	21,8 \pm 2,9 21,2 17,3/31,9	ns
BMI w ciąży średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	26,3 \pm 4,9 25,2 17,8/43,9	27,1 \pm 3,4 27,1 20,4/37,6	ns
Przyrost BMI średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	4,4 \pm 2,1 4,5 0,0/12,6	5,3 \pm 1,9 5,2 0,3/12,6	ns
Sposób ukończenia ciąży (%) poród samoistny cięcie cesarskie inne operacyjne	52 (43,3) 65 (54,2) 3 (2,5)	97 (80,8) 17 (14,2) 6 (5,0)	<0,0001
Palenie papierosów przed ciążą (%) tak nie	36 (30,0) 84 (70,0)	26 (21,7) 94 (78,3)	ns
Palenie papierosów w ciąży (%) tak nie	12 (10,0) 108 (90,0)	6 (5,0) 114 (95,0)	ns
Kwas foliowy przed ciążą (%) tak nie	44 (36,7) 76 (63,3)	71 (59,2) 49 (40,8)	0,0007
Kwas foliowy w ciąży (%) tak nie	105 (87,5) 15 (12,5)	89 (74,2) 31 (25,8)	0,013
Witaminy w ciąży (%) tak nie	109 (90,8) 11 (9,2)	115 (95,8) 5 (4,2)	ns
Narażenie na czynniki szkodliwe (%) tak nie	6 (5,0) 114 (95,0)	17 (14,2) 103 (85,8)	0,03
Wykształcenie (%) wyższe średnie podstawowe	44 (36,7) 48 (40,0) 28 (23,3)	76 (63,3) 41 (34,2) 3 (2,5)	< 0,0001
Zamieszkanie (%) duże miasto małe miasto wieś	52 (43,3) 42 (35,0) 26 (21,7)	65 (54,2) 34 (28,3) 21 (17,5)	ns

4.2. PODZIAŁ GRUPY BADANEJ

W analizie i opisie wyników pracy zastosowano dwa podziały grupy badanej:

1. Pierwszy podział powstał w zależności od tygodnia zakończenia ciąży (grupa I - 68 kobiet, w której poród odbył się $\geq 37+0$ tc. oraz grupa II - 52 kobiet, które urodziły $< 36+6$ tc.). Średni czas zakończenia ciąży w I grupie wynosił $38,3 \pm 1,01$ tc., natomiast w grupie II $33,1 \pm 2,8$ tc. ($p < 0,0001$). Średni wiek pacjentek, wzrost i masa ciała nie różniły się istotnie w obu grupach. Wartości średnie ciśnienia skurczowego, jak i wartości ciśnienia rozkurczowego nie różniły się istotnie statystycznie w grupie pacjentek, które urodziły przed 37 tc. oraz po 37 tc. (ciśnienie skurczowe: $111,6 \pm 12,3$ vs. $116,8 \pm 11,7$ mmHg, *ns*; ciśnienie rozkurczowe: $70,1 \pm 8,4$ vs. $71,6 \pm 7,9$ mmHg, *ns*). Nie stwierdzono istotnych różnic dotyczących masy ciała, BMI oraz ich przyrostów w trakcie ciąży. W obu grupach większy odsetek stanowiły pierwiastki, choć różnica ta była bardziej zauważalna w grupie pacjentek, które urodziły $\geq 37+0$ tc. ($58,8$ vs. $41,2\%$, $p=0,46$) w porównaniu z drugą grupą ($51,9$ vs. $48,1\%$, $p=0,46$). Analizowane grupy różniły się natomiast między sobą istotnie pod względem sposobu ukończenia ciąży. W grupie I dominował poród samoistny ($54,4$ vs. $42,7\%$, $p=0,008$), natomiast w grupie II najczęstszym sposobem ukończenia ciąży było cięcie cesarskie ($69,2$ vs. $28,9\%$, $p=0,008$). Poród operacyjny drogą pochwową odbyły dwie pacjentki z grupy I oraz jedna z grupy II. W grupie II nieco więcej pacjentek paliło papierosy przed ciążą ($32,7$ vs. $29,4\%$, $p=0,84$), a w grupie I w trakcie ciąży ($13,2$ vs. $7,7\%$, $p=0,39$). W grupie I - 4 pacjentki podawały narażenie na działanie szkodliwych czynników, a tylko 2 z grupy II ($p=0,69$). Więcej kobiet z grupy I zażywało kwas foliowy, zarówno przed ($38,2$ vs. $30,8\%$, $p=0,44$) jak i w trakcie ciąży ($88,2$ vs. $86,5\%$, $p=0,10$), natomiast w grupie II więcej pacjentek stosowało preparaty witaminy w ciąży ($94,2$ vs. $89,7\%$, $p=0,51$), różnica jednak nie była istotna statystycznie. Analiza danych socjoekonomicznych wykazała istotną statystycznie przewagę pacjentek z wykształceniem wyższym w grupie I ($47,0$ vs. $25,0\%$, $p=0,04$), natomiast z wykształceniem średnim ($50,0$ vs. $32,4\%$, $p=0,04$) oraz podstawowym ($25,0$ vs. $20,6\%$, $p=0,05$) w grupie II. Więcej pacjentek, które urodziły $\geq 37+0$ tc. zamieszkiwało duże miasto ($52,9$ vs. $30,8\%$, $p=0,05$), w porównaniu z pacjentkami z porodem $< 36+6$ tc., które częściej zamieszkiwały małe miasto ($42,3$ vs. $29,4\%$, $p=0,05$). Najmniej pacjentek z obu grup mieszkało na wsi, jednak statystycznie częściej ciężarne z grupy II niż I ($26,9$ vs. $17,7\%$, $p=0,05$) (tab. 6).

Tab. 6. Podział pacjentek z grupy badanej w zależności od tygodnia zakończenia ciąży (poród $\geq 37+0$ tc oraz poród $< 36+6$ tc).

	Grupa badana – hipotrofia płodu		p
	Poród $\geq 37+0$ tc	Poród $< 36+6$ tc	
Liczebność grupy (n)	68	52	
Wiek (lata)			
średnia (\pm SD)	30,0 \pm 5,4	28,4 \pm 6,1	ns
mediana	30,0	28,0	
minimum/maksimum	18/44	18/42	
Czas zakończenia ciąży (tc)			
średnia (\pm SD)	38,3 \pm 1,1	33,1 \pm 2,8	<0,0001
mediana	38,0	34,0	
minimum/maksimum	37/40	26/36	
Pierwiastki (%)	40 (58,8)	27 (51,9)	ns
Wieloródki (%)	28 (41,2)	25 (48,1)	
RR skurczowe (mmHg)			
średnia (\pm SD)	111,6 \pm 12,3	116,8 \pm 11,7	ns
mediana	110,0	120,0	
minimum/maksimum	90/130	90/130	
RR rozkurczowe (mmHg)			
średnia (\pm SD)	70,1 \pm 8,4	71,6 \pm 7,9	ns
mediana	70,0	70,0	
minimum/maksimum	50/80	60/80	
Wzrost (cm)			
średnia (\pm SD)	164,6 \pm 6,5	164,8 \pm 7,2	ns
mediana	164,5	165,0	
minimum/maksimum	150/178	140/178	
Masa ciała przed ciążą (kg)			
średnia (\pm SD)	57,7 \pm 11,6	61,3 \pm 11,7	ns
mediana	56,5	59,5	
minimum/maksimum	35/111	45/95	
Masa ciała w ciąży (kg)			
średnia (\pm SD)	70,3 \pm 12,7	72,3 \pm 14,5	ns
mediana	69,0	69,5	
minimum/maksimum	40/114	49/121	
Przyrost masy ciała w ciąży (kg)			
średnia (\pm SD)	12,7 \pm 5,1	11,0 \pm 6,2	ns
mediana	12,5	9,5	
minimum/maksimum	2/30	0/34	
BMI przed ciążą			
średnia (\pm SD)	21,3 \pm 4,1	22,6 \pm 4,3	ns
mediana	20,2	21,7	
minimum/maksimum	15,6/40,8	17,2/34,5	
BMI w ciąży			
średnia (\pm SD)	26,0 \pm 4,6	26,7 \pm 5,4	ns
mediana	24,7	25,2	
minimum/maksimum	17,8/41,9	18,5/43,9	

Przyrost BMI średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	4,7 \pm 1,9 4,7 0,7/10,6	4,1 \pm 2,3 3,9 0/12,6	ns
Sposób ukończenia ciąży (%) poród samoistny cięcie cesarskie inne operacyjne	37 (54,4) 29 (42,7) 2 (2,9)	15 (28,9) 36 (69,2) 1 (1,9)	0,008
Palenie papierosów przed ciążą (%) tak nie	20 (29,4) 48 (70,6)	17 (32,7) 35 (67,3)	ns
Palenie papierosów w ciąży (%) tak nie	9 (13,2) 59 (86,8)	4 (7,7) 48 (92,3)	ns
Kwas foliowy przed ciążą (%) tak nie	26 (38,2) 42 (61,8)	16 (30,8) 36 (69,2)	ns
Kwas foliowy w ciąży (%) tak nie	60 (88,2) 8 (11,8)	45 (86,5) 7 (13,5)	ns
Witaminy w ciąży (%) tak nie	61 (89,7) 7 (10,3)	49 (94,2) 3 (5,8)	ns
Narażenie na czynniki szkodliwe (%) tak nie	4 (5,9) 64 (94,1)	2 (3,8) 50 (96,2)	ns
Wykształcenie (%) wyższe średnie podstawowe	32 (47,0) 22 (32,4) 14 (20,6)	13 (25,0) 26 (50,0) 13 (25,0)	0,04
Zamieszkanie (%) duże miasto małe miasto wieś	36 (52,9) 20 (29,4) 12 (17,7)	16 (30,8) 22 (42,3) 14 (26,9)	0,05

2. Drugi podział powstał w oparciu o masę urodzeniową noworodka (grupa I - 89 matek noworodków z urodzeniową masą ciała \geq 1500 g oraz grupa II - 31 matek dzieci z masą urodzeniową <1500 g). Średnia masą urodzeniową noworodka w I grupie wynosiła 2259,7 \pm 342,9 g, natomiast w II grupie 1112,4 \pm 282,9 g. Średnie wartości dotyczące wieku pacjentek (29,6 \pm 5,9 vs. 28,4 \pm 5,5 lat, *ns*) w obydwu grupach nie różniły się istotnie, jak również wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego (ciśnienie skurczowe 113,4 \pm 12,4 vs. 115,3 \pm 12,1 mmHg, *ns*; ciśnienie rozkurczowe 71,2 \pm 8,4 vs. 69,5 \pm 7,6 mmHg, *ns*). Zaobserwowano natomiast istotną statystycznie różnicę dotyczącą czasu zakończenia ciąży w

obydwu grupach: w grupie I wynosił on $37,4 \pm 1,9$ tc., a w grupie II $32,2 \pm 3,2$ tc. ($p < 0,0001$).

Przewagę w obu grupach stanowiły pierwiastki (56,2 vs. 43,8% w grupie I; 54,8 vs. 45,2% w grupie II). Odnotowano podobny wzrost pacjentek w obydwu podgrupach ($164,5 \pm 7,1$ vs. $165,2 \pm 5,9$ cm, *ns*). Pacjentki z grupy II prezentowały statystycznie istotnie wyższe wartości wyjściowej masy ciała ($64,4 \pm 12,0$ vs. $57,4 \pm 11,1$ kg, $p = 0,004$) i BMI ($23,6 \pm 4,5$ vs. $21,2 \pm 4,0$, $p = 0,006$), natomiast mniejsze przyrosty tych parametrów w trakcie ciąży, w porównaniu z grupą I (przyrost masy ciała: $12,7 \pm 5,7$ vs. $9,8 \pm 4,8$ kg, $p = 0,013$; przyrost BMI: $4,7 \pm 2,1$ vs. $3,6 \pm 1,8$, $p = 0,01$). W grupie matek noworodków z masą urodzeniową ≥ 1500 g odsetek porodów naturalnych był większy w porównaniu z grupą matek noworodków z masą urodzeniową < 1500 g (48,3 vs. 29,0%, $p = 0,07$). W grupie II przeważał natomiast poród za pomocą cięcia cesarskiego (71,0% vs. 29,0%, $p = 0,07$). W grupie I odbyły się 2 porody operacyjne drogą pochwową, natomiast ani jednego w grupie II. W grupie I więcej pacjentek posiadało wykształcenie wyższe (41,6 vs. 22,6%, $p = 0,07$) i zamieszkiwało duże miasto (49,5 vs. 25,8%, $p = 0,01$), natomiast pacjentki z grupy II częściej posiadały średnie wykształcenie (51,6 vs. 37,1%, $p = 0,17$) i zamieszkiwały wieś (38,7 vs. 15,7%, $p = 0,01$) lub małe miasto (35,5 vs. 34,8%, $p = 0,01$). Pacjentki z grupy I nieco częściej zażywały kwas foliowy, zarówno przed (37,1 vs. 32,3%, *ns*) jak i w trakcie ciąży (88,8 vs. 80,4%, *ns*), a także preparaty witamin w ciąży (92,1 vs. 87,1%, *ns*), jednak też częściej paliły papierosy (12,4 vs. 6,5%, *ns*) i były narażone na działanie czynników szkodliwych (6,0% vs. 3,0%, *ns*). Z powyższych parametrów tylko różnica dotycząca miejsca zamieszkania była jednak istotna statystycznie. Omówione powyżej parametry dotyczące pacjentek z tych dwóch grup prezentuje tabela 7.

Tab. 7. Podział pacjentek z grupy badanej w zależności od masy urodzeniowej noworodka (masa urodzeniowa noworodka ≥ 1500 g i < 1500 g).

	<i>Grupa badana – hipotrofia płodu</i>		<i>p</i>
	<i>Masa urodzeniowa ≥ 1500 g</i>	<i>Masa urodzeniowa < 1500g</i>	
Liczebność grupy (n)	89	31	
Wiek (lata) średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	29,6 \pm 5,9 30,0 18/44	28,4 \pm 5,5 28,0 18/37	ns
Czas zakończenia ciąży (tc) średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	37,4 \pm 1,9 38,0 32/40	32,2 \pm 3,2 32,0 26/38	<0,0001

Pierwiastki (%)	50 (56,2)	17 (54,8)	ns
Wieloródki (%)	39 (43,8)	14 (45,2)	
RR skurczowe(mmHg)			ns
średnia (±SD)	113,4±12,4	115,3±12,1	
mediana	110,0	120,0	
minimum/maksimum	90/130	90/130	
RR rozkurczowe(mmHg)			ns
średnia (±SD)	71,2±8,4	69,5±7,6	
mediana	70,0	70,0	
minimum/maksimum	50/80	60/80	
Wzrost (cm)			ns
średnia (±SD)	164,5±7,1	165,2±5,9	
mediana	164,0	166,0	
minimum/maksimum	140/178	155/176	
Masa ciała przed ciążą (kg)			0,004
średnia (±SD)	57,4±11,1	64,4±12,0	
mediana	56,0	62,0	
minimum/maksimum	35/111	47/92	
Masa ciała w ciąży (kg)			ns
średnia (±SD)	70,2±13,5	74,2±13,0	
mediana	68,0	70,0	
minimum/maksimum	40/121	51/108	
Przyrost masy ciała w ciąży (kg)			0,0126
średnia (±SD)	12,7±5,7	9,8±4,8	
mediana	12,0	9,0	
minimum/maksimum	0/34	3/22	
BMI przed ciążą			0,006
średnia (±SD)	21,2±4,0	23,6±4,5	
mediana	20,0	22,7	
minimum/maksimum	15,6/40,8	17,4/32,6	
BMI w ciąży			ns
średnia (±SD)	26,0±4,9	27,2±4,9	
mediana	24,8	25,6	
minimum/maksimum	17,8/43,9	18,5/38,3	
Przyrost BMI			0,01
średnia (±SD)	4,7±2,1	3,6±1,8	
mediana	4,7	3,2	
minimum/maksimum	0,0/12,6	1,1/8,4	
Sposób ukończenia ciąży (%)			0,07
poród samoistny	43 (48,3)	9 (29,0)	
cięcie cesarskie	43 (48,3)	22 (71,0)	
inne operacyjne	3 (3,4)	0 (0)	
Palenie papierosów przed ciążą (%)			ns
tak	27 (30,3)	10 (32,3)	
nie	62 (79,7)	21 (67,7)	
Palenie papierosów w ciąży (%)			ns
tak	11 (12,4)	2 (6,5)	
nie	78 (87,6)	29 (93,5)	

Kwas foliowy przed ciążą (%)			
tak	33 (37,1)	10 (32,3)	ns
nie	56 (62,9)	21 (67,7)	
Kwas foliowy w ciąży (%)			
tak	79 (88,8)	25 (80,4)	ns
nie	10 (11,2)	6 (19)	
Witaminy w ciąży (%)			
tak	82 (92,1)	27 (87,1)	ns
nie	7 (7,9)	4 (12,9)	
Narażenie na czynniki szkodliwe (%)			
tak	5 (6)	1 (3)	ns
nie	84 (94)	30 (97)	
Wykształcenie (%)			
wyższe	37 (41,6)	7 (22,6)	ns
średnie	33 (37,1)	16 (51,6)	
podstawowe	19 (21,3)	8 (25,8)	
Zamieszkanie (%)			
duże miasto	44 (49,5)	8 (25,8)	0,01
małe miasto	31 (34,8)	11 (35,5)	
wieś	14 (15,7)	12 (38,7)	

4.3. CHARAKTERYSTYKA PORÓWNAWCZA PARAMETRÓW DOTYCZĄCYCH NOWORODKÓW

Kolejnym etapem pracy była analiza porównawcza parametrów dotyczących noworodków z grupy z hipotrofią płodu oraz z grupy kontrolnej, z prawidłową masą ciała. Zanotowane parametry w obu grupach zawarte są w tabeli 4. Średnia masa urodzeniowa noworodka z grupy badanej wynosiła $1963,3 \pm 601,2$ g, co stanowiło średnio $3,1 \pm 2,8$ centyl, natomiast w grupie kontrolnej - $3490,3 \pm 351,3$ g oraz $52,2 \pm 25,9$ centyl, co stanowiło statystycznie istotną różnicę ($p < 0,0001$). Zaobserwowano natomiast, że punktacja w skali Apgar w pierwszej i piątej minucie była statystycznie wyższa w grupie kontrolnej (Ap 1' mediana: 9 pkt vs. 10 pkt, $p < 0,0001$, Ap 5': mediana 10,0 vs. $10,0 \pm 0,1$, $p < 0,0001$), natomiast wartości pH żylnego jak i tętniczego nie różniły się istotnie w obydwu grupach. Stwierdzono, iż średnia masa łożyska w grupie noworodków z hipotrofią płodu wynosiła $403,8 \pm 106,6$ g i była istotnie statystycznie niższa, niż w grupie kontrolnej, w której masa łożyska stanowiła $616 \pm 114,5$ g ($p < 0,0001$) (tab. 8).

Tab. 8. Charakterystyka porównawcza danych dotyczących noworodka z grupy z hipotrofią płodu i z grupy kontrolnej.

	<i>Grupa badana</i>	<i>Grupa kontrolna</i>	<i>p</i>
Liczebność grupy (n)	120	120	
Masa urodzeniowa noworodka (g) średnia (±SD) mediana minimum/maksimum	1963,3±601,2 2110,0 350/2920	3490,3±351,3 3505,0 2520/4280	<0,0001
Centyl urodzeniowej masy ciała noworodka średnia (±SD) mediana minimum/maksimum	3,1±2,8 2,0 0/9	52,2±25,9 50,0 11/98	<0,0001
Płeć noworodka (%) żeńską męską	67 (55,8) 53 (44,2)	64 (53,3) 56 (46,7)	ns
Apgar 1' średnia (±SD) mediana minimum/maksimum	7,8±2,7 9,0 1/10	9,7±0,7 10,0 7/10	<0,0001
Apgar 5' średnia (±SD) mediana minimum/maksimum	8,8±1,6 10,0 3/10	10,0±0,1 10,0 9/10	<0,0001
Masa łożyska średnia (±SD) mediana minimum/maksimum	403,8±106,6 400,0 110/650	616,0±114,5 600,0 410/900	<0,0001
pH żyłne średnia (±SD) mediana minimum/maksimum	7,31±0,1 7,33 7,07/7,49	7,3±0,1 7,32 7,10/7,46	ns
pH tętnicze średnia (±SD) mediana minimum/maksimum	7,26±0,1 7,26 6,96/7,54	7,24±0,1 7,24 7,07/7,46	<0,0001

Następnie przeprowadzono analizę porównawczą parametrów dotyczących noworodków, z uwzględnieniem obu podziałów grupy badanej. Kryterium pierwszego podziału stanowił tydzień zakończenia ciąży, a parametry dotyczące noworodka z jego uwzględnieniem zostały zebrane w tabeli 5. Średnia masa urodzeniowa noworodka z pierwszej grupy (poród ≥ 37 tc.) wynosiła 2326,9±384,2 g i była statystycznie wyższa od średniej masy urodzeniowej noworodka z grupy drugiej (poród <37 tc.) – 1487,9±492,7 g, $p < 0,0001$. Natomiast wartości centylowe odpowiadające masie ciała noworodków nie różniły się istotnie, mediana wynosiła: 2 centyl w grupie pierwszej oraz 2 centyl w grupie drugiej, *ns*. Wartości średnie masy łożyska w grupie I wynosiły 449,6±82,2 g, a w grupie drugiej były statystycznie niższe 343,9±105,6 g, $p < 0,0001$. Średnie wartości pH w żyłę pępowinowej nie

różniły się istotnie w obydwu grupach ($7,3\pm 0,1$ vs. $7,3\pm 0,1$, *ns*), zaobserwowano natomiast statystycznie wyższe wartości pH w tętnicy pępowinowej ($7,3\pm 0,1$ vs. $7,2\pm 0,1$, $p<0,0001$), a także punktacji w skali Apgar w 1 i 5 minucie w grupie pierwszej (Apgar 1' mediana : 10 pkt vs. 8 pkt, $p<0,0001$; Apgar 5' mediana: 10 pkt vs. 8 pkt, $p<0,0001$) (tab. 9).

Tab. 9. Charakterystyka porównawcza danych dotyczących noworodków z grupy badanej - podział w zależności od tygodnia zakończenia ciąży (poród ≥ 37 tc. i < 37 tc.).

	Grupa badana – Hipotrofia płodu		p
	Grupa poród ≥ 37 tc.	Grupa poród < 37 tc.	
Liczebność grupy (n)	68	52	
Masa urodzeniowa noworodka (gram) średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	2326,9 \pm 384,2 2395,0 1110/2920	1487,9 \pm 492,7 1445,0 350/2270	<0,0001
Centyl urodzeniowej masy ciała noworodka średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	3,5 \pm 3,0 2,0 0/9	2,7 \pm 2,6 2,0 0/9	ns
Płeć noworodka (%) żeńską męską	41 (60,3) 27 (39,7)	26 (50) 26 (50)	ns
Apgar 1' średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	8,9 \pm 1,8 10,0 2/10	6,4 \pm 3,2 7,0 1/10	<0,0001
Apgar 5' średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	9,6 \pm 0,9 10,0 6/10	8,2 \pm 1,9 8,0 3/10	<0,0001
Masa łożyska średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	449,6 \pm 82,2 440,0 250/650	343,9 \pm 105,6 340,0 110/590	<0,0001
pH żyłne średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	7,3 \pm 0,1 7,34 7,09/7,45	7,3 \pm 0,1 7,30 7,07/7,49	ns
pH tętnicze średnia (\pm SD) mediana minimum/maksimum	7,3 \pm 0,1 7,26 7,07/7,43	7,2 \pm 0,1 7,25 6,96/7,54	<0,0001

W następnym etapie przeprowadzono analizę porównawczą parametrów dotyczących noworodków z grupy I z masą urodzeniową ≥ 1500 g oraz grupy II z masą urodzeniową < 1500 g. Średnia masa urodzeniowa noworodka w grupie I wynosiła $2259,7\pm 342,9$ g,

natomiast w grupie II 1112,4±282,9 g ($p<0,0001$). Średnie wartości masy łożyska w grupie I wynosiły 442,30±81,93 g, a w grupie II 293,2±91,2 g, co stanowiło istotną statystycznie różnicę ($p<0,0001$). Również wartości centylowe masy ciała noworodków z obu grup wykazywały istotną statystycznie różnicę (mediana 2 vs. 1, $p=0,02$). Zanotowano również istotną różnicę w punktacji Apgar (Apgar 1' mediana: 10 pkt vs. 6 pkt, $p<0,0001$; Apgar 5' mediana: 10 pkt vs. 7 pkt, $p<0,0001$). Wartość średnia pH w tętnicy pępowinowej była istotnie wyższa w grupie I: 7,3±0,1 vs. 7,2±0,1, $p<0,0001$. Nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami w zakresie wartości średnich pH w żyłę pępowinowej: 7,3±0,1 vs. 7,3±0,1, *ns* (tab. 10).

Tab. 10. Charakterystyka porównawcza danych dotyczących noworodków z grupy badanej - podział w zależności od masy urodzeniowej noworodka (1500-2500 g oraz <1500 g).

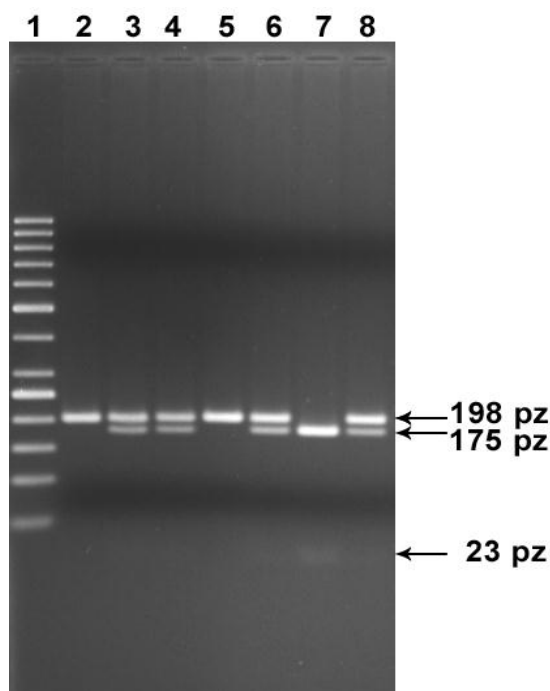
	Grupa badana – Hipotrofia płodu		<i>p</i>
	<i>Masa urodzeniowa 1500-2500 g</i>	<i>Masa urodzeniowa <1500 g</i>	
Liczebność grupy (n)	89	31	
Masa urodzeniowa noworodka (gram) średnia (±SD) mediana minimum/maksimum	2259,7±342,9 2310,0 342,87/2920,00	1112,4±282,9 1200,0 350/1470	<0,0001
Płeć noworodka (%) żeńska męska	52 (58,4) 37 (41,6)	15 (48,4) 16 (51,6)	ns
Centyl urodzeniowej masy ciała noworodka średnia (±SD) mediana minimum/maksimum	3,5±2,8 2,0 0/9	2,1±2,6 1,0 0/9	0,02
Apgar 1' średnia (±SD) mediana minimum/maksimum	8,7±2,0 10,0 1/10	5,4±3,2 6,0 1/10	<0,0001
Apgar 5' średnia (±SD) mediana minimum/maksimum	9,5±1,0 10,0 6/10	7,4±1,9 7,0 3/10	<0,0001
Masa łożyska średnia (±SD) mediana minimum/maksimum	442,3±81,9 420,0 250/650	293,2±91,2 300,0 110/500	<0,0001
pH żyłne średnia (±SD) mediana minimum/maksimum	7,3±0,1 7,34 7,12/7,48	7,3±0,1 2,27 2,07/7,49	ns
pH tętnicze średnia (±SD) mediana minimum/maksimum	7,3±0,1 7,26 7,06/7,42	7,2±0,1 7,24 6,96/7,54	<0,0001

4.4. ANALIZA CZĘSTOŚCI WYSTĘPOWANIA GENOTYPÓW I ALLELI POLIMORFIZMÓW WYBRANYCH GENÓW W GRUPIE MATEK NOWORODKÓW Z HIPOTROFIĄ PŁODU ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ

Na tym etapie pracy oceniano częstość występowania poszczególnych wariantów genetycznych wybranych genów związanych z metabolizmem folianów w grupie 120 pacjentek z hipotrofią płodu oraz 120 pacjentek z grupy kontrolnej. Poszczególne genotypy badanych polimorfizmów, uzyskane przy użyciu metody RCR/RFLP, zostały przedstawione na zdjęciach oznaczonych kolejno numerami od 1 do 8.

Polimorfizm 677C>T genu *MTHFR*

W pierwszej kolejności analizowano częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR*. Na fotografii 1 przedstawiono obraz poszczególnych genotypów tego polimorfizmu. Wynik otrzymano dzięki zastosowaniu hydrolizy enzymem restrykcyjnym *HinfI* (Eurx, Polska) fragmentu po reakcji PCR wielkości 198 pz zawierającego miejsce występowania tego polimorfizmu. Przy obecności homozygotycznego genotypu niezmutowanego 677CC (brak miejsca hydrolizy przez enzym restrykcyjny) uzyskiwano jeden prążek wielkości 198 pz. Heterozygotyczny genotyp 677CT odczytywano przy obecności trzech fragmentów o wielkości: 198, 175 i 23 par zasad. Genotyp homozygotyczny zmutowany typu 677TT odczytywano przy obecności 2 prążków o wielkości 175 i 23 par zasad.



Fot. 1. Analiza genotypów polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *HinfI*. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 2, 5 to homozygoty niezmutowane CC, tory 3, 4, 6, 8, heterozygoty CT, tor 7 to homozygota zmutowana TT.

Zaobserwowano różnicę w zakresie częstości występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego *677TT* pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną (*677TT*: 11,7 vs 6,7%, WR=1,85, $p=0,13$). Genotyp homozygotyczny niezmutowany typu *677CC* występował nieco częściej w grupie badanej (*677CC*: 50,8 vs. 44,1%, WR=1,31, $p=0,18$). Stwierdzono natomiast mniejszą częstość występowania heterozygot typu *677CT* w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej (*677CT*: 37,5 vs. 49,2%, WR=0,62, $p=0,045$). Wartości oczekiwane i obserwowane poszczególnych genotypów badanego polimorfizmu spełniały założenia prawa Hardy'ego-Weinberga.

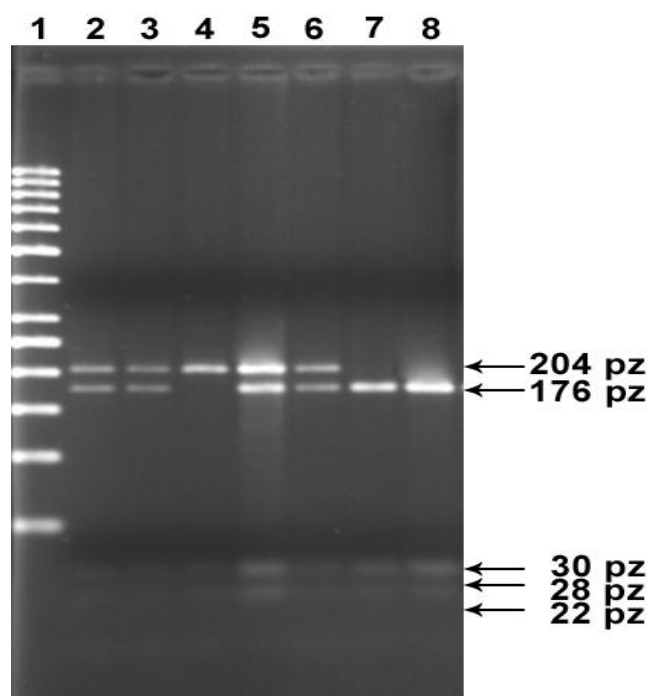
Analizując częstość występowania allela *677C* oraz zmutowanego allela *677T* polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR* nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic (allel *677C*: 69,6 vs. 68,7%, WR=1,04, $p=0,46$; allel *677T*: 30,4 vs. 31,3%, WR=0,96, $p=0,46$). Omówione wyniki prezentuje tabela 11.

Tab. 11. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR* w grupie matek noworodków z hipotrofią płodu oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> <i>677C>T</i>	<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i> <i>(n=120)</i>		<i>Grupa kontrolna</i> <i>(n=120)</i>		WR	95%PU	<i>p</i>
	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>			
<i>CC</i>	61 (50,8)	48,4	53 (44,1)	47,3	1,31	0,76-2,24	0,18
<i>CT</i>	45 (37,5)	42,3	59 (49,2)	42,9	0,62	0,36-1,07	0,045
<i>TT</i>	14 (11,7)	9,3	8 (6,7)	9,8	1,85	0,68-5,29	0,13
<i>suma</i>	120 (100,0)	100,0	120 (100,0)	100,0			
<i>Allele</i>							
<i>C</i>	167 (69,6)	—	165 (68,7)	—	1,04	0,69-1,56	0,46
<i>T</i>	73 (30,4)	—	75 (31,3)	—	0,96	0,64-1,44	0,46
<i>suma</i>	240 (100,0)	—	240 (100,0)	—			

Polimorfizm *1298A>C* genu *MTHFR*

Następnym analizowanym polimorfizmem był wariant *1298A>C* genu *MTHFR*. W przypadku homozygoty niezmutowanej *1298AA* w wyniku działania enzymu restrykcyjnego *Mbo*II (Fermentas, Litwa) uzyskano cztery prążki, które odpowiadają fragmentom wielkości 176, 30, 28, 22 pz. Heterozygota *1298AC* również dawała obraz czterech prążków odpowiadających fragmentom 204, 30, 28, 22 pz. W przypadku homozygoty zmutowanej *1298CC* ze względu na obecność dwóch miejsc restrykcyjnych uzyskiwano trzy fragmenty o wielkości 204, 30, 22 pz (fot. 2).



Fot. 2. Analiza genotypów polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Mbo*II. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 2, 3, 5, 6 to heterozygoty *AC*, tory 7, 8 homozygoty niezmutowane *AA* tor 4 to homozygota zmutowana *CC*.

Analiza statystyczna nie ujawniła istotnych statystycznie różnic w częstości występowania genotypu dzikiego *1298AA* (*1298AA*: 45,0 vs. 48,3%, WR=1,02, $p=0,52$), heterozygotycznego *1298AC* (*1298AC*: 47,5 vs. 46,7%, WR=1,03, $p=0,50$) oraz zmutowanego *1298CC* (*1298CC*: 7,5 vs. 5,0%, WR=1,54, $p=0,30$) pomiędzy grupą badaną a kontrolną.

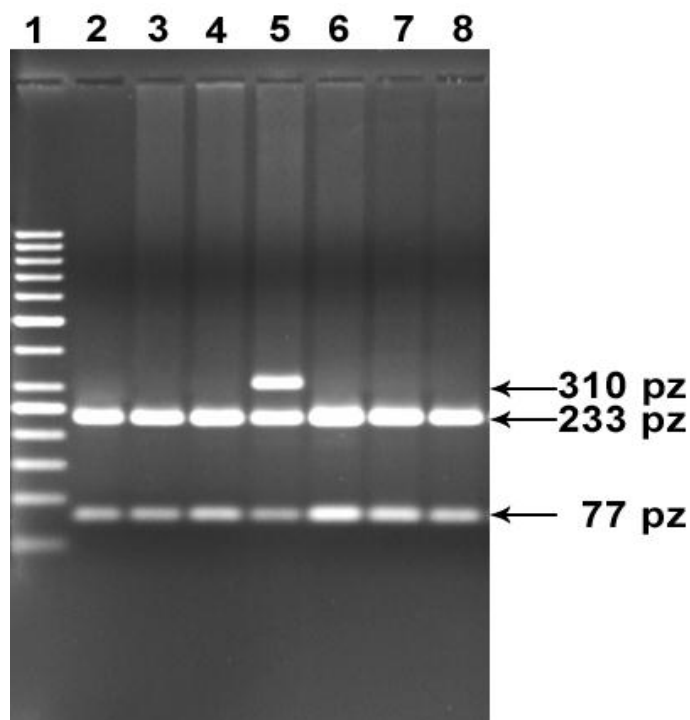
Również obserwowana częstość występowania alleli polimorfizmu *1298A>C* w obydwu grupach była podobna. Obserwowano następujące frekwencje: dla niezmutowanego allela *1298A*: 68,8 vs. 71,7%, WR=0,87, $p=0,27$, dla zmutowanego allela *1298C*: 31,2 vs. 28,3%, WR=1,15, $p=0,27$) (tab. 12).

Tab. 12. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR* w grupie matek noworodków z hipotrofią płodu oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> <i>1298A>C</i>	<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i> (<i>n=120</i>)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=120</i>)		<i>WR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>			
<i>AA</i>	54 (45,0)	47,3	58 (48,3)	51,4	1,02	0,59-1,72	0,52
<i>AC</i>	57 (47,5)	43,0	56 (46,7)	40,6	1,03	0,60-1,77	0,50
<i>CC</i>	9 (7,5)	9,8	6 (5,0)	8,0	1,54	0,47-5,43	0,30
<i>suma</i>	120 (100,0)	100,0	120 (100,0)	100,0			
<i>Allele</i>							
<i>A</i>	165 (68,8)	—	172 (71,7)	—	0,87	0,57-1,31	0,27
<i>C</i>	75 (31,2)	—	68 (28,3)	—	1,15	0,76-1,73	0,27
<i>suma</i>	240 (100,0)	—	240 (100,0)	—			

Polimorfizm 1793G>A genu *MTHFR*

Na fotografii 3 przedstawiono obraz elektroforezy na żelu agarozowym obrazujący rozkład genotypów polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR*. Do analizy zastosowano enzym restrykcyjny *Mbi*I, (*Bsr*BI) na produkt PCR wielkości 310 pz. Uzyskano: dwa prążki odpowiadające genotypowi dzikiemu 1793GG, trzy prążki odpowiadające fragmentom 310, 233 i 77 pz dla heterozygoty 1793GA. Genotypowi homozygotycznemu 1793AA teoretycznie powinien odpowiadać jeden prążek wielkości 310 pz. Ze względu na to, że genotyp nie zaobserwowano takiego genotypu w grupie badanej i kontrolnej, nie przedstawiono również tego genotypu na poniższej fotografii analizy rozkładu na żelu agarozowym.



Fot. 3. Analiza genotypów polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Mbi*I, (*Bsr*BI). Tor 1 marker wielkości 50 pz, tor 5 to heterozygota GA tory 2, 3, 4, 6, 7, 8, homozygoty niezmutowane GG.

W wyniku analizy polimorfizmu 1793G>A zaobserwowano podobną częstość występowania homozygot niezmutowanych 1793GG (90,0 vs. 92,5%, WR=0,72, $p=0,32$) oraz heterozygot 1793GA (10,0 vs. 7,5%, WR=1,37, $p=0,32$) w obu grupach badanej i kontrolnej. Ani w grupie badanej, ani w grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych nie odnotowano obecności genotypu homozygotycznego zmutowanego.

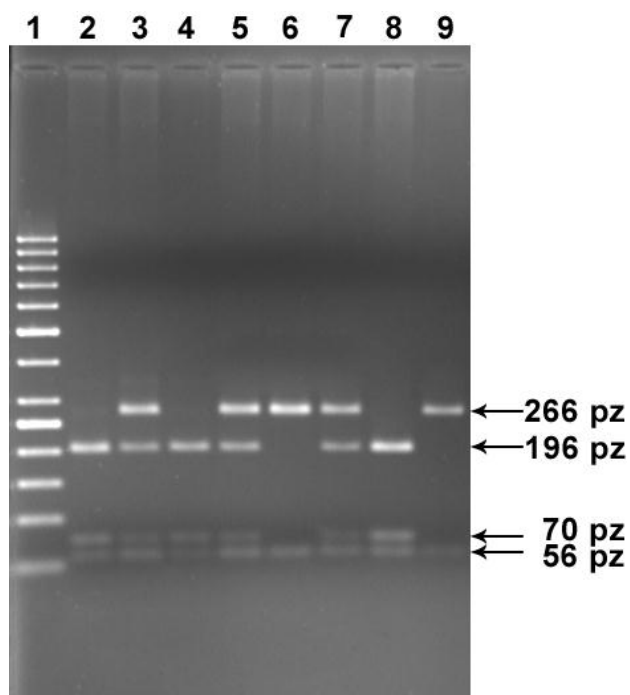
Zaobserwowano również podobną częstość występowania zmutowanego allele 1793A (5,0 vs. 3,8%, WR=1,35, $p=0,33$), jak również allele typu dzikiego 1793G (95,0 vs. 96,2%, WR=0,74, $p=0,33$) (tab. 13).

Tab. 13. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* w grupie matek noworodków z hipotrofią płodu oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> 1793G>A	<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i> (<i>n=120</i>)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=120</i>)		<i>WR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>			
GG	108 (90,0)	90,3	111 (92,5)	92,6	0,72	0,26-1,97	0,32
GA	12 (10,0)	9,5	9 (7,5)	7,2	1,37	0,51-3,84	0,32
AA	0 (0,0)	0,3	0 (0,0)	0,2	—	—	—
suma	120 (100,0)	100,0	120 (100,0)	100,0			
Allele							
G	228 (95,0)	—	231 (96,2)	—	0,74	0,27-1,95	0,33
A	12 (5,0)	—	9 (3,8)	—	1,35	0,51-3,70	0,33
suma	240 (100,0)	—	240 (100,0)	—			

Polimorfizm 1958G>A genu *MTHFD1*

Przykładowy wynik elektroforezy dla polimorfizmu 1958G>A genu *MTHFD1* pokazuje fotografia 4. Otrzymany produkt po reakcji PCR poddawano hydrolizie enzymem restrykcyjnym *MspI*. Dla homozygoty niezmutowanej 1958GG otrzymano cztery prążki odpowiadające fragmentom o wielkości 196, 70, 56 i 8 pz. W przypadku heterozygoty 1958GA uzyskano natomiast fragmenty o wielkości 266, 196, 70, 56 i 8 pz. Homozygota zmutowana 1958AA pozwalała zobrazować trzy prążki odpowiadające odcinkom wielkości 266, 56 i 8 pz (fot. 4.).



Fot. 4. Analiza genotypów polimorfizmu 1958G>A genu *MTHFD1* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *MspI*. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 2, 4, 8 to homozygoty niezmutowane GG, tory 3, 5, 7, to heterozygoty GA, tor 6, 9, to homozygoty zmutowane AA.

W grupie badanej kobiet, które urodziły dzieci z hipotrofią zaobserwowano porównywalną częstość homozygot niezmutowanych *1958GG* (*1958GG*: 30,8 vs. 26,7%, $WR=1,23$, $p=0,28$) oraz heterozygot *1958GA* (*1958GA*: 50,0 vs. 52,5%, $WR=0,90$, $p=0,39$) w porównaniu do grupy kontrolnej zdrowych ciężarnych. Różnice nie były istotne statystycznie. Również częstość występowania homozygot zmutowanych *1958AA* w grupie badanej była podobna do częstości ich występowania w grupie kontrolnej (*1958AA*: 19,2 vs. 20,8%, $WR=0,90$, $p=0,43$). Obserwowana różnica nie była statystycznie istotna.

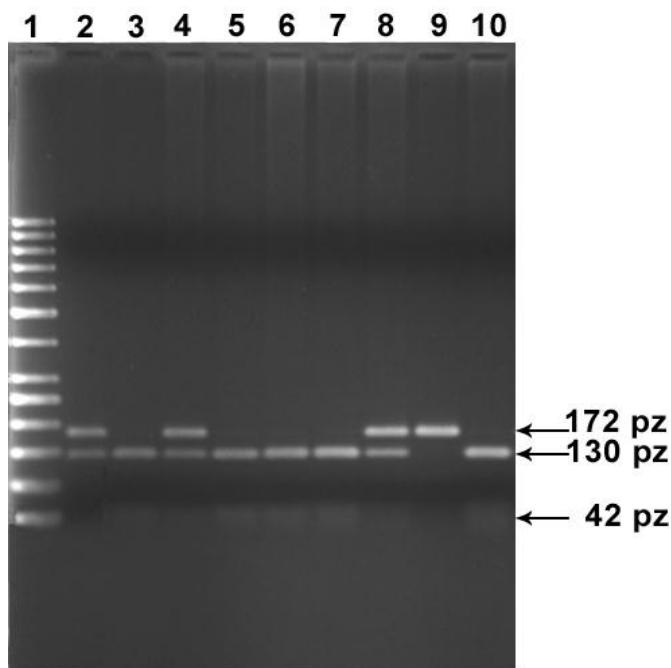
Niezmutowany allel *1958G* występował z podobną częstością w grupie badanej i kontrolnej (*1958G*: 55,8 vs. 52,9%, $WR=1,12$, $p=0,29$). Również obserwowana frekwencja zmutowanego allela *1958A* była porównywalna w grupie badanej i kontrolnej (*1958A*: 44,2 vs. 47,1%, $WR=0,89$, $p=0,29$). Różnica nie była statystycznie istotna (tab. 14).

Tab. 14. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *1958G>A* genu *MTHFD1* w grupie matek noworodków z hipotrofią płodu oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFD1</i> <i>1958G>A</i>	<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i> (<i>n=120</i>)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=120</i>)		<i>WR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>			
<i>GG</i>	37 (30,8)	31,2	32 (26,7)	28,0	1,23	0,67-2,23	0,28
<i>GA</i>	60 (50,0)	49,3	63 (52,5)	49,8	0,90	0,52-1,55	0,39
<i>AA</i>	23 (19,2)	19,5	25 (20,8)	22,2	0,90	0,45-1,78	0,43
<i>suma</i>	120 (100,0)	100,0	120 (100,0)	100,0			
<i>Allele</i>							
<i>G</i>	134 (55,8)	—	127 (52,9)	—	1,12	0,77-1,63	0,29
<i>A</i>	106 (44,2)	—	113 (47,1)	—	0,89	0,61-1,29	0,29
<i>suma</i>	240 (100,0)	—	240 (100,0)	—			

POLIMORFIZM 401G>A GENU *MTHFD1*

Dla polimorfizmu 401G>A genu *MTHFD1* uzyskano obraz prążków rozkładu poszczególnych genotypów co pokazuje fotografia 5. Po hydrolizie z enzymem restrykcyjnym *BsmAI* (*Alw26I*) (Fermentas, Litwa) odczytywano otrzymane genotypy. Genotyp homozygotyczny niezmutowany 401GG odczytywano na podstawie obecności dwóch prążków odpowiadających fragmentom 130 oraz 42 pz. Z kolei dla heterozygoty 401GA otrzymywano trzy prążki: 172, 130 i 42 pz. W genotypie zmutowanym 401AA z uwagi na brak miejsca restrykcyjnego otrzymywano jeden prążek o długości 172 pz (fot. 5).



Fot. 5. Analiza genotypów polimorfizmu 401G>A genu *MTHFD1* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *BsmAI* (*Alw26I*). Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 3, 5, 6, 7, 10 to homozygoty niezmutowane GG, tory 2, 4, 8 to heterozygoty GA tor 9 to homozygota zmutowana AA.

W grupie pacjentek z hipotrofią płodu zaobserwowano przewagę genotypu heterozygotycznego *401GA* oraz homozygotycznego zmutowanego *401AA* w porównaniu do grupy kontrolnej (*401GA*: 39,2 vs. 30,8%, WR=1,44, $p=0,11$; *401AA*: 7,5 vs. 3,4%, WR=2,35, $p=0,12$). Powyższe różnice nie były jednak istotne statystycznie. Natomiast w grupie kontrolnej odnotowano więcej homozygot niezmutowanych (*401GG*: 53,3 vs. 65,8% w grupie kontrolnej, WR=0,59, $p=0,03$).

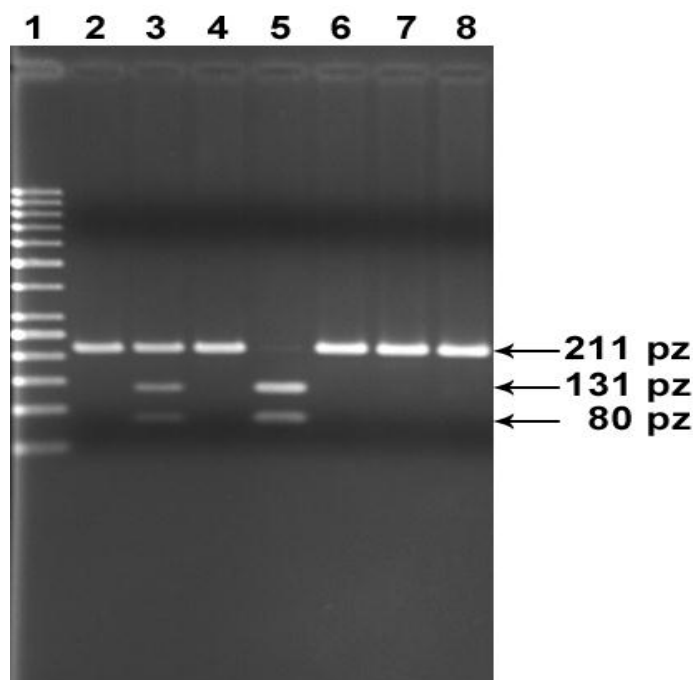
Częstość występowania allela zmutowanego *401A* była jednak znacząco większa w grupie badanej z hipotrofią, natomiast allela typu dzikiego *401G* w grupie kontrolnej (*401A*: 27,1 vs. 18,8% w grupie kontrolnej, WR=1,61, $p=0,02$; *401G*: 72,9 vs. 81,2% w grupie kontrolnej, WR=0,62, $p=0,02$). Różnice częstości występowania poszczególnych alleli w zakresie tego polimorfizmu były istotne statystycznie. Frekwencje poszczególnych genotypów oraz alleli tego polimorfizmu w obu grupach ilustruje tabela 15.

Tab. 15. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *401G>A* genu *MTHFD1* w grupie matek noworodków z hipotrofią płodu oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFD1</i> <i>401G>A</i>	<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i> (<i>n=120</i>)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=120</i>)		WR	95%PU	<i>p</i>
	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> (%)	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> (%)			
GG	64 (53,3)	53,2	79 (65,8)	66,0	0,59	0,35-1,00	0,03
GA	47 (39,2)	39,5	37 (30,8)	30,5	1,44	0,85-2,46	0,11
AA	9 (7,5)	7,3	4 (3,4)	3,5	2,35	0,70-7,86	0,12
suma	120 (100,0)	100,0	120 (100,0)	100,0			
Allele							
G	175 (72,9)	—	195 (81,2)	—	0,62	0,40-0,96	0,02
A	65 (27,1)	—	45 (18,8)	—	1,61	1,05-2,48	0,02
suma	240 (100,0)	—	240 (100,0)	—			

POLIMORFIZM 2756A>G GENU *MTR*

Fotografia 6 przedstawia wynik elektroforezy produktu reakcji PCR wielkości 211 pz dla polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* przy użyciu enzymu *Bsu*RI (Fermentas, Litwa). W rezultacie tej reakcji powstało od jednego do trzech fragmentów produktu. W przypadku genotypu dzikiego homozygotycznego typu 2756AA nie występowało miejsce hydrolizy rozpoznawane przez endonukleazę i uwidoczniono jeden prążek długości 211 pz. W genotypie heterozygotycznym 2756AG otrzymano trzy fragmenty o wielkości 211, 131 i 80 pz, dające obraz trzech prążków. Natomiast w genotypie homozygotycznym zmutowanym 2756GG uzyskano dwa prążki, obrazujące hydrolizę na fragmenty o wielkości 131 i 80 pz (fot. 6).



Fot. 6. Analiza genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Bsu*RI. Tor 1 marker wielkości 50 pz., tory 2, 4, 6, 7, 8 homozygoty niezmutowane AA, tor 3 heterozygota AG, tor 5 to homozygota zmutowana GG.

Uzyskane dane dotyczące częstości występowania poszczególnych genotypów oraz alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* zebrano w tabeli 16. Zannotowano dwukrotnie częstsze występowanie genotypu zmutowanego 2756GG w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną (2756GG: 4,2 vs. 2,5%, WR=1,70, $p=0,36$), co jednak nie stanowiło istotnej statystycznie różnicy. Genotyp niezmutowany 2756AA oraz genotyp heterozygotyczny 2756AG występowały w obu grupach z podobną częstością (2756AA: 60,8 vs. 56,7%, WR=1,09, $p=0,30$; 2756GA: 35,0 vs. 40,8%, WR=0,78, $p=0,21$).

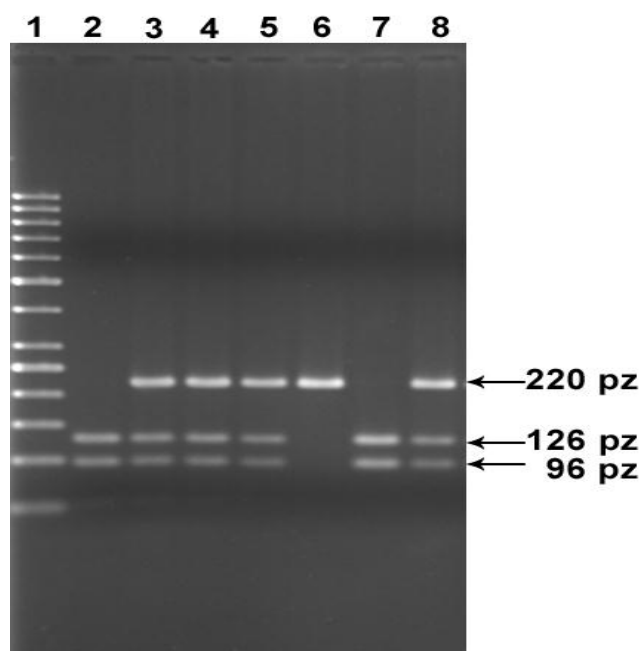
Również w zakresie częstości występowania allela zmutowanego 2756G jak i niezmutowanego 2756A nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupę badaną i grupą kontrolną (2756A: 78,3 vs. 77,1%, WR=1,07, $p=0,41$; 2756G: 21,7 vs. 22,9%, WR=0,93, $p=0,41$) (tab. 16).

Tab. 16. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie matek noworodków z hipotrofią płodu oraz w grupie kontrolnej.

MTR 2756A>G	Grupa badana Hipotrofia płodu (n=120)		Grupa kontrolna (n=120)		WR	95%PU	p
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)			
AA	73 (60,8)	61,4	68 (56,7)	59,4	1,19	0,71-1,99	0,30
AG	42 (35,0)	33,9	49 (40,8)	35,3	0,78	0,46-1,32	0,21
GG	5 (4,2)	4,7	3 (2,5)	5,3	1,70	0,40-7,26	0,36
suma	120 (100,0)	100,0	120 (100,0)	100,0			
Allele							
A	188 (78,3)	—	185 (77,1)	—	1,07	0,70-1,65	0,41
G	52 (21,7)	—	55 (22,9)	—	0,93	0,61-1,43	0,41
suma	240 (100,0)	—	240 (100,0)	—			

POLIMORFIZM 776C>G GENU *TCII*

Na fotografii 7 pokazano przykładową analizę poszczególnych genotypów dla polimorfizmu 776C>G genu *TCII*. Fragment PCR wielkości 220 par zasad poddano hydrolizie enzymem restrykcyjnym *MvaI* (Fermentas, Litwa). Otrzymano fragmenty o wielkości 126 i 94 pz w przypadku genotypu niezmutowanego typu 766AA (dwa prążki), natomiast w przypadku heterozygoty 766AG trzy prążki odpowiadające fragmentom o wielkości 220, 126 i 94 pz. Genotyp zmutowany 766GG nie podlegał hydrolizie Endonukleazy *MvaI*, co w rezultacie dawało obraz jednego prążka (fot. 7).



Fot. 7. Analiza genotypów polimorfizmu 766C>G genu *TCII* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *MvaI*. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 2, 7 homozygoty niezmutowane AA, tory 3, 4, 5, 8, heterozygoty AG, tor 6 to homozygota zmutowana GG

Podczas analizy rozkładu poszczególnych genotypów polimorfizmu 776C>G genu *TCII* zaobserwowano podobną częstość występowania genotypu zmutowanego 776GG w grupie badanej i grupie kontrolnej (776GG: 20,0 vs. 22,5%, WR=0,86, $p=0,37$). Nie stwierdzono także statystycznie istotnych różnic w zakresie częstości występowania genotypu dzikiego 776CC, ani genotypu heterozygotycznego 776CG pomiędzy obiema grupami (776CC: 27,5 vs. 30,8%, WR=0,85, $p=0,33$; genotyp 776CG: 52,5 vs. 46,7, WR=1,26, $p=0,22$).

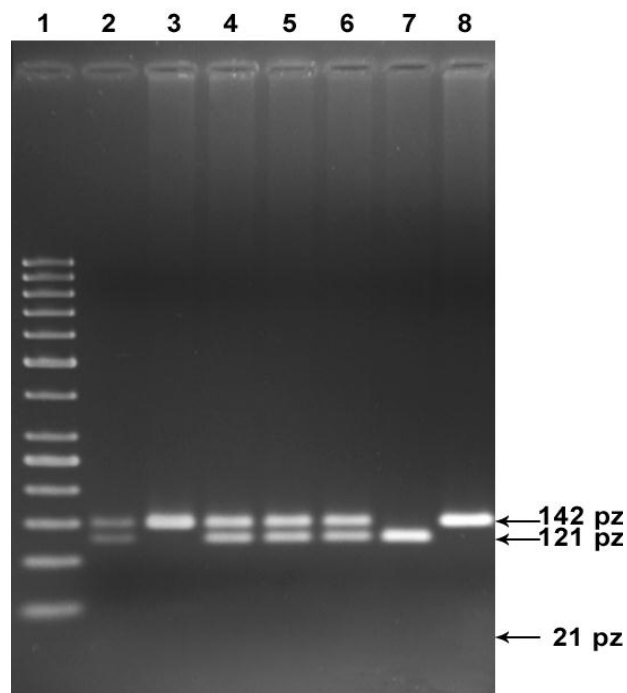
Również częstość występowania typu dzikiego allele 776C oraz zmutowanego allele 776G były zbliżone w grupie badanej i kontrolnej (776C: 53,8 vs. 54,2%, WR=0,98, $p=0,50$; 776G: 46,2% vs. 45,8%, WR=1,02, $p=0,50$) (tab. 17).

Tab. 17. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 766C>G genu *TCII* w grupie matek noworodków z hipotrofią płodu oraz w grupie kontrolnej.

<i>TCII</i> 776C>G	<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i> (<i>n=120</i>)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=120</i>)		WR	95%PU	<i>p</i>
	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>(%)</i>			
<i>CC</i>	33 (27,5)	28,9	37 (30,8)	29,3	0,85	0,49-1,49	0,33
<i>CG</i>	63 (52,5)	49,7	56 (46,7)	49,7	1,26	0,76-2,10	0,22
<i>GG</i>	24 (20,0)	21,4	27 (22,5)	21,0	0,86	0,46-1,60	0,37
<i>suma</i>	120 (100,0)	100,00	120 (100,00)	100,0			
<i>Allele</i>							
<i>C</i>	129 (53,8)	—	130 (54,2)	—	0,98	0,69-1,41	0,50
<i>G</i>	111 (46,2)	—	110 (45,8)	—	1,02	0,71-1,46	0,50
<i>suma</i>	240 (100,0)	—	240 (100,0)	—			

POLIMORFIZM 66A>G GENU *MTRR*

Po hydrolizie z użyciem endonukleazy *NdeI* (Fermentas, Litwa) produktu PCR o wielkości 142 pz odpowiadającego miejscu występowania polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* otrzymano od jednego do trzech fragmentów. W przypadku zmutowanego genotypu 66GG miejsce hydrolizy nie występowało i uzyskiwano tylko jeden wyjściowy fragment o wielkości 142 pz (pojedynczy prążek). W przypadku heterozygoty 66AG otrzymywano trzy fragmenty o wielkości 142, 121 i 21 par zasad, co odpowiadało trzem prążkom, natomiast dla homozygoty niezmutowanej 66AA dwa fragmenty 21 i 121 pz (dwa prążki) (fot. 8).



Fot. 8. Analiza genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *NdeI* (Fermentas, Litwa). Tor 1 marker wielkości 50 pz., tor 7 homozygota niezmutowana AA, tory 2, 4, 5, 6 heterozygoty AG, tory 3, 8 to homozygoty zmutowane GG.

W pracy nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą badaną i kontrolną pod względem częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR*. Genotyp dziki typu 66AA występował u 19,2% pacjentek z grupy badanej oraz u takiej samej liczby pacjentek z grupy kontrolnej (WR=1,00, $p=0,57$). Genotyp heterozygotyczny 66AG występował u 50,8% pacjentek w grupie badanej oraz u 52,5% pacjentek z grupy kontrolnej, co nie stanowiło istotnej statystycznie różnicy (WR=0,94, $p=0,45$). Ponadto zaobserwowano podobną frekwencję dotyczącą homozygot zmutowanych 66GG w obydwu grupach (66GG: 30,0 vs. 28,3%, WR=1,08, $p=0,44$).

Nie zanotowano także różnic w zakresie częstości występowania allela dzikiego 66A i zmutowanego 66G (66A: 44,6 vs. 45,4%, WR=0,97, $p=0,46$; 66G: 55,4 vs. 54,6%, WR=1,03, $p=0,46$) (tab. 18).

Tab. 18. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie matek noworodków z hipotrofią płodu oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTRR</i> 66A>G	<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i> (<i>n=120</i>)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n=120</i>)		WR	95%PU	<i>p</i>
	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> (%)	<i>wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiwana</i> (%)			
<i>AA</i>	23 (19,2)	19,9	23 (19,2)	20,6	1,00	0,53-1,90	0,57
<i>AG</i>	61 (50,8)	49,4	63 (52,5)	49,6	0,94	0,56-1,55	0,45
<i>GG</i>	36 (30,0)	30,7	34 (28,3)	29,8	1,08	0,62-1,89	0,44
<i>suma</i>	120 (100,0)	100,0	120 (100,0)	100,0			
<i>Allele</i>							
<i>A</i>	107 (44,6)	—	109 (45,4)	—	0,97	0,67-1,39	0,46
<i>G</i>	133 (55,4)	—	131 (54,6)	—	1,03	0,72-1,48	0,46
<i>suma</i>	240 (100,0)	—	240 (100,0)	—			

4.5. ANALIZA PORÓWNAWCZA GENOTYPÓW I ALLELI BADANYCH POLIMORFIZMÓW W ZALEŻNOŚCI OD TYGODNIA ZAKOŃCZENIA CIĄŻY (PORÓD ≥ 37 TC. ORAZ < 37 TC.)

W celu dokładnej analizy wyników w pracy przeprowadzono 2 podziały grupy badanej kobiet, które urodziły dzieci z hipotrofią. W przypadku obydwu przeprowadzonych podziałów analizowano częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów. Podział pierwszy dotyczył kryterium czasowego:

1. Podgrupa kobiet, u których ciąża zakończyła się przed 37 tc. ($< 36+6$ tc, < 37 tc.)
2. Podgrupa kobiet, u których ciąża zakończyła się po 37 tc. ($\geq 37+0$ tc, ≥ 37 tc.)

Drugi podział dotyczył masy ciała noworodków:

1. Podgrupa kobiet, u których ciąża zakończyła się urodzeniem dziecka o masie mniejszej niż 1500 g (≤ 1499 g)
2. Podgrupa kobiet, u których ciąża zakończyła się urodzeniem dziecka o masie większej niż 1500 g (≥ 1500 g)

W zakresie analizy polimorfizmu $677C>T$ genu *MTHFR* odnotowano następujące częstości występowania genotypu heterozygotycznego $677CT$ 38,3% w podgrupie, w której ciąża zakończyła się ≥ 37 tc., 36,5% w podgrupie, w której ciąża zakończyła się < 37 tc. oraz 49,2% w grupie kontrolnej. W grupie kontrolnej odnotowano większą częstość występowania genotypu $677CT$ w porównaniu do podgrupy < 37 tc. (49,2 vs. 36,5%, WR=0,59, $p=0,08$). Żadna z tych różnic nie była statystycznie istotna.

Najciekawszą obserwacją było stwierdzenie większej częstości występowania genotypu $677TT$ zarówno w grupie, w której poród odbył się ≥ 37 tc. (13,2 vs. 6,6%, WR=2,14, $p=0,11$), jak również < 37 tc. (9,6 vs. 6,6%, WR=1,49, $p=0,35$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Częstość występowania zmutowanego allela $677T$ była porównywalna w obydwu badanych podgrupach w stosunku do grupy kontrolnej (tab. 19).

Tab. 19. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na czas zakończenia ciąży ≥ 37 tc. i < 37 tc. oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> 677C>T	<i>Grupa badana (n=120)</i> <i>Hipotrofia płodu</i>				<i>Grupa kontrolna</i> <i>(n=120)</i>
	<i>Poród ≥ 37 tc. (n=68)</i>		<i>Poród < 37 tc. (n=52)</i>		
<i>Genotypy</i>	wartość obserw. n (%)	WR (p)*	wartość obserw. n (%)	WR (p)**	wartość obserw. n (%)
<i>CC</i>	33 (48,5)	1,19 (0,33)	28 (53,9)	1,14 (0,16)	53 (44,2)
<i>CT</i>	26 (38,3)	0,64 (0,09)	19 (36,5)	0,59 (0,08)	59 (49,2)
<i>TT</i>	9 (13,2)	2,14 (0,11)	5 (9,6)	1,49 (0,35)	8 (6,6)
<i>suma</i>	68 (100,0)	-	52 (100,0)	-	120 (100,0)
<i>Allele</i>					
<i>C</i>	92 (67,7)	0,95 (0,46)	75 (72,1)	1,18 (0,31)	165 (68,7)
<i>T</i>	44 (32,3)	1,05 (0,46)	29 (27,9)	0,85 (0,31)	75 (31,3)
<i>suma</i>	136 (100,0)	-	104 (100,0)	-	240 (100,0)

W zakresie polimorfizmu 1298A>C najciekawszą obserwacją było odnotowanie większej częstości występowania zmutowanego genotypu 1298CC w grupie, gdzie poród odbył się < 37 tc. w porównaniu do grupy kontrolnej (9,6 vs. 5,0%, WR=1,84, $p=0,25$). Obserwowane częstości występowania alleli 1298A oraz 1298C w obydwu podgrupach (poród dziecka z hipotrofią ≥ 37 tc. oraz < 37 tc.) oraz w grupie kontrolnej były porównywalne (*ns*) (tab. 20).

Tab. 20. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 1298A>C genu *MTHFR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na czas zakończenia ciąży ≥ 37 tc. i < 37 tc. oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> 1298A>C	<i>Grupa badana (n=120)</i> <i>Hipotrofia płodu</i>				<i>Grupa kontrolna</i> <i>(n=120)</i>
	<i>Poród ≥ 37 tc. (n=68)</i>		<i>Poród < 37 tc. (n=52)</i>		
<i>Genotypy</i>	wartość obserw. n (%)	WR (p)*	wartość obserw. n (%)	WR (p)**	wartość obserw. n (%)
<i>AA</i>	28 (39,7)	0,78 (0,21)	26 (50,0)	1,06 (0,48)	58 (48,3)
<i>AC</i>	36 (54,4)	1,28 (0,25)	21 (40,4)	0,77 (0,28)	56 (46,7)
<i>CC</i>	4 (5,9)	1,08 (0,57)	5 (9,6)	1,84 (0,25)	6 (5,0)
<i>suma</i>	68 (100,0)	-	52 (100,0)	-	120 (100,0)
<i>Allele</i>					
<i>A</i>	91 (66,9)	0,79 (0,19)	73 (70,2)	0,93 (0,44)	172 (71,7)
<i>C</i>	45 (33,1)	1,25 (0,19)	31 (29,8)	1,07 (0,44)	68 (28,3)
<i>suma</i>	136 (100,0)	--	104 (100,0)	-	240 (100,0)

Analizując grupę kobiet, które zakończyły ciążę po 37 tc. urodzeniem dziecka z hipotrofią dla polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* odnotowano większą częstość występowania genotypu homozygotycznego 1793GG w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy badanej (92,5 vs. 83,8%, WR=0,42, $p=0,06$). Obserwowano również większą frekwencję genotypu heterozygotycznego 1793GA w tej grupie kobiet, które urodziły ≥ 37 tc. (16,2 vs. 7,5%, WR=2,38, $p=0,06$). Również częstość występowania zmutowanego allele 1793A była wyższa w podgrupie ≥ 37 tc. (8,1 vs. 3,8%, WR=2,26, $p=0,06$) (tab. 21).

W podgrupie, w której nastąpił poród <37 tc. odnotowano porównywalną frekwencję genotypu typu dzikiego 1793GG w stosunku do grupy kontrolnej (98,1 vs. 92,5%, WR=4,13, $p=0,14$) oraz mniejszą częstość występowania genotypu heterozygotycznego 1793GA (1,9 vs. 7,5% w grupie kontrolnej, WR=0,24, $p=0,14$). Podobna obserwacja dotyczyła obydwu alleli polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* (tab. 21).

Tab. 21. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na czas zakończenia ciąży ≥ 37 tc. i <37 tc. oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> 1793G>A	<i>Grupa badana (n=120)</i> <i>Hipotrofia płodu</i>				<i>Grupa kontrolna</i> <i>(n=120)</i>
	<i>Poród ≥ 37 tc. (n=68)</i>		<i>Poród <37 tc. (n=52)</i>		
<i>Genotypy</i>	wartość obserw. n (%)	WR (p)*	wartość obserw. n (%)	WR (p)**	wartość obserw. n (%)
<i>GG</i>	57 (83,8)	0,42 (0,06)	51 (98,1)	4,13 (0,14)	111 (92,5)
<i>GA</i>	11 (16,2)	2,38 (0,06)*	1 (1,9)	0,24 (0,14)	9 (7,5)
<i>AA</i>	0 (0,0)	-	0 (0,0)	-	0 (0,0)
<i>suma</i>	68 (100,0)		52 (100,0)		120 (100,0)
<i>Allele</i>					
<i>G</i>	125 (91,9)	0,44 (0,06)	103 (99,0)	4,01 (0,14)	231 (96,2)
<i>A</i>	11 (8,1)	2,26 (0,06)*	1 (1,0)	0,25 (0,14)	9 (3,8)
<i>suma</i>	136 (100,0)		104 (100,0)		240 (100,0)

W zakresie polimorfizmu 1958G>A genu *MTHFD1* w podgrupie kobiet, w której poród odbył się ≥ 37 tc. zaobserwowano następujący rozkład genotypów: 1958GG 33,8%, 1958GA 41,2%, 1958AA 25,0%. Rozkład genotypów w grupie, w której poród odbył się < 37 tc. był następujący 1958GG 26,9%, 1958GA 61,6%, 1958AA 11,5%. Nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych w rozkładzie genotypów pomiędzy analizowanymi podgrupami a grupą kontrolną (tab. 22).

Obserwowane częstości występowania obydwu alleli – typu dzikiego 1958G (u kobiet ≥ 37 tc. 54,4%, u kobiet < 37 tc. 57,7%) oraz allela zmutowanego 1958A (u kobiet ≥ 37 tc. 45,6%, u kobiet < 37 tc. 42,3%) oraz w grupie kontrolnej (allel 1958G – 52,9%, allel 1958A 47,1%) w badanych podgrupach kobiet były porównywalne (tab. 22).

Tab. 22. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 1958G>A genu *MTHFD1* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na czas zakończenia ciąży ≥ 37 tc. i < 37 tc. oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFD1</i> 1958G>A	<i>Grupa badana (n=120)</i> <i>Hipotrofia płodu</i>				<i>Grupa kontrolna</i> (n=120)
	<i>Poród ≥ 37 tc. (n=68)</i>		<i>Poród < 37 tc. (n=52)</i>		
<i>Genotypy</i>	wartość obserw. n (%)	WR (p)*	wartość obserw. n (%)	WR (p)**	wartość obserw. n (%)
<i>GG</i>	23 (33,8)	1,41 (0,19)	14 (26,9)	1,01 (0,56)	32 (26,7)
<i>GA</i>	28 (41,2)	0,63 (0,09)	32 (61,6)	1,44 (0,18)	63 (52,5)
<i>AA</i>	17 (25,0)	1,27 (0,31)	6 (11,5)	0,49 (0,11)	25 (20,8)
<i>suma</i>	68 (100,0)		52 (100,0)		120 (100,0)
<i>Allele</i>					
<i>G</i>	74 (54,4)	1,06 (0,43)	60 (57,7)	1,21 (0,24)	127 (52,9)
<i>A</i>	62 (45,6)	0,94 (0,43)	44 (42,3)	0,82 (0,24)	113 (47,1)
<i>suma</i>	136 (100,0)		104 (100,0)		240 (100,0)

Dla polimorfizmu $401G>A$ genu *MTHFD1* w grupie kobiet, które urodziły dzieci z hipotrofią <37 tc. zaobserwowano niższą częstość występowania genotypu $401GG$ (44,2 vs. 65,8% w grupie kontrolnej, $WR=0,41$, $p=0,007$) oraz wyższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego $401GA$, zawierającego jeden zmutowany allel (48,1 vs. 30,8% w grupie kontrolnej, $WR=2,08$, $p=0,024$). Podobne obserwacje przeprowadzono dla alleli polimorfizmu $401G>A$. Allel $401G$ występował z niższą częstością w podgrupie <37 tc. (68,3 vs. 81,3%, $WR=0,49$, $p=0,007$), natomiast allel zmutowany $401A$ pojawiał się w większej częstości w tej podgrupie badanej (<37 tc.) (31,7 vs. 18,8%, $WR=2,01$, $p=0,007$).

Również w podgrupie, gdzie poród odbył się ≥ 37 tc. zaobserwowano większą częstość występowania genotypu zmutowanego $401AA$ (7,4 vs. 3,3 w grupie kontrolnej, $WR=2,30$, *ns*). Natomiast częstość występowania alleli badanego polimorfizmu w grupie ≥ 37 tc. oraz w grupie kontrolnej była porównywalna (tab. 23).

Tab. 23. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $401G>A$ genu *MTHFD1* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na czas zakończenia ciąży ≥ 37 tc. i <37 tc. oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFD1</i> $401G>A$	<i>Grupa badana (n=120)</i> <i>Hipotrofia płodu</i>				<i>Grupa kontrolna</i> <i>(n=120)</i>
	<i>Poród ≥ 37 tc. (n=68)</i>		<i>Poród <37 tc. (n=52)</i>		
<i>Genotypy</i>	wartość obserw. n (%)	WR (p)*	wartość obserw. n (%)	WR (p)**	wartość obserw. n (%)
GG	41 (60,3)	0,79 (0,27)	23 (44,2)	0,41 (0,007)	79 (65,8)
GA	22 (32,3)	1,07 (0,47)	25 (48,1)	2,08 (0,024)	37 (30,8)
AA	5 (7,4)	2,30 (0,18)	4 (7,7)	2,42 (0,19)	4 (3,3)
<i>suma</i>	68 (100,0)		52 (100,0)		120 (100,0)
<i>Allele</i>					
G	104 (76,5)	0,75 (0,17)	71 (68,3)	0,49 (0,007)	195 (81,3)
A	32 (23,5)	1,33 (0,17)	33 (31,7)	2,01 (0,007)*	45 (18,8)
<i>suma</i>	136 (100,0)		104 (100,0)		240 (100,0)

Dla polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* genotyp homozygotyczny niezmutowany 2756AA występował częściej u pacjentek, których poród zakończył się ≥ 37 tc. w porównaniu do grupy kontrolnej (64,7% vs. 56,7%, WR=1,40, $p=0,18$). Genotyp heterozygotyczny 2756AG występował u 40,8% kobiet z grupy kontrolnej, u 38,4% w grupie kobiet <37 tc. (WR=0,90, $p=0,45$) oraz u 32,4% w grupie kobiet ≥ 37 tc. (WR=0,69, $p=0,15$). Wariant zawierający oba zmutowane allele 2756GG najczęściej występował u kobiet rodzących przed 37 tc. (5,8 vs. 2,5% w grupie kontrolnej, WR=2,38, $p=0,26$) (tab. 24).

Analizując częstość występowania alleli w badanych podgrupach kobiet w porównaniu do grupy kontrolnej, allel typu dzikiego 2756A występował w podobnej częstości w podgrupie rodzących w 37 tc. lub później (80,9% vs. 77,1% w grupie kontrolnej, WR=1,26, $p=0,23$). Również u kobiet, u których poród nastąpił przed 37 tc. allel 2756A występował z podobną częstością (75,0%), jak w grupie kontrolnej (WR=0,89, $p=0,38$). Zaobserwowano podobną częstość występowania zmutowanego allele 2756G w podgrupie <37 tc. oraz w grupie kontrolnej (25% vs. 22,9% w grupie kontrolnej WR=1,12, $p=0,38$), jak również w podgrupie > 37 tc. (19,1%) w porównaniu do grupy kontrolnej (WR=0,79, $p=0,23$) (tab. 24).

Tab. 24. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na czas zakończenia ciąży ≥ 37 tc. i <37 tc. oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTR</i> 2756A>G	<i>Grupa badana (n=120)</i> <i>Hipotrofia płodu</i>				<i>Grupa kontrolna</i> <i>(n=120)</i>
	<i>Poród ≥ 37 tc. (n=68)</i>		<i>Poród <37 tc. (n=52)</i>		
<i>Genotypy</i>	wartość obserw. n (%)	WR (p)*	wartość obserw. n (%)	WR (p)**	wartość obserw. n (%)
<i>AA</i>	44 (64,7)	1,40 (0,18)	29 (55,8)	0,96 (0,52)	68 (56,7)
<i>AG</i>	22 (32,4)	0,69 (0,15)	20 (38,4)	0,90 (0,45)	49 (40,8)
<i>GG</i>	2 (2,9)	1,18 (0,59)	3 (5,8)	2,38 (0,26)	3 (2,5)
<i>suma</i>	68 (100,0)		52 (100,0)		120 (100,0)
<i>Allele</i>					
<i>A</i>	110 (80,9)	1,26 (0,23)	78 (75,0)	0,89 (0,38)	185 (77,1)
<i>G</i>	26 (19,1)	0,79 (0,23)	26 (25,0)	1,12 (0,38)	55 (22,9)
<i>suma</i>	136 (100,0)		104 (100,0)		240 (100,0)

W zakresie polimorfizmu $776C>G$ genu *TCII* wariant zawierający dwa allele niezmutowane $776CC$ występował w podobnej częstotliwości w grupie kontrolnej oraz w podgrupach pacjentek, których poród wystąpił ≥ 37 tc. (26,5% vs. 30,8 w grupie kontrolnej, $WR=0,81$, $p=0,32$), jak i w podgrupie kobiet rodzących <37 tc. (28,8 vs. 30,8%, $WR=0,91$, $p=0,47$). Genotyp heterozygotyczny $776CG$ natomiast w grupie kontrolnej występował najrzadziej (46,7%), w podgrupie ≥ 37 tc. w 55,9% ($WR=1,45$, $p=0,14$ oraz w podgrupie <37 tc. w 48,1% ($WR=1,06$, $p=0,49$). Wariant homozygotyczny zmutowany $776GG$ zaobserwowano nieznacznie rzadziej w podgrupie ≥ 37 tc. (17,6 vs. 22,5% w grupie kontrolnej, $WR=0,73$, $p=0,28$) oraz trochę częściej w podgrupie <37 tc. (23,1%, $WR=1,03$, $p=0,54$) (tab. 25).

Rozkład obu alleli w podgrupie ≥ 37 tc. był bardzo zbliżony do grupy kontrolnej (allele $776C$: 54,4 vs. 54,2%, $WR=1,01$, $p=0,53$, allele $776G$: 45,6 vs. 45,8%, $WR=0,99$, $p=0,53$). W podgrupie kobiet rodzących przed 37 tc. dla allele $776C$ również nie zaobserwowano znaczących różnic w porównaniu z grupą kontrolną (52,9%, $WR=0,94$, $p=0,46$), podobnie jak dla allele zmutowanego $776G$ (47,1%, $WR=1,05$, $p=0,46$) (tab. 25).

Tab. 25. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $776C>G$ genu *TCII* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na czas zakończenia ciąży ≥ 37 tc. i <37 tc. oraz w grupie kontrolnej.

<i>TCII</i> $776C>G$	<i>Grupa badana (n=120)</i> <i>Hipotrofia płodu</i>				<i>Grupa kontrolna</i> (n=120)
	<i>Poród ≥ 37 tc. (n=68)</i>		<i>Poród < 37 tc. (n=52)</i>		
<i>Genotypy</i>	wartość obserw. n (%)	WR (p)*	wartość obserw. n (%)	WR (p)**	wartość obserw. n (%)
<i>CC</i>	18 (26,5)	0,81 (0,32)	15 (28,8)	0,91 (0,47)	37 (30,8)
<i>CG</i>	38 (55,9)	1,45 (0,14)	25 (48,1)	1,06 (0,49)	56 (46,7)
<i>GG</i>	12 (17,6)	0,73 (0,28)	12 (23,1)	1,03 (0,54)	27 (22,5)
<i>suma</i>	68 (100,0)		52 (100,0)		120 (100,00)
<i>Allele</i>					
<i>C</i>	74 (54,4)	1,01 (0,53)	55 (52,9)	0,94 (0,46)	130 (54,2)
<i>G</i>	62 (45,6)	0,99 (0,53)	49 (47,1)	1,05 (0,46)	110 (45,8)
<i>suma</i>	136 (100,0)		104 (100,0)		240 (100,0)

Dla polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* przy porównaniu podgrupy z porodem ≥ 37 tc. z grupą kontrolną nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w częstości obserwowanych genotypu homozygotycznego niezmutowanego 66AA (21,3 vs. 19,2%, WR=1,14, $p=0,41$), heterozygotycznego 66AG (50,6 vs. 52,5%, WR=0,92, $p=0,45$) oraz zawierającego oba zmutowane allele 66GG (28,1 vs. 28,3%; WR=0,99, $p=0,55$). Rozkład alleli również był w obu grupach podobny: allel 66A (46,6 vs. 45,4%, WR=1,05, $p=0,44$) oraz allel 66G (53,4 vs. 54,6%, WR=0,95, $p=0,44$).

W podgrupie kobiet rodzących < 37 tc. rozkład genotypów w porównaniu z grupą kontrolną przedstawiał się następująco: 66AA (12,9 vs. 19,2%; WR=0,62, $p=0,30$), 66AG (51,6 vs. 52,5%, WR=0,96, $p=0,54$) oraz 66GG (35,5 vs. 28,3%, WR=1,39, $p=0,28$). Zmutowany allel 66G występował w tej grupie częściej (61,3%, WR=1,32, $p=0,21$), natomiast allel 66A rzadziej (38,7%) niż w grupie kontrolnej (45,4%, WR=0,76, $p=0,21$) (tab. 26).

Tab. 26. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na czas zakończenia ciąży ≥ 37 tc. i < 37 tc. oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTRR</i> 66A>G	<i>Grupa badana (n=120)</i> <i>Hipotrofia płodu</i>				<i>Grupa kontrolna</i> (n=120)
	<i>Poród ≥ 37 tc. (n=68)</i>		<i>Poród < 37 tc. (n=52)</i>		
<i>Genotypy</i>	wartość obserw. n (%)	WR (p)*	wartość obserw. n (%)	WR (p)**	wartość obserw. n (%)
<i>AA</i>	19 (21,3)	1,14 (0,41)	4 (12,9)	0,62 (0,30)	23 (19,2)
<i>AG</i>	45 (50,6)	0,92 (0,45)	16 (51,6)	0,96 (0,54)	63 (52,5)
<i>GG</i>	25 (28,1)	0,99 (0,55)	11 (35,5)	1,39 (0,28)	34 (28,3)
<i>suma</i>	89 (100,0)		31 (100,0)		120 (100,0)
<i>Allele</i>					
<i>A</i>	83 (46,6)	1,05 (0,44)	24 (38,7)	0,76 (0,21)	109 (45,4)
<i>G</i>	95 (53,4)	0,95 (0,44)	38 (61,3)	1,32 (0,21)	131 (54,6)
<i>suma</i>	178 (100,0)		62 (100,0)		240 (100,0)

4.6. ANALIZA PORÓWNAWCZA GENOTYPÓW I ALLELI BADANYCH POLIMORFIZMÓW W ZALEŻNOŚCI OD MASY URODZENIOWEJ NOWORODKA

W zakresie polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* w grupie kobiet, które urodziły dzieci z masą ≥ 1500 g zaobserwowano większą częstość występowania genotypu homozygotycznego zmutowanego 677TT (13,5 vs. 6,7%, WR=2,18, $p=0,08$). Natomiast częstość występowania zmutowanego allele 677T w tej grupie kobiet wynosiła 32,1% i była porównywalna do grupy kontrolnej (31,3%, WR=1,03, $p=0,47$) (tab. 27).

W grupie kobiet, które urodziły dzieci z masą <1500 g częstość zmutowanego genotypu 677TT wynosiła 6,5% w porównaniu do grupy kontrolnej 6,7% (WR=0,96, $p=0,66$). Również frekwencja zmutowanego allele 677T w badanej podgrupie (<1500 g) oraz w grupie kontrolnej nie różniła się istotnie statystycznie (25,8 vs. 31,3%, WR=0,77, $p=0,25$) (tab. 27).

Tab. 27. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na noworodki z urodzeniową masą ciała ≥ 1500 g i <1500 g oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> 677C>T	Grupa badana (n=120) Hipotrofia płodu				Grupa kontrolna (n=120)
	Noworodki ≥ 1500 g (n=89)		Noworodki <1500 g (n=31)		
Genotypy	wartość obserw. n (%)	WR (p)*	wartość obserw. n (%)	WR (p)**	wartość obserw. n (%)
CC	44 (49,4)	1,23 (0,27)	17 (54,8)	1,54 (0,19)	53 (44,1)
CT	33 (37,1)	0,61 (0,05)	12 (38,7)	0,65 (0,20)	59 (49,2)
TT	12 (13,5)	2,18 (0,08)	2 (6,5)	0,96 (0,66)	8 (6,7)
suma	89 (100,0)		31 (100,0)		120 (100,0)
Allele					
C	121 (67,9)	0,96 (0,47)	46 (74,2)	1,31 (0,25)	165 (68,7)
T	57 (32,1)	1,03 (0,47)	16 (25,8)	0,77 (0,25)	75 (31,3)
suma	178 (100,0)		62 (100,0)		240 (100,0)

W zakresie polimorfizmu $1298A>C$ *MTHFR* frekwencja zmutowanego genotypu *1298CC* w grupie kobiet, które urodziły dzieci w przedziale ≥ 1500 g zaobserwowano następującą częstość występowania genotypów: *1298 AA* 43,8%, *1298AC* 47,2%, *1298CC* 9,0%. Genotyp *1298CC* występował częściej w tej grupie w porównaniu do grupy kontrolnej (9,0 vs. 5,0%, $WR=1,88$, $p=0,19$). Częstość występowania alleli *1298A* oraz *1298C* była podobna w obydwu badanych grupach.

W podgrupie kobiet, które urodziły dzieci z masą <1500 g rozkład częstość genotypów przedstawiał się następująco: *1298AA* 48,4%, *1298AC* 48,4% oraz *1298CC* 3,2%. Był on porównywalny z rozkładem genotypów w grupie kontrolnej (48,3%, 46,7% oraz 5,0% odpowiednio dla genotypu *1298AA*, *1298AC* oraz *1298CC*). Różnice były statystycznie nieistotne. Również frekwencja alleli w tej podgrupie kobiet była podobna do frekwencji w grupie kontrolnej (allel *1298A*: 72,6 vs. 71,7%, allel *1298C*: 27,4 vs. 28,3%) (tab. 28).

Tab. 28. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $1298A>C$ genu *MTHFR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na noworodki z urodzeniową masą ciała ≥ 1500 g i <1500 g oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> <i>1298A>C</i>	<i>Grupa badana (n=120)</i> <i>Hipotrofia płodu</i>				<i>Grupa kontrolna</i> <i>(n=120)</i>
	<i>Noworodki ≥ 1500 g</i> <i>(n=89)</i>		<i>Noworodki <1500 g</i> <i>(n=31)</i>		
<i>Genotypy</i>	wartość obserw. n (%)	WR (p)*	wartość obserw. n (%)	WR (p)**	wartość obserw. n (%)
<i>AA</i>	39 (43,8)	0,83 (0,31)	15 (48,4)	1,01 (0,58)	58 (48,3)
<i>AC</i>	42 (47,2)	1,02 (0,57)	15 (48,4)	1,07 (0,51)	56 (46,7)
<i>CC</i>	8 (9,0)	1,88 (0,19)	1 (3,2)	0,63 (0,56)	6 (5,0)
<i>suma</i>	89 (100,0)		31 (100,0)		120 (100,0)
<i>Allele</i>					
<i>A</i>	120 (67,4)	0,81 (0,20)	45 (72,6)	1,04 (0,51)	172 (71,7)
<i>C</i>	58 (32,6)	1,22 (0,20)	17 (27,4)	0,95 (0,51)	68 (28,3)
<i>suma</i>	178 (100,0)		62 (100,0)		240 (100,0)

W zakresie polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* w grupie kobiet, które urodziły noworodki z masą ≥ 1500 g częstość genotypu typu dzikiego 1793GG wynosiła 86,5%, genotypu heterozygotycznego 1793GA 13,5%, Nie obserwowano występowania genotypu 1793AA w tej grupie kobiet. W tej grupie kobiet uwagę zwraca fakt dużej częstości występowania genotypu 1793GA (13,5%) w porównaniu do grupy kontrolnej (7,5%, WR=1,92, $p=0,12$). Również obserwowano większą częstość występowania zmutowanego allele 1793A w grupie kobiet z masą urodzeniową dzieci ≥ 1500 g (6,7%) w porównaniu do grupy kontrolnej (3,8%, WR=1,86, $p=0,12$) (tab. 29).

W podgrupie kobiet, które urodziły noworodki z masą < 1500 g obserwowano tylko wystąpienie genotypu homozygotycznego niezmutowanego 1793GG (100,0%) (tab. 29).

Tab. 29. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na noworodki z urodzeniową masą ciała ≥ 1500 g i < 1500 g oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFR</i> 1793G>A	<i>Grupa badana (n=120)</i> <i>Hipotrofia płodu</i>				<i>Grupa kontrolna</i> (n=120)
	<i>Noworodki ≥ 1500 g</i> (n=89)		<i>Noworodki < 1500 g</i> (n=31)		
<i>Genotypy</i>	wartość obserw. n (%)	WR (p)*	wartość obserw. n (%)	WR (p)**	wartość obserw. n (%)
<i>GG</i>	77 (86,5)	0,52 (0,12)	31 (100,0)	-	111 (92,5)
<i>GA</i>	12 (13,5)	1,92 (0,12)	0 (0,0)	-	9 (7,5)
<i>AA</i>	0 (0,0)	-	0 (0,0)	-	0 (0,0)
<i>suma</i>	89 (100,0)		31 (100,0)		120 (100,0)
<i>Allele</i>					
<i>G</i>	166 (93,3)	0,54 (0,12)	62 (100,0)	-	231 (96,2)
<i>A</i>	12 (6,7)	1,86 (0,12)	0 (0,0)	-	9 (3,8)
<i>suma</i>	178 (100,0)		62 (100,0)		240 (100,0)

W odniesieniu do polimorfizmu 1958G>A genu *MTHFD1* w grupie kobiet, które urodziły noworodki w przedziale ≥ 1500 g odnotowano następujący rozkład genotypów: 1958GG 30,3%, 1958GA 48,3%, 1958AA 21,4%. Częstości te były porównywalne do częstości występowania tych samych genotypów w grupie kontrolnej. Podobna obserwacja dotyczyła frekwencji alleli polimorfizmu 1958G>A genu *MTHFD1* w tej grupie kobiet (tab. 30).

W grupie kobiet, które urodziły noworodki z masą <1500 g częstość występowania genotypu 1958GG wynosiła 32,3 vs. 26,7% ($p=0,34$), genotypu 1958GA 54,8 vs. 52,5 oraz genotypu 1958AA 12,9 vs. 20,8%. Żadna różnica nie była istotna statystycznie (tab. 30).

Tab. 30. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 1958G>A genu *MTHFD1* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na noworodki z urodzeniową masą ciała ≥ 1500 g i <1500 g oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFD1</i> 1958G>A	<i>Grupa badana (n=120)</i> <i>Hipotrofia płodu</i>				<i>Grupa kontrolna</i> <i>n=120</i>
	<i>Noworodki ≥ 1500 g</i> <i>(n=89)</i>		<i>Noworodki <1500 g</i> <i>(n=31)</i>		
<i>Genotypy</i>	wartość obserw. n (%)	WR (p)*	wartość obserw. n (%)	WR (p)**	wartość obserw. n (%)
<i>GG</i>	27 (30,3)	1,19 (0,33)	10 (32,3)	1,31 (0,34)	32 (26,7)
<i>GA</i>	43 (48,3)	0,85 (0,32)	17 (54,8)	1,09 (0,49)	63 (52,5)
<i>AA</i>	19 (21,4)	1,03 (0,53)	4 (12,9)	0,56 (0,23)	25 (20,8)
<i>suma</i>	89 (100,0)		31 (100,0)		120 (100,0)
<i>Allele</i>					
<i>G</i>	97 (54,5)	1,06 (0,41)	37 (59,7)	1,31 (0,21)	127 (52,9)
<i>A</i>	81 (45,5)	0,93 (0,41)	25 (40,3)	0,76 (0,21)	113 (47,1)
<i>suma</i>	178 (100,0)		62 (100,0)		240 (100,0)

Analizując polimorfizm 401G>A genu *MTHFD1* w grupie kobiet z masą urodzeniową dzieci ≥ 1500 g potwierdzono mniejszą częstość występowania genotypu 401GG w porównaniu do grupy kontrolnej (51,7 vs. 65,8%, WR=0,55, $p=0,03$). Występowanie genotypu heterozygotycznego 401GA odnotowano częściej w tej grupie kobiet (39,3 vs. 30,8%, WR=1,45, $p=0,13$). Również genotyp 401AA występował częściej w grupie badanej kobiet z masą noworodków ≥ 1500 g (9,0 vs. 3,4%, WR=2,86, $p=0,07$). Ciekawą obserwacją było również odnotowanie większej częstości zmutowanego allele 401A w tej grupie kobiet (28,7 vs. 18,8%, WR=1,74, $p=0,01$) (tab. 31).

Natomiast w grupie kobiet, które urodziły dzieci z masą < 1500 g nie odnotowano znaczących różnic pomiędzy częstością poszczególnych genotypów badanego polimorfizmu (tab. 31).

Tab. 31. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 401G>A genu *MTHFD1* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na noworodki z urodzeniową masą ciała ≥ 1500 g i < 1500 g oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTHFD1</i> 401G>A	<i>Grupa badana (n=120)</i> <i>Hipotrofia płodu</i>				<i>Grupa kontrolna</i> (n=120)
	<i>Noworodki ≥ 1500 g</i> (n=89)		<i>Noworodki < 1500 g</i> (n=31)		
<i>Genotypy</i>	wartość obserw. n (%)	WR (p)*	wartość obserw. n (%)	WR (p)**	wartość obserw. n (%)
GG	46 (51,7)	0,55 (0,03)	18 (58,1)	0,71 (0,27)	79 (65,8)
GA	35 (39,3)	1,45 (0,13)	12 (38,7)	1,41 (0,26)	37 (30,8)
AA	8 (9,0)	2,86 (0,07)	1 (3,2)	0,97 (0,72)	4 (3,4)
<i>suma</i>	89 (100,0)		31 (100,0)		120 (100,0)
<i>Allele</i>					
G	127 (71,3)	0,57 (0,01)	48 (77,4)	0,79 (0,30)	195 (81,2)
A	51 (28,7)	1,74 (0,01)*	14 (22,6)	1,26 (0,30)	45 (18,8)
<i>suma</i>	178 (100,0)		62 (100,0)		240 (100,0)

Analizując polimorfizm 2756A>G genu *MTR* w podgrupach kobiet, w zależności od masy ciała noworodków uzyskano następujące częstości występowania genotypów 2756AA 68,2% w podgrupie ≥ 1500 g vs. 56,7% w grupie kontrolnej (WR=1,67, $p=0,05$), natomiast w podgrupie < 1500 g 38,7 vs. 56,7% (WR=0,48, $p=0,05$). Wariant 2756AG zawierający jeden zmutowany allel, występował częściej w grupie kontrolnej (40,8%) niż w podgrupie ≥ 1500 g (28,1%, WR=0,57, $p=0,04$), natomiast w podgrupie < 1500 g występował najczęściej (54,8%, WR=1,76, $p=0,12$). Genotyp homozygotyczny zmutowany 2756GG obserwowano częściej w obu badanych podgrupach kobiet w porównaniu do grupy kontrolnej, u których był obecny u 2,5% badanych. U rodzących noworodki z masą ≥ 1500 g wystąpił u 3,4% kobiet (WR=1,36, $p=0,51$), natomiast u rodzących noworodki z masą < 1500 g występował ponad dwukrotnie częściej (6,3%) niż w grupie kontrolnej (WR=4,11, $p=0,16$) (tab. 32).

Rozkład alleli dla tego polimorfizmu przedstawiał się następująco: częstość allela 2756A w podgrupie ≥ 1500 g wynosiła 82,6%, w podgrupie < 1500 g wynosiła 66,1%, a w grupie kontrolnej 77,1% (odpowiednio: WR=1,41, $p=0,11$ oraz WR=0,58, $p=0,05$). Zmutowany allel 2756G był obserwowany rzadziej w podgrupie ≥ 1500 g w porównaniu do kontroli (17,4 vs. 23,0%, WR=0,71, $p=0,11$), natomiast w podgrupie < 1500 g występował częściej niż w grupie kontrolnej (33,9 vs. 23,0%, WR=1,72, $p=0,05$) (tab. 32).

Tab. 32. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na noworodki z urodzeniową masą ciała ≥ 1500 g i < 1500 g oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTR</i> 2756A>G	<i>Grupa badana (n=120)</i> <i>Hipotrofia płodu</i>				<i>Grupa kontrolna</i> <i>(n=120)</i>
	<i>Noworodki ≥ 1500 g</i> <i>(n=89)</i>		<i>Noworodki < 1500 g</i> <i>(n=31)</i>		
<i>Genotypy</i>	wartość obserwow. n (%)	WR (p)*	wartość obserwow. n (%)	WR (p)**	wartość obserwow. n (%)
AA	61 (68,5)	1,67 (0,05)	12 (38,7)	0,48 (0,05)	68 (56,7)
AG	25 (28,1)	0,57 (0,04)	17 (54,8)	1,76 (0,12)	49 (40,8)
GG	3 (3,4)	1,36 (0,51)	2 (6,5)	4,11 (0,16)	3 (2,5)
<i>suma</i>	89 (100,0)		31 (100,0)		120 (100,0)
<i>Allele</i>					
A	147 (82,6)	1,41 (0,11)	41 (66,1)	0,58 (0,05)	185 (77,1)
G	31 (17,4)	0,71 (0,11)	21 (33,9)	1,72 (0,05)*	55 (23,0)
<i>suma</i>	178 (100,0)		62 (100,0)		240 (100,0)

Genotyp homozygotyczny niezmutowany 776CC występował u 30,8% badanych z grupy kontrolnej oraz u 28,1% z grupy ≥ 1500 g (WR=0,87, $p=0,39$) oraz u 25,8% z grupy < 1500 g (WR=0,78, $p=0,38$). Heterozygotyczny wariant 776CG uzyskano dla 57,3% matek z grupy ≥ 1500 g, w grupie kontrolnej dla 46,7% (WR=1,53, $p=0,08$). W drugiej podgrupie zaobserwowano 38,7% osób z tym genotypem (WR=0,72, $p=0,28$). Genotyp homozygotyczny zmutowany 776GG obserwowano u większej liczby pacjentek z grupy < 1500 g (35,5%) w porównaniu do grupy kontrolnej (22,5%) (WR=1,89, $p=0,10$, natomiast w grupie ≥ 1500 g u mniejszej liczby kobiet (14,8%, WR=0,59, $p=0,10$) (tab. 33).

Rozkład alleli w grupie kobiet rodzących noworodki z masą ≥ 1500 g i w grupie kontrolnej był podobny: allel 776C 56,8 vs. 54,2% (WR=1,11, $p=0,33$), allel 776G 43,2 vs. 45,8% (WR=0,90, $p=0,33$). Natomiast w grupie matek dzieci z masą urodzeniową < 1500 g allel 776C występował rzadziej niż w grupie kontrolnej (45,2 vs. 54,2%; WR=0,69, $p=0,13$), a allel 776G częściej (54,8 vs. 45,8%; WR=1,44, $p=0,13$) (tab. 33).

Tab. 33. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 776C>G genu *TCII* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na noworodki z urodzeniową masą ciała ≥ 1500 g i < 1500 g oraz w grupie kontrolnej.

<i>TCII</i> 776C>G	<i>Grupa badana (n=120)</i> <i>Hipotrofia płodu</i>				<i>Grupa kontrolna</i> (n=120)
	<i>Noworodki ≥ 1500 g</i> (n=89)		<i>Noworodki < 1500 g</i> (n=31)		
<i>Genotypy</i>	wartość obserw. n (%)	WR (p)*	wartość obserw. n (%)	WR (p)**	wartość obserw. n (%)
<i>CC</i>	25 (28,1)	0,87 (0,39)	8 (25,8)	0,78 (0,38)	37 (30,8)
<i>CG</i>	51 (57,3)	1,53 (0,08)	12 (38,7)	0,72 (0,28)	56 (46,7)
<i>GG</i>	13 (14,6)	0,59 (0,10)	11 (35,5)	1,89 (0,10)	27 (22,5)
<i>suma</i>	89 (100,0)		31 (100,0)		120 (100,00)
<i>Allele</i>					
<i>C</i>	101 (56,8)	1,11 (0,33)	28 (45,2)	0,69 (0,13)	130 (54,2)
<i>G</i>	77 (43,2)	0,90 (0,33)	34 (54,8)	1,44 (0,13)	110 (45,8)
<i>suma</i>	178 (100,0)		62 (100,0)		240 (100,0)

W zakresie polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* zaobserwowano podobną częstość występowania genotypu zawierającego oba allele typu dzikiego 66AA w podgrupie noworodków z masą urodzeniową ≥ 1500 g w porównaniu do grupy kontrolnej (22,1 vs. 19,2%, WR=1,19, $p=0,38$) oraz podobną częstość pacjentek z tym genotypem w grupie matek noworodków z masą < 1500 g (15,4%; WR=0,77, $p=0,36$). Genotyp heterozygotyczny 66AG występował u podobnej liczby pacjentek we wszystkich grupach: w grupie kontrolnej (52,5%), w podgrupie ≥ 1500 g u 48,5% (WR=0,85, $p=0,36$), a w podgrupie < 1500 g u 53,8% badanych (WR=1,05, $p=0,51$). Częstość występowania genotypu z dwoma zmutowanymi allelami 66GG była podobna w podgrupie ≥ 1500 g i w kontroli (29,4 vs. 28,3%, WR=1,05, $p=0,51$), jak również w grupie < 1500 g (30,8%, WR=1,12, $p=0,44$) (tab. 34).

Rozkład alleli w podgrupie 68 matek noworodków ≥ 1500 g i w kontrolnej był zbliżony: allel 66A: 46,3 vs. 45,4% (WR=1,04, $p=0,47$), allel 66G: 53,7 vs. 54,6%, WR=0,96, $p=0,47$). W drugiej podgrupie < 1500 g częściej występował allel zmutowany 66G (57,7%, WR=1,13, $p=0,34$) oraz rzadziej allel 66A (42,3%, WR=0,88, $p=0,34$) (tab. 34).

Tab. 34. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na noworodki z urodzeniową masą ciała ≥ 1500 g i < 1500 g oraz w grupie kontrolnej.

<i>MTRR</i> 66A>G	<i>Grupa badana (n=120)</i> <i>Hipotrofia płodu</i>				<i>Grupa kontrolna</i> (n=120)
	<i>Noworodki ≥ 1500 g</i> (n=89)		<i>Noworodki < 1500 g</i> (n=31)		
<i>Genotypy</i>	wartość obserw. n (%)	WR (p)*	wartość obserw. n (%)	WR (p)**	wartość obserw. n (%)
AA	15 (22,1)	1,19 (0,38)	8 (15,4)	0,77 (0,36)	23 (19,2)
AG	33 (48,5)	0,85 (0,36)	28 (53,8)	1,05 (0,51)	63 (52,5)
GG	20 (29,4)	1,05 (0,51)	16 (30,8)	1,12 (0,44)	34 (28,3)
<i>suma</i>	68 (100,0)		52 (100,0)		120 (100,0)
<i>Allele</i>					
A	63 (46,3)	1,04 (0,47)	44 (42,3)	0,88 (0,34)	109 (45,4)
G	73 (53,7)	0,96 (0,47)	60 (57,7)	1,13 (0,34)	131 (54,6)
<i>suma</i>	136 (100,0)		104 (100,0)		240 (100,0)

4.7. WSPÓLWYSTĘPOWANIE GENOTYPÓW ANALIZOWANYCH W PRACY POLIMORFIZMÓW W POSZCZEGÓLNYCH BADANYCH GRUPACH

W następnym etapie przeprowadzono analizę współwystępowania poszczególnych genotypów wszystkich badanych w pracy polimorfizmów genetycznych. Przede wszystkim przeprowadzono analizę współwystępowania genotypów genów *MTHFR* (badano 3 polimorfizmy) oraz *MTHFD1* (badano 2 polimorfizmy). Następnie badano współwystępowanie genotypów wszystkich pozostałych polimorfizmów.

Podczas analizy współwystępowania genotypów polimorfizmów *677C>T* oraz *1298A>C* nie zaobserwowano żadnych różnic statystycznie istotnych pomiędzy grupą badaną i kontrolną (tab. 35).

Tab. 35. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *677C>T* oraz *1298A>C* genu *MTHFR* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTHFR 1298A>C</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>AA</i>	<i>AC</i>	<i>CC</i>	
<i>Grupa badana Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFR 677C>T</i>	<i>CC</i>	14 (11,7)	38 (31,6)	9 (7,5)	61 (50,8)
		<i>CT</i>	26 (21,6)	19 (15,9)	0 (0,0)	45 (37,5)
		<i>TT</i>	14 (11,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	14 (11,7)
		<i>suma</i>	54 (45,0)	57 (47,5)	9 (7,5)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFR 677C>T</i>	<i>CC</i>	14 (11,6)	33 (27,5)	6 (5,0)	53 (44,1)
		<i>CT</i>	36 (30,0)	23 (19,2)	0 (0,0)	59 (49,2)
		<i>TT</i>	8 (6,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (6,7)
		<i>suma</i>	58 (48,3)	56 (46,7)	6 (5,0)	120 (100,0)

Analiza współwystępowania genotypów polimorfizmów 677C>T oraz 1793G>A genu *MTHFR* wykazała wyższą częstość występowania kombinacji genotypów 677CT / 1793GG w grupie kontrolnej (45,0 vs. 34,1%, WR=0,63, PU 0,36-1,10, $p=0,05$). Ciekawą obserwacją było również odnotowanie większej frekwencji kombinacji genotypów 677TT / 1793GG (z obecnością zmutowanego genotypu 677TT) w grupie badanej z hipotrofią płodu (11,7 vs. 6,7%, WR=1,85 PU 0,69-5,29, $p=0,13$) oraz kombinacji genotypów 677CC / 1793GA, która z większą częstością występowała w grupie badanej (6,6 vs. 3,3%, WR=2,07, PU 0,53-9,64, $p=0,18$ (tab. 36).

Tab. 36. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 677C>T oraz 1793G>A genu *MTHFR* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTHFR</i> 1793G>A			<i>Ogółem</i>
			<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	
<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia</i> <i>płodu</i>	<i>MTHFR</i> 677C>T	<i>CC</i>	53 (44,2)	8 (6,6)	0 (0,0)	61 (50,8)
		<i>CT</i>	41 (34,1)*	4 (3,4)	0 (0,0)	45 (37,5)
		<i>TT</i>	14 (11,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	14 (11,7)
		<i>suma</i>	108 (90,0)	12 (10,0)	0 (0,0)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFR</i> 677C>T	<i>CC</i>	49 (40,8)	4 (3,3)	0 (0,0)	53 (44,1)
		<i>CT</i>	54 (45,0)*	5 (4,2)	0 (0,0)	59 (49,2)
		<i>TT</i>	8 (6,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	8 (6,7)
		<i>suma</i>	111 (92,5)	9 (7,5)	0 (0,0)	120 (100,0)

* $p=0,05$

Analiza współwystępowania genotypów 1298A>C oraz 1793G>A genu *MTHFR* nie pokazała żadnych różnic statystycznie istotnych pomiędzy badanymi grupami kobiet zdrowych ciężarnych oraz matek dzieci z hipotrofią (tab. 37).

Tab. 37. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1298A>C oraz 1793G>A genu *MTHFR* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTHFR 1793G>A</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	
<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFR</i> <i>1298A>C</i>	<i>AA</i>	54 (45,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	54 (45,0)
		<i>AC</i>	48(40,0)	9 (7,5)	0 (0,0)	57 (47,5)
		<i>CC</i>	6 (5,0)	3 (2,5)	0 (0,0)	9 (7,5)
		<i>suma</i>	108 (90,0)	12 (10,0)	0 (0,0)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFR</i> <i>1298A>C</i>	<i>AA</i>	58 (48,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	58 (48,3)
		<i>AC</i>	48 (40,0)	8 (6,7)	0 (0,0)	56 (46,7)
		<i>CC</i>	5 (4,2)	1 (0,8)	0 (0,0)	6 (5,0)
		<i>suma</i>	111 (92,5)	9 (7,5)	0 (0,0)	120 (100,0)

Najciekawsze wyniki otrzymano we współwystępowaniu polimorfizmów 1958G>A oraz 401G>A genu *MTHFD1*. W tej grupie odnotowano różnicę w częstości kombinacji genotypów 1958GA / 401GG pomiędzy grupą badaną ,a grupą kontrolną (36,6 vs. 24,1%, WR=0,55, PU 0,30-0,99, $p=0,02$). Interesująca była również obserwacja większej frekwencji kombinacji genotypów heterozygotycznego oraz zmutowanego 1958GA / 401AA w grupie badanej z hipotrofią płodu (5,9 vs. 0,9%, WR=7,37, PU 0,30-0,99, $p=0,03$) (tab. 38).

Tab. 38. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1958G>A oraz 401G>A genu *MTHFD1* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTHFD1 401G>A</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	
<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFD1</i> <i>1958G>A</i>	<i>GG</i>	21 (17,5)	15 (12,5)	1 (0,8)	37 (30,8)
		<i>GA</i>	29 (24,1)*	24 (20,0)	7 (5,9)**	60 (50,0)
		<i>AA</i>	14 (11,7)	8 (6,7)	1 (0,8)	23 (19,2)
		<i>suma</i>	64 (53,3)	47 (39,2)	9 (7,5)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFD1</i> <i>1958G>A</i>	<i>GG</i>	16 (13,4)	13 (10,8)	3 (2,5)	32 (26,7)
		<i>GA</i>	44 (36,6)*	18 (15,0)	1 (0,9)**	63 (52,5)
		<i>AA</i>	19 (15,8)	6 (5,0)	0 (0,0)	25 (20,8)
		<i>suma</i>	79 (65,8)	37 (30,8)	4 (3,4)	120 (100,0)

* $p=0,02$, ** $p=0,03$

W przypadku analizy polimorfizmów 677C>T genu *MTHFR* oraz 1958G>A genu *MTHFD1* w badanych grupach kobiet wskazano, że kombinacja genotypów 677TT / 1958GG (z obecnością genotypu zmutowanego 677TT) występowała częściej w grupie badanej z hipotrofią płodu (5,0 vs. 1,7%, PU 0,53-31,94, $p=0,14$) (tab. 39).

Tab. 39. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 677C>T genu *MTHFR* oraz 1958G>A genu *MTHFD1* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTHFD1</i> 1958G>A			Ogółem
			GG	GA	AA	
Grupa badana <i>Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFR</i> 677C>T	CC	17 (14,1)	33 (27,5)	11 (9,2)	61 (50,8)
		CT	14 (11,7)	22 (18,3)	9 (7,5)	45 (37,5)
		TT	6 (5,0)	5 (4,2)	3 (2,5)	14 (11,7)
		suma	37 (30,8)	60 (50,0)	23 (19,2)	120 (100,0)
Grupa kontrolna	<i>MTHFR</i> 677C>T	CC	12 (10,0)	31 (25,8)	10 (8,3)	53 (44,1)
		CT	18 (15,0)	27 (22,5)	14 (11,7)	59 (49,2)
		TT	2 (1,7)	5 (4,2)	1 (0,8)	8 (6,7)
		suma	32 (26,7)	63 (52,5)	25 (20,8)	120 (100,0)

Badanie współwystępowania genotypów 677C>T genu *MTHFR* oraz 401G>A genu *MTHFD1* pokazało na znaczenie obecności genotypu 677TT w grupie z hipotrofią płodu (5,0 vs. 1,6, WR=3,10, PU 0,53-31,94, $p=0,14$) (tab. 40).

Tab. 40. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 677C>T genu *MTHFR* oraz 401G>A genu *MTHFD1* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTHFD1</i> 401G>A			Ogółem
			GG	GA	AA	
Grupa badana <i>Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFR</i> 677C>T	CC	35 (29,1)	20 (16,7)	6 (5,0)	61 (50,8)
		CT	21 (17,5)	21 (17,5)	3 (2,5)	45 (37,5)
		TT	8 (6,7)	6 (5,0)	0 (0,0)	14 (11,7)
		suma	64 (53,3)	47 (39,2)	9 (7,5)	120 (100,0)
Grupa kontrolna	<i>MTHFR</i> 677C>T	CC	35 (29,1)	17 (14,1)	1 (0,9)	53 (44,1)
		CT	39 (32,5)	18 (15,0)	2 (1,7)	59 (49,2)
		TT	5 (4,2)	2 (1,7)	1 (0,8)	8 (6,7)
		suma	79 (65,8)	37 (30,8)	4 (3,4)	120 (100,0)

W dalszym etapie badano współwystępowanie polimorfizmów 677C>T genu *MTHFR* oraz 2756A>G genu *MTR* w obydwu grupach kobiet. Odnotowano większą częstość współwystępowania genotypów 677CT / 2756AG w grupie kontrolnej 20,8 vs. 11,6% w grupie badanej (WR=0,50, PU 0,22-1,07, $p=0,04$) (tab. 41).

Tab. 41. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 677C>T genu *MTHFR* oraz 2756A>G genu *MTR* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTR 2756A>G</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFR 677C>T</i>	<i>CC</i>	38 (31,6)	21 (17,5)	2 (1,7)	61 (50,8)
		<i>CT</i>	29 (24,2)	14 (11,6)*	2 (1,7)	45 (37,5)
		<i>TT</i>	6 (5,0)	7 (5,9)	1 (0,8)	14 (11,7)
		<i>suma</i>	73 (60,8)	42 (35,0)	5 (4,2)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFR 677C>T</i>	<i>CC</i>	27 (22,4)	23 (19,2)	3 (2,5)	53 (44,1)
		<i>CT</i>	34 (28,4)	25 (20,8)*	0 (0,0)	59 (49,2)
		<i>TT</i>	7 (5,9)	1 (0,8)	0 (0,0)	8 (6,7)
		<i>suma</i>	68 (56,7)	49 (40,8)	3 (2,5)	120 (100,0)

* $p=0,04$

Podczas analizy polimorfizmów 677C>T genu *MTHFR* oraz 66A>G genu *MTRR* nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych we współwystępowaniu kolejno analizowanych kombinacji genotypów wariantów genetycznych (42).

Tab. 42. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 677C>T genu *MTHFR* oraz 66A>G genu *MTRR* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTRR 66A>G</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFR 677C>T</i>	<i>CC</i>	11 (9,2)	32 (26,6)	18 (15,0)	61 (50,8)
		<i>CT</i>	8 (6,7)	23 (19,2)	14 (11,6)	45 (37,5)
		<i>TT</i>	4 (3,3)	6 (5,0)	4 (3,4)	14 (11,7)
		<i>suma</i>	23 (19,2)	61 (50,8)	36 (30,0)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFR 677C>T</i>	<i>CC</i>	15 (12,5)	24 (20,0)	14 (11,6)	53 (44,1)
		<i>CT</i>	6 (5,0)	35 (29,2)	18 (15,0)	59 (49,2)
		<i>TT</i>	2 (1,7)	4 (3,3)	2 (1,7)	8 (6,7)
		<i>suma</i>	23 (19,2)	63 (52,5)	34 (28,3)	120 (100,0)

W przypadku polimorfizmów 677C>T genu *MTHFR* oraz 776C>G genu *TCII* zaobserwowano częste współwystępowanie kombinacji genotypów 677TT / 776CG w grupie z hipotrofią (10,0 vs. 2,5%, WR=4,33, PU 1,12-24,43, $p=0,01$) (tab. 43).

Tab. 43. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 677C>T genu *MTHFR* oraz 776C>G genu *TCII* w badanych grupach kobiet.

			<i>TCII 776C>G</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFR 677C>T</i>	<i>CC</i>	17 (14,2)	30 (25,0)	14 (11,6)	61 (50,8)
		<i>CT</i>	16 (13,3)	21 (17,5)	8 (6,7)	45 (37,5)
		<i>TT</i>	0 (0,0)	12 (10,0)*	2 (1,7)	14 (11,7)
		<i>suma</i>	33 (27,5)	63 (52,5)	24 (20,0)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFR 677C>T</i>	<i>CC</i>	16 (13,3)	22 (18,3)	15 (12,5)	53 (44,1)
		<i>CT</i>	19 (15,8)	31 (25,9)	9 (7,5)	59 (49,2)
		<i>TT</i>	2 (1,7)	3 (2,5)*	3 (2,5)	8 (6,7)
		<i>suma</i>	37 (30,8)	56 (46,7)	27 (22,5)	120 (100,0)

* $p=0,01$

W czasie analizy polimorfizmów 1298A>C genu *MTHFR* oraz 1958G>A genu *MTHFD1* w badanych grupach kobiet nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych pomiędzy badanymi grupami kobiet (tab. 44).

Tab. 44. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1298A>C genu *MTHFR* oraz 1958G>A genu *MTHFD1* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTHFD1 1958G>A</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	
<i>Grupa badana Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFR 1298A>C</i>	<i>AA</i>	15 (12,5)	27 (22,5)	12 (10,0)	54 (45,0)
		<i>AC</i>	18 (15,0)	30 (25,0)	9 (7,5)	57 (47,5)
		<i>CC</i>	4 (3,3)	3 (2,5)	2 (1,7)	9 (7,5)
		<i>suma</i>	37 (30,8)	60 (50,0)	23 (19,2)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFR 1298A>C</i>	<i>AA</i>	19 (15,8)	28 (23,3)	11 (9,2)	58 (48,3)
		<i>AC</i>	12 (10,0)	32 (26,7)	12 (10,0)	56 (46,7)
		<i>CC</i>	1 (0,9)	3 (2,5)	2 (1,6)	6 (5,0)
		<i>suma</i>	32 (26,7)	63 (52,5)	25 (20,8)	120 (100,0)

Podczas analizy polimorfizmów 1298A>C genu *MTHFR* oraz 401G>A genu *MTHFD1* najbardziej interesującą było odnotowanie znacznej przewagi kombinacji genotypów 1298AC / 401GA (z obecnością zmutowanych alleli obydwu badanych polimorfizmów) w grupie z hipotrofią (19,2 vs. 10,9%, WR=1,95, PU 0,89-4,43, $p=0,05$) (tab. 45).

Tab. 45. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1298A>C genu *MTHFR* oraz 401G>A genu *MTHFD1* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTHFD1 401G>A</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	
<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFR</i> 1298A>C	<i>AA</i>	28 (23,3)	21 (17,5)	5 (4,2)	54 (45,0)
		<i>AC</i>	31 (25,8)	23 (19,2)*	3 (2,5)	57 (47,5)
		<i>CC</i>	5 (4,2)	3 (2,5)	1 (0,8)	9 (7,5)
		<i>suma</i>	64 (53,3)	47 (39,2)	9 (7,5)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFR</i> 1298A>C	<i>AA</i>	34 (28,3)	23 (19,1)	1 (0,9)	58 (48,3)
		<i>AC</i>	40 (33,3)	13 (10,9)*	3 (2,5)	56 (46,7)
		<i>CC</i>	5 (4,2)	1 (0,8)	0 (0,0)	6 (5,0)
		<i>suma</i>	79 (65,8)	37 (30,8)	4 (3,4)	120 (100,0)

* $p=0,05$

Przy porównywaniu współwystępowania polimorfizmów 1298A>C genu *MTHFR* oraz 2756A>G genu *MTR* nie stwierdzono żadnych różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi grupami kobiet (tab. 46).

Tab. 46. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1298A>C genu *MTHFR* oraz 2756A>G genu *MTR* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTR 2756A>G</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFR</i> 1298A>C	<i>AA</i>	28 (23,3)	23 (19,2)	3 (2,5)	54 (45,0)
		<i>AC</i>	40 (33,3)	15 (12,5)	2 (1,7)	57 (47,5)
		<i>CC</i>	5 (4,2)	4 (3,3)	0 (0,0)	9 (7,5)
		<i>suma</i>	73 (60,8)	42 (35,0)	5 (4,2)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFR</i> 1298A>C	<i>AA</i>	33 (27,5)	25 (20,8)	0 (0,0)	58 (48,3)
		<i>AC</i>	32 (26,7)	22 (18,3)	2 (1,7)	56 (46,7)
		<i>CC</i>	3 (2,5)	2 (1,7)	1 (0,8)	6 (5,0)
		<i>suma</i>	68 (56,7)	49 (40,8)	3 (2,5)	120 (100,0)

Jedyną zaobserwowaną różnicą statystycznie istotną podczas analizy polimorfizmów 1298A>C genu *MTHFR* oraz 66A>G genu *MTRR* w badanych grupach było odnotowanie większej częstości genotypów 1298CC / 66AG w grupie z hipotrofią (5,8 vs. 0,8, WR=7,37, $p=0,03$; ponieważ obserwacja ta odnosiła się do bardzo małych liczebnie grup $n=7$ vs. $n=1$, to przedział ufności dla wartości WR wynosił: PU 0,91-334,95) (tab. 47).

Tab. 47. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1298A>C genu *MTHFR* oraz 66A>G genu *MTRR* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTRR 66A>G</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFR</i> 1298A>C	<i>AA</i>	13 (10,8)	26 (21,7)	15 (12,5)	54 (45,0)
		<i>AC</i>	9 (7,5)	28 (23,3)	20 (16,7)	57 (47,5)
		<i>CC</i>	1 (0,8)	7 (5,8)*	1 (0,8)	9 (7,5)
		<i>suma</i>	23 (19,2)	61 (50,8)	36 (30,0)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFR</i> 1298A>C	<i>AA</i>	7 (5,9)	36 (30,0)	15 (12,4)	58 (48,3)
		<i>AC</i>	16 (13,3)	26 (21,7)	14 (11,7)	56 (46,7)
		<i>CC</i>	0 (0,0)	1 (0,8)*	5 (4,2)	6 (5,0)
		<i>suma</i>	23 (19,2)	63 (52,5)	34 (28,3)	120 (100,0)

* $p=0,03$

Analiza polimorfizmów 1298A>C genu *MTHFR* oraz 776C>G genu *TCII* w badanych grupach kobiet nie potwierdziła różnic statystycznie istotnych (tab. 48).

Tab. 48. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1298A>C genu *MTHFR* oraz 776C>G genu *TCII* w badanych grupach kobiet.

			<i>TCII 776C>G</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFR</i> 1298A>C	<i>AA</i>	14 ((11,7)	31 (25,8)	9 (7,5)	54 (45,0)
		<i>AC</i>	17 (14,1)	26 (21,7)	14 (11,7)	57 (47,5)
		<i>CC</i>	2 (1,7)	6 (5,0)	1 (0,8)	9 (7,5)
		<i>suma</i>	33 (27,5)	63 (52,5)	24 (20,0)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFR</i> 1298A>C	<i>AA</i>	17 (14,1)	28 (23,4)	13 (10,8)	58 (48,3)
		<i>AC</i>	18 (15,0)	25 (20,8)	13 (10,9)	56 (46,7)
		<i>CC</i>	2 (1,7)	3 (2,5)	1 (0,8)	6 (5,0)
		<i>suma</i>	37 (30,8)	56 (46,7)	27 (22,5)	120 (100,0)

Podczas analizy współwystępowania poszczególnych genotypów polimorfizmów 1793G>A genu *MTHFR* oraz 1958G>A genu *MTHFD1* pomiędzy nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w częstości kombinacji genotypów (tab. 49).

Tab. 49. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1793G>A genu *MTHFR* oraz 1958G>A genu *MTHFD1* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTHFD1 1958G>A</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	
<i>Grupa badana Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFR 1793G>A</i>	<i>GG</i>	35 (29,2)	51 (42,5)	22 (18,3)	108 (90,0)
		<i>GA</i>	2 (1,6)	9 (7,5)	1 (0,9)	12 (10,0)
		<i>AA</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		<i>suma</i>	37 (30,8)	60 (50,0)	23 (19,2)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFR 1793G>A</i>	<i>GG</i>	31 (25,9)	58 (48,3)	22 (18,3)	111 (92,5)
		<i>GA</i>	1 (0,8)	5 (4,2)	3 (2,5)	9 (7,5)
		<i>AA</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		<i>suma</i>	32 (26,7)	63 (52,5)	25 (20,8)	120 (100,0)

Analiza polimorfizmów 1793G>A genu *MTHFR* oraz 401G>A genu *MTHFD1* pomiędzy badanymi grupami kobiet pokazała większą częstość występowania kombinacji genotypów 1793GG / 401GG (z obecnością niezmutowanych alleli) w grupie kontrolnej zdrowych kobiet ciężarnych (60,8 vs. 47,5%, WR=0,58, PU 0,34-1,00, $p=0,025$) (tab. 50).

Tab. 50. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1793G>A genu *MTHFR* oraz 401G>A genu *MTHFD1* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTHFD1 401G>A</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	
<i>Grupa badana Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFR 1793G>A</i>	<i>GG</i>	57 (47,5)*	44 (36,7)	7 (5,8)	108 (90,0)
		<i>GA</i>	7 (5,8)	3 (2,5)	2 (1,7)	12 (10,0)
		<i>AA</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		<i>suma</i>	64 (53,3)	47 (39,2)	9 (7,5)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFR 1793G>A</i>	<i>GG</i>	73 (60,8)*	34 (28,3)	4 (3,4)	111 (92,5)
		<i>GA</i>	6 (5,0)	3 (2,5)	0 (0,0)	9 (7,5)
		<i>AA</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		<i>suma</i>	79 (65,8)	37 (30,8)	4 (3,4)	120 (100,0)

* $p=0,025$

Dla analizy polimorfizmów 1793G>A genu *MTHFR* oraz 2756A>G genu *MTR* pomiędzy badanymi grupami kobiet zaobserwowano większą częstość występowania genotypów 1793GA / 2756AA w grupie kobiet z hipotrofią (8,3 vs. 3,4%, WR=2,63, PU 0,73-11,81, $p=0,08$) (tab. 51).

Tab. 51. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1793G>A genu *MTHFR* oraz 2756A>G genu *MTR* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTR 2756A>G</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFR</i> 1793G>A	<i>GG</i>	63 (52,5)	40 (33,3)	5 (4,2)	108 (90,0)
		<i>GA</i>	10 (8,3)*	2 (1,7)	0 (0,0)	12 (10,0)
		<i>AA</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		<i>suma</i>	73 (60,8)	42 (35,0)	5 (4,2)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFR</i> 1793G>A	<i>GG</i>	64 (53,3)	46 (38,4)	1 (0,8)	111 (92,5)
		<i>GA</i>	4 (3,4)*	3 (2,4)	2 (1,7)	9 (7,5)
		<i>AA</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		<i>suma</i>	68 (56,7)	49 (40,8)	3 (2,5)	120 (100,0)

* $p=0,08$

Porównując współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1793G>A genu *MTHFR* oraz 66A>G genu *MTRR* w badanych grupach zauważono większą częstość genotypów 1793GA / 66AG w grupie z hipotrofią (5,8 vs. 2,5, WR=2,41, PU 0,53-14,78, $p=0,17$) (tab. 52).

Tab. 52. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1793G>A genu *MTHFR* oraz 66A>G genu *MTRR* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTRR 66A>G</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFR</i> 1793G>A	<i>GG</i>	22 (18,3)	54 (45,0)	32 (26,7)	108 (90,0)
		<i>GA</i>	1 (0,9)	7 (5,8)	4 (3,3)	12 (10,0)
		<i>AA</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		<i>suma</i>	23 (19,2)	61 (50,8)	36 (30,0)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFR</i> 1793G>A	<i>GG</i>	19 (15,9)	60 (50,0)	32 (26,6)	111 (92,5)
		<i>GA</i>	4 (3,3)	3 (2,5)	2 (1,7)	9 (7,5)
		<i>AA</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		<i>suma</i>	23 (19,2)	63 (52,5)	34 (28,3)	120 (100,0)

Przy porównaniu polimorfizmów 1793G>A genu *MTHFR* oraz 776C>G genu *TCII* pomiędzy grupami stwierdzono większą frekwencję kombinacji genotypów 1793GA / 776GG (zawierającego zmutowany genotyp 776GG) (4,2 vs. 1,6%, WR=2,56, PU 0,40-27,35, $p=0,22$) (tab. 53).

Tab. 53. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1793G>A genu *MTHFR* oraz 776C>G genu *TCII* w badanych grupach kobiet.

			<i>TCII 776C>G</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFR</i> 1793G>A	<i>GG</i>	33 (27,5)	56 (46,7)	19 (15,8)	108 (90,0)
		<i>GA</i>	0 (0,0)	7 (5,8)	5 (4,2)	12 (10,0)
		<i>AA</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		<i>suma</i>	33 (27,5)	63 (52,5)	24 (20,0)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFR</i> 1793G>A	<i>GG</i>	35 (29,2)	51 (42,4)	25 (20,9)	111 (92,5)
		<i>GA</i>	2 (1,6)	5 (4,3)	2 (1,6)	9 (7,5)
		<i>AA</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		<i>suma</i>	37 (30,8)	56 (46,7)	27 (22,5)	120 (100,0)

Podczas analizy współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1958G>A genu *MTHFD1* oraz 2756A>G genu *MTR* nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami (tab. 54).

Tab. 54. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1958G>A genu *MTHFD1* oraz 2756A>G genu *MTR* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTR 2756A>G</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFD1</i> 1958G>A	<i>GG</i>	22 (18,3)	13 (10,8)	2 (1,7)	37 (30,8)
		<i>GA</i>	37 (30,8)	20 (16,7)	3 (2,5)	60 (50,0)
		<i>AA</i>	14 (11,7)	9 (7,5)	0 (0,0)	23 (19,2)
		<i>suma</i>	73 (60,8)	42 (35,0)	5 (4,2)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFD1</i> 1958G>A	<i>GG</i>	18 (15,0)	14 (11,7)	0 (0,0)	32 (26,7)
		<i>GA</i>	34 (28,3)	28 (23,3)	1 (0,9)	63 (52,5)
		<i>AA</i>	16 (13,4)	7 (5,8)	2 (1,6)	25 (20,8)
		<i>suma</i>	68 (56,7)	49 (40,8)	3 (2,5)	120 (100,0)

Również podczas badania polimorfizmów 1958G>A genu *MTHFD1* oraz 66A>G genu *MTRR* w poszczególnych grupach kobiet nie odnotowano różnic statystycznie istotnych w częstości występowania analizowanych kombinacji genotypów (tab. 55).

Tab. 55. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1958G>A genu *MTHFD1* oraz 66A>G genu *MTRR* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTRR 66A>G</i>			Ogółem
			<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	
Grupa badana <i>Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFD1</i> 1958G>A	<i>GG</i>	6 (5,0)	19 (15,8)	12 (10,0)	37 (30,8)
		<i>GA</i>	13 (10,8)	32 (26,7)	15 (12,5)	60 (50,0)
		<i>AA</i>	4 (3,4)	10 (8,3)	9 (7,5)	23 (19,2)
		<i>suma</i>	23 (19,2)	61 (50,8)	36 (30,0)	120 (100,0)
Grupa kontrolna	<i>MTHFD1</i> 1958G>A	<i>GG</i>	6 (5,0)	16 (13,4)	10 (8,3)	32 (26,7)
		<i>GA</i>	13 (10,8)	33 (27,5)	17 (14,2)	63 (52,5)
		<i>AA</i>	4 (3,4)	14 (11,6)	7 (5,8)	25 (20,8)
		<i>suma</i>	23 (19,2)	63 (52,5)	34 (28,3)	120 (100,0)

W czasie analizy współwystępowania genotypów polimorfizmów 1958G>A genu *MTHFD1* oraz 776C>G genu *TCII* potwierdzono większą częstość występowania genotypów 1958GG / 776GG w grupie kontrolnej (7,5 vs. 2,5%, WR=0,31, PU 0,05-1,36, $p=0,07$) (tab. 56).

Tab. 56. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1958G>A genu *MTHFD1* oraz 776C>G genu *TCII* w badanych grupach kobiet.

			<i>TCII 776C>G</i>			Ogółem
			<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>	
Grupa badana <i>Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFD1</i> 1958G>A	<i>GG</i>	10 (8,3)	24 (20,0)	3 (2,5)*	37 (30,8)
		<i>GA</i>	18 (15,0)	27 (22,5)	15 (12,5)	60 (50,0)
		<i>AA</i>	5 (4,2)	12 (10,0)	6 (5,0)	23 (19,2)
		<i>suma</i>	33 (27,5)	63 (52,5)	24 (20,0)	120 (100,0)
Grupa kontrolna	<i>MTHFD1</i> 1958G>A	<i>GG</i>	6 (5,0)	17 (14,2)	9 (7,5)*	32 (26,7)
		<i>GA</i>	20 (16,7)	31 (25,8)	12 (10,0)	63 (52,5)
		<i>AA</i>	11 (9,1)	8 (6,7)	6 (5,0)	25 (20,8)
		<i>suma</i>	37 (30,8)	56 (46,7)	27 (22,5)	120 (100,0)

* $p=0,07$

Przy analizie polimorfizmów 401G>A genu *MTHFD1* oraz 2756A>G genu *MTR* odnotowano większą częstość kombinacji genotypów 401GG / 2756AA w grupie kontrolnej (34,1 vs. 25,0% w grupie z hipotrofią, WR=0,64, PU 0,35-1,16, $p=0,08$) oraz większą frekwencję genotypów 401GA / 2756AA w grupie z hipotrofią (30,0 vs. 19,2%, WR=1,81, PU 0,95-3,46, $p=0,03$) (tab. 57).

Tab. 57. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 401G>A genu *MTHFD1* oraz 2756A>G genu *MTR* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTR 2756A>G</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFD1 401G>A</i>	<i>GG</i>	30 (25,0)*	32 (26,6)	2 (1,7)	64 (53,3)
		<i>GA</i>	36 (30,0)**	8 (6,7)	3 (2,5)	47 (39,2)
		<i>AA</i>	7 (5,8)	2 (1,7)	0 (0,0)	9 (7,5)
		<i>suma</i>	73 (60,8)	42 (35,0)	5 (4,2)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFD1 401G>A</i>	<i>GG</i>	41 (34,1)*	35 (29,2)	3 (2,5)	79 (65,8)
		<i>GA</i>	23 (19,2)**	14 (11,6)	0 (0,0)	37 (30,8)
		<i>AA</i>	4 (3,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (3,4)
		<i>suma</i>	68 (56,7)	49 (40,8)	3 (2,5)	120 (100,0)

* $p=0,08$, ** $p=0,03$

Analiza polimorfizmów 401G>A genu *MTHFD1* oraz 66A>G genu *MTRR* pomiędzy badanymi grupami kobiet nie pokazał różnic statystycznie istotnych (tab. 58).

Tab. 58. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 401G>A genu *MTHFD1* oraz 66A>G genu *MTRR* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTRR 66A>G</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFD1 401G>A</i>	<i>GG</i>	10 (8,3)	37 (30,8)	17 (14,2)	64 (53,3)
		<i>GA</i>	11 (9,2)	22 (18,3)	14 (11,7)	47 (39,2)
		<i>AA</i>	2 (1,7)	2 (1,7)	5 (4,1)	9 (7,5)
		<i>suma</i>	23 (19,2)	61 (50,8)	36 (30,0)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFD1 401G>A</i>	<i>GG</i>	17 (14,2)	41 (34,2)	21 (17,4)	79 (65,8)
		<i>GA</i>	5 (4,1)	20 (16,7)	12 (10,0)	37 (30,8)
		<i>AA</i>	1 (0,9)	2 (1,6)	1 (0,9)	4 (3,4)
		<i>suma</i>	23 (19,2)	63 (52,5)	34 (28,3)	120 (100,0)

W czasie analizy polimorfizmów 401G>A genu *MTHFD1* oraz 776C>G genu *TCII* w badanych grupach kobiet zaobserwowano większą częstość występowania kombinacji genotypów 401GG / 776CC w grupie kontrolnej (13,3 vs. 21,6 w grupie kontrolnej, WR=0,55, PU 0,26-1,15, $p=0,06$). Ciekawą obserwacją było również odnotowanie większej frekwencji genotypów 401GA / 776CC w grupie z hipotrofią (14,2 vs. 7,5% w grupie kontrolnej, WR=2,03, PU 0,81-5,41, $p=0,07$) (tab. 59).

Tab. 59. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 401G>A genu *MTHFD1* oraz 776C>G genu *TCII* w badanych grupach kobiet.

			<i>TCII 776C>G</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana Hipotrofia płodu</i>	<i>MTHFD1 401G>A</i>	<i>GG</i>	16 (13,3)*	36 (30,0)	12 (10,0)	64 (53,3)
		<i>GA</i>	17 (14,2)**	20 (16,7)	10 (8,3)	47 (39,2)
		<i>AA</i>	0 (0,0)	7 (5,8)	2 (1,7)	9 (7,5)
		<i>suma</i>	33 (27,5)	63 (52,5)	24 (20,0)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTHFD1 401G>A</i>	<i>GG</i>	26 (21,6)*	36 (30,0)	17 (14,2)	79 (65,8)
		<i>GA</i>	9 (7,5)**	19 (15,8)	9 (7,5)	37 (30,8)
		<i>AA</i>	2 (1,7)	1 (0,9)	1 (0,8)	4 (3,4)
		<i>suma</i>	37 (30,8)	56 (46,7)	27 (22,5)	120 (100,0)

* $p=0,06$, ** $p=0,07$

Podczas analizy polimorfizmów 2756A>G genu *MTR* oraz 66A>G genu *MTRR* w dwóch badanych grupach kobiet nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych (tab. 60).

Tab. 60. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 2756A>G genu *MTR* oraz 66A>G genu *MTRR* w badanych grupach kobiet.

			<i>MTRR 66A>G</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana Hipotrofia płodu</i>	<i>MTR 2756A>G</i>	<i>AA</i>	14 (11,7)	35 (29,1)	24 (20,0)	73 (60,8)
		<i>AG</i>	8 (6,6)	23 (19,2)	11 (9,2)	42 (35,0)
		<i>GG</i>	1 (0,9)	3 (2,5)	1 (0,8)	5 (4,2)
		<i>suma</i>	23 (19,2)	61 (50,8)	36 (30,0)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTR 2756A>G</i>	<i>AA</i>	11 (9,2)	39 (32,5)	18 (15,0)	68 (56,7)
		<i>AG</i>	12 (10,0)	23 (19,2)	14 (11,6)	49 (40,8)
		<i>GG</i>	0 (0,0)	1 (0,8)	2 (1,7)	3 (2,5)
		<i>suma</i>	23 (19,2)	63 (52,5)	34 (28,3)	120 (100,0)

Analizując polimorfizm 2756A>G genu *MTR* oraz 776C>G genu *TCII* w badanych grupach kobiet nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych (tab. 61).

Tab. 61. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 2756A>G genu *MTR* oraz 776C>G genu *TCII* w badanych grupach kobiet.

			<i>TCII 776C>G</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i>	<i>MTR</i> 2756A>G	<i>AA</i>	22 (18,3)	37 (30,8)	14 (11,7)	73 (60,8)
		<i>AG</i>	10 (8,3)	22 (18,4)	10 (8,3)	42 (35,0)
		<i>GG</i>	1 (0,9)	4 (3,3)	0 (0,0)	5 (4,2)
		<i>suma</i>	33 (27,5)	63 (52,5)	24 (20,0)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTR</i> 2756A>G	<i>AA</i>	26 (21,7)	29 (24,2)	13 (10,8)	68 (56,7)
		<i>AG</i>	11 (9,1)	26 (21,7)	12 (10,0)	49 (40,8)
		<i>GG</i>	0 (0,0)	1 (0,8)	2 (1,7)	3 (2,5)
		<i>suma</i>	37 (30,8)	56 (46,7)	27 (22,5)	120 (100,0)

Analizując współwystępowanie polimorfizmów 66A>G genu *MTRR* oraz 776C>G genu *TCII* pomiędzy badanymi grupami kobiet zaobserwowano większą częstość występowania kombinacji genotypów 66AA / 776GG (z obecnością zmutowanego genotypu 776GG) w grupie kontrolnej zdrowych kobiet ciężarnych (8,4 vs. 1,7%, PU 0,02-0,91, $p=0,02$) (tab. 62).

Tab. 62. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 66A>G genu *MTRR* oraz 776C>G genu *TCII* w badanych grupach kobiet.

			<i>TCII 776C>G</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>	
<i>Grupa badana</i> <i>Hipotrofia płodu</i>	<i>MTRR</i> 66A>G	<i>AA</i>	7 (5,8)	14 (11,7)	2 (1,7)*	23 (19,2)
		<i>AG</i>	19 (15,8)	28 (23,3)	14 (11,7)	61 (50,8)
		<i>GG</i>	7 (5,9)	21 (17,5)	8 (6,6)	36 (30,0)
		<i>suma</i>	33 (27,5)	63 (52,5)	24 (20,0)	120 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>MTRR</i> 66A>G	<i>AA</i>	3 (2,5)	10 (8,3)	10 (8,4)*	23 (19,2)
		<i>AG</i>	24 (20,0)	29 (24,2)	10 (8,3)	63 (52,5)
		<i>GG</i>	10 (8,3)	17 (14,2)	7 (5,8)	34 (28,3)
		<i>suma</i>	37 (30,8)	56 (46,7)	27 (22,5)	120 (100,0)

* $p=0,02$

5. DYSKUSJA

Intensywny rozwój biologii molekularnej na przestrzeni ostatnich lat pozwolił na identyfikację genetycznego podłoża licznych chorób u człowieka, których dotychczasowa etiologia pozostawała nie do końca wyjaśniona. Postęp ten zawdzięczamy wprowadzeniu wielu nowoczesnych metod diagnostycznych stosowanych już powszechnie w wielu laboratoriach diagnostyki molekularnej [99, 189]. Do takich metod należy z pewnością reakcja łańcuchowej polimerazy, jak również metoda polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych. Pierwsza z tych technik umożliwia powielenie wybranego fragmentu DNA, który może być następnie użyty na dalszych etapach badań. Druga znajduje natomiast zastosowanie do identyfikacji punktowych mutacji oraz polimorfizmów genetycznych. Wskazanie polimorfizmów genów, mających wpływ na występowanie powikłań znajduje zastosowanie w wielu dziedzinach medycyny. Szczególnie dotyczy to badań molekularnych w chorobach o podłożu wieloczynnikowym, w których etiologii rozpatruje się wzajemne interakcje czynników środowiskowych i genetycznych. Dotychczas zidentyfikowano wiele polimorfizmów genetycznych, mogących sprzyjać rozwojowi powikłań także dziedzinie położnictwa i ginekologii. Istnieje wiele doniesień o genetycznym podłożu takich jednostek jak poród przedwczesny, przedwczesne pęknięcie błon płodowych, stan przedrzucawkowy, poronienia nawracające, hipotrofia płodu, dziedziczny rak piersi i jajnika oraz osteoporoza pomenopauzalna. Wiedza z dziedziny biologii molekularnej może znaleźć zastosowanie w określeniu etiopatogenezy oraz wyodrębnienia czynników ryzyka wystąpienia tych chorób, Umożliwi również prewencję w grupach osób o zwiększonym prawdopodobieństwie wystąpienia danego schorzenia. Prowadzone są także badania nad zastosowaniem terapii genowej, co pozwoliło by na przyczynowe leczenie wielu genetycznie uwarunkowanych chorób [168, 176].

Znanych jest wiele czynników ryzyka wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu, jednakże nadal często nie udaje się przewidzieć jego wystąpienia oraz określić etiologii [123]. Analiza polimorfizmów genów związanych ze zwiększonym ryzykiem rozwoju wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu w przyszłości może prowadzić do wyłonienia grupy kobiet zagrożonych powstaniem tego powikłania w przebiegu ciąży. Być

może pozwoli to również na wprowadzenie prewencji i umożliwi uniknięcie zaburzeń w rozwoju noworodków pochodzących z ciąży powikłanych hipotrofią.

5.1. ZABURZENIA METABOLIZMU FOLIANÓW A HIPOTROFIA PŁODU

Zapotrzebowanie na foliany jest zdecydowanie większe u kobiet ciężarnych i wzrasta wraz z wiekiem ciążowym. Największe zapotrzebowanie na foliany w ciąży odnotowuje się w III trymestrze, ze względu na intensywny proces wzrastania płodu. W sytuacji niedostatecznej podaży kwasu foliowego, już od piątego miesiąca ciąży dochodzi do stopniowego spadku jego stężenia w osoczu oraz erytrocytach ciężarnej [53]. Badanie prospektywne Baker i wsp. wskazuje na związek pomiędzy niedostatecznym spożyciem folianów (<187 µg/dzień) a zwiększeniem ryzyka hipotrofii płodu [12]. W pracy Goldenberg i wsp. wyższe stężenia folianów w 30 tc. były związane z większą masą płodu oraz niższym ryzykiem rozwoju hipotrofii [67]. Neggers i wsp. badali zależność między matczyną suplementacją kwasem foliowym a IUGR i stwierdzili istotną statystycznie pozytywną korelację pomiędzy poziomem osoczym folianów a masą płodu ($p=0,03$) [132]. Także Mitchell i wsp. zaobserwowali związek suplementacji kwasem foliowym ze zmniejszonym ryzykiem hipotrofii [121]. Praca Leeda i wsp. pokazuje jak prowadzenie odpowiedniej suplementacji kwasem foliowym u ciężarnych z wywiadem obciążonym w kierunku IURG spowodowało istotny statystycznie wzrost masy urodzeniowej płodu w kolejnej ciąży [103]. Zaobserwowano również, że wyższe stężenie folianów w erytrocytach korelowało z niższym ryzykiem rozwoju hipotrofii płodu. Stężenie folianów w erytrocytach >805 nmol/L wiązało się z 60% redukcją ryzyka IUGR (OR=0,4, $p<0,05$). Jedynie w pracy Steegers-Theunissen i wsp. nie stwierdzono natomiast wpływu obniżonego poziomu folianów (<298 nmol/L) na zwiększone ryzyko rozwoju tego powikłania [185]. Jednocześnie wiadomo, że w ciąży fizjologicznej stężenie homocysteiny ulega zmniejszeniu w porównaniu ze stężeniem tego aminokwasu u kobiet nieciążarnych [193]. Poziom homocysteiny w osoczu zmniejsza się w ciągu I trymestru, osiąga minimum w II trymestrze i wzrasta nieznacznie pod koniec ciąży, osiągając poziom jak w I trymestrze, stąd ocena występowania umiarkowanej hiperhomocysteinemii w czasie trwania ciąży może być utrudniona.

Jednym z możliwych mechanizmów w jaki zaburzony metabolizm folianów może indukować nieprawidłowości wzrastania płodu są zmiany dotyczące cyklu metioninowego. Zmiany w przekształcaniu homocysteiny do metioniny mogą prowadzić do kumulacji nadmiaru homocysteiny oraz zaburzeń metylacji DNA. Ekspozycja komórek trofoblastu na

podwyższone stężenie homocysteiny (20 $\mu\text{mol/ml}$) może nasilać proces apoptozy i zaburzać jego funkcję [44]. Ponadto podwyższony poziom homocysteiny poprzez indukowanie stresu oksydacyjnego może prowadzić do uszkodzenia śródbłonna [202]. Tak więc poprzez upośledzenie procesu placentacji nadmiar homocysteiny może zaburzać proces wzrastania płodu [20].

Innym mechanizmy rozwoju hipotrofii płodu polega na zmniejszeniu stabilności DNA. Niedobór folianów powoduje zaburzenia przemiany deoksyurydynomonofosforanu (dUMP) do deoksytyminomonofosforanu (dTMP), co może skutkować inkorporacją nadmiaru dUMP do DNA, prowadząc do łamliwości chromosomów. Zarówno badania *in vitro*, jak i *in vivo* na komórkach ludzkich pokazują, że niedobory folianów mogą przyczyniać się do zwiększonej misinkorporacji uracylu, hipometylacji DNA, a w rezultacie zwiększonej łamliwości chromosomów oraz formacji *mikronucleus* [54]. Z drugiej strony niedostateczny poziom folianów może skutkować zaburzeniami syntezy puryn i pirymidyn wchodzącymi w skład DNA. Jako że podczas procesu embriogenezy synteza kwasów nukleinowych i białek ulega wzmożeniu, zaburzenia dotyczące metabolizmu folianów mogą potencjalnie wpływać na proces wzrastania płodu [10].

Hiperhomocysteinemia uważana jest za jeden z istotnych czynników ryzyka chorób o podłożu naczyniowym [154]. Liczne doniesienia wskazują także na jej możliwy udział w powstawaniu licznych powikłań położniczych m. in. z nawracającymi poronieniami, wewnątrzmacicznym obumarciem płodu, przedwczesnym oddzieleniem łożyska, a także ograniczeniem wewnątrzmacicznego wzrastania płodu [89]. Istnieją doniesienia o indukowaniu przez nadmiernie wysoki poziom homocysteiny apoptozy w komórkach trofoblastu i zmniejszonej syntezie hCG *in vitro*, jak też o zależnym od stężenia Hcy wzroście kurczliwości *myometrium* izolowanego od ciężarnych, co razem może prowadzić do samoistnego poronienia [9, 45]. Ze względu na ścisły związek przemian folianów z cyklem metioninowym, hiperhomocysteinemia może być jednym z potencjalnych czynników poprzez który manifestuje się wpływ zaburzonego metabolizmu folianów na proces wzrastania płodu.

De Vries i wsp. wśród 13 pacjentek z niewyjaśnionym IURG zaobserwował podwyższony poziom osoczowej homocysteiny u 5 pacjentek (38%) [42]. Leeda i wsp. badali grupę 207 kobiet z IURG lub preeklampsją w wywiadzie. Wśród 26 pacjentek z IUGR – 5 z nich (19,2%) miało podwyższony poziom homocysteiny na czczo lub po teście obciążenia metioniną. Wśród 37 pacjentek z potwierdzoną hiperhomocysteinemią 14 ponownie zaszło w ciążę, podczas której prowadzono suplementację kwasem foliowym, witaminą B6 oraz

kwasem acetylosalicylowym w niskich dawkach (80 mg). Urodzeniowa masa płodu w tej grupie wynosiła 2867 ± 648 g w porównaniu z wynikiem z poprzedniej ciąży wynoszącym 1088 ± 570 g ($p < 0,0001$) [103]. Praca Klai i wsp. dotyczyła 303 pacjentek z powikłaniami ciąży o podłożu naczyniowym, gdzie 50 pacjentek stanowiło podgrupę z IUGR, również dowiodła związku podwyższonego stężenia homocysteiny z rozwojem hipotrofii płodu. W badaniu tym średnie osoczowe stężenie homocysteiny w grupie ciężarnych w III trym. z rozpoznaniem IUGR wynosił $8,03 \pm 1,39$ $\mu\text{mol/l}$ w porównaniu z $6,07 \pm 2,17$ $\mu\text{mol/l}$ w grupie kontrolnej, co stanowiło istotną statystycznie różnicę [89]. Wyniki pracy Lindblatt i wsp. również potwierdzają istnienie takiej zależności. W badaniu oceniano stężenie folianów, homocysteiny i witaminy B12 w osoczu matki i we krwi pępowinowej w przypadku IUGR i w ciążach o prawidłowym przebiegu. Stwierdzono, że stężenie folianów u matki i płodu było dwukrotnie niższe w przypadku hipotrofii płodu ($p=0,004$, $p=0,005$). Ryzyko IUGR było natomiast zmniejszone u pacjentek ze stężeniem osoczym folianów w górnych kwartylach (OR=0,31). Poziom homocysteiny w osoczu matki był wyższy w ciąży powikłanej IUGR niż w grupie kontrolnej ($p=0,02$). Nie stwierdzono żadnej korelacji pomiędzy stężeniem witaminy B12 a IUGR, wykazano natomiast odwrotną zależność pomiędzy stężeniem homocysteiny i folianów we krwi pępowinowej ($-r=0,26$, $p=0,006$) [104]. Najnowsze badanie z 2012 roku autorstwa Bregen i wsp. oceniało stężenie homocysteiny i folianów w I trymestrze ciąży oraz ich możliwy udział w rozwoju późniejszych powikłań położniczych. Było to duże badanie populacyjne (*the Generation R Study*) obejmujące 5805 ciężarnych. Oprócz standardowego badania ultrasonograficznego wykonywano również badanie dopplerowskie w II i III trym. ciąży. Celem oceny oporu w krążeniu maciczo-łożyskowym i płodowo-łożyskowym obliczano index pulsacji w tętnicach macicznych oraz w tętnicy pępowinowej. Wykazano, że masa urodzeniowa dzieci kobiet z grupy o podwyższonym stężeniu homocysteiny w osoczu ($>7,31$ mol/L) była o 110 g mniejsza niż u dzieci pacjentek z grupy kontrolnej (poziom homocysteiny $\leq 5,81$ mol/L). Również masa łożyska była o 15-30 g mniejsza w grupie z hiperhomocysteinemią. Odwrotną zależność zaobserwowano dla stężenia folianów: masa noworodków matek z obniżonym stężeniem folianów we krwi ($<19,0$ nmol/L) była o 53-125 g mniejsza niż w grupie kontrolnej (stężenie folianów $\geq 25,9$ nmol/L). Tak więc podwyższone ryzyko urodzenia dziecka z małą masą urodzeniową obserwowano zarówno w grupie z podwyższonym stężeniem homocysteiny (OR=1,68, $p=0,006$) jak i z obniżonym stężeniem folianów w surowicy (OR=1,91, $p=0,002$). Ponadto u pacjentek z obniżonym stężeniem folianów we krwi uzyskano statystycznie istotnie wyższe indeksy pulsacji w tętnicach

macicznych mierzone w II trym. oraz w tętnicy pępowinowej mierzone pod koniec III trymestru ciąży ($p=0,001$ i $p=0,006$). U pacjentek z podwyższonym stężeniem homocysteiny w osoczu krwi uzyskano statystycznie istotnie wyższe indeksy pulsacji w tętnicy pępowinowej pod koniec III trym. ciąży ($p=0,02$) [20]. Praca ta wyraźnie wskazuje na możliwy udział hiperhomocysteinemii indukowanej małym stężeniem osoczym folianów w rozwoju zaburzeń na poziomie jednostki maciczno-łożyskowej mogących w rezultacie prowadzić do upośledzenia wzrastania płodu.

Stegers-Theunissen i wsp. oceniali związek pomiędzy hiperhomocysteinemią a powikłaniami ciąży o możliwym pochodzeniu naczyniowym. W swoim badaniu porównywali oni metabolizm homocysteiny u 1212 pacjentek z przebyłym co najmniej jednym powikłaniem w ciąży (nadciśnienie ciążowe, preeklampsja, zespół HELLP, nawracające utraty ciąży, przedwczesne oddzielenie łożyska, IUGR oraz wewnątrzmaciczne obumarcie płodu) z grupą kontrolną 176 zdrowych ciężarnych. W obu grupach wykonano pomiar stężenia folianów w surowicy i erytrocytach oraz poziom homocysteiny na czczo oraz po obciążeniu metioniną (tzw. *methionine loading test*). Stwierdzono korelację podwyższonego poziomu homocysteiny na czczo (OR=1,9) oraz po teście obciążenia metioniną (OR=2,1) z występowaniem wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu. Podobną korelację potwierdzono dla nadciśnienia ciążowego [185].

Kolejne prace pokazują jednak nieco odmienne wnioski. Badanie Hogg i wsp. nie potwierdziło związku stężenia homocysteiny w drugim trymestrze ciąży z rozwojem IUGR i nadciśnienia w ciąży [73]. Wyniki te są zgodne ze spostrzeżeniami Sutterlin i wsp. o braku wpływu osocznego stężenia folianów oraz kobalaminy na częstość występowania nawracających poronień, przedwczesnego oddzielenia łożyska oraz hipotrofii płodu [191]. W doniesieniu opublikowanym przez Burke i wsp. w 1992 roku, autorzy zbadali masę 30 noworodków pacjentek, które były heterozygotami pod względem mutacji β -syntazy cystationiny, która prowadzi do hiperhomocysteinemii. Stwierdzono, że średnia masa noworodków w grupie badanej wynosiła 3408 ± 774 g, co nie odbiegało istotnie od poziomu populacyjnego. W pracy zmierzono również osoczowy poziom homocysteiny na czczo u 37 matek noworodków z hipotrofią płodu (48-72 godzin po porodzie), porównując uzyskane wyniki z grupą kontrolną 35 matek noworodków z masą urodzeniową >10 centyla. W grupie badanej stężenie homocysteiny wynosił $7,7 \pm 2,3$ $\mu\text{mol/l}$ w porównaniu z $7,9 \pm 2,3$ $\mu\text{mol/l}$ w grupie kontrolnej, co nie stanowiło istotnej statystycznie różnicy [29].

W ostatnich latach możliwa stała się ocena wariantów polimorfizmów genów enzymów uczestniczących w cyklu przemian folianów, a tym samym mogących wpływać na osoczowe stężenie homocysteiny [134, 82]. Jednocześnie wiadomo, że metabolizm homocysteiny jest zależny od właściwego stężenia folianów, witaminy B12 oraz witaminy B6 [103, 166]. W ostatnim czasie dużo uwagi poświęca się ocenie możliwego wpływu zaburzeń genetycznych w metabolizmie folianów oraz jego wpływu na rozwój powikłań położniczych, w tym hipotrofii płodu.

5.2. ANALIZA BADANYCH POLIMORFIZMY GENÓW BIORĄCYCH UDZIAŁ W METABOLIZMIE FOLIANÓW I WSPÓLWYSTĘPOWANIA GENOTYPÓW W HIPOTROFII PŁODU

5.2.1. POLIMORFIZM GENU *MTHFR*

Jest bardzo dużo badań oceniających związek polimorfizmów genu *MTHFR* z rozwojem hipotrofii płodu oraz innych nieprawidłowości w ciąży. Kupfermanc i wsp. badali współwystępowanie czterech powikłań położniczych związanych z rozwojem zakrzepicy w krążeniu maciczno-łożyskowym (IUGR, stan przedrzucawkowy, przedwczesne oddzielenie łożyska i obumarcie wewnątrzmaciczne), z obecnością wrodzonych polimorfizmów predysponujących do trombofilii, wśród których znalazł się również polimorfizm *677C>T* genu *MTHFR*. Stwierdzono, iż obecność tego wariantu była częstsza wśród matek noworodków z IURG (OR=4,2) [96]. Kolejne ciekawe doniesienie to metaanaliza obejmująca dostępne publikacje w przedziale czasowym 1999-2000 będące próbą oceny wpływu wrodzonych trombofilii na rozwój powikłań położniczych. Badanie to pokazało przewagę homozygotycznego genotypu *677TT* wśród pacjentek z hipotrofią płodu w porównaniu z grupą kontrolną (27,3 vs. 8,2%, OR=5,0) [4]. W pracy Martinelli i wsp. również oceniano wpływ wrodzonej trombofilii, w tym polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR* u matki na rozwój hipotrofii płodu. Wykazano, że częstość homozygotycznego genotypu *677TT* wynosiła 47,2% w grupie badanej vs. 10,4% w grupie kontrolnej (OR=1,5). Jednakże po uwzględnieniu innych zmiennych, analiza statystyczna nie potwierdziła niezależnego związku tego polimorfizmu z hipotrofią [115]. Rok wcześniej Murphy i wsp. w swojej pracy badali wpływ polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR* na rozwój powikłań położniczych, w tym IURG nie potwierdzając żadnego związku istotnego statystycznie ($p=0,7947$) [Murphy 2000]. Do podobnych wniosków prowadzi badanie Vespryck i wsp., przeprowadzone na grupie matek noworodków z IURG urodzonych w Klinice Uniwersyteckiej w Rouen w Normandii, Francja.

W pracy oceniano zależność trombofilii wrodzonej z występowaniem ograniczenia wzrastania płodu. Częstość występowania homozygotycznego genotypu *677TT MTHFR* nie różniła się istotnie statystycznie pomiędzy grupą badaną a kontrolną (11,3 vs. 15,5%, $p=0,52$) [203].

Anteby i wsp. badali wpływ trombofilii, w tym polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR*, na rozwój powikłań położniczych takich jak IUGR, preeklampsja i przedwczesne oddzielenie łożyska. Wyniki wskazują na udział tylko polimorfizmu *20210G>A* genu protrombiny i *1691G>A* czynnika V Leiden w rozwoju hipotrofii. W pracy nie potwierdzono korelacji wariantu *677C>T* genu *MTHFR* z hipotrofią płodu [6].

Kolejna metaanaliza autorstwa Robertson i wsp. badała rolę trombofilii nabytych i wrodzonych z rozwojem powikłań ciąży. Analizowano 5 badań z łączną liczbą 195 pacjentek z hipotrofią płodu, spośród których dwie prace analizowały związek polimorfizmu *677C>T MTHFR* z tym powikłaniem. Obecność homozygotycznego genotypu *677TT* genu *MTHFR* stwierdzono u 62 ze 121 pacjentek z IUGR oraz u 460 z 961 pacjentek z grupy kontrolnej. Obliczono, że różnica we frekwencji genotypu *677TT* genu *MTHFR* nie była w tym przypadku istotna statystycznie ($p=0,28$) [159].

Engel i wsp. badali wpływ 5 polimorfizmów genetycznych mogących zaburzać metabolizm folianów: *677C>T MTHFR*, *1298A>C MTHFR*, *2756A>G MTR*, *66A>G MTRR* oraz *1420C>T* metylotransferazy serynowej-1 (*SHMT1 - serine metylotransferase 1*) na rozwój hipotrofii płodu oraz wystąpienie porodu przedwczesnego. Zaobserwowano nieznaczne zwiększenie ryzyka urodzenia dziecka z hipotrofią dla nosicielek allele *677T* genu *MTHFR* rasy białej ($OR=1,2$). Stwierdzono także, że nosicielki genotypu homozygotycznego dzikiego *1298AA* genu *MTHFR* miały zmniejszone ryzyko rozwoju hipotrofii w porównaniu do nosicielek genotypu homozygotycznego *1298CC* ($OR=0,6$). Nie stwierdzono różnic we wpływie powyższych polimorfizmów w zależności od podaży folianów w diecie [49]. Wyniki powyższego badania choć nie były istotne statystycznie, pozostają po części w zgodzie z innymi doniesieniami opublikowanymi przez Nurk i wsp. Badanie *Hordalan Homocysteine Study* było dużym badaniem kohortowym przeprowadzonym w zachodniej Norwegii, które objęło 5867 pacjentek, oceniającym wpływ polimorfizmów *1298A>C* i *677C>T* genu *MTHFR* na rozwój powikłań położniczych. Autorzy zaobserwowali nieznaczne zwiększanie ryzyka hipotrofii płodu w zależności od liczby kopii allele *677T* genu *MTHFR* (OR dla genotypu *677CC*: 1,0, dla *677CT*: 1,1, dla *TT*: 1,2, $p=0,04$).

Stwierdzono także, że genotyp *1298CC MTHFR* wiązał się z nieco mniejszym ryzykiem masy ciała noworodka poniżej 1500 g (OR=0,4, $p=0,05$) oraz pomiędzy 1500-2500 g (OR=0,8, $p=0,09$), a także niższym ryzykiem rozwoju hipotrofii płodu (OR=0,8, $p=0,06$) [134].

Odmienne wyniki prezentują w swojej pracy Gebhardt i wsp. Celem badania była ocena wpływu polimorfizmów *1298A>C* i *677C>T* w obrębie genu *MTHFR* na rozwój powikłań o możliwym podłożu naczyniowym w przebiegu ciąży obejmujących IUGR oraz przedwczesne oddzielenie łożyska. Zaobserwowano, że frekwencja genotypu heterozygotycznego *677CT* była podobna w grupie z hipotrofią płodu i w grupie kontrolnej (22 vs. 26%, OR=0,73, $p=0,6343$). Nie zaobserwowano obecności homozygot zmutowanych w grupie badanej. Częstość występowania zmutowanego allele *677T* również nie wykazywała istotnych statystycznie różnic w obu grupach (11 vs. 15%, OR=0,71, $p=0,538$). Potwierdzono natomiast zależność dla polimorfizmu *1298A>C* oraz rozwoju hipotrofii. Częstość homozygot zmutowanych *1298CC* i heterozygot *1298AC* różniły się statystycznie istotnie (OR=1,99, $p=0,0192$). Zmutowany allele *1298C* polimorfizmu *1298A>C* genu *MTHFR* występował częściej w grupie z hipotrofią (34 vs. 21%, OR=2,06, $p=0,019$) [63].

Asocjacji polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR* ze zwiększonym ryzykiem hipotrofii płodu nie potwierdza praca Infante-Rivard i wsp. z 2002 roku, prowadzona wśród kobiet z populacji kanadyjskiej. W badaniu oceniano obecność polimorfizmów związanych z wrodzoną trombofilią, wśród których znalazły się również warianty genetyczne *677C>T* oraz *1298A>C* genu *MTHFR*, u matek noworodków z urodzeniową masą ciała poniżej 10 centyla. Stwierdzono jedynie zwiększone ryzyko wystąpienia hipotrofii płodu dla nosicielek obydwu zmutowanych allele *677TT*, które nie zażywały w ciąży preparatów multiwitamin (OR=12,3) w porównaniu z pacjentkami z właściwą suplementacją witamin (OR=1,4). Nie potwierdzono współzależności dla obecności tej mutacji i palenia papierosów a wystąpieniem IUGR. Ciekawą obserwacją było także stwierdzenie ochronnego wpływu wariantu *1298A>C* genu *MTHFR* u matki w stosunku do hipotrofii płodu (OR=0,49) [79].

W pracy Ubeda i wsp. z 2011 roku badano współzależność pomiędzy poziomem homocysteiny w osoczu kobiet ciężarnych a stężeniem folianów, witaminy B12, polimorfizmem *677C>T* genu *MTHFR* oraz występowaniem powikłań położniczych. Wykonano pomiary stężeń powyższych substancji w 15, 24 i 32 tygodniu ciąży u 152 pacjentek, oznaczono genotyp pod względem polimorfizmu *677C>T MTHF* oraz zanotowano przypadki wystąpienia powikłań położniczych w tym hipotrofii płodu. Zaobserwowano

wystąpienie tego powikłania w 11% przypadków, jednak nie stwierdzono związku hipotrofii z polimorfizmem $677C>T$ *MTHFR*, stężeniem folianów, witaminy B12 oraz homocysteiny w surowicy ciężarnych [197].

Wyniki pracy Klai i wsp. wskazują na możliwą rolę polimorfizmu $1298A>C$, ale nie $677C>T$ genu *MTHFR* w rozwoju powikłań ciąży o podłożu waskulopatii łożyskowej, wśród których znalazło się również ograniczenie wewnątrzmacicznego wzrastania płodu. Uzyskano istotne statystyczną przewagę w częstości występowania zmutowanego genotypu $1298CC$ polimorfizmu $1298A>C$ *MTHFR* w grupie z hipotrofią (OR=4,7, $p=0,001$). Także frekwencja zmutowanego allele $1298C$ była statystycznie istotnie większa w grupie z hipotrofią (14,0 vs. 3,5%, OR=4,5, $p=0,001$) [89].

Praca Said i wsp. z 2012 roku oceniała wpływ wrodzonych trombofilii na rozwój powikłań położniczych. W dwóch australijskich ośrodkach ginekologiczno-położniczych III stopnia referencji zrekrutowano 115 pacjentek z powikłaniami położniczymi, wśród których znalazły się hipotrofia płodu, przedwczesne oddzielenie łożyska, stan przedrzucawkowy, wewnątrzmaciczne obumarcie płodu. U pacjentek z grupy badanej oraz takiej samej liczby pacjentek z niepowikłanym rozwojem ciąży oznaczono frekwencję genotypów polimorfizmu $677C>T$ oraz $1298A>C$ genu *MTHFR*. W grupie badanej znalazły się 44 pacjentki z hipotrofią płodu. Częstość genotypów homozygotycznego zmutowanego $677TT$ (10,4 vs. 11,3%) i $1298CC$ (9,6 vs. 11,3%) oraz heterozygotycznego $677CT$ (40,0 vs. 42,6%) i $1298AC$ (42,6 vs. 47,0%) genu *MTHFR* nie różniły się istotnie pomiędzy obiema grupami. Badanie to nie potwierdziło związku powyższych polimorfizmów z hipotrofią płodu [163].

Jedyną pracą poruszającą zagadnienie hipotrofii płodu w kontekście polimorfizmu $1793G>A$ genu *MTHFR* jest praca Kordas i wsp., z 2009 roku. W pracy oceniano związek spożycia przez kobiety ciężarne folianów modyfikowalne przez działanie negatywnych czynników środowiskowych takie jak ekspozycja na ołów oraz możliwe oddziaływanie matczyne i płodowe polimorfizmów w obrębie genu *MTHFR*, w tym polimorfizmu $1793G>A$, na masę urodzeniową płodu. Do badania zakwalifikowano 473 pacjentki z Mexico City, Meksyk. Ekspozycję na ołów oceniano poprzez pomiar jego koncentracji w kości piszczelowej. Wyniki pracy wskazują na możliwą pozytywną korelację pomiędzy spożyciem folianów oraz negatywną korelację pomiędzy ekspozycją na ołów a małą masą urodzeniową płodu. Nie wykazano jednak modyfikującego wpływu polimorfizmu $1793G>A$, $677C>T$ oraz $1298A>C$ genu *MTHFR* na masę urodzeniową płodu, niezależnie od spożycia folianów oraz ekspozycji na ołów [92].

Obecnie prezentowane badanie nie ujawniło różnic istotnych statystycznie w zakresie częstości występowania genotypów i alleli wszystkich trzech badanych polimorfizmów genu *MTHFR*, co może wskazywać na brak bezpośredniego związku tych polimorfizmów z rozwojem hipotrofii płodu. Zaobserwowano tylko częstsze występowanie zmutowanego genotypu homozygotycznego *677TT* w grupie badanej niż w grupie kontrolnej, bez różnicy statystycznie istotnej (*677TT*: 11,7 vs 6,7%, WR=1,85, $p=0,13$). Ciekawą obserwacją było także stwierdzenie większej częstości występowania genotypu *677TT* zarówno w grupie, w której poród odbył się ≥ 37 tc. (13,2 vs. 6,6%, WR=2,14, $p=0,11$), jak również < 37 tc. 9,6 vs. 6,6%, WR=1,49, $p=0,35$) w porównaniu do grupy kontrolnej, wynik nie osiągnął jednak istotności statystycznej. Także w grupie kobiet, które urodziły dzieci z masą ≥ 1500 g zaobserwowano zdecydowanie większą, jednak również nieistotną statystycznie, częstość występowania genotypu homozygotycznego zmutowanego *677TT* (13,5 vs. 6,7%, WR=2,18, $p=0,08$), czego nie stwierdzono w grupie pacjentek, które urodziły dzieci z masą < 1500 g, gdzie częstość zmutowanego genotypu *677TT* była porównywalna do grupy kontrolnej (6,5% vs. 6,7%, WR=0,96, $p=0,66$).

Także w zakresie genotypów oraz frekwencji alleli polimorfizmu *1298A>C MTHFR* nie uzyskano istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą badaną a kontrolną. Częstość występowania genotypu dzikiego *1298AA* (45,0 vs. 43,3%), heterozygotycznego *1298AC* (47,5 vs. 51,7%) oraz zmutowanego *1298CC* (7,5 vs. 5,0%) prezentowały podobne wartości. Frekwencja zmutowanego allela *1298C* w obydwu grupach była podobna (68,8 vs. 71,7%). Interesującą obserwacją było odnotowanie większej częstości występowania zmutowanego genotypu *1298CC* w grupie, gdzie poród odbył się < 37 tc. w porównaniu do grupy kontrolnej (9,6 vs. 5,0%, WR=1,84, $p=0,25$), co jednak nie stanowiło statystycznej różnicy. Nie zaobserwowano natomiast istotnych różnic po uwzględnieniu podziału w zależności od masy urodzeniowej noworodka.

W obecnej pracy nie odnotowano obecności genotypu homozygotycznego zmutowanego *1793AA* zarówno w grupie badanej, jak i kontrolnej. Zaobserwowano podobną częstość występowania heterozygot *1793GA* (10,0 vs. 7,5%, WR=1,37, $p=0,32$) oraz podobną frekwencję występowania zmutowanego allela *1793A* (5,0 vs. 3,8%, WR=1,35, $p=0,33$). Ciekawą obserwacją było natomiast stwierdzenie istotnej statystycznie wyższej częstości występowania zmutowanego allela *1793A* (8,1 vs. 3,8%, WR=2,26, $p=0,06$), a także frekwencji genotypu heterozygotycznego *1793GA* (16,2 vs. 7,5%, WR=2,38, $p=0,06$) w grupie kobiet, które urodziły ≥ 37 tc. w porównaniu do grupy kontrolnej. W pracy w zakresie

polimorfizmu *1793G>A* genu *MTHFR* w grupie kobiet, które urodziły noworodki z masą ≥ 1500 g zwraca także uwagę fakt dużej częstości występowania genotypu heterozygotycznego *1793GA* (13,5%) w porównaniu do grupy kontrolnej (7,5%, WR=1,92, $p=0,12$) oraz większej częstości występowania zmutowanego allele *1793A* (6,7% vs. 3,8%, WR=1,86, $p=0,12$), co jednak nie osiąga wartości istotnej statystycznie.

Pomimo, że powyższa praca nie ujawniła bezpośredniego związku badanych polimorfizmów genu *MTHFR* z rozwojem hipotrofii u płodu, ciekawych wniosków dostarczyło badanie współwystępowania genotypów.

Zaobserwowano mieszczącą się na granicy istotności statystycznej wyższą częstość występowania kombinacji genotypów *677CT / 1793GG* w grupie kontrolnej (45,0 vs. 34,1%, WR=0,63, $p=0,05$). Także analiza współwystępowania polimorfizmów *1793G>A* genu *MTHFR* oraz *401G>A* genu *MTHFD1* pomiędzy badanymi grupami kobiet pokazała większą częstość występowania kombinacji genotypów *1793GG / 401GG* (z obecnością niezmutowanych alleli) w grupie kontrolnej zdrowych kobiet ciężarnych (60,8 vs. 47,5%, WR=0,58, $p=0,025$).

Podczas analizy polimorfizmów *1298A>C* genu *MTHFR* oraz *401G>A* genu *MTHFD1* niezwykle interesującą było odnotowanie znacznej przewagi kombinacji genotypów *1298AC / 401GA* (z obecnością zmutowanych alleli obydwu badanych polimorfizmów) w grupie z hipotrofią (19,2 vs. 10,9%, WR=1,95, PU 0,89-4,43, $p=0,05$).

5.2.2. POLIMORFIZM GENU *MTHFD1*

Piśmiennictwo dostarcza znacznie mniej danych na temat wpływu pozostałych polimorfizmów związanych z metabolizmem folianów na rozwój hipotrofii płodu. Furness i wsp. oceniali możliwy udział wybranych polimorfizmów genów związanych z metabolizmem folianów w rozwoju niewydolności maciczo-łożyskowej. Badanie to było pierwszym w którym oceniano wpływ matczyne polimorfizmu *1958G>A* genu *MTHFD1* na rozwój hipotrofii. Badanie prowadzono w sposób prospektywny w populacji ciężarnych z Adelaide na południu Australii. W okresie poniżej 20 tc. pacjentki kwalifikowano wstępnie do dwóch grup wysokiego i niskiego ryzyka rozwoju tego powikłania, w zależności od obecności opisywanych powszechnie czynników etiologicznych z wywiadu bądź ryzyka w badaniu przedmiotowym. Dane te następnie poddawano konfrontacji z rozpoznaniem ostatecznym oraz wynikami analizy genetycznej, w której oceniano obecność m.in. polimorfizmu *1985G>A* genu *MTHFD1*, ale także innych wariantów omówionych w dalszej części tego

rozdziálu. Oceniono również stężenia folianów w osoczu i w erytrocytach oraz poziom osoczowej witaminy B12 i B6 w osoczu. Stwierdzono istotny statystycznie wzrost ryzyka hipotrofii u dzieci matek nosicielek zmutowanego genotypu *1958AA*, który występował z częstością 14,3% w grupie kontrolnej oraz 38,9% w grupie badanej, $p=0,047$. Ryzyko względne (*RR- relative risk*) urodzenia dziecka z IURG dla homozygot pod względem tej mutacji obliczono na 5,8. U pacjentek z tym polimorfizmem stwierdzono również podwyższone stężenie folianów w osoczu ($p=0,054$), co jednak straciło na istotności statystycznej po uwzględnieniu takich danych jak suplementacja folianów, witaminy B12 oraz palenie papierosów [58].

Praca Beaudin i wsp. ocenia wpływ polimorfizmu *1958G>A* genu *MTHFD1* w połączeniu z niedoborem folianów w diecie na wzrost płodu, występowanie wad cewy nerwowej oraz płodność u myszy. W dwóch grupach samic myszy nosicielek genotypu zmutowanego oraz genotypu typu dzikiego stosowano dietę ubogą w foliany lub standardową. Zaobserwowano niższe stężenie metioniny i folianów w osoczu u samic myszy ze zmutowanym genotypem *1958AA*. Potomstwo samic nosicielek zmutowanego genotypu utrzymywanych na diecie ubogiej w foliany prezentowało ciężkie upośledzenie wewnątrzmacicznego wzrastania w porównaniu z grupą kontrolną. Natomiast obecność zmutowanego genotypu *1958AA* u płodu nie korelowało z rozwojem hipotrofii [18].

Przegląd piśmiennictwa nie ujawnił żadnego badania dotyczącego związku polimorfizmu *401G>A* genu *MTHFD1* z hipotrofią płodu. Obecna praca podejmuje więc próbę określenia takiej zależności po raz pierwszy.

W powyższej pracy uzyskano istotne statystycznie różnice we frekwencji występowania poszczególnych genotypów i alleli w zakresie polimorfizmu *401G>A* genu *MTHFD1*, co może sugerować jego potencjalny związek z rozwojem hipotrofii u płodu.

W grupie pacjentek z hipotrofią płodu zaobserwowano przewagę genotypu heterozygotycznego *401GA* (39,2 vs. 30,8%, $WR=1,44$) oraz homozygotycznego zmutowanego *401AA* (7,5 vs. 3,4%, $WR=2,35$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Powyższe różnice nie były jednak istotne statystycznie. Natomiast w grupie kontrolnej odnotowano większy procent występowania homozygot niezmutowanych (*401GG*: 53,3 vs. 65,8% w grupie kontrolnej, $WR=0,59$, $p=0,03$). Częstość występowania allela zmutowanego *401A* była również znamienne większa w grupie badanej z hipotrofią, natomiast allela typu dzikiego *401G* w grupie kontrolnej (*401A*: 27,1 vs. 18,8% w grupie kontrolnej), co jest niezwykle

ciekawe w kontekście braku wcześniejszych doniesień na ten temat w dostępnym piśmiennictwie.

Podział na podgrupy w zależności od tygodnia zakończenia ciąży ujawnił także interesującą istotną statystycznie niższą częstość występowania genotypu *401GG* (44,2 vs. 65,8% w grupie kontrolnej, $WR=0,41$, $p=0,007$) oraz wyższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego *401GA*, zawierającego jeden zmutowany allel (48,1 vs. 30,8% w grupie kontrolnej, $WR=2,42$, $p=0,024$) w grupie kobiet, które urodziły dzieci z hipotrofią <37 tc. Podobnie istotną statystycznie różnicę stwierdzono w obecnym badaniu dla allela niezmutowanego *401G*, który występował z niższą częstością w podgrupie <37 tc. (68,3 vs. 81,3%, $WR=0,49$, $p=0,007$). Natomiast allel zmutowany *401A* pojawiał się w większej istotnej statystycznie częstości w tej podgrupie badanej pacjentek, które urodziły <37 tc. (31,7 vs. 18,8%, $WR=2,01$, $p=0,007$). Kolejną interesującą obserwacją było stwierdzenie istotnie statystycznie mniejszej częstości występowania genotypu niezmutowanego *401GG* w porównaniu do grupy kontrolnej (51,7 vs. 65,8%, $WR=0,55$, $p=0,03$) w podgrupie kobiet z masą urodzeniową dzieci ≥ 1500 g oraz istotnie statystycznie większej częstości zmutowanego allela *401A* w tej grupie kobiet (28,7 vs. 18,8%, $WR=1,74$, $p=0,01$). Również genotyp heterozygotyczny *401GA* jak też genotyp homozygotyczny zmutowany *401AA* występował częściej w tej grupie pacjentek (*401GA*: 39,3 vs. 30,8%, $WR=1,45$, $p=0,13$, *401AA*: 9,0 vs. 3,4%, $WR=2,86$, $p=0,07$). Natomiast w grupie kobiet, które urodziły dzieci z masą <1500 g nie odnotowano podobnych różnic.

Obecna praca nie ujawniła natomiast istotnych statystycznie różnic dotyczących polimorfizmu *1958G>A*. Odnotowano porównywalną częstość homozygot niezmutowanych *1958GG* (30,8 vs. 26,7%) oraz heterozygot *1958GA* (50,0 vs. 52,5%), również frekwencja homozygot zmutowanych *1958AA* w grupie badanej była podobna do częstości ich występowania w grupie kontrolnej (19,2 vs. 20,8%). Także niezmutowany allel *1958G* oraz zmutowany allel *1958A* występowały z podobną częstością w grupie badanej i kontrolnej. Podział w zależności od tygodnia zakończenia ciąży oraz masy urodzeniowej noworodka nie ujawnił istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi podgrupami.

Ciekawe wyniki otrzymano natomiast analizując współwystępowanie polimorfizmów *1958G>A* oraz *401G>A* genu *MTHFD1*. Odnotowano istotną statystycznie różnicę w częstości kombinacji genotypów *1958GA / 401GG* w grupie kontrolnej (36,6 vs. 24,1%, $WR=0,55$, $p=0,02$). Interesująca była również obserwacja istotnej statystycznie większej

frekwencji kombinacji genotypów *1958GA / 401AA* w grupie badanej z hipotrofią płodu (5,9 vs. 0,9%, $WR=7,37$, $p=0,03$), co może wskazywać na pośredni udział polimorfizmu *1958G>A* w rozwoju hipotrofii.

5.2.3. POLIMORFIZM GENU *MTR*

Analiza piśmiennictwa pokazuje jedynie dwie pozycje opisujące związek pomiędzy analizowanym polimorfizmem *2756A>G* genu *MTR*, a zmniejszoną masą urodzeniową płodu. Furness i wsp. oceniali wpływ kilku polimorfizmów, wśród których znalazł się także polimorfizm *2756A>G* genu *MTR* w badaniu kohortowym obejmującym 50 pacjentek ze zwiększonym ryzykiem oraz 90 pacjentek z niskim ryzykiem rozwoju powikłań w przebiegu ciąży. Frekwencje poszczególnych genotypów polimorfizmu *2756A>C* nie różniły się istotnie w grupach z hipotrofią i w grupie kontrolnej (*2756AA*: 66,7 vs. 50,0%, *2756AG*: 23,8 vs. 44,4%, *2756GG*: 9,5 vs. 5,6%, $p=0,191$). Stwierdzono natomiast istotną statystycznie przewagę genotypu zmutowanego *2756GG MTR* u płodu w przypadku niewydolności maciczno-łożyskowej oraz jego pozytywną korelację ze zwiększonym stężeniem homocysteiny w osoczu u matki. Wyniki badania wskazują także na możliwą rolę matczynego zmutowanego allele *2756G* w rozwoju niewydolności maciczno-łożyskowej (obejmującej razem przypadki hipotrofii płodu i stanu przedzruciawkowego, $p=0,049$) [58]. Praca Engel i wsp. oceniała także wpływ polimorfizmu *2756A>G* genu *MTR* na występowanie zmniejszonej masy urodzeniowej płodu (SGA), definiowanej jako masa poniżej 10 percentyla w stosunku do wieku ciążowego dla danej populacji, co stanowi definicję zbliżoną do hipotrofii płodu, lecz zawiera w sobie także płody konstytucjonalnie małe, bez wskazania przyczyny patologicznej zaburzającej proces wzrastania. Analizowane dane pochodziły od 180 pacjentek z SGA, spośród których 87 stanowiły kobiety ciężarne rasy białej, 53 rasy czarnej oraz 539 pacjentek z grupy kontrolnej (223 rasy białej, 316 rasy czarnej). Różnice w częstości występowania zmniejszonej masy urodzeniowej płodu nie różniły się istotnie statystycznie pod względem genotypu *2756A>G* genu *MTR* pomiędzy grupą badaną i kontrolną zarówno dla rasy białej, jak i czarnej [49].

W prezentowanej rozprawie zaobserwowano dwukrotnie częstsze występowanie genotypu zmutowanego 2756GG w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną (4,2 vs. 2,5%), co jednak nie stanowiło istotnej statystycznie różnicy. Możliwą przyczynę takiego wyniku analizy można upatrywać w tym przypadku w małej liczebności homozygot zmutowanych w obu grupach. W grupie badanej, jak i kontrolnej uzyskano natomiast podobną frekwencję genotypu niezmutowanego 2756AA (60,8 vs. 56,7%) oraz genotypu heterozygotycznego 2756AG (35,0 vs. 40,8%) oraz częstość występowania allela zmutowanego 2756G (21,7 vs. 22,9%), jak i niezmutowanego 2756A (78,3 vs. 77,1%). Podział na podgrupy kobiet, które urodziły przed i po 37 tygodniem ciąży także nie wykazał zasadniczych różnic pomiędzy badanymi grupami w częstości obserwowanych genotypów.

Ciekawe obserwacje w zakresie polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* odnotowano natomiast analizując wyniki po podziale grupy badanej w zależności od masy urodzeniowej noworodka. Zaobserwowano większą częstość występowania genotypu niezmutowanego 2756AA w podgrupie pacjentek które urodziły dziecko z masa ≥ 1500 g w porównaniu z grupą kontrolną (68,5% vs. 56,7%, WR=1,67, $p=0,05$). Mniejszą częstość tego genotypu stwierdzono natomiast w podgrupie z masa noworodka <1500g (38,7 vs. 56,7%, WR=0,48, $p=0,05$). Wynik znajdował się na granicy istotności statystycznej. Wariant heterozygotyczny 2756AG zawierający jeden zmutowany allel, występował istotnie statystycznie częściej w grupie kontrolnej (40,8%) niż w podgrupie ≥ 1500 g (28,1%, WR=0,57, $p=0,04$). Zaobserwowano także mieszczący się na granicy istotności statystycznej wynik dotyczący większej częstości zmutowanego allela 2756G w podgrupie badanych pacjentek, które urodziły dziecko z masa ciała <1500 g (33,9 vs. 23,0%, WR=1,72, $p=0,05$) w porównaniu z grupą kontrolną.

Kolejnych ciekawych obserwacji dostarczyło badanie współwystępowania polimorfizmów 677C>T genu *MTHFR* oraz 2756A>G genu *MTR*. Odnotowano istotnie statystycznie większą częstość współwystępowania genotypów 677CT / 2756AG w grupie kontrolnej (20,8 vs. 11,6% w grupie badanej, WR=0,50, $p=0,04$). Natomiast podczas analizy współwystępowania polimorfizmów 2756A>G genu *MTR* oraz 401G>A genu *MTHFD1* odnotowano większą frekwencję kombinacji genotypów 401GA / 2756AA w grupie z hipotrofią (30,0 vs. 19,2%, WR=1,81, $p=0,03$).

5.2.4. POLIMORFIZM GENU *MTRR*

Dane dotyczące możliwego związku mutacji *66A>G* genu *MTRR* także są nieliczne i pochodzą z dwóch pozycji piśmiennictwa. Wymieniana już wcześniej praca Engel i wsp. oceniała związek wybranych polimorfizmów z występowaniem małej masy urodzeniowej noworodka, wśród których znalazł się polimorfizm *66A>G* genu *MTRR*. Autorzy nie zaobserwowali zwiększonego ryzyka małej masy urodzeniowej u nosicielek genotypu heterozygotycznego *66GA* oraz homozygotycznego *66AA* i *66GG* zarówno dla populacji kaukaskiej, jak i afroamerykańskiej [49].

Także w pracy Furness i wsp., częstość poszczególnych genotypów polimorfizmu *66A>G* genu *MTRR* nie wykazywała istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą z hipotrofią płodu, a grupą kontrolną zdrowych ciężarnych (*66AA*: 33,3 vs. 33,3%, *66AG*: 42,9 vs. 50,0%, *GG*: 23,8 vs. 16,7%, $p=0,669$). Nie stwierdzono także żadnych różnic istotnych statystycznie w stężeniu osoczym folianów, witaminy B12, a także homocysteiny w zależności od genotypów *66A>G MTRR* ciężarnej [58].

Również w obecnym badaniu, podobnie jak w powyżej cytowanych pracach, nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą badaną i kontrolną pod względem częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli polimorfizmu *66A>G* genu *MTRR*, co może sugerować brak jego bezpośredniego związku z rozwojem hipotrofii płodu. Genotyp heterozygotyczny *66AG* występował u 50,8% pacjentek w grupie badanej oraz u 52,5% pacjentek z grupy kontrolnej. Nie uzyskano także istotnych statystycznie różnic dla frekwencji homozygot zmutowanych *66GG* (30,0 vs. 28,3%) oraz w zakresie częstości występowania allela zmutowanego *66G* (55,4 vs. 54,6%) w obydwu grupach. Rozkład genotypów oraz alleli tego polimorfizmu w podgrupach ciężarnych, które urodziły dziecko z hipotrofią ≥ 37 tc. i < 37 tc. oraz podział w zależności od masy urodzeniowej noworodka także nie wykazał żadnych istotnych statystycznie różnic.

Analizując wyniki dotyczące współwystępowanie polimorfizmów *66A>G* genu *MTRR* oraz *776C>G* genu *TCII* stwierdzono istotnie statystycznie większą częstość występowania kombinacji genotypów *66AA / 776GG* (z obecnością zmutowanego genotypu *776GG*) w grupie kontrolnej zdrowych kobiet ciężarnych (8,4 vs. 1,7% w grupie kontrolnej, $p=0,02$).

5.2.5. POLIMORFIZM GENU *TCII*

Wśród dostępnego piśmiennictwa nie odnaleziono prac badających związek pomiędzy hipotrofią płodu a polimorfizmem *766C>G* genu transkobalaminy II. Obecna praca jest pierwszą próbą poruszenia tego zagadnienia.

W powyższej pracy zaobserwowano podobną częstość występowania genotypu zmutowanego *776GG* (20,0 vs. 22,5%), a także genotypu dzikiego *776CC* (27,5 vs. 30,8%) i genotypu heterozygotycznego *776CG* (52,5 vs. 46,7) w grupie badanej i grupie kontrolnej. Także frekwencja występowania typu dzikiego allele *766C* (53,8 vs. 54,2%) oraz zmutowanego allele *776G* (46,3% vs. 45,8%) były zbliżone w obu grupach. Nie stwierdzono również różnic statystycznie istotnych w zakresie rozkładu poszczególnych genotypów i alleli w obu podgrupach w zależności od tygodnia zakończenia ciąży lub masy urodzeniowej noworodka w porównaniu z grupą kontrolną. W podgrupie matek dzieci z masą urodzeniową <1500 g zaobserwowano nieznacznie rzadszą frekwencję występowania allele niezmutowanego *776C* (45,3 vs. 54,2%; WR=0,69, $p=0,13$), natomiast częstszą allele zmutowanego *776G* (54,8 vs. 45,8%; WR=1,44, $p=0,13$) niż w grupie kontrolnej, co jednak nie było istotne statystycznie. Genotyp homozygotyczny zmutowany *776GG* obserwowano u nieco większej liczby pacjentek z grupy <1500 g (35,5%) w porównaniu do grupy kontrolnej (22,5%, WR=1,89, $p=0,10$), natomiast w grupie ≥ 1500 g u mniejszej liczby kobiet (14,6%, WR=0,59, $p=0,10$).

Ciekawej obserwacji dostarczyła natomiast analiza współwystępowania genotypów. W przypadku polimorfizmów *776C>G* genu *TCII* oraz polimorfizmu *677C>T* genu *MTHFR* zaobserwowano częste współwystępowanie kombinacji genotypów *677TT / 776CG* w grupie z hipotrofią (10,0 vs. 2,5%, WR=4,33, $p=0,01$), co stanowiło istotną statystycznie różnicę.

Dane z piśmiennictwa, dotyczące związku matczynych polimorfizmów w obrębie badanych genów metabolizmu folianów z rozwojem hipotrofii płodu opisane przez innych autorów w skróconej formie zaprezentowano w tabeli 63. Tabela 64 prezentuje natomiast dostępne w piśmiennictwie przykłady polimorfizmów innych genów mogących mieć udział w rozwoju hipotrofii płodu.

Tab. 63. Polimorfizmy genów związanych z metabolizmem folianów i ich udział w rozwoju hipotrofii płodu.

<i>Gen</i>	<i>Polimorfizm</i>	<i>Możliwy związek polimorfizmu z hipotrofią płodu</i>	<i>Liczba pacjentek, kraj/rasa</i>	<i>Autor</i>
<i>MTHFR</i>	<i>667C>T</i>	wzrost ryzyka (WR=4,2)	44 ciężarne, Izrael	Kupferminc i wsp., 1999
		brak wpływu	584 ciężarnych, Irlandia w tym 9 z hipotrofią płodu	Murphy i wsp., 2000
		przewaga homozygotycznego genotypu <i>677TT</i> w grupie badanej (47,2 vs. 10,4%, WR=1,5), jednakże po uwzględnieniu innych zmiennych, analiza statystyczna nie potwierdziła niezależnego związku tego polimorfizmu z IURG	61 ciężarnych, Włochy	Martinelli i wsp., 2001
		wzrost ryzyka tylko dla homozygot <i>677TT</i> w przypadku niezażywania multiwitamin (WR=12,3)	493 ciężarne, Kanada	Infante-Rivadr i wsp., 2002
		brak wpływu	97 ciężarnych, Francja	Vespryck i wsp., 2002
		mierny wzrost ryzyka (dla <i>677TT</i> WR=1,2)	1734 ciężarne, Norwegia	Nurk i wsp., 2004
		brak wpływu	195 ciężarnych, metaanaliza	Robertson i wsp., 2005
		nieznaczny wzrost ryzyka (WR=1,2)	180 pacjentek, USA (87 rasy białej, 53 rasy czarnej)	Engel i wsp., 2006
		brak wpływu	154 ciężarne, Hiszpania	Ubeda i wsp., 2011
	brak wpływu	44 ciężarne, Francja	Said, 2012	
	<i>1298A>C</i>	zmniejszenie ryzyka SGA dla homozygot niezmutowanych <i>1298AA</i> rasy białej (WR=0,6)	180 ciężarnych, USA (87 rasy białej, 53 rasy czarnej)	Engel i wsp., 2006
		wzrost ryzyka (WR=2,06)	36 ciężarne, Płd. Afryka	Gebhardt i wsp., 2001
		zmniejszenie ryzyka (WR=0,49)	493 ciężarne, Kanada	Infante-Rivard i wsp., 2002
		wzrost ryzyka (WR=4,7)	50 ciężarnych, Tunezja	Klai i wsp., 2011

		brak wpływu	44 ciężarne, Francja	Said, 2012
	1793G>A	brak wpływu	473 ciężarne, Meksyk	Kordas i wsp., 2009
	1958G>A	istotny wzrost ryzyka dla homozygot 1958 AA (WR=5,8)	149 ciężarnych, Australia	Furness i wsp., 2008
	401G>A	brak danych	brak danych	brak danych
MTR(MS)	2756A>G	brak wpływu matczynej polimorfizmu, możliwa rola wariantów genetycznych u płodu	149 ciężarnych, Australia	Furness i wsp., 2008
		brak wpływu	180 ciężarnych, USA (87 rasy białej, 53 rasy czarnej)	Engel i wsp., 2006
MTRR (MSR)	66A>G	brak wpływu	149 ciężarnych, Australia	Furness i wsp., 2008
		brak wpływu	180 ciężarnych, USA (87 rasy białej, 53 rasy czarnej)	Engel i wsp., 2006
TCII	776C>G	brak danych	brak danych	brak danych

Tab. 64. Inne matczyne polimorfizmy mogące mieć udział w rozwoju hipotrofii płodu.

<i>Gen</i>	<i>Polimorfizm</i>	<i>Możliwy związek polimorfizmu u matki z hipotrofią płodu</i>	<i>Kraj/rasa</i>	<i>Liczba pacjentek</i>	<i>Autor</i>
VDR	rs11168292	wzrost ryzyka dla ciężarnych rasy białej	USA, rasa biała	77 ciężarnych	Bodnar i wsp., 2010
	rs11168287, rs3782905, rs2239179	wzrost ryzyka dla ciężarnych rasy czarnej	USA, rasa czarna	34 ciężarne	
EGF	61G > A	większa masa urodzeniowa dla genotypów: <i>61AA > 61GA > 61GG</i>	Indie, Wielka Brytania rasa biała	272 ciężarne rasy białej 171 ciężarnych, Indie/Wielka Brytania	Dissannayake i wsp., 2007
	2566G > A	większa masa urodzeniowa dla genotypów <i>2566GG > 2566GA > 2566AA</i>			
Mitochondrialne DNA	16189 wariant	wzrost ryzyka	dane niedostępne	dane niedostępne	Dunger i wsp., 2006
H19	2992C>T	(odpowiada za zwiększone stężenie IGF-II) rola ochronna allele 2992T w rozwoju hipotrofii	Anglia, rasa biała	822 ciężarne	Petry i wsp., 2005
TIMP2	rs2277698	wzrost ryzyka	Chile	530 ciężarnych	Edwards i wsp., 2011

COL5A2 PLAU	GNSC_635148713 rs2227562	wzrost ryzyka przy współistnieniu obydwu polimorfizmów	Chile	530 ciężarne	Edwards i wsp., 2011
ACE	delecja	wzrost ryzyka	Japonia	470 ciężarnych	Nakamura i wsp., 2012
Fas (TNFRSF6)	-670	wzrost ryzyka	USA	27 ciężarnych	Robinson i wsp.,
COMT	rs4680	wzrost ryzyka	Japonia	412 ciężarnych	Sata i wsp., 2006
TNF-alpha	AluI	wzrost ryzyka	Polska	42 ciężarne	Seremak-Mrozikiewicz i wsp., 2008
MBL	polimorfizm – kodon 54	rola ochronna	Węgry	65 ciężarnych	Sziller i wsp., 2007
LRP8	rs2297660	rola ochronna	rasa czarna/USA	164 ciężarne	Wang i wsp., 2006
Czynnik V	1691G > A	wzrost ryzyka	Australia	6755 ciężarnych	Dudding i wsp., 2004
Czynnik V	1691G > A	wzrost ryzyka	Kanada	metaanaliza 10 badań	Howney i wsp., 2005
Protrombina	20210G > A	wzrost ryzyka	Kanada		

VDR- vitamin D receptor, EGF- epidermal growth factor, H19- imprinted maternally expressed transcript, COL5A2- collagen type 5 alpha 2, ACE-angitensin converting enzyme, PLAU- plasminogen activator urokinase, COL1A1-alpha 1 type I collagen preproteine, TIMP2 - tissue inhibitor of metalloproteinase 2, TNFRSF6 - tumor necrosis factor receptor superfamilly member 6, COMT - catechol-O-methyltransferase, TNF-alpha- tumor necrosis factor alpha, MBL - mannose-binding lectin, LPR8- Low-density lipoprotein receptor-related protein 8 (ApoE receptor 2)

5.3. IMPLIKACJE KLINICZNE I MOŻLIWOŚCI TERAPII

Pomimo wielu badań wskazujących na możliwe czynniki ryzyka i patofizjologię rozwoju hipotrofii płodu możliwości terapii tej patologii ciąży są nadal ograniczone. Postępowanie w hipotrofii obejmuje regularną ocenę dobrostanu płodu, przy zastosowaniu takich metod jak kardiografia i ultrasonografia, ze szczególnym uwzględnieniem badania dopplerowskiego [17, 211]. Decyzje o wcześniejszym zakończeniu ciąży podejmuje się w przypadku wystąpienia objawów zagrożenia życia płodu. Istnieją doniesienia na temat prób terapii hipotrofii przy zastosowaniu L-argininy, aspiryny w małym dawkowaniu lub heparyny drobnocząsteczkowej w dawkach profilaktycznych [92]. Obecnie brak jest jakichkolwiek dowodów na skuteczność takiego postępowania. W przeciwieństwie do współczesnych możliwości diagnostyki hipotrofii, nie istnieją obecnie praktycznie żadne ustalone i powszechnie przyjęte skuteczne metody terapii tego powikłania [160].

Możliwym sposobem prewencji zaburzonego wzrastania płodu, związanego z nieprawidłowym metabolizmem folianów, może być stosowanie właściwej suplementacji. Dotyczy to zarówno dawki, jak i formy preparatu uzupełniającego ilość folianów dostarczanych z codzienną dietą. Dotychczas najpowszechniej stosowaną metodą suplementacji folianów zalecaną w okresie przygotowania do ciąży oraz w trakcie ciąży jest spożywanie kwasu foliowego, stosowane celem prewencji wad cewy nerwowej u płodu. Polskie Towarzystwo Ginekologiczne zaleca w takiej sytuacji stosowanie 0,4 mg preparatu kwasu foliowego dziennie najlepiej już w okresie 3 miesięcy poprzedzającym zajście w ciążę oraz przez cały czas jej trwania. W szczególnych sytuacjach zalecana dawka powinna być zwiększona do 4 mg na dobę [155]. Kwas foliowy jest syntetyczną formą folianów, obecną we wzbogaconej żywności oraz preparatach witaminowych. Po podaniu musi ulec przekształceniu do aktywnego metabolicznie tetrahydrofolianu przy udziale enzymu reduktazy dihydrofolianowej (DHFR - *dihydrofolate reductase*). Tetrahydrofolian następnie ulega przemianie do L-5-metylenotetrahydrofolianu, co wymaga aktywności enzymu MTHFR, której polimorfizmy są przedmiotem obecnej rozprawy. Proces ten zachodzi w komórkach nabłonka jelitowego podczas wchłaniania kwasu foliowego. Tak więc dominującą formą folianów powstającą w wyniku przemiany kwasu foliowego oraz aktywną metabolicznie odmianą stanowiącą do 98% osoczowych folianów jest L-5 metyltetrahydrofolian. Piśmiennictwo podaje, że w rasie kaukaskiej częstość występowania

zmutowanych homozygot *677TT* genu *MTHFR* wynosi 10-26%, a w populacji pochodzenia latynoskiej ich liczebność sięga nawet do 37% [11]. Ta dość istotna część populacji, w przypadku wcześniejszego rozpoznania obecności mutacji mogłaby odnieść korzyści z zastosowania L-5-metylenotetrahydrofolianu, który nie wymaga przekształcenia podczas procesu wchłaniania z przewodu pokarmowego [148].

Z powodu mniejszej stabilności L-5-metylenotetrahydrofolianu jego zastosowanie na szerszą skalę jako alternatywy dla suplementacji kwasem foliowym nie było możliwe, do czasu uzyskania jego stabilnej soli wapniowej. Zaletą zastosowania L-5-metylenotetrahydrofolianu w porównaniu do kwasu foliowego jest brak zależności od aktywności enzymów takich jak *DHFR* oraz *MTHFR*. Można przypuszczać, że zastosowanie tej formy suplementacji może mieć istotne znaczenie także w przypadku nosicielek zarówno zmutowanych wariantów polimorfizmów genu *MTHFR*, jak również innych genów biorących udział w metabolizmie folianów. W licznych badaniach udowodniono, że zastosowanie preparatu L-5-metylenotetrahydrofolianu cechuje się conajmniej taką samą skutecznością w podwyższeniu zawartości folianów, jak zastosowanie kwasu foliowego. W pracach tych za miernik ustrojowego stężenia folianów uznawano zarówno ich poziom w osoczu oraz w erytrocytach, będący implikacją przemian metabolicznych folianów [148].

W badaniu Lamers i wsp., autorzy dowodzą co najmniej takiej samej skuteczności zastosowania L-5-metylenotetrahydrofolianu w porównaniu z preparatem kwasu foliowego. W grupie 144 kobiet podawano losowo 400 µg kwasu foliowego, 416 µg [6S]-5-metylenotetrahydrofolianu, 208 µg [6S]-5-metylenotetrahydrofolianu, bądź placebo. Po upływie 4 tygodni zmierzono stężenie homocysteiny i folianów w osoczu. Zaobserwowano porównywalny istotny statystycznie spadek stężenia homocysteiny oraz wzrost stężenia folianów w osoczu we wszystkich trzech grupach w porównaniu z grupą placebo. Wzrost stężenia folianów w osoczu oraz w erytrocytach w grupie pacjentek zażywających 416 µg [6S]-5-metylenotetrahydrofolianu był jednak istotnie statystycznie wyższy w porównaniu z kobietami otrzymującymi 400 µg kwasu foliowego, 208 µg [6S]-5-metylenotetrahydrofolianu oraz placebo [98].

Kolejna praca autorstwa Houghton i wsp. na podstawie trwającego 16 tygodni randomizowanego badania z zastosowaniem placebo w grupie 72 pacjentek będących w trakcie laktacji wykazali, że zastosowanie [6S]-5-metylenotetrahydrofolianu podwyższa

stężenie folianów w erytrocytach w większym stopniu w porównaniu ze stosowaniem preparatu kwasu foliowego ($p < 0,05$) [76].

Interesujące są wyniki uzyskane przez Fohr i wsp., które opisują efekty zastosowania kwasu foliowego w dawce 400 $\mu\text{g}/24$ h lub równoważnej ilości L-5-metylenotetrahydrofolianu 906 nmol/24 h w ciągu 8 tygodni w grupie 160 młodych kobiet. Po 4 i 8 tygodniach w obu grupach pacjentek zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu folianów w osoczu w porównaniu z grupą placebo. Wykazano, że po tym okresie osoczowe stężenie folianów wzrosło 3-krotnie bardziej w grupie pacjentek stosujących L-5-metylenotetrahydrofolian. Wzrost poziomu folianów zawartych w erytrocytach był natomiast porównywalny w obu grupach (69% i 66%). Interesującą obserwacją był wzrost stężenia ustrojowego folianów oraz obniżenia poziomu homocysteiny w osoczu (z uwzględnieniem dwóch rodzajów suplementacji oraz w grupie placebo) w trzech podgrupach z uwzględnieniem polimorfizmu $677C > T$ genu *MTHFR*. Zastosowanie suplementacji kwasem foliowym znamienne obniżało stężenie homocysteiny o co najmniej 13% u pacjentek z każdym genotypem polimorfizmu $677C > T$. Największy spadek stężenia homocysteiny wynoszący 20% ($p < 0,05$) charakteryzował pacjentki z genotypem $677TT$ polimorfizmu $677C > T$ *MTHFR* mierzony po 4 tygodniach. W grupie heterozygot $677CT$ zaobserwowano spadek poziomu homocysteiny o 15%. Dalsza obserwacja do 8 tygodni nie wykazała pogłębiania tej tendencji. Natomiast w grupie niezmutowanych homozygot $677CC$ istotny statystycznie spadek (o 13%) stwierdzono dopiero po ośmiu tygodniach. W grupie pacjentek zażywających L5-metylenotetrahydrofolian istotny statystycznie spadek stężenia homocysteiny (o 7%) zaobserwowano w podgrupie heterozygot $677CT$. Największy efekt obniżający stężenie homocysteiny zaobserwowano w grupie zmutowanych homozygot $677TT$. Pacjentki te wykazały istotny statystycznie spadek poziomu osoczowej homocysteiny, który wynosił 20% po 4 tygodniach zastosowania preparatu kwasu foliowego. Zaobserwowano także nieistotny statystycznie spadek o 15% po 4 tygodniach suplementacji L-5-metyltetrahydrofolianem. W przypadku zastosowania każdej suplementacji, w grupie pacjentek z genotypem zmutowanym $677TT$ *MTHFR* wykazano największe wzrosty poziomu folianów zawartych w erytrocytach (84%), w porównaniu z grupą heterozygot CT (50%) oraz homozygot TT (42%), co stanowiło istotną statystycznie różnicę [56].

Pomimo że liczne badania dowodzą co najmniej podobnej skuteczności zastosowania preparatów L-5-metylenotetrahydrofolianu w porównaniu z substytucją kwasem foliowym,

jednak dane dotyczące prac uwzględniających podział na genotypy pod względem polimorfizmów *MTHFR* są dość ograniczone. W badaniu Pentieva i wsp. mierzono stężenie folianów w osoczu przed i do 10 godzin po zastosowaniu w sposób losowy 500 µg kwasu foliowego, 500 µg L-5-metylenotetrahydrofolianu, bądź placebo. Z badania tego wykluczono homozygoty zmutowane *677TT*. Z uwzględnieniem pozostałych genotypów wykazano poziom osoczowy folianów narastał istotnie od 0,5 do 5 godzin po zastosowaniu suplementacji i nie różnił się w przypadku obu preparatów, co może wskazywać na ich zbliżoną biodostępność [146].

5.4. PODSUMOWANIE

Hipotrofia płodu jest niezwykle złożonym powikłaniem ciąży, które ze względu na możliwe bezpośrednie konsekwencje w skrajnym przypadku może prowadzić nawet do zagrożenia życia płodu. Coraz częściej dyskutowane są również odległe skutki metaboliczne u dzieci hipotroficznym w późniejszym życiu. W wielu przypadkach etiologia hipotrofii płodu pozostaje niewyjaśniona. Ponieważ właściwy rozwój wewnątrzmaciczny płodu zależny m. in. od dostępności folianów, dlatego obecnie zainteresowanie budzą badania związane z zaburzeniami ich przemiany. Zaburzenia metabolizmu folianów, poprzez nadmiar homocysteiny mogą wpływać na implantację i embriogenezę oraz upośledzać tworzenie naczyń krwionośnych łożyska. Z kolei zahamowanie syntezy zasad potrzebnych do budowy DNA oraz upośledzenie metylacji DNA, może skutkować ograniczeniem proliferacji i różnicowania się komórek. Wszystkie te procesy mogą prowadzić do rozwoju powikłań w przebiegu ciąży, w tym do zaburzeń wzrastania płodu.

Uwarunkowania hipotrofii wynikające z obecności polimorfizmów genetycznych są przedmiotem badań w wielu ośrodkach naukowych. W ostatnie dekadzie wykazano, że obecność niektórych polimorfizmów warunkujących aktywność enzymów i kofaktorów w cyklu przemian folianów silnie zaburza metabolizm homocysteiny, syntezę puryn i pirymidyn oraz metylację DNA. Najlepiej poznanymi pod tym względem są warianty genetyczne enzymu *MTHFR* (*677C>T*, *1298A>C*, *1793G>A*). Wydaje się jednak, że również inne enzymy uczestniczące w procesie przemiany folianów mogą odgrywać istotną rolę w

regulacji stężenia homocysteiny i folianów w osoczu oraz stężenia folianów w erytrocytach. Należą do nich m.in. enzymy MTR/MS, MTRR, MTHFD1 oraz TCII.

W piśmiennictwie spotyka się tylko pojedyncze doniesienia na temat roli polimorfizmów związanych z metabolizmem folianów w kontekście występowania hipotrofii płodu. Obecna rozprawa doktorska porusza więc stosunkowo nowe zagadnienie. Dodatkowo badany polimorfizm 401G>A genu *MTHRD1* oraz polimorfizm 766C>G genu *TC II* w aspekcie etiologii hipotrofii płodu analizowany był po raz pierwszy.

Ponadto wielu autorów sugeruje, że dopiero całościowa analiza wspólnego oddziaływania kilku polimorfizmów daje pełny obraz wpływu czynników genetycznych na metabolizm folianów i możliwość dokładnego poznania znaczenia uwarunkowań genetycznych w hipotrofii płodu, także w aspekcie klinicznym. Sugestia ta została częściowo potwierdzona w prezentowanej rozprawie, gdzie wskazano na wpływ jednoczesnego współdziałania kilku polimorfizmów na ryzyko wystąpienia hipotrofii: polimorfizmu 401G>A genu *MTHFD1*, 677C>T, 1298A>C, 1793G>A genu *MTHFR*, 2756A>G genu *MTR* oraz 776C>G genu *TCII*.

Wobec roli problemu jakim jest występowanie hipotrofii w przebiegu ciąży, badania genetyczne dotyczące polimorfizmów genów związanych z przemianą folianów mogą rzucać nowe spojrzenie na postępowanie w tym powikłaniu ciąży. W obliczu braku udowodnionych metod terapii wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu niezwykle ważną kwestią w postępowaniu w hipotrofii wydaje się nie tylko wczesne rozpoznanie i właściwy nadzór położniczy. Istotną kwestią pozostaje również, po wyznaczeniu grupy ryzyka kobiet nosicielek polimorficznych wariantów zaburzających aktywność enzymów szlaku przemian folianów, właściwa profilaktyka w postaci odpowiedniej suplementacji folianami.

6. WNIOSKI

1. Analiza polimorfizmów genów enzymów związanych z metabolizmem folianów pokazała najistotniejszy bezpośredni wpływ zmutowanego wariantu *401A* genu *MTHFD1* na ryzyko rozwoju hipotrofii płodu.
2. Przeprowadzone badania sugerują szczególnie związek zmutowanego allele *401A* genu *MTHFD1* z hipotrofią w przypadku ciąż zakończonych przed 37 tc. i u noworodków z masą powyżej 1500 g.
3. W pracy wskazano również na możliwą rolę zmutowanego allele *2756G* genu *MTR* w etiologii hipotrofii płodu u noworodków z masą poniżej 1500 g.
4. Uzyskane wyniki dotyczące częstości występowania poszczególnych genotypów oraz allele polimorfizmu *677C>T*, *1298A>C*, *1793G>A* genu *MTHFR*, *1958G>A* genu *MTHFD1*, *776C>G* genu *TCII*, oraz *66A>G* genu *MTRR* nie wskazują na ich bezpośredni związek z ryzykiem rozwoju hipotrofii płodu.
5. Analiza współwystępowania genotypów wskazała na możliwość interakcji polimorfizmów wpływającej na wzrost ryzyka hipotrofii, a zwłaszcza łącznego wpływu wariantów: *401G>A* genu *MTHFD1*, *677C>T*, *1298A>C*, *1793G>A* genu *MTHFR*, *2756A>G* genu *MTR* oraz *776C>G* genu *TCII*.

6. PIŚMIENNICTWO

1. Aardema MW, Oosterhof H, Timmer A, van Rooy I, Aarnoudse JG. Uterine artery Doppler flow and uteroplacental vascular pathology in normal pregnancies and pregnancies complicated by pre-eclampsia and small for gestational age fetuses. *Placenta*. 2001, 22, 405-411.
2. ACOG American College of Obstetricians and Gynecologists. Intrauterine growth restriction. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet*. 2001, 72, 85-89.
3. Akar N, Akar E. Methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase 1958G>A (R653Q) polymorphism in Turkish patients with venous thromboembolism. *Acta Haematol*. 1999, 102, 199-200.
4. Alfirevic Z, Roberts D, Martlew V. How strong is the association between maternal thrombophilia and adverse pregnancy outcome? A systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2002, 101, 6-14.
5. Allen LH. Biological mechanisms that might underlie iron's effects on fetal growth and preterm birth. *J Nutr*. 2001, 131, 581-589.
6. Anteby EY, Musalam B, Milwidsky A, Blumenfeld A, Gilis S, Valsky D, Hamani Y. Fetal inherited thrombophilias influence the severity of preeclampsia, IUGR and placental abruption. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004, 113, 31-35.
7. Arechavaleta-Velasco F, Koi H, Strauss JF, III, Parry S. Viral infection of the trophoblast: time to take a serious look at its role in abnormal implantation and placentation? *J Reprod Immunol*. 2002, 55, 113-121.
8. Arlettaz R, Kashiwagi M, Das-Kundu S, Fauchere JC, Lang A, Bucher HU. Methadone maintenance program in pregnancy in a Swiss perinatal center (II): neonatal outcome and social resources. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2005, 84, 145-150.
9. Ayar A, Celik H, Ozelik O, Kelestimur H. Homocysteine induced enhancement of spontaneous contractions of myometrium isolated from pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2003, 82, 789-793.
10. Bailey LB, Gregory JF: Folate metabolism and requirements. *J Nutr*. 1999, 129, 779-782.
11. Bailey LB, Moyers S, Gregory III FJ. Folate. In: Bowman BA, Russell RM, editors. *Present knowledge of nutrition*. 8th ed Washington, DC: ILSI Press, 2001, 214-219.
12. Baker PN, Wheeler SJ, Sanders TA, Thomas JE, Hutchinson CJ, Clarke K, Berry JL, Jones RL, Seed PT, Poston L. A prospective study of micronutrient status in adolescent pregnancy. *Am J Clin Nutr*. 2009, 89, 1114-1124.
13. Barber R, Shalat S, Hendricks K, Joggerst B, Larsen R, Suarez L, Finnell R. Investigation of folate pathway gene polymorphisms and the incidence of neural tube defects in a Texas Hispanic population. *Mol Genet Metab*. 2000, 70, 45-52.
14. Barlowe CK, Williams ME, Rabinowitz JC, Appling DR. Site-directed mutagenesis of yeast C1-tetrahydrofolate synthase: analysis of an overlapping active site in a multifunctional enzyme. *Biochemistry*. 1989, 28, 2099-2106.
15. Barut F, Barut A, Gun BD, Kandemir NO, Harma MI, Harma M, Aktunc E, Ozdamar SO. Intrauterine growth restriction and placental angiogenesis. *Diagn. Pathol*. 2010, 22, 24.
16. Baschat AA. Pathophysiology of fetal growth restriction: implications for diagnosis and surveillance. *Obstetrical and Gynecological Survey*. 2004, 59, 617-627.

17. Baschat AA, Gembruch U, Harman CR. The sequence of changes in Doppler and biophysical parameters as severe fetal growth restriction worsens. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2001, 18, 571–577.
18. Beaudin AE, Perry CA, Stabler SP, Allen RH, Stover PJ. Maternal Mthfd1 disruption impairs fetal growth but does not cause neural tube defects in mice. *Am J Clin Nutr.* 2012, 95, 882-891.
19. Becroft DM, Thompson JM, Mitchell EA. The epidemiology of placental infarction at term. *Placenta* 2002, 23, 343-351.
20. Bergen NE, Jaddoe VWV, Timmermans S, Hofman A, Lindemans J, Russcher H, Raat H, Steegers-Theunissen RPM, Steegers EAP. Homocysteine and folate concentrations in early pregnancy and the risk of adverse pregnancy outcomes: the Generation R Study. *BJOG.* 2012, 119, 739-751.
21. Bodnar LM, Catov JM, Zmuda JM, Cooper ME, Parrott MS, Roberts JM, Marazita ML, Simhan HN. Maternal serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with small-for-gestational age births in white women. *J Nutr.* 2010, 140, 999-1006.
22. Botto LD, Yang Q. Methylene tetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HUGE review. *Am J Epidemiol* 2000, 151, 862-877.
23. Bowen R A, Wong BY, Cole DE. Population-based differences in frequency of the transcobalamin II Pro259Arg polymorphism. *Clin Biochem.* 2004, 37, 128-133.
24. Brenner B. Clinical management of thrombophilia-related placental vascular complications. *Blood* 2004, 103, 4003-4009.
25. Brodsky D, Christou H. Current concepts in intrauterine growth restriction. *J Intensive Care Med.* 2004, 19, 307-319.
26. Brody LC, Conley M, Cox Ch. et al., A polymorphism, R653Q, in trifunctional enzyme methylenetetrahydrofolate dehydrogenase / methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase / formyltetrahydrofolate synthetase is a maternal genetic risk factor for neural tube defects : report of birth defect research group. *Am J Hum Genet.* 2002, 71, 1207-1215.
27. Brown CA, McKinney KQ, Kaufman JS, Gravel RA, Rozen R. A common polymorphism in methionine synthase reductase increases risk of premature coronary artery disease. *J Cardiovasc Risk.* 2000, 7, 197-200.
28. Brzozowska I. Kształtowanie się wielkości parametrów rozwoju fizycznego noworodków w Polsce. *Probl Med Wieku Rozw.* 1973, 3, 83-98.
29. Burke G, Robinson K, Refsum H, Drumm J, Graham I. Intrauterine Growth Retardation, Perinatal Death, and Maternal Homocysteine Levels *N Engl J Med.* 1992, 326, 69-70.
30. Castro R, Rivera I, Ravasco P, Jacobs C, Blom HJ, Camilo ME, De Almeida IT. 15,10-methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C-->T and 1298A-->C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet.* 2004, 41, 454-458.
31. Chango A, Fillon-Emery N, Mircher C, Blehaut H, Lambert D, Herbeth B, James SJ, Rethore MO, Nicolas JP. No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers. *Br J Nutr.* 2005, 94, 166-169.
32. Cheng J, Zhu WL, Dao JJ, Li SQ, Li Y. Relationship between polymorphism of methylenetetrahydrofolate dehydrogenase and congenital heart defect. *Biomed Environ Sci.* 2005, 18, 58-64.
33. Churchill D, Bayliss H, Beevers G. Fetal growth restriction. *Lancet* 2000, 355, 1366-1367.
34. Clausson B, Cnattingius S, Axelsson O. Preterm and term births of small for gestational age infants: a population-based study of risk factors among nulliparous women. *Br J Obstet Gynaecol.* 1998, 105, 1011-1017.
35. Cone TE. De ponolere in fautum recens notarium. The history of weighing the newborn infant. *Pediatr.* 1961, 1490-1498.

36. Coppede F, Migheli F, Bargagna S, Siciliano G, Antonucci I, Stuppia L, Palka G, Migliore L. Association of maternal polymorphisms in folate metabolizing genes with chromosome damage and risk of Down syndrome offspring. *Neurosci Lett.* 2009, 449, 15-19.
37. Curtin K, Ulrich CM, Samowitz WS, Wolff RK, Duggan DJ, Makar KW, Caan BJ, Slattery ML. Candidate pathway polymorphisms in one-carbon metabolism and risk of rectal tumor mutations. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2011, 2, 1-8.
38. Czczot H. Kwas foliowy w fizjologii i patologii. *Postepy Hig Med Dosw.* 2008, 62, 405-419.
39. Dashe JS, McIntire DD, Lucas MJ, Leveno KJ. Effects of symmetric and asymmetric fetal growth on pregnancy outcomes. *Obstet Gynecol.* 2000, 96, 321-327.
40. Dawes MG, Grudzinskas JG. Repeated measurement of maternal weight during pregnancy. Is this a useful practice? *Br J Obstet Gynaecol.* 1991, 98, 189-194.
41. Dissanayake VH, Tower C, Broderick A, Stocker LJ, Seneviratne HR, Jayasekara RW, Kalsheker N, Broughton Pipkin F, Morgan L. Polymorphism in the epidermal growth factor gene is associated with birthweight in Sinhalese and white Western Europeans. *Mol Hum Reprod.* 2007, 13, 425-429.
42. De Vries JLP, Dekker GA, Huijgens PC, Jakobs C, Blomberg BME, Van Geijn HP. Hyperhomocysteinaemia and protein S deficiency in complicated pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997, 104, 1248-1254.
43. de Zegher F, Albertsson-Wikland K, Wilton P, Chatelain P, Jonsson B, Löfström A, Butenandt O, Chaussain JL. Growth hormone treatment of short children born small for gestational age: meta-analysis of four independent, randomized, multicenter studies. *Acta Paediatr.* 1996, 417, 27-31.
44. Di Simone N, Maggiano N, Caliandro D, et al. Homocysteine induces trophoblast cell death with apoptotic features. *Biol Reprod.* 2003, 69, 1129-1134.
45. Dudding TE, Attia J. The association between adverse pregnancy outcomes and maternal factor V Leiden genotype: a meta-analysis. *Thromb Haemost.* 2004, 91, 700-711.
46. Dunger DB, Petry CJ, Ong KK. Genetic variations and normal fetal growth. *Horm Res.* 2006, 65, Suppl 3, 34-40.
47. Edwards DR, Romero R, Kusanovic JP, Hassan SS, Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E, Kim CJ, Erez O, Chaiworapongsa T, Pearce BD, Bartlett J, Friel LA, Salisbury BA, Anant MK, Vovis GF, Lee MS, Gomez R, Behnke E, Oyarzun E, Tromp G, Menon R, Williams SM. Polymorphisms in maternal and fetal genes encoding for proteins involved in extracellular matrix metabolism alter the risk for small-for-gestational-age. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011, 24, 362-380.
48. Elgen I, Sommerfelt K, Markestad T. Population based, controlled study of behavioural problems and psychiatric disorders in low birthweight children at 11 years of age. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Med.* 2002, 87, 128-132.
49. Engel SM, Olshan AF, Siega-Riz AM, Savitz DA, Chanock SJ. Polymorphisms in folate metabolizing genes and risk for spontaneous preterm and small-for-gestational age birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology,* 2006, 195, 1231-1231.
50. Facco F, You W, Grobman W. Genetic Thrombophilias and Intrauterine Growth Restriction. *Obstet Gynecol.* 2009, 113, 1206-1216.
51. Fajemirokun-Odudeyi O, Sinha C, Tutty S, Pairaudeau P, Armstrong D, Phillips T, Lindow SW. Pregnancy outcome in women who use opiates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006, 126, 170-175.
52. Fall CH. The fetal and early life origins of adult disease. *Indian Pediatr.* 2003, 40, 480-502.
53. Fekete K, Berti C, Trovato M, Lohner S, Dullemeijer C, Souverein OW, Cetin I, Decsi T. Effect of folate intake on health outcomes in pregnancy: a systematic review and meta-

- analysis on birth weight, placental weight and length of gestation. *Nutr J.* 2012, 11, 75-83.
54. Fenech M: The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutat Res* 2001, 475, 57-67.
55. Fenton WA, Rosenberg LE. Inherited disorders of cobalamin transport and metabolism. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. Ed.: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. New York: McGraw-Hill, 1995, 3129-3149.
56. Fohr IP, Prinz-Langenohl R, Brönstrup A, Bohlmann AM, Nau H, Berthold HK, Pietrzik K. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase genotype determines the plasma homocysteine-lowering effect of supplementation with 5-methylenetetrahydrofolate or folic acid in healthy young women. *Am J Clin Nutr.* 2002, 75, 275-282.
57. Frosst P, Blom H, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, Rozen R. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995, 10, 111-113.
58. Furness DL, Fenech MF, Khong YT, Romero R, Dekker GA. One-carbon metabolism enzyme polymorphisms and uteroplacental insufficiency. *Am J Obstet Gynecol.* 2008, 199, 276-278.
59. Gadzinowski J, Kaliszewska-Drozdowska MD, Kosińska M, Mazela J, Stoińska B. Birth weight and gestational age of newborns from Wielkopolski and Lubuski regions. *Ginekol Pol.* 2003, 74, 186-192.
60. Garite TJ, Clark R, Thorp JA. Intrauterine growth restriction increases morbidity and mortality among premature neonates. *Am J Obstet Gynecol.* 2004, 191, 481-487.
61. Garrod MG, Allen LH, Haan NM, Green R, Miller JW. Transcobalamin C776G Genotype Modifies the Association between Vitamin B12 and Homocysteine in Older Hispanics. *Eur J Clin Nutr.* 2010, 64, 503-509.
62. Gaughan, DJ, Barbaux, S, Kluijtmans LAJ, Whithead AS. The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene.* 2000, 257, 279-289.
63. Gebhardt GS, Scholtz CL, Hillermann R, Odendaal HJ. Combined heterozygosity for methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations C677T and A1298C is associated with abruptio placentae but not with intrauterine growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001, 97, 174-177.
64. Ghezzi F, Tibiletti MG, Raio L. Idiopathic fetal intrauterine growth restriction: a possible inheritance pattern. *Prenat Diagn.* 2003, 23, 259-264.
65. Gilbert WM, Danielsen B. Pregnancy outcomes associated with intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2003, 188, 1596-1599.
66. Goldenberg RL, Cliver SP. Small for gestational age and intrauterine growth restriction: definitions and standards. *Clin Obstet Gynecol.* 1997, 40, 704-714.
67. Goldenberg RL, Tamura T, Cliver SP, Cutter GR, Hoffmann HJ, Copper RL, Serum folate and fetal growth retardation: a matter of compliance? *Obstet Gynecol.* 1992, 79, 719-722.
68. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AM, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nat Genet.* 1994, 7, 195-200.
69. Guenther B, Sheppard C, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML. The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol.* 1999, 6, 359-365.
70. Gudnason V, Stansible D, Scott J, Bowron A, Nicaud V, Humphries S. C677T (thermolabile alanine/valine) polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): its frequency and impact on plasma homocysteine concentration in different European populations. *Atherosclerosis.* 1998, 136, 347-354.

71. Haram K, Svendsen E, Myking O. Growth Restriction: Etiology, Maternal and Neonatal Outcome. A Review. *Curr Women's Health Reviews*. 2007, 3, 145-160.
72. Hobbs CA, James SJ, Parsian A, Krakowiak PA, Jernigan S, Greenshaw JJ, Lu Y, Cleves MA. Congenital heart defects and genetic variants in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Med Genet*. 2006, 43, 162-166.
73. Hogg BB, Tamura T, Johnston KE, Dubard MB, Goldenberg RL. Second-trimester plasma homocysteine levels and pregnancy-induced hypertension, preeclampsia, and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 2000, 183, 805-809.
74. Holmes RP, Soothill PW. Intra-uterine growth retardation. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1996, 8, 148-154.
75. Holm PI, Ueland PM, Vollset SE, Midttun O, Blom HJ, Keijzer MBAJ, den Heijer M. Betaine and folate status as cooperative determinants of plasma homocysteine in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005, 25, 1-7.
76. Houghton LA, Sherwood KL, Pawlowsky R, Ito S, O'Connor DL. [6S]-5-methyltetrahydrofolate is at least as effective as folic acid in preventing a decline in blood folate concentration during lactation. *Am J Clin Nutr*. 2006, 83, 842-850.
77. Howley HE, Walker M, Rodger MA. A systematic review of the association between factor V Leiden or prothrombin gene variant and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 2005, 192, 694-708.
78. Hum DW, Bell AW, Rozen R, MacKenzie RE. Primary structure of a human trifunctional enzyme: isolation of a cDNA encoding methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase. *J Biol Chem*. 1988, 263, 15946-15950.
79. Infante-Rivard C, Rivard GE, Yotov WV, Génin E, Guiguet M, Weinberg C, Gauthier R, Feoli-Fonseca JC. Absence of association of thrombophilia polymorphisms with intrauterine growth restriction. *N Engl J Med*. 2002, 347, 19-25.
80. Isaksen CV, Laurini RN, Jacobsen G. Pre-pregnancy risk factors of small-for-gestational-age births and perinatal mortality. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1997, 165, 44-49.
81. Jacques PF, Bostom GA, Selhub J et al. Effects of polymorphisms of methionine synthase and methionine synthase reductase on total plasma homocysteine in the NHLBI Family Heart Study. *Atherosclerosis*. 2003, 166, 49-55.
82. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr*. 1999, 70, 495-501.
83. Jasińska EA, Wasiluk A. Wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu (IUGR) jako problem kliniczny. *Perinat Neonat Ginekol*. 2010, 3, 255-261.
84. Jiang Y, Zhao J, Jiang T, Ge L, Zhou F, Chen Z, Lei Y, Huang S, Xia B. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase G1793A, hyperhomocysteinemia, and folate deficiency correlate with ulcerative colitis in central China. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010, 25, 1157-1161.
85. Jing Xu, Xiaohan Xu, Lei Xue, Xiang Liu, Haiyong Gu, Hailong Cao, Wanshan Qiu, Zhibin Hu, Hongbing Shen, Yijiang Chen. MTHFR c.1793G>A polymorphism is associated with congenital cardiac disease in a Chinese population. *Cardiol Young*. 2010, 20, 318-326.
86. Kalanda BF, Verhoeff FH, Chimsuku L, Harper G, Brabin BJ. Adverse birth outcomes in a malarious area. *Epidemiol Infect*. 2005, 134, 1-8.
87. Kempisty B, Sikora J, Lianeri M, Szczepankiewicz A, Czernski P, Hauser J, Jagodziński PP. MTHFD 1958G>A and MTR 2756A>G polymorphisms are associated with bipolar disorder and schizophrenia. *Psychiatr Genet*. 2007, 17, 177-181.
88. Kim YI. Role of the MTHFR polymorphisms in cancer risk modification and treatment. *Future Oncol*. 2009, 5, 523-542.

89. Klai S, Fekih-Mrissa N, El Housaini S, Kaabechin N, Nsiri B, Rachdi R, Gritli N. Association of MTHFR A1298C polymorphism (but not of MTHFR C677T) with elevated homocysteine levels and placental vasculopathies. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2011, 22, 374–378.
90. Klerk M, Verhoef P, Clarke P, Blom HJ, Kok FJ, Schouten EG and the MTHFR Studies Collaboration Group. MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA*. 2002, 288, 2023-2031.
91. Kłaczkow Gabriela, Anuszevska Elżbieta L. Kwas foliowy i jego znaczenie dla prawidłowego rozwoju organizmu człowieka. *Profilaktyka wad wrodzonych układu nerwowego*. *Przew Lek* 2000, 5, 86-90.
92. Kordas K, Ettinger AS, Lamadrid-Figueroa H, Tellez-Rojo MM, Hernández-Avila M, Hu H, Wright RO. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T, A1298C and G1793A genotypes, and the relationship between maternal folate intake, tibia lead and infant size at birth. *Br J Nutr*. 2009, 102, 907-914.
93. Kowalska-Jasiecka J, Szymański P, Ropacka M, Markwitz W, Bręborowicz GH. The effect of L-arginine treatment on Doppler measurements in pregnant women with gestational hypertension and hypertrophy. *Arch Perinat Med*. 2008, 14, 12-17.
94. Kozłowska-Wojciechowska M.: Jak zapobiegać hiperhomocysteinemii? Naturalne źródła folianów i witamin z grupy B w polskiej diecie. *Czynniki Ryzyka*. 2005, 11, 25-26.
95. Krajcinovic M, Lemieux-Blanchard E, Chiasson S et al., Role of polymorphisms in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics J*. 2004, 4, 66-72.
96. Kupferminc MJ, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, Fait G, Lessing JB. Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy. *N Engl J Med*. 1999, 340, 9-13.
97. Kupferminc MJ, Peri H, Zwang E, Yaron Y, Wolman I, Eldor A. High prevalence of the prothrombin gene mutation in women with intrauterine growth retardation, abruptio placentae and second trimester loss. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000, 79, 963-967.
98. Lamers Y, Prinz-Langenohl R, Moser R, Pietrzik K. Supplementation with [6S]-5-methyltetrahydrofolate or folic acid equally reduces plasma homocysteine concentrations in healthy women. *Am J Clin Nutr*. 2004, 79, 473-478.
99. Latos-Bieleńska A, Wybrane zagadnienia genetyki w położnictwie i ginekologii. W: *Położnictwo i Ginekologia*. Pod red.: Bręborowicz GH. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL. 2012, 4, 1-30.
100. Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, Eydoux P, Rosenblatt DS, Rozen R, Gravel RA. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders *Human Molecular Genetics*. 1996, 5, 1867–1874.
101. Leclerc D, Odievre M, Wu Q, Wilson A, Huizenga JJ, Rozen R, Scherer SW, Gravel RA. Molecular cloning, expression and physical mapping of the human methionine synthase reductase gene. *Gene*. 1999, 240, 75-88.
102. Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D, Heng HH, Rommens JM, Scherer SW, Rosenblatt DS, Gravel RA. Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998, 95, 3059-3064.
103. Leeda M, Riyazi N, De Vries JIP, Jakobs C, Van Geijn HP, Dekker GA. Effects of folic acid and vitamin B6 supplementation on women with hyperhomocysteinemia and a history of preeclampsia or fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 1998, 179, 135-139.
104. Lindblad B, Zaman S, Malik A, Martin H, Ekström AM, Amu S, Holmgren A, Norman M. Folate, vitamin B12, and homocysteine levels in South Asian women with growth-retarded

- fetuses. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005, 84, 1055-1061.
105. Li SY, Rong M, Iacopetta B. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in human breast cancer. *Oncol Rep.* 2006, 15, 221-225.
106. Lin CC, Santolaya-Forgas J. Current concepts of fetal growth restriction: part I. Causes, classification, and pathophysiology. *Obstet Gynecol.* 1998, 92, 1044-1055.
107. Lubchenco LO, Hansman C, Dressler M, Boyd E. Intrauterine growth as estimated from liveborns birth weight data at 24 to 42 weeks of gestation. *Pediatrics.* 1963, 32, 793-800.
108. Łubińska M, Kazimierska E, Sworzak K. Hyperhomocysteinemia as a new risk factor for different diseases. *Adv Clin Exp Med* 2006, 15, 897-903.
109. Mahdi MH, Seyed RM, Rouhallah NS, Mohsen V, Somayeh G, Mohammad RZ. Association between the 1793G>A MTHFR Polymorphism and Sporadic Colorectal Cancer in Iran. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2008, 9, 659-662.
110. Mandruzzato G, Antsaklis A, Botet F, Botet F, Chervenak FA, Figueras F, Grunebaum A, Puerto B, Skupski D, Stanojevic M. Intrauterine restriction (IUGR). *J Perinat Med.* 2008, 36, 277-281.
111. Manning FA. Intrauterine growth retardation. In: *Fetal medicine: Principles and practice.* Ed.: Manning FA. Norwalk Connecticut: Norwalk: Apelson and Lange 1995, 307-393.
112. Markestad T, Vik T, Ahlsten G, Gebre-Medhin M, Skjaerven R, Jacobsen G, Hoffman HJ, Bakketeig LS. Small-for-gestational-age (SGA) infants born at term: growth and development during the first year of life. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1997, 165, 93-101.
113. Marsal K. Intrauterine growth restriction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2002, 14, 127-135.
114. Marsal K, Persson PH, Larsen T, Lilja H, Selbing A, Sultan B. Intrauterine growth curves based on ultrasonically estimated foetal weights. *Acta Paediatr.* 1996, 85, 843-848.
115. Martinelli P, Grandone E, Colaizzo D, Paladini D, Sciannone N, Margaglione M, Di Minno G. Familial thrombophilia and the occurrence of fetal growth restriction. *Haematologica.* 2001, 86, 428-431.
116. McElvy SS, Demarini S, Miodovnik M, Khoury JC, Rosenn B, Tsang RC. Fetal weight and progression of diabetic retinopathy. *Obstet Gynecol.* 2001, 97, 587-592.
117. McIntire DD, Bloom SL, Casey BM, Leveno KJ. Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants. *N Engl J Med.* 1999, 340, 1234-1238.
118. McNulty H., Pentieva K. Folate bioavailability. *Proc Nutr Soc.* 2004, 63, 529-536.
119. McNulty H, Downey RC, Strain JJ, Dunne A, Ward M, Molloy AM, McAnena LB, Hughes JP, Hannon-Fletcher M, Scott JM. Riboflavin lowers homocysteine in individuals homozygous for MTHFR 677C->T polymorphism. *Circulation.* 2006, 113, 74-80.
120. Miller AL, Kelly GS. Homocysteine metabolism: nutritional modulation and impact on health and disease. *Altern Med Rev.* 1997, 2, 234-254.
121. Mitchell EA, Robinson E, Clark PM, Becroft DM, Glavish N, Pattison NS, Pryor JE, Thompson JM, Wild CJ. Maternal nutritional risk factors for small for gestational age babies in a developed country: a case-control study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004, 89, 431-435.
122. Molloy AM. Folate bioavailability and health. *Int J Vitam Nutr Res.* 2002, 72, 46-52.
123. Mongelli M, Gardosi J. Fetal growth. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2000, 12, 111-115.
124. Monk D, Moore GE. Intrauterine growth restriction-genetic causes and consequences. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2004, 9, 371-378.
125. Morgan RG. Role of folypoly-g-glutamate synthetase in therapeutics with tetrahydrofolate antimetabolites. An overview *Semin Oncol.* 1999, 26, 11-23.
126. Morita H, Taguchi J, Kurihara H. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary artery disease. *Circulation.* 1997, 95, 2032-2036.
127. Mostowska A, Hozyasz KK, Jagodzinski PP. Maternal MTR genotype contributes to the

- risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population. *Clin Genet* 2006, 69, 512–517.
128. Moyers S, Bailey L, Fetal malformations and folate metabolism: review of recent evidence. *Nutr Rev.* 2001, 7, 215-235.
129. Nakamura E, Okamoto T, Nagaya K, Hayashi T. Maternal Deletion Allele of Angiotensin-Converting Enzyme Gene Is Associated with Fetal Growth Restriction. *Pediatr Dev Pathol.* 2012, 15, 114-117.
130. Namour F, Guy M, Aimone-Gastin I, de Nonancourt M, Mrabet N, Guéant JL Isoelectrofocusing phenotype and relative concentration of transcobalamin II isoproteins related to the codon 259 Arg/Pro polymorphism. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, 251, 769-774.
131. Namour F, Olivier JL, Abdelmouttaleb I, Adjalla Ch, Debard R, Salvat C, s Gue´ant JL. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood.* 2001, 4, 1092-1098.
132. Neggers YH, Goldenberg RL, Tamura T, Cliver SP, Hoffmann HJ. The relationship between dietary intake and infant birthweight. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1997, 165, 71-75.
133. Nunoue T, Kusuhara K, Hara T. Human fetal infection with parvovirus B19: maternal infection time in gestation, viral persistence and fetal prognosis. *Pediatr Infect Dis J.* 2002, 21, 1133-1136.
134. Nurk E, Tell GS, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Associations between maternal methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and adverse outcomes of pregnancy: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Med.* 2004, 117, 26-31.
135. Obwegeser R, Hohlagschwandtner M, Sinzinger H. Homocysteine- a pathophysiological cornerstone in obstetrical and gynaecological disorders? *Hum Reprod.* 1999, 5, 64-72.
136. Odendaal HJ, van Schie DL, de Jeu RM. Adverse effects of maternal cigarette smoking on preterm labor and abruptio placentae. *Int J Gynaecol Obstet.* 2001, 74, 287-288.
137. Ornoy A, av-Citrin O. Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy. *Reprod Toxicol.* 2006, 21, 399-409.
138. Oterino A, Valle N, Pascual J, Bravo Y, Munoz P, Castillo J, Ruiz-Alegria C, Sánchez-Velasco P, Leyva-Cobián F, Cid C. Thymidylate synthase promotor tandem repeat and MTHFD1 R653Q polymorphisms modulate the risk for migraine conferred by the MTHFR T677 allele. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005, 1, 163-168.
139. Park MH, Lee YB, Joe YA. Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation. *Biol Signals.* 1997, 6, 115-123.
140. Parle-McDermott A, Mills JL, Kirke PN, O'Leary VB, Swanson DA, Pangilinan F, Conley M, Molloy AM, Cox C, Scott JM, Brody LC Analysis of the MTHFR 1298A>C and 677C>T polymorphisms as risk factors for neural tube defects. *J Hum Genet.* 2003, 48, 190-193.
141. Parle-McDermott A, Pangilinan F, Mills JL, Signore CC, Molloy AM, Cotter A, Conley M, Cox C, Kirke PN, Scott JM, Brody LC. A polymorphism in MTHFD1 gene increases a mother's risk of having an unexplained second trimester pregnancy loss. *Mol Hum Reprod.* 2005, 11, 477-480.
142. Parle-McDermott A, Pangilinan F, Mills JL et al, Confirmation of R653Q polymorphisms of trifunctional C1-synthetase enzymes as a maternal risk for neural tube defects in Irish population. *Eur J Hum Genet.* 2006, 14, 768-772.
143. Parle-McDermott A, Mills JL, Kirke PN, Cox C, Signore CC, Kirke S, Molloy AM, O'Leary VB, Pangilinan FJ, O'Herlihy C, Brody LC, Scott JM. MTHFD1 R653Q polymorphism is a maternal genetic risk factor for severe abruptio placentae. *Am J Med Genet A.* 2005, 132, 365-368.

144. Pegg AE, Poulin R, Coward JK. Use of aminopropyltransferase inhibitors and of non-metabolizable analogs to study polyamine regulation and function. *Int J Biochem Cell Biol.* 1995, 27, 425-442.
145. Peleg D, Kennedy CM, Hunter SK. Intrauterine growth restriction: identification and management. *Am Fam Physician.* 1998, 58, 453-457.
146. Pentieva K, McNulty H, Reichert R, Ward M, Strain JJ, McKillop DJ, McPartlin JM, Connolly E, Molloy A, Krämer K, Scott JM. The short-term bioavailabilities of [6S]-5-methyltetrahydrofolate and folic acid are equivalent in men. *J Nutr.* 2004, 134, 580-585.
147. Petry CJ, Ong KK, Barratt BJ, Wingate D, Cordell HJ, Ring SM, Pembrey ME, Reik W, Todd JA, Dunger DB: Common polymorphism in H19 associated with birthweight and cord blood IGF-II levels in humans. *BMC Genet.* 2005, 6, 22-26.
148. Pietrzik K, Bailey L, Shane B. Folic acid and 1-5-methyltetrahydrofolate: comparison of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet.* 2010, 48, 535-548.
149. Pileri P, Franchi F, Cetin I, Mando C, Antonazzo P, Ibrahim B, Rossi F, Biguzzi E. Maternal and fetal thrombophilia in intrauterine growth restriction in the presence or absence of maternal hypertensive disease. *Reprod Sci.* 2010, 17, 844-848.
150. Piper JM, Xenakis EM, McFarland M, Elliott BD, Berkus MD, Langer O. Do growth-retarded premature infants have different rates of perinatal morbidity and mortality than appropriately grown premature infants? *Obstet Gynecol.* 1996, 87, 169-174.
151. Podsiadło B, Caus I, Naworska B i wsp., Hipotrofia płodu – przyczyny, sposoby prowadzenia ciąży i rozwiązanie w materiałach II Kliniki Położnictwa i Ginekologii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach. *Klin Ginekol Perinatol.* 2007, 43, 61-64.
152. Rady PL, Szucs S, Grady J, et al. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. *Am J Med Genet.* 2002, 107, 162-168.
153. Rasmussen S, Irgens LM, Albrechtsen S, Dalaker K. Predicting preeclampsia in the second pregnancy from low birth weight in the first pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2000, 96, 696-700.
154. Refsum H, Ueland P, Nygard O, Vollset S. Homocysteine and cardiovascular disease. *Ann Rev Med.* 1998, 49, 31-62.
155. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego w zakresie wybranych patologii wczesnej ciąży oraz postępowania w ciąży po zapłodnieniu in vitro. *Ginekol Dypl. Wydanie specjalne.* Luty 2008, 208-212.
156. Resnik R. Intrauterine growth restriction. *Obstet Gynecol.* 2002, 99, 490-496.
157. Rinehart BK, Terrone DA, Taylor CW, Isler CM, Larmon JE, Roberts WE. Single umbilical artery is associated with an increased incidence of structural and chromosomal anomalies and growth restriction. *Am J Perinatol.* 2000, 17, 229-232.
158. Robinson R, Hsu CD, Chesebro AL, Nguyen J, Ali N, Maramreddy H, Parton LA A single-nucleotide polymorphism (-670) of the maternal Fas gene is associated with intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2009, 201, 620-624.
159. Robertson L, Wu O, Langhorne P, Twaddle S, Clark P, Lowe GD, Walker ID, Greaves M, Brenkel I, Regan L, Greer IA; Thrombosis: Risk and Economic Assessment of Thrombophilia Screening (TREATS) Study. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *Br J Haematol.* 2006, 132, 171-196.
160. Ropacka-Lesiak M, Bręborowicz H. Management of pregnancy complicated by intrauterine fetal growth restriction]. *Ginekol Pol.* 2012, 83, 373-376.
161. Ronco AM, Arguello G, Munoz L, Gras N, Llanos M. Metals content in placentas from moderate cigarette consumers: correlation with newborn birth weight. *Biomaterials.* 2005, 18, 233-241.

162. Rozen R. Molecular genetics of methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *J Inherit Metab Dis.* 1996, 19, 589-594.
163. Said JM, Higgins JR, Moses EK, Walker SP, Monagle PT, Brennecke SP. Inherited thrombophilias and adverse pregnancy outcomes: a case-control study in an Australian population. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2012, 91, 250-255.
164. Sata F, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Yamada T, Minakami H, Kishi R. Functional maternal catechol-O-methyltransferase polymorphism and fetal growth restriction. *Pharmacogenet Genomics.* 2006, 16, 775-781.
165. Scholl TO, Johnson WG. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr.* 2000, 71, 1295-303.
166. Scott JM, Weir DG: Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *J. Cardiovasc. Risk.* 1998, 5, 223-227.
167. Seeds JW, Peng T. Impaired growth and risk of fetal death: is the tenth percentile the appropriate standard? *Am J Obstet Gynecol.* 1998, 178, 658-69.
168. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K. Wybrane zagadnienia genetyki w położnictwie i ginekologii. W: *Położnictwo i Ginekologia.* Pod red.: Bręborowicz GH. Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL. 2012, 4, 35-41.
169. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Kurzawinska G, Bogacz A, Grześkowiak E, Mrozikiewicz PM. The significance of 1793G>A polymorphism in MTHFR gene in women with first trimester recurrent miscarriages. *Neuro Endocrinol Lett.* 2010, 31, 717-723.
170. Seremak-Mrozikiewicz A, Dubiel M, Drews K, Gudmundsson S, Mrozikiewicz PM. TNF-alpha gene polymorphism and fetal Doppler velocimetry in intrauterine growth restriction. *Neuroendocrinol Lett.* 2008, 29, 493-499.
171. Sepulveda W, Rojas I, Robert JA, Schnapp C, Alcalde JL. Prenatal detection of velamentous insertion of the umbilical cord: a prospective color Doppler ultrasound study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2003, 21, 564-569.
172. Siler-Khodr TM, Yang Y, Grayson MH, Henderson GI, Lee M, Schenker S. Effect of ethanol on thromboxane and prostacyclin production in the human placenta. *Alcohol.* 2000, 21, 169-180.
173. Skibola CF, Forrest MS, Coppede F, Agana L, Hubbard A, Smith MT, Bracci PM, Holly EA, Paige M, Bracci and Elizabeth AH. Polymorphisms and haplotypes in folate metabolizing genes and risk of non Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 2004, 104, 2155-2162.
174. Singla PN, Tyagi M, Kumar A, Dash D, Shankar R. Fetal growth in maternal anaemia. *J Trop Pediatr.* 1997, 43, 89-92.
175. Słomko Z, Kuczyński J. Ciężar ciała noworodków. W: *Pamiętnik I Konferencji Naukowej Sekcji Medycyny Perinatalnej PTG - Zakażenia płodu i noworodka.* Poznań, 1969, 480-487.
176. Słomski R, Szalata M, Wielgus K. Diagnostyka molekularna. W: *Analiza DNA.* Pod red.: Słomski R. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2008, 17-23.
177. Smith GD, Whitely E, Gissler M, Hemminki E. Birth dimensions of offspring, premature birth, and the mortality of mothers. *Lancet.* 2000, 356, 2066-1067.
178. Smulders Y.M., Stehouwer CD. Folate metabolism and cardiovascular diseases. *Semin Vasc Med.* 2005, 5, 87-97.
179. Snijders RJ, Sherrod C, Gosden CM, Nicolaidis KH. Fetal growth retardation: associated malformations and chromosomal abnormalities. *Am J Obstet Gynecol.* 1993, 168, 547-555.
180. Sohda S, Arinami T, Hamada H, Yamada N, Hamaguchi H, Kubo T. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and preeclampsia. *J Med Genet.* 1997, 34, 525-526.
181. Sommerfelt K, Troland K, Ellertsen B, Markestad T. Behavioral problems in low-

- birthweight preschoolers. *Dev Med Child Neurol.* 1996, 38, 927-940.
182. Soothill PW, Bobrow CS, Holmes R. Small for gestational age is not a diagnosis. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1999, 13, 225-228.
183. Spencer N, Bambang S, Logan S, Gill L. Socioeconomic status and birth weight: comparison of an area-based measure with the Registrar General's social class. *J Epidemiol Community Health.* 1999, 53, 495-498.
184. Spencer N, Logan S. Social influences on birth weight. *J Epidemiol Community Health.* 2002, 56, 326-327.
185. Steegers-Theunissen, RP, Van Iersel CA, Peer PG, Nelen WL, Steegers EA. Hyperhomocysteinemia, pregnancy complications, and the timing of investigation. *Obstet Gynecol.* 2004, 104, 336-343.
186. Stern LL, Mason JB, Selhub J, Choi WS. Genomic DNA hypomethylation a characteristic of most cancers is present in peripheral leukocytes of individuals who are homozygous for the (677 T polymorphism in the MTHFR gene. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2000, 9, 849-853.
187. Stevens VL, McCullough ML, Pavluck AL, Talbot JT, Feigelson HS, Thun MJ, Calle EE. Association of Polymorphisms in one-carbon metabolism genes and postmenopausal breast cancer incidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007, 16, 1140-1147.
188. Stover PJ. Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutr Rev.* 2004, 62, 3-12.
189. Strachan T, Read AP. *Human Molecular Genetics*, 3rd ed. New York. Garland Publishing, 2004, 9-13.
190. Sunder-Plussmann G, Födinger M. Genetic determinants of the homocysteine level. *Kidney International.* 2003, 63, 141-144.
191. Sutterlin M, Bussen S, Ruppert D, Steck T. Serum levels of folate and cobalamin in women with recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod.* 1997, 12, 2292-2296.
192. Sziller I, Babula O, Hupuczi P, Nagy B, Rigó B, Szabó G, Papp Z, Linhares IM, Witkin SS. Mannose-binding lectin (MBL) codon 54 gene polymorphism protects against development of pre-eclampsia, HELLP syndrome and pre-eclampsia-associated intrauterine growth restriction. *Mol Hum Reprod.* 2007, 13, 281-285.
193. Tamura T, Picciano MF. Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr.* 2006, 83, 993-1016.
194. Tan T, Yeo G. Intrauterine growth restriction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2005, 17, 135-142.
195. Taylor MJ, Govender L, Jolly M, Wee L, Fisk NM. Validation of the Quintero staging system for twin-twin transfusion syndrome. *Obstet Gynecol.* 2002, 100, 1257-1265.
196. Trembath D, Sherbondy AL, Vandyke DC, Shaw GM, Todoroff K, Lammer EJ, Finnell RH, Marker S, Lerner G, Murray JC. Analysis of select folate pathway genes, PAX3, and human T in a Midwestern neural tube defect population. *Teratology.* 1999, 59, 331-341.
197. Ubeda N, Reyes L, González-Medina A, Alonso-Aperte E, Varela-Moreiras G. Physiologic changes in homocysteine metabolism in pregnancy: a longitudinal study in Spain. *Nutrition.* 2011, 27, 925-930.
198. Yamada K, Chen Z, Rozen R, Matthews RG. Effect of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001, 98, 14853-14858.
199. Young IS, Woodside JV. Folate and homocysteine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2000, 3, 427-432.
200. Vandenbosche RC, Kirchner JT. Intrauterine growth retardation. *Am Fam Physician.* 1998, 58, 1384-1390.
201. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, van den

- Heuvel LP, Blom HJ. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet.* 1998, 62, 1044-1051.
202. van Mil, Oosterbaan AM, Steegers-Theunissen RP. teratogenicity and underlying mechanisms of homocysteine on animal models: a review. *Reprod Toxicol.* 2010, 30, 520-531.
203. Vespyck E, Le Cam-Duchez V, Goffinet F, Tron F, Marpeau L, Borg JY. Thrombophilia and immunological disorders in pregnancies as risk factors for small for gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol.* 2002, 109, 28–33.
204. Viel A, Dall'Agnese L, Simone F, Canzonieri V, Capozzi E, Visentin MC, Valle R, Boiocchi M. Loss of heterozygosity at the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase locus in human ovarian carcinomas. *Br J Cancer.* 1997, 75, 1105-1110.
205. Villar J, Merialdi M, Gulmezoglu AM, Abalos E, Carroli G, Kulie R, de Onis M. Characteristics of randomized controlled trials included in systematic reviews of nutritional interventions reporting maternal morbidity, mortality, preterm delivery, intrauterine growth restriction and small for gestational age and birth weight outcomes. *J Nutr.* 2003, 133, 1632-1639.
206. Wang L, Wang X, Laird N, Zuckerman B, Stubblefield P, Xu X. Polymorphism in maternal LRP8 gene is associated with fetal growth. *Am J Hum Genet.* 2006, 78, 770-777.
207. Wang Lina, QiaoKe Qiao, Chen Wensen, Wang Jianming, Tan Yongfei, Zhou Yan, Hua Zhaolai, Ding Weiliang. Polymorphisms of MTHFD, Plasma Homocysteine Levels, and Risk of Gastric Cancer in a High-Risk Chinese Population. *Clin Cancer Res.* 2007, 13, 2526-2532.
208. Warkany J, Monroe BB, Sutherland BS. Intrauterine growth retardation. *Amer J Dis Child.* 1961, 102, 249-279.
209. Wartanowicz M. Foliiany w żywieniu (przegląd piśmiennictwa). *Żyw Człow Metab.* 1997, 24, 81-90.
210. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab.* 1998, 64, 169-172.
211. Węgrzyn P, Kaźmierczak P, Fiegler P, Kamiński K. Wewnątrzmaciczne opóźnione wzrastanie płodu - analiza sposobu rozwiązania ciąży, przebiegu porodu oraz pourodzeniowego stanu noworodka. *Ginekologia Praktyczna.* 2004, 12, 32-37.
212. Winick M, Morgan BI. Nutrition and brain development. W: *Nutrition in pediatrics.* Ed.: Walker WA, Watkins J.B. Little Brown and Company, Boston/Toronto. 1985, 233-251.
213. William W, Pattti J, Marriane S. Wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu płodu. *Med Dypl.* 2002, 6, 84-92.
214. Wilson A, Leclerc D, Rosenblatt DS, Gravel LA. Molecular basis for methionine synthase reductase deficiency in patients belonging to cblE complementation group of disorders in folate/cobalamin metabolism. *Hum Mol Genet.* 1999, 8, 2009-2016.
215. Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel RA, Rozen R. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increase risk for spina bifida. *Mol Genet Metab.* 1999, 67, 317-323.
216. Węgrzyn P, Borowski D, Szaflik K, Wielgoś M. Doppler flow characteristics in ductus venosus between 22-42 weeks in intrauterine growth restriction and normal pregnancies. *Ginekol Pol.* 2005, 76, 358-364.
217. Yassae F, Taherzadeh P, Abadi AR. The relationship between thrombophilia and intrauterine growth restriction. *Int J Nurs Midwifery.* 2010, 3, 154-157.
218. Zdrajtkovic T, Genbacev O, McMaster MT, Fisher SJ. The adverse effects of maternal smoking on the human placenta: a review. *Placenta.* 2005, 26, 81-86.

8. STRESZCZENIE

Wstęp: Problemy hipotrofii wewnątrzmacicznej płodu oraz związanych z tym powikłań u noworodków o małej masie urodzeniowej od dawna są przedmiotem szczególnego zainteresowania położników i neonatologów. Wykazano udział licznych czynników mogących wpływać na rozwój hipotrofii płodu. Zaburzenia metabolizmu folianów, poprzez wpływ na cykl metioninowy, mogą prowadzić do upośledzenia metylacji DNA, wpływając na implantację, proces embriogenezy i angiogenezy w łożysku. Nieprawidłowy cykl folianowy powoduje także hiperhomocysteinemię, zmniejszenie syntezy zasad nukleotydowych prowadząc do ograniczenia proliferacji i różnicowania się komórek. W ten sposób procesy te mogą prowadzić do rozwoju hipotrofii. W ostatnim czasie szczególne zainteresowanie budzi wpływ czynników genetycznych, w tym udział polimorfizmów genetycznych związanych z aktywnością enzymów biorących udział w metabolizmie folianów w rozwoju hipotrofii płodu.

Cel pracy: Ocena związku polimorfizmów wybranych genów metabolizmu folianów ze wzrostem ryzyka rozwoju hipotrofii płodu. Cel ten realizowany był poprzez analizę: danych klinicznych, a także parametrów urodzeniowych noworodków. Analizie poddano częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmów: 677C>T, 1298A>C, 1793G>A genu *MTHFR*, 1958G>A, 401G>A genu *MTHFD1*, 2756A>G genu *MTR/MS*, 66A>G genu *MTRR/MSR*, 776C>G genu *TCII*, również z zastosowaniem podziału grupy badanej na podgrupy w zależności od tygodnia ciąży oraz masy urodzeniowej noworodka. Oceniano także częstości współwystępowania genotypów poszczególnych polimorfizmów w obydwu badanych grupach kobiet.

Materiał i metodyka: Grupa badaną stanowiło 120 pacjentek, które urodziły dziecko z hipotrofią płodu (masa noworodka <2 SD lub 10 percentyla, średnia masa noworodka 1963,3±601,0 g, 3,14±2,83 centyl). Grupa kontrolna składała się z 120 zdrowych ciężarnych, które urodziły noworodka z prawidłową masą ciała (średnia masa noworodka 3490,3±351,3 g, 52,2±25,9 centyl). Grupę badaną podzielono na 2 podgrupy w zależności od: tygodnia zakończenia ciąży (52 pacjentki <37 tc., 68 pacjentek ≥37tc.) oraz masy urodzeniowej noworodka (31 matek dzieci <1500 g, 89 matek noworodków z masą ciała ≥1500 g). Badane polimorfizmy analizowano metodą reakcji łańcuchowej polimerazy oraz polimorfizmu

długości fragmentów restrykcyjnych (PCR/RFLP).

Wyniki:

1. Analiza danych klinicznych i socjodemograficznych: W grupie badanej zaobserwowano niższy czas zakończenia ciąży (35,0 vs. 39,2 tc., $p < 0,0001$) oraz częstsze ukończenie porodu za pomocą cięcia cesarskiego (54,2 vs. 14,2%, $p < 0,0001$). W grupie z hipotrofią więcej pacjentek wykazało się wykształceniem średnim (40,0 vs. 34,2%, $p < 0,0001$) i podstawowym (23,3 vs. 2,5%, $p < 0,0001$), natomiast w grupie kontrolnej wykształceniem wyższym. Wszystkie te różnice były istotne statystycznie.

2. Analiza częstości występowania polimorfizmów genetycznych: Najciekawsze wyniki otrzymano w przypadku polimorfizmu $401G > A$ genu *MTHFD1*. W grupie pacjentek z hipotrofią płodu zaobserwowano przewagę genotypu heterozygotycznego $401GA$ oraz homozygotycznego zmutowanego $401AA$ w porównaniu do grupy kontrolnej ($401GA$: 39,2 vs. 30,8%, $WR=1,44$, $p=0,11$, $401AA$: 7,5 vs. 3,4%, $WR=2,35$, $p=0,12$). Częstość występowania allela zmutowanego $401A$ była znamienne większa w grupie badanej ($401A$: 27,1 vs. 18,8%, $WR=1,61$, $p=0,02$).

3. Analiza genotypów badanych polimorfizmów z uwzględnieniem obu podziałów grupy badanej (w zależności od czasu zakończenia ciąży oraz od masy urodzeniowej noworodka): Badanie polimorfizmu $401G > A$ genu *MTHFD1* w grupie kobiet, które urodziły dzieci z hipotrofią < 37 tc. wykazało niższą częstość występowania genotypu $401GG$ (44,2 vs. 65,8%, $WR=0,41$, $p=0,007$) oraz wyższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego $401GA$ (48,1 vs. 30,8% , $WR=2,08$, $p=0,024$), jak również wyższą częstość zmutowanego allela $401A$ (31,7 vs. 18,8%, $WR=2,01$, $p=0,007$). Analizując polimorfizm $401G > A$ genu *MTHFD1* w grupie kobiet z masą urodzeniową dzieci ≥ 1500 g stwierdzono wyższą częstość występowania genotypu homozygotycznego zmutowanego $401AA$ (9,0 vs. 3,3%, $WR=2,86$, $p=0,07$), jak również statystycznie istotną większą frekwencję występowania zmutowanego allela $401A$ (28,7 vs. 18,8%, $WR=1,74$, $p=0,01$). W zakresie polimorfizmu $2756A > G$ genu *MTR* genotyp homozygotyczny zmutowany $2756GG$ obserwowano dwukrotnie częściej w podgrupie pacjentek, które urodziły dziecko z masą ciała < 1500 g, bez istotności statystycznej, ale z wysokim współczynnikiem ryzyka $WR=4,11$ (6,5 vs. 2,5%), a także istotnie statystycznie częściej obserwowano zmutowany allel $2756G$ (33,9 vs. 23,0%, $WR=1,72$, $p=0,05$).

4. Ocena współwystępowania genotypów badanych polimorfizmów ujawniła wyższą frekwencję w grupie pacjentek z hipotrofią płodu kombinacji genotypów: $1958GA$ *MTHFD1* /

401AA *MTHFD1* (5,9 vs. 0,9%, $p=0,03$), 677TT *MTHFR* / 776CG *TCII* (10,0 vs. 2,5%, $p=0,01$), 1298AC *MTHFR* / 401GA *MTHFD1* (19,2 vs. 10,9%, $p=0,05$), 401GA *MTHFD1* / 2756AA *MTR* (30,0 vs. 19,2%, $p=0,03$), 401GA *MTHFD1* / 776CC *TCII* (14,2 vs. 7,5%, $p=0,07$).

Wnioski:

1. Analiza polimorfizmów genów enzymów związanych z metabolizmem folianów pokazała najistotniejszy bezpośredni wpływ zmutowanego wariantu 401A genu *MTHFD1* na ryzyko rozwoju hipotrofii płodu.
2. Przeprowadzone badania sugerują szczególny związek zmutowanego allela 401A genu *MTHFD1* z hipotrofią w przypadku ciąży zakończonych przed 37 tc. i u noworodków z masą powyżej 1500 g.
3. W pracy wskazano również na możliwą rolę zmutowanego allela 2756G genu *MTR* w etiologii hipotrofii płodu u noworodków z masą poniżej 1500 g.
4. Uzyskane wyniki dotyczące częstości występowania poszczególnych genotypów oraz alleli polimorfizmu 677C>T, 1298A>C, 1793G>A genu *MTHFR*, 1958G>A genu *MTHFD1*, 776C>G genu *TCII*, oraz 66A>G genu *MTRR* nie wskazują na ich bezpośredni związek z ryzykiem rozwoju hipotrofii płodu.
5. Analiza współwystępowania genotypów wskazała na możliwość interakcji polimorfizmów wpływającej na wzrost ryzyka hipotrofii, a zwłaszcza łącznego wpływu wariantów: 401G>A genu *MTHFD1*, 677C>T, 1298A>C, 1793G>A genu *MTHFR*, 2756A>G genu *MTR* oraz 776C>G genu *TCII*.

9. SUMMARY

Introduction: Fetal hypotrophy and its consequences in low birth weight of newborns is very important issue in perinatal and neonatal medicine. In etiology of this condition the contribution of numerous factors has been shown. Disturbances in folate metabolic pathway through its impact on methionine cycle, could result in DNA hypomethylation and influence implantation, embriogenesis and angiogenesis in placenta. Insufficient folate metabolism could also results in hiperhomocysteinemia, decreases nucleic acids synthesis leading to restriction in cells proliferation and differentiation. All this pathways are involved in fetal hypotrophy. Nowadays, important role is attributed to genetic determinants, especially genetic polymorphisms connected with enzyme activity in folate metabolism and involved in hypotrophy development.

Aim of study: To investigate the connection of selected genetic polymorphisms of folate metabolizing enzymes with increased risk of fetal hypotrophy. This was realized by analysis of clinical, sociodemographic and newborn parameters in both study and control groups. The following polymorphisms were investigated: 677C>T, 1298A>C, 1793G>A *MTHFR*, 1958G>A, 401G>A *MTHFD1*, 2756A>G *MTR/MS*, 66A>G *MTRR/MSR*, 776C>G *TCII* in both groups, as well as in subgroups of women with fetal hypotrophy, divided according to gestational age in the time of delivery and by neonatal weight. The co-occurrence of genotypes frequency of investigated polymorphisms in both groups has been also assessed.

Material and methods: Study group consisted of 120 mothers of children with fetal hypotrophy (mean birth weight of neonate <2 SD or 10 percentile, mean birth weight 1963,3±601,0 g, 3,14±2,83 percentile). In control group we included 120 healthy women, who delivered normal weight neonates (mean birth weight: 3490,3±351,3 g, 52,2±25,9 percentile). Study group was divided twice on two subgroups according to gestational age in the time of delivery (52 patients <37 weeks, 68 patients delivered ≥37 weeks) and by neonatal weight (31 mothers of children with birth weigth <1500 g, 89 mothers of neonate with birth weight ≥1500 g). All investigated polymorphisms were analyzed by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR/RFLP).

Results:

1. Analysis of socioeconomic data: In the study group lower gestational age in the time of delivery (35,0 vs. 39,2 week, $p < 0,0001$) and higher incidence of caesarean section (54,2 vs. 14,2%, $p < 0,0001$) have been noted. In the intrauterine restriction group more women had primary (23,3 vs. 2,5%, $p < 0,0001$) and secondary (40,0 vs. 34,2%, $p < 0,0001$) education, but in control group more women had higher education. All observed differences were statistically significant.

2. Frequency of genotypes and alleles of investigated polymorphisms: The most interesting data were obtained in analysis of polymorphism 401G>A of gene *MTHFD1*. We observed higher incidence of heterozygous genotype 401GA and mutated homozygous genotype 401AA in study group compared to the controls (401GA: 39,2 vs. 30,8%, OR=1,44, $p=0,11$; 401AA: 7,5 vs. 3,4%, OR=2,35, $p=0,12$). Also frequency of mutated allele 401A was statistically higher in study group (401A: 27,1 vs. 18,8%, OR=1,61, $p=0,02$).

3. Frequency of genotypes and alleles of genetic polymorphisms in subgroups of study group with fetal hypotrophy (divided according to gestational age in the time of delivery and by neonatal weight): For 401G>A polymorphism of *MTHFD1* gene in subgroup of mother of neonates with intrauterine growth restriction who were born before 37 weeks of gestation we observed: lower frequency of 401GG genotype (44,2 vs. 65,8%, OR=0,41, $p=0,007$), but higher incidence of heterozygous 401GA genotype (48,1 vs. 30,8%, OR =2,08, $p=0,024$) and mutated allele 401A (31,7 vs. 18,8%, OR=2,01, $p=0,007$) compared to controls. For 401G>A polymorphism of *MTHFD1* gene in subgroup of women with the newborns weight ≥ 1500 g, higher frequency of homozygous mutated 401AA genotype (9,0 vs. 3,3%, OR=2,86, $p=0,07$), as well as significantly higher frequency of mutated 401A allele (28,7 vs. 18,8%, OR=1,74, $p=0,01$) were noted. For 2756A>G polymorphism of *MTR* gene mutated homozygous 2756GG genotype twice more frequent in subgroup of patients whose newborn weighted < 1500 g than in controls with high odds ratio OR=4,11 (6,5 vs. 2,5%, ns) has been observed. Also significantly higher incidence of mutated 2756G allele were noted in this subgroup (33,9 vs. 23,0%, OR=1,72, $p=0,05$).

4. Genotypes co-occurrence: Analysis of co-occurrence of genotypes revealed in study group the higher incidence of combination of genotypes: 1958GA *MTHFD1* / 401AA *MTHFD1* (5,9 vs. 0,9%, $p=0,03$), 677TT *MTHFR* / 776CG *TCII* (10,0 vs. 2,5%, $p=0,01$), 1298AC *MTHFR* / 401GA *MTHFD1* (19,2 vs. 10,9%, $p=0,05$), 401GA *MTHFD1* / 2756AA *MTR* (30,0 vs. 19,2%, $p=0,03$), 401GA *MTHFD1* / 776CC *TCII* (14,2 vs. 7,5%, $p=0,07$) compared to controls.

Conclusion:

1. The analysis of genotypes and alleles of investigated polymorphisms in genes involved in folate metabolisms shows direct impact of mutated 401A allele of *MTHFD1* gene on risk of fetal hypotrophy development.
2. The study suggest the particular connection of mutated 401A allele of *MTHFD1* gene with fetal hypotrophy in mothers of neonates born before 37 weeks of gestation and with birth weight above 1500 g.
3. Analysis also shows possible role of mutated 2756G allele of *MTR* gene in etiology of fetal hypotrophy in mothers of neonates with weight below 1500 g at birth.
4. The obtained results connecting to frequency of genotypes and alleles of polymorphisms: 677C>T, 1298A>C, 1793G>A of *MTHFR* gene, 1958G>A of *MTHFD1* gene, 776C>G of *TCII* gene and 66A>G of *MTRR* gene do not show the direct connection of these polymorphisms with risk of fetal hypotrophy.
5. Analysis of co-occurrence of genotypes indicated the possible interaction of polymorphisms influence to risk of fetal hypotrophy, especially combined effect of polymorphisms: 401G>A of *MTHFD1* gene, 677C>T, 1298A>C, 1793G>A of *MTHFR* gene, 2756A>G of *MTR* gene and 776C>G of *TCII* gene.

10. SPIS TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII

Spis tabel

Tab. 1. Charakterystyka porównawcza kobiet z grupy z hipotrofią płodu i pacjentek z grupy kontrolnej.

Tab. 2. Charakterystyka polimorfizmów genów biorących udział w przemianie folianów.

Tab. 3. Skład mieszaniny w reakcji PCR.

Tab. 4. Warunki dla poszczególnych etapów reakcji PCR.

Tab. 5. Charakterystyka porównawcza kobiet z grupy z hipotrofią płodu oraz z grupy kontrolnej.

Tab. 6. Podział pacjentek z grupy badanej w zależności od tygodnia zakończenia ciąży (poród $\geq 37+0$ tc oraz poród $< 36+6$ tc).

Tab. 7. Podział pacjentek z grupy badanej w zależności od masy urodzeniowej noworodka (masa urodzeniowa noworodka ≥ 1500 g i < 1500 g).

Tab. 8. Charakterystyka porównawcza danych dotyczących noworodka z grupy z hipotrofią płodu i z grupy kontrolnej.

Tab. 9. Charakterystyka porównawcza danych dotyczących noworodków z grupy badanej - podział w zależności od tygodnia zakończenia ciąży (poród ≥ 37 tc. i < 37 tc.).

Tab. 10. Charakterystyka porównawcza danych dotyczących noworodków z grupy badanej - podział w zależności od masy urodzeniowej noworodka (1500-2500 g oraz < 1500 g).

Tab. 11. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $677C>T$ genu *MTHFR* w grupie matek noworodków z hipotrofią płodu oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 12. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $1298A>C$ genu *MTHFR* w grupie matek noworodków z hipotrofią płodu oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 13. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $1793G>A$ genu *MTHFR* w grupie matek noworodków z hipotrofią płodu oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 14. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $1958G>A$ genu *MTHFD1* w grupie matek noworodków z hipotrofią płodu oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 15. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $401G>A$ genu *MTHFD1* w grupie matek noworodków z hipotrofią płodu oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 16. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $2756A>G$ genu *MTR* w grupie matek noworodków z hipotrofią płodu oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 17. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $766C>G$ genu *TCII* w grupie matek noworodków z hipotrofią płodu oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 18. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $66A>G$ genu *MTRR* w grupie matek noworodków z hipotrofią płodu oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 19. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $677C>T$ genu *MTHFR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na czas zakończenia ciąży ≥ 37 tc. i < 37 tc. oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 20. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $1298A>C$ genu *MTHFR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na czas zakończenia ciąży ≥ 37 tc. i < 37 tc. oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 21. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $1793G>A$ genu *MTHFR* w

grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na czas zakończenia ciąży ≥ 37 tc. i < 37 tc. oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 22. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 1958G>A genu *MTHFD1* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na czas zakończenia ciąży ≥ 37 tc. i < 37 tc. oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 23. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 401G>A genu *MTHFD1* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na czas zakończenia ciąży ≥ 37 tc. i < 37 tc. oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 24. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na czas zakończenia ciąży ≥ 37 tc. i < 37 tc. oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 25. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 776C>G genu *TCII* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na czas zakończenia ciąży ≥ 37 tc. i < 37 tc. oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 26. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na czas zakończenia ciąży ≥ 37 tc. i < 37 tc. oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 27. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na noworodki z urodzeniową masą ciała ≥ 1500 g i < 1500 g oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 28. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 1298A>C genu *MTHFR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na noworodki z urodzeniową masą ciała ≥ 1500 g i < 1500 g oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 29. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na noworodki z urodzeniową masą ciała ≥ 1500 g i < 1500 g oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 30. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 1958G>A genu *MTHFD1* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na noworodki z urodzeniową masą ciała ≥ 1500 g i < 1500 g oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 31. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 401G>A genu *MTHFD1* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na noworodki z urodzeniową masą ciała ≥ 1500 g i < 1500 g oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 32. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na noworodki z urodzeniową masą ciała ≥ 1500 g i < 1500 g oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 33. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 776C>G genu *TCII* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na noworodki z urodzeniową masą ciała ≥ 1500 g i < 1500 g oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 34. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie matek noworodków z hipotrofią, z uwzględnieniem podziału na noworodki z urodzeniową masą ciała ≥ 1500 g i < 1500 g oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 35. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 677C>T oraz 1298A>C genu *MTHFR* w badanych grupach kobiet.

Tab. 36. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 677C>T oraz 1793G>A genu *MTHFR* w badanych grupach kobiet.

Tab. 37. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1298A>C oraz 1793G>A genu *MTHFR* w badanych grupach kobiet.

Tab. 38. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1958G>A oraz 401G>A genu *MTHFD1* w badanych grupach kobiet.

Tab. 39. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 677C>T genu *MTHFR* oraz

1958G>A genu *MTHFD1* w badanych grupach kobiet.

Tab. 40. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 677C>T genu *MTHFR* oraz 401G>A genu *MTHFD1* w badanych grupach kobiet.

Tab. 41. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 677C>T genu *MTHFR* oraz 2756A>G genu *MTR* w badanych grupach kobiet.

Tab. 42. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 677C>T genu *MTHFR* oraz 66A>G genu *MTRR* w badanych grupach kobiet.

Tab. 43. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 677C>T genu *MTHFR* oraz 776C>G genu *TCII* w badanych grupach kobiet.

Tab. 44. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1298A>C genu *MTHFR* oraz 1958G>A genu *MTHFD1* w badanych grupach kobiet.

Tab. 45. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1298A>C genu *MTHFR* oraz 401G>A genu *MTHFD1* w badanych grupach kobiet.

Tab. 46. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1298A>C genu *MTHFR* oraz 2756A>G genu *MTR* w badanych grupach kobiet.

Tab. 47. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1298A>C genu *MTHFR* oraz 66A>G genu *MTRR* w badanych grupach kobiet.

Tab. 48. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1298A>C genu *MTHFR* oraz 776C>G genu *TCII* w badanych grupach kobiet.

Tab. 49. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1793G>A genu *MTHFR* oraz 1958G>A genu *MTHFD1* w badanych grupach kobiet.

Tab. 50. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1793G>A genu *MTHFR* oraz 401G>A genu *MTHFD1* w badanych grupach kobiet.

Tab. 51. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1793G>A genu *MTHFR* oraz 2756A>G genu *MTR* w badanych grupach kobiet.

Tab. 52. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1793G>A genu *MTHFR* oraz 66A>G genu *MTRR* w badanych grupach kobiet.

Tab. 53. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1793G>A genu *MTHFR* oraz 776C>G genu *TCII* w badanych grupach kobiet.

Tab. 54. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1958G>A genu *MTHFD1* oraz 2756A>G genu *MTR* w badanych grupach kobiet.

Tab. 55. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1958G>A genu *MTHFD1* oraz 66A>G genu *MTRR* w badanych grupach kobiet.

Tab. 56. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 1958G>A genu *MTHFD1* oraz 776C>G genu *TCII* w badanych grupach kobiet.

Tab. 57. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 401G>A genu *MTHFD1* oraz 2756A>G genu *MTR* w badanych grupach kobiet.

Tab. 58. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 401G>A genu *MTHFD1* oraz 66A>G genu *MTRR* w badanych grupach kobiet.

Tab. 59. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 401G>A genu *MTHFD1* oraz 776C>G genu *TCII* w badanych grupach kobiet.

Tab. 60. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 2756A>G genu *MTR* oraz 66A>G genu *MTRR* w badanych grupach kobiet.

Tab. 61. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 2756A>G genu *MTR* oraz 776C>G genu *TCII* w badanych grupach kobiet.

Tab. 62. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 66A>G genu *MTRR* oraz 776C>G genu *TCII* w badanych grupach kobiet.

Tab. 63. Polimorfizmy genów związanych z metabolizmem folianów i ich udział w rozwoju hipotrofii płodu.

Tab. 64. Inne matczyne polimorfizmy mogące mieć udział w rozwoju hipotrofii płodu.

Spis rycin

- Ryc. 1.** Główne grupy czynników ryzyka wewnątrzmacicznego zaburzenia wzrastania płodu [za Baschat i wsp., 2004].
- Ryc. 2.** Wzór strukturalny kwasu foliowego (C₁₉H₁₉O₆N₇, m.cz. 441,4).
- Ryc.3** Cykl przemian folianów [wg Moyers i wsp., 2001].
- Ryc. 4.** Dwuetapowa przemiana kwasu foliowego do TH₄ folianu.
- Ryc. 5.** Pochodne TH₄-folianu pełniące rolę koenzymów w wielu w reakcjach ustrojowych.
- Ryc. 6.** Przemiana TH₄-folianu do N₅,N₁₀ metyleno-TH₄ folianu.
- Ryc. 7.** Udział folianów w syntezie kwasów nukleinowych [wg Czeczot 2008].
- Ryc. 8.** Udział folianów w cyklu przemian homocysteiny w organizmie [wg Czeczot 2008].
- Ryc. 9.** Reakcja katalizowana przez reduktazę metylenotetrahydrofolianową.
- Ryc. 10.** Reakcje katalizowane przez MTHFD1 [wg Brody i wsp. 2002].
- Ryc. 11.** Cykl przemian metioniny przy udziale enzymów MTR i MTRR [wg Leclerc 1998].

Spis fotografii

- Fot.1.** Analiza genotypów polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Hinf*I. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 2, 5 to homozygoty niezmutowane CC, tory 3, 4, 6, 8, heterozygoty CT, tor 7 to homozygota zmutowana TT.
- Fot.2.** Analiza genotypów polimorfizmu 1298A>C genu *MTHFR* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Mbo*II. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 2, 3, 5, 6 to heterozygoty AC, tory 7, 8 homozygoty niezmutowane AA tor 4 to homozygota zmutowana CC.
- Fot.3.** Analiza genotypów polimorfizmu 1793G>A genu *MTHFR* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Mbi*I, (*Bsr*BI). Tor 1 marker wielkości 50 pz, tor 5 to heterozygota GA tory 2, 3, 4, 6, 7, 8, homozygoty niezmutowane GG.
- Fot.4.** Analiza genotypów polimorfizmu 1958G>A genu *MTHFD1* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Msp*I. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 2, 4, 8 to homozygoty niezmutowane GG, tory 3, 5, 7, to heterozygoty GA, tor 6, 9, to homozygoty zmutowane AA.
- Fot. 5.** Analiza genotypów polimorfizmu 401G>A genu *MTHFD1* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Bsm*AI (*Alw*26I). Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 3, 5, 6, 7, 10 to homozygoty niezmutowane GG, tory 2, 4, 8 to heterozygoty GA tor 9 to homozygota zmutowana AA.
- Fot. 6.** Analiza genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Bsu*RI. Tor 1 marker wielkości 50 pz., tory 2, 4, 6, 7, 8 homozygoty niezmutowane AA, tor 3 heterozygota AG, tor 5 to homozygota zmutowana GG.
- Fot. 7.** Analiza genotypów polimorfizmu 766C>G genu *TCII* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Mva*I. Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 2, 7 homozygoty niezmutowane AA, tory 3, 4, 5, 8, heterozygoty AG, tor 6 to homozygota zmutowana GG.
- Fot. 8.** Analiza genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Nde*I (Fermentas, Litwa). Tor 1 marker wielkości 50 pz., tor 7 homozygota niezmutowana AA, tory 2, 4, 5, 6 heterozygoty AG, tory 3, 8 to homozygoty zmutowane GG.