

**UNIWERSYTET MEDYCZNY
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU
WYDZIAŁ LEKARSKI II**

**POLIMORFIZM KATECHOLO-*O*-METYLOTRANSFERAZY (COMT) ORAZ
RECEPTORÓW DOPAMINY (DRD1, DRD4)
W ETIOLOGII I TERAPII STANU PRZEDRZUCAWKOWEGO**

MGR FARM. PAULINA MAGDALENA MAREK

ROZPRAWA DOKTORSKA

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

POZNAŃ 2014

*Pani Profesor dr hab. Agnieszce Seremak-Mrozikiewicz
za opiekę merytoryczną, poświęcony czas, wsparcie i wyrozumiałość*

*Pani Doktor Grażynie Kurzawińskiej
za cenne wskazówki i życzliwość*

*Moim Rodzicom
za nieocenione wsparcie i niezachwianą wiarę w moje możliwości*

*Ramiro
za pomoc, cierpliwość i wsparcie duchowe*

Serdecznie dziękuję

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
1. WSTĘP	7
1.1. Klasyfikacja nadciśnienia w ciąży	8
1.2. Etiopatogeneza stanu przedrzucawkowego	8
1.2.1. Podłoże genetyczne stanu przedrzucawkowego	17
1.3. Farmakoterapia i profilaktyka stanu przedrzucawkowego	19
1.3.1. Metyldopa (3-hydroksy- α -metylo-L-tyrozyna)	22
1.4. COMT - katecholo- <i>O</i> -metylotransferaza	24
1.4.1. COMT - występowanie i działanie	24
1.4.2. Warianty polimorficzne genu <i>COMT</i>	26
1.5. Receptory dopaminy	29
1.5.1. Dopamina – występowanie i działanie	29
1.5.2. Receptory dopaminy - występowanie i działanie	30
1.5.3. Warianty polimorficzne genów receptorów <i>DRD1</i> i <i>DRD4</i>	32
2. CEL PRACY	34
3. MATERIAŁ I METODYKA	35
3.1. Charakterystyka grupy badanej	35
3.2. Charakterystyka grupy kontrolnej	35
3.3. Metodyka	36
3.3.1. Materiał badawczy	36
3.3.2. Izolacja DNA	36
3.3.3. Oznaczanie jakości i ilości DNA za pomocą metod spektrofotometrycznych	37
3.3.4. Reakcja PCR/RFLP	38
3.3.5. Elektroforeza	39
3.4. Aparatura stosowana w badaniach	39
3.5. Analiza genetyczna polimorfizmów	40
3.5.1. Polimorfizm <i>472G>A (Val108/158Met)</i> genu <i>COMT</i>	40
3.5.2. Polimorfizm <i>-48A>G</i> genu <i>DRD1</i>	41
3.5.3. Polimorfizm <i>-521C>T</i> genu <i>DRD4</i>	42
3.6. Oprogramowanie komputerowe oraz biologiczne bazy danych	43
3.7. Analiza statystyczna	44
4. WYNIKI	46
4.1. Charakterystyka porównawcza danych klinicznych i parametrów biochemicznych badanych grup kobiet	46
4.2. Analiza parametrów biochemicznych kobiet z grupy badanej	48
4.3. Analiza danych klinicznych noworodków z grupy badanej i kontrolnej	49
4.4. Analiza wyników badań genetycznych	50
4.4.1. Polimorfizm <i>472G>A (Val108/158Met)</i> genu <i>COMT</i>	50
4.4.2. Polimorfizm <i>-48A>G</i> genu <i>DRD1</i>	53
4.4.3. Polimorfizm <i>-521C>T</i> genu <i>DRD4</i>	57

4.4.4.	Współwystępowanie badanych polimorfizmów w grupach kobiet ze stanem przedrzucawkowym i w grupie kontrolnej	60
4.4.5.	Analiza danych klinicznych pacjentek w zależności od poszczególnych genotypów	64
4.4.5.1.	Dane kliniczne pacjentek w zależności od genotypu polimorfizmu <i>COMT 472G>A</i>	64
4.4.5.2.	Dane kliniczne pacjentek w zależności od genotypu polimorfizmu <i>DRD1 -48A>G</i>	69
4.4.5.3.	Dane kliniczne pacjentek w zależności od genotypu polimorfizmu <i>DRD4 -521C>T</i>	74
4.4.6.	Analiza danych klinicznych noworodków w zależności od rodzaju oznaczanych genotypów u badanych kobiet	79
4.4.6.1.	Dane kliniczne noworodków w zależności od genotypu polimorfizmu <i>COMT 472G>A</i>	79
4.4.6.2.	Dane kliniczne noworodków w zależności od genotypu polimorfizmu <i>DRD1 -48A>G</i>	81
4.4.6.3.	Dane kliniczne noworodków w zależności od genotypu polimorfizmu <i>DRD4 -521C>T</i>	83
4.4.7.	Analiza otrzymywanych dawek leku metyldopa u kobiet z grupy badanej w zależności od rodzaju genotypu	86
5.	OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA	92
5.1.	Udział polimorfizmu <i>472G>A COMT</i> w etiologii stanu przedrzucawkowego	93
5.2.	Udział polimorfizmu <i>-48A>G</i> genu receptora <i>DRD1</i> w etiologii stanu przedrzucawkowego	99
5.3.	Udział polimorfizmu <i>-521C>T</i> genu receptora <i>DRD4</i> w etiologii stanu przedrzucawkowego	102
5.4.	Korelacja poszczególnych genotypów badanych polimorfizmów genu enzymu <i>COMT</i> i genów receptorów dopaminy <i>DRD1</i> i <i>DRD4</i> z danymi biochemicznymi badanych pacjentek i ich noworodków	105
5.5.	Znaczenie wariantów polimorficznych w farmakoterapii nadciśnienia tętniczego i stanu przedrzucawkowego	106
5.6.	Podsumowanie	111
6.	WNIOSKI	112
7.	PIŚMIENNICTWO	113
8.	STRESZCZENIE W J. POLSKIM	122
9.	STRESZCZENIE W J. ANGIELSKIM	125
10.	SPIS TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII	128

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACOG	Amerykańskie Stowarzyszenie Położników i Ginekologów (ang. <i>American Congress of Obstetricians and Gynecologists</i>)
ADHD	zespół nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ang. <i>attention deficit hyperactivity disorder</i>)
Ap	skala Apgar (ang. <i>Apgar score</i>)
AT1	angiotensyna 1 (ang. <i>angiotensin 1</i>)
AT2	angiotensyna 2 (ang. <i>angiotensin 2</i>)
BUN	azot mocznika (ang. <i>blood urea nitrogen</i>)
cAMP	3',5'-cykliczny adenylozomonofosforan (ang. <i>3', 5'-cyclic adenosine monophosphate</i>)
cGMP	3',5'-cykliczny guanozynomonofosforan (ang. <i>3', 5'-cyclic guanosine monophosphate</i>)
COMT	katecholo- <i>O</i> -metylotransferaza (ang. <i>catechol-O-methyltransferase</i>)
COMT^H	katecholo- <i>O</i> -metylotransferaza termostabilna, COMT*1 (ang. <i>catechol-O-methyltransferase thermostable</i>)
COMT^L	katecholo- <i>O</i> -metylotransferaza termolabilna, COMT*2 (ang. <i>catechol-O-methyltransferase thermolabile</i>)
DA	dopamina (ang. <i>dopamine</i>)
dATP	trifosforan deoksyadenozyny (ang. <i>deoxyadenosine triphosphate</i>)
dCTP	trifosforan deoksytyminy (ang. <i>deoxycytidine triphosphate</i>)
dGTP	trifosforan deoksyguanozyny (ang. <i>deoxyguanosine triphosphate</i>)
DNA	kwasy dezoksyrybonukleinowe (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dTTP	trifosforan deoksytymidyny (ang. <i>2'-deoxythymidine triphosphate</i>)
DRD1	receptor dopaminowy D1 (ang. <i>dopamine receptor D1</i>)
DRD4	receptor dopaminowy D4 (ang. <i>dopamine receptor D4</i>)
E	erytrocyty (ang. <i>erythrocyte</i>)
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowe (ang. <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
Flt1	rozpuszczalna forma receptora 1 dla czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. <i>vascular endothelial growth factor receptor 1</i>)
ET	endotelina (ang. <i>endothelin</i>)
eNOS	endotelialna syntaza tlenku azotu (ang. <i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
FA	szybka acetylacja (ang. <i>fast acetylation</i>)
FBAT	test asocjacji oparty na badaniach rodzinnych (ang. <i>family-based association test</i>)
GRK2	beta adrenergiczny receptor kinazy 2 (ang. <i>beta adrenergic receptor kinase 2</i>)
GRK4	beta adrenergiczny receptor kinazy 4 (ang. <i>beta adrenergic receptor kinase 4</i>)
Hb	hemoglobina (ang. <i>haemoglobin</i>)
HELLP	(ang. <i>Hemolytic anemia, Elevated Liver enzyme, Low Platelets count</i>)
HIF-1α	czynnik 1 α indukowany niedotlenieniem (ang. <i>hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>)
Htk	hematokryt (ang. <i>haematocrit</i>)
L	leukocyty (ang. <i>leukocyte</i>)
IL-6	interleukina 6 (ang. <i>interleukin 6</i>)
IL-8	interleukina 8 (ang. <i>interleukin 8</i>)
MB-COMT	forma związana COMT (ang. <i>membrane-bound COMT</i>)
2-ME	2-metoksyestradiol (ang. <i>2-methoxyestradiol</i>)
mRNA	matrycowy RNA (ang. <i>messenger RNA</i>)

MTHFR	reduktaza 5,10-metylenotetrahydrofolianu (ang. <i>5,10 methylenetetrahydrofolate reductase</i>)
NAT1	N-acetylotransferaza 1 (ang. <i>N-acetyltransferase 1</i>)
NAT2	N-acetylotransferaza 2 (ang. <i>N-acetyltransferase 2</i>)
NIR	test najmniejszych istotnych różnic (ang. <i>least significant differences - LSD</i>)
OD	gęstość optyczna (ang. <i>optical density</i>)
NO	tlenek azotu (ang. <i>nitric oxide</i>)
NOS	syntaza tlenku azotu (ang. <i>nitric oxide synthase</i>)
4-OHE2	4-hydroksyestradiol (ang. <i>4-hydroxyestradiol</i>)
PCR	polimerazowa reakcja łańcuchowa (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	preeclampsja (ang. <i>preeclampsia</i>)
PIGF	czynnik wzrostu łożyska 1 (ang. <i>human placental growth factor-1</i>)
PKC	kinaza proteinowa C (ang. <i>protein kinase C</i>)
PI	płytki krwi (ang. <i>blood platelets</i>)
PP 13	białko łożyskowe 13 (ang. <i>placental protein 13</i>)
PU	przedział ufności (ang. <i>confidence limit</i>)
RAA	układ renina-angiotensyna-aldosteron (ang. <i>renin angiotensin aldosterone system</i>)
RFLP	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. <i>restriction fragments length polymorphism</i>)
RNA	kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
RR diast.	ciśnienie tętnicze rozkurczowe (ang. <i>diastolic blood pressure</i>)
RR syst.	ciśnienie tętnicze skurczowe (ang. <i>systolic blood pressure</i>)
SA	wolna acetylacja (ang. <i>slow acetylation</i>)
S-COMT	forma rozpuszczalna COMT (ang. <i>soluble COMT</i>)
SD	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>)
SEng	rozpuszczalna forma endogliny (ang. <i>soluble endoglin</i>)
sFlt-1	rozpuszczalna forma tyrozyny kinazy 1(ang. <i>soluble fms-like tyrosine kinase-1</i>)
SOD	dysmutaza ponadtlenkowa (ang. <i>superoxide dismutase</i>)
TNF-α	czynnik martwicy guza α (ang. <i>tumor necrosis factor α</i>)
UV	promieniowanie ultrafioletowe (ang. <i>ultraviolet</i>)
V1	wazopresyna 1 (ang. <i>vasopressin 1</i>)
VEGF-A	czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego A (ang. <i>vascular endothelial growth factor A</i>)
WR	współczynnik ryzyka, iloraz szans (ang. <i>odds ratio</i>)

1. WSTĘP

Stan przedrzucawkowy (PE – *preeclampsia*) jest poważnym i złożonym powikłaniem ciąży. Częstość występowania tego schorzenia szacuje się na 5-8% ciężarnych na świecie. PE może prowadzić do wielu zmian narządowych w organizmie [Liang i wsp. 2012]. Występuje po 20 tygodniu ciąży, charakteryzuje się ciśnieniem tętniczym powyżej 140/90 mmHg i białkomoczem z utratą co najmniej 300 mg białka na dobę. Stan przedrzucawkowy jest przyczyną wystąpienia ciężkich powikłań u matki i płodu oraz jest jedną z głównych przyczyn umieralności okołoporodowej matek, zarówno w krajach wysokorozwiniętych jak i rozwijających się [Chappell i wsp. 2002, Gilbert i wsp. 2008, Hertig i wsp. 2010, Redman i wsp. 2005, Roberts i wsp. 2002].

W przypadku braku wprowadzenia odpowiedniego postępowania terapeutycznego PE, może wystąpić rzucawka (*eclampsia*) - stan, który jest bezpośrednim zagrożeniem życia matki i dziecka. Rzucawka występuje u około 1% kobiet ze stanem przedrzucawkowym i objawia się napadem drgawek toniczno-klonicznych i/lub śpiączką. Napad drgawek może pojawić się w ciąży, w czasie porodu, ale także w okresie połogu [Leszczyńska-Gorzelał i wsp. 2009].

Stan przedrzucawkowy jako pierwszy opisał Hipokrates około 400 lat p.n.e., zwracając uwagę na bóle głowy, uczucie ciężkości oraz konwulsje pojawiające się u ciężarnych kobiet. Jako remedium zalecał przywrócenie „równowagi płynów” poprzez zmianę diety, oczyszczanie i upuszczanie krwi [Bell 2010]. Rzucawka u ciężarnych opisana została dwa tysiące lat temu przez Celsusa. Ponieważ drgawki wydawały się pojawiać nagle, bez wcześniejszych oznak, zostały określone jako *eclampsia* (grec.) co oznacza błyskawicę [Roberts i wsp. 2002]. W XVII wieku po raz pierwszy usystematyzowano wiadomości na temat stanu przedrzucawkowego i rzucawki oraz dokonano spostrzeżenia, iż u kobiet, które rodzą po raz pierwszy istnieje większe ryzyko wystąpienia drgawek niż u wieloródek. Flebotomia w tym czasie nadal była jedną z podstawowych metod leczenia. W XIX wieku, dzięki wieloletnim obserwacjom kobiet ze stanem przedrzucawkowym oraz postępowi w dziedzinie medycyny ustalono jednoznacznie, iż do podstawowych objawów klinicznych stanu przedrzucawkowego należą bóle głowy oraz obrzęki. Powiązано również stan przedrzucawkowy ze wzrostem wartości ciśnienia tętniczego krwi oraz obecnością białkomoczu które to wykładniki laboratoryjne są uwzględniane do chwili obecnej [Bell 2010].

1.1. Klasyfikacja nadciśnienia w ciąży

Nadciśnienie ciążowe to stosunkowo częste powikłanie, które występuje u 5-10% ciężarnych. W Stanach Zjednoczonych ilość zachorowań wynosi 8%, a ilość nowych przypadków zwiększyła się na przestrzeni ostatnich lat o 40% [Yamaguchi i wsp. 2009]. Nadciśnienie tętnicze rozpoznajemy przy wartości ciśnienia skurczowego ≥ 140 mmHg oraz rozkurczowego ≥ 90 mmHg. Istotne jest również czy nadciśnienie występowało u pacjentki jeszcze przed zajściem w ciążę (diagnozowane przez pierwszych 20 tygodni), czy też pojawiło się dopiero po 20 tc. [Cifkova 2005, Hollier i wsp. 2001, Jobe i wsp. 2013, Kean 2002].

Amerykańskie Towarzystwo Położników i Ginekologów (ACOG - *American College of Obstetricians and Gynecologists*) wyróżnia nadciśnienie izolowane (nadciśnienie ciążowe bez białkomoczu i objawów patologicznych), stan przedrzucawkowy (nadciśnienie ciążowe, białkomoczu) i rzucawkę. Osobną kategorię stanowi nadciśnienie przewlekłe, nadciśnienie przewlekłe z nakładającym się stanem przedrzucawkowym lub rzucawką oraz nadciśnienie przemijające [Szczepaniak-Chicheł i wsp. 2006]. W stanie przedrzucawkowym, na podstawie objawów, można wyróżnić dwie postaci: łagodną oraz ciężką. Postać łagodną rozpoznawana jest gdy objawy to jedynie podwyższone ciśnienie tętnicze krwi $>140/90$ mmHg przy dwukrotnym pomiarze w odstępie 6 godzin, oraz białkomoczu w pojedynczej próbce moczu lub dobową utratą >300 mg białka. Kryteria rozpoznania ciężkiej postaci są następujące (wg ACOG): ciśnienie powyżej 160/110 mmHg (mierzone dwukrotnie w spoczynku w odstępach 6-godzinnych), białkomoczu powyżej 2000 mg na dobę, oliguria poniżej 500 ml na dobę, małopłytkowość poniżej 100 000/mm³. Ponadto ciężkiej postaci towarzyszą zaburzenia funkcji wątroby, zaburzenia ze strony OUN (ból i zawroty głowy, zaburzenia widzenia, zaburzenia świadomości), ból w nadbrzuszu, obrzęk płuc, zaburzenia wzrastania płodu [Leszczyńska-Gorzela i wsp. 2009].

1.2. Etiopatogeneza stanu przedrzucawkowego

Często pierwszym, zauważalnym objawem jest nieprawidłowy rozwój i hipotrofia płodu oraz towarzyszące małowodzie. Ponadto u ciężarnej może również dojść do uszkodzenia wątroby, co objawia się bólem brzucha, nudnościami, wymiotami i podwyższonym poziomem enzymów wątrobowych. W badaniach histopatologicznych obserwuje się obecność złogów fibryny, jak również, w rzadkich przypadkach krwotoki i martwicę komórek wątroby [Powe i wsp. 2011]. W stanie przedrzucawkowym dochodzi także do niekiedy głębokiego upośledzenia przepływu krwi w krążeniu maczyno-płodowym i

niedotlenienia płodu.

Do objawów sugerujących wystąpienie ciężkiego stanu przedrzucawkowego należą nagły przyrost masy ciała, obrzęki, bóle głowy i zaburzenia widzenia. Obserwuje się również obrzęk płuc, drgawki, oligurię. Ponadto dochodzi do zwiększenia stężenia we krwi takich neuroprzekaźników jak noradrenalina i serotonina, związanych ze zwiększoną aktywnością układu sympatycznego. Może również wystąpić patologiczna aktywacja procesów fibrynolitycznych i koagulacyjnych, trombocytopenia oraz zmiany stężenia enzymów wątrobowych. W przypadku braku farmakoterapii istnieje ryzyko wystąpienia drgawek i rzucawki [Sibai i wsp. 2005].

Wśród czynników ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego można wymienić: nadciśnienie tętnicze, cukrzycę, schorzenia nerek, trombofilię, nadwagę, wiek matki (poniżej 18 lub powyżej 40 roku życia), palenie papierosów, zespół policystycznych jajników, choroby układu immunologicznego, infekcje w czasie ciąży (np. zakażenie dróg moczowych) [Leszczyńska-Gorzelałak i wsp. 2009].

W literaturze można znaleźć również doniesienia na temat zależności pomiędzy występowaniem PE a wysokością geograficzną. W pracy dotyczącej kobiet mieszkających w Boliwii analizowano pacjentki zamieszkujące tereny położone powyżej 2500 m n.p.m. oraz mieszkanki obszaru o wysokości 300 m n.p.m. Otrzymane wyniki pokazały, iż u kobiet żyjących na dużych wysokościach częściej występowało nadciśnienie tętnicze i stan przedrzucawkowy, jak również mniejsza masa urodzeniowa noworodków [Keyes i wsp. 2003].

Zwykle u kobiet, u których prawdopodobnie wystąpi PE, najpierw pojawia się nadciśnienie, które od samego początku ciąży powinno być pod kontrolą. W dalszej kolejności występuje białkomocz. W badaniach laboratoryjnych należy przeprowadzić dobową zbiórkę moczu, kontrolować funkcję nerek, zmiany hematologiczne oraz funkcję wątroby [Hansson i wsp. 2006, Kean 2002, Moore Simas i wsp. 2007, Powe i wsp. 2011].

Badania prowadzone w poszczególnych rasach dostarczają ciekawych wniosków. Największą częstość występowania nadciśnienia ciążowego i stanu przedrzucawkowego zaobserwowano u kobiet rasy czarnej, a następnie rasy białej. Zdecydowanie najrzadziej powikłania te występują u kobiet rasy żółtej, z wyjątkiem mieszkanki wysp Pacyfiku i Południowej Azji [Leszczyńska-Gorzelałak i wsp. 2009].

W prawidłowo przebiegającej ciąży zachodzi wiele zmian funkcjonalnych w obrębie układu sercowo-naczyniowego. Następuje szybki przyrost całkowitej objętości krążącej krwi, zwiększenie ilości uderzeń serca na minutę oraz zwiększenie wyrzutu serca. Ciśnienie tętnicze stopniowo zmniejsza się do około 20-24 tygodnia czsu trwania ciąży, a następnie stopniowo rośnie. Te hemodynamiczne zmiany w organizmie są łatwe do wykrycia już od wczesnej ciąży. Zmiany wazodilatacyjne pojawiają się już od momentu fazy lutealnej po poczęciu, a peryferyjny opór naczyniowy zmniejsza się stopniowo aż do osiągnięcia w około 20 tygodniu ciąży wartości o 34% niższej niż przed poczęciem. W rezultacie rozszerzenia naczyń w organizmie matki następuje zwiększenie przepływu krwi w naczyniach peryferyjnych – skórnych, nerkowych oraz maciczno-łożyskowych. Zmiany w syntezie lub odpowiedzi na czynniki wazoaktywne, takie jak tlenek azotu, prostaglandyny, endoteliny i angiotensyny mogą być włączone w proces zmniejszania oporu naczyń peryferyjnych. W stanie przedrzucawkowym ta hemodynamiczna i naczyniowa adaptacja jest zawsze zakłócona [VanWijk i wsp. 2000].

Wiele danych wskazuje na to, iż stan przedrzucawkowy jest dziedzicznym zaburzeniem o podłożu autoimmunologicznym. Istnieje hipoteza, iż w czasie ciąży organizm matki indukuje powstawanie autoprzeciwciał, aktywujących receptory angiotensynowe [Dragun i wsp. 2009, Xia i wsp. 2009]. Cechą charakterystyczną jest również stan zapalny w komórkach naczyniowych endotelium oraz zwiększona aktywność układu współczulnego [Redman i wsp. 1999]. Nadciśnienie w stanie przedrzucawkowym wynika także z wazokonstrykcji naczyń peryferyjnych i zmniejszonej podatności na odkształcanie tętnic. Białkomocz związany jest z patognomicznym uszkodzeniem nerek znanym jako endotelioza kłębkowa [Powe i wsp. 2011].

W ciąży przebiegającej prawidłowo trofoblast odpowiada za przekształcenie warstwy mięśniowej i unerwienia autonomicznego tętnic spiralnych, zamieniając je w tętnice maciczno-łożyskowe. Jest to mechanizm fizjologiczny, który umożliwia zmniejszenie oporu obwodowego w łożysku naczyniowym i przepływ krwi pod niskim ciśnieniem. W przypadku ciąży powikłanej nadciśnieniem proces ten jest ograniczony i dotyczy jedynie doczesnej części tych tętnic. Część znajdująca się w macicy nie ulega poszerzeniu, nie obserwuje się także zmian w unerwieniu autonomicznym. Ponadto stwierdza się odkładanie w tych naczyniach włókniaka. Te patologiczne zmiany powodują ograniczenie przepływu krwi przez jednostkę maciczno-łożyskową, zmniejszając podaż substancji niezbędnych do rozwoju płodu. Ten nieprawidłowy remodeling naczyń występuje na długo zanim pojawią się objawy stanu przedrzucawkowego [Morgan i wsp. 1999].

Kolejnym zaburzeniem jest nieprawidłowa funkcja śródbłonka. Komórki śródbłonka wydzielają szereg substancji wielko- i drobnocząsteczkowych, zapewniających właściwy przepływ krwi oraz drożność naczyń. Do substancji wielkocząsteczkowych zalicza się fibronektynę, siarczan heparanu, interleukinę 1, tkankowy aktywator plazminogenu oraz czynniki wzrostu. Substancje drobnocząsteczkowe to m.in. prostacyklina, tlenek azotu, czynnik aktywujący płytki krwi i endotelina 1. Uszkodzenie śródbłonka może spowodować wydzielanie aktywnych miogenów oraz czynników obkurczających naczynia poprzez zwiększenie produkcji przez śródbłonek peptydowego czynnika wzrostu lub uwalnianie zapasów z aktywowanych płytek krwi. Twierdzenie, iż nieprawidłowa funkcja śródbłonka odgrywa rolę w powstawaniu nadciśnienia w ciąży wynika z analizy osocza krwi chorych, które wykazuje zwiększoną aktywność mitogenną i jest cytotoksyczne w stosunku do komórek śródbłonka *in vitro* [Bręborowicz i wsp. 2000].

Zakłócenia równowagi pomiędzy czynnikami powodującymi skurcz i rozkurcz naczyń jest istotnym elementem wyjaśniającym rozwój stanu przedrzucawkowego. Tromboksan A₂, syntetyzowany w płytkach jest związkiem silnie obkurczającym naczynia i powodującym agregację płytek. Prostacyklina syntetyzowana w śródbłonku działa przeciwnie – rozkurcza naczynia i hamuje agregację płytek. U kobiet z PE obserwuje się zmniejszoną biosyntezę prostacykliny – zmniejszenie wydalania z moczem pojawia się już w I trymestrze i poprzedza pojawienie się klinicznych objawów nadciśnienia. Równocześnie obserwuje się zwiększenie syntezy tromboksanu A₂ i podwyższone stężenie jego metabolitu – tromboksanu B₂ w moczu. Zbyt niskim poziomem prostacykliny, wynikającym z uszkodzenia komórek śródbłonka można wytłumaczyć brak prawidłowej stymulacji układu renina-angiotensyna oraz zwiększenie wrażliwości naczyń na angiotensynę II i noradrenalinę. Wzrost produkcji tromboksanu w stosunku do prostacykliny może powodować selektywne uszkodzenie płytek krwi, któremu towarzyszy hemoliza i zmniejszony przepływ krwi przez naczynia spiralne wraz z tworzeniem się zatorów w łożysku [Bręborowicz i wsp. 2000].

W patogenezie uszkodzenia naczyń odgrywają również rolę granulocyty obojętnochłonne, których aktywację obserwuje się w przebiegu stanu przedrzucawkowego. Stężenie elastazy neutrofilowej, która jest markerem aktywacji granulocytów, znacznie wzrasta w stanie przedrzucawkowym. Aktywacja tego enzymu może być również związana z obecnością wolnych rodników tlenowych i hydroperoksydazy lipidowej. Wolne rodniki powodują peroksydację lipidów błony komórkowej, liżę komórek śródbłonka, jego uszkodzenie i wzrost przepuszczalności naczyń. Hydroperoksydazy aktywują cyklooksigenazę i zaburzają produkcję prostacyklin w śródbłonku.

Kolejny czynnik, którego podwyższone stężenie pojawia się w przypadku ciąży powikłanej nadciśnieniem to endotelina (ET - *endothelin*). Nazwa ta określa grupę kilku peptydów (ET-1, ET-2, ET-3), składających się z 21-aminokwasów. Endotelina 1 jest czynnikiem silnie zwężającym naczynia krwionośne, szczególnie podatnym na jej działanie jest układ naczyniowy nerek. Badania potwierdziły wyższy poziom ET-1 w osoczu kobiet ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym. Wskazuje to na ciągle wytwarzanie ET-1 w śródbłonku tętnic. W stanie przedrzucawkowym dochodzi do uszkodzenia śródbłonka, co powoduje zwiększone, lokalne wydzielanie endoteliny zwężającej naczynia. Endotelina 1 poza zwiększaniem napięcia mięśniówki naczyń może również pogłębiać zmiany w obrębie ściany uszkodzonego naczynia krwionośnego i nasilać przerost mięśniówki gładkiej, poprzez swoje właściwości mitogenne [Bręborowicz i wsp. 2000, Saczko i wsp. 2009].

Tlenek azotu (NO – *nitric oxide*) to również ważny związek, który pełni w organizmie funkcję regulacyjną, a wytwarzany jest m.in. w śródbłonku naczyń, neuronach ośrodkowego układu nerwowego i komórkach tłuszczowych. Powstaje w wyniku połączenia O₂ z resztą guanidynową L-argininy. Rezultatem jest powstanie NO i L-cytruliny. Reakcję tę kontrolują trzy postaci syntazy NO, dwie z nich mają postać syntazy konstytutywnej, jak syntaza występująca w komórkach śródbłonka (eNOS – *endothelial nitric oxide synthase*). Istnieje hipoteza, iż zwiększona reaktywność na czynniki wazokonstrykcyjne u kobiet ze stanem przedrzucawkowym może być spowodowana zwiększonym wydzielaniem NO przez komórki śródbłonka podczas ciąży i mniejszym jego wydzielaniem w stanie przedrzucawkowym. W ciąży występuje też stosunkowo niskie stężenie L-argininy, co może być powodem niedostatecznej syntezy NO. Istnieją badania, które mówią o zmniejszonej zdolności do produkcji NO w stanie przedrzucawkowym [Saczko i wsp. 2009, Sandrim i wsp. 2010].

W czasie prawidłowo przebiegającej ciąży, wyrzut i objętość krwi wyrzucanej na obwód zwiększa się o 40-50%, podczas gdy ciśnienie krwi i obwodowy opór naczyniowy zmniejszają się. Istnieje wiele dowodów na to, iż NO bierze udział w tych procesach. Badania prowadzone na szczurach wykazały, iż stężenie cGMP (drugi przekaźnik NO) w osoczu, jak również nitratów w moczu są zwiększone. Chroniczna inhibicja NOS u ciężarnych szczurów powodowała nadciśnienie z wazokonstrykcją naczyń nerkowych i obwodowych, proteinurię, ograniczenie wzrastania płodów oraz ich zwiększoną śmiertelność, co sugerowało objawy przypominające symptomy stanu przedrzucawkowego u ciężarnych kobiet [Yamaguchi i wsp. 2009].

Jednym z czynników rozwoju stanu przedrzucawkowego jest homocysteina, związek indukujący zakrzepicę naczyń łożyskowych i generujący stres oksydacyjny. W metabolizmie

homocysteiny biorą udział witamina B6, witamina B12 oraz foliany. Niedostateczna podaż tych substancji może przyczynić się do rozwoju hiperhomocysteinemii. Czynnikiem wpływającym na podwyższenie stężenia homocysteiny jest również obecność termolabilnego wariantu reduktazy 5, 10-metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR - *5,10-methylenetetrahydrofolate reductase*) enzymu, który odpowiada za zależną od witaminy B₁₂ remetylację homocysteiny do metioniny. Termolabilność, spowodowana zamianą nukleotydu cytozyny na tyminę w pozycji 677 eksonu 4 genu MTHFR, powoduje w następstwie zamianę alaniny na walinę w pozycji 222 białka enzymatycznego. Jest to przyczyną redukcji aktywności enzymu i podwyższenia stężenia homocysteiny w surowicy krwi [Laivuori i wsp. 2000]. W przeprowadzonych badaniach wykazano, iż suplementacja folianami w drugim trymestrze ciąży znacznie obniża stężenie homocysteiny w osoczu i zmniejsza ryzyko wystąpienia stanu przedrzucawkowego. Nawet łagodna postać hyperhomocysteinemii powoduje uszkodzenia naczyń i może przyczynić się do zaburzenia funkcji naczyń. Obserwowano też zwiększone stężenia homocysteiny u pacjentek ze stanem przedrzucawkowym po przeprowadzeniu testu z metioniną [Sohda i wsp. 1997].

Aktywność układu renina-angiotensyna w ciąży prawidłowej jest zwiększona, natomiast u kobiet ze stanem przedrzucawkowym wzrost tej aktywności jest mniej zaznaczony. Ponadto stężenia reniny, angiotensyny II i aldosteronu są mniejsze. Angiotensyna II w ciąży powikłanej stanem przedrzucawkowym wywiera silniejsze działanie presyjne niż w ciąży przebiegającej prawidłowo [Bręborowicz i wsp. 2000].

W przypadku rozwoju stanu przedrzucawkowego w łożysku zachodzi wiele biochemicznych zmian, jak zwiększony stres oksydacyjny. Wśród czynników stresu oksydacyjnego wymienić można zwiększoną ekspresję oksydazy ksantynowej, zmniejszoną aktywność dysmutazy nadadtlenkowej (SOD - *superoxide dismutase*) i zmniejszony poziom witaminy E w tkankach. Praca Chappell i wsp. z 2002 roku wskazuje również na podatność organizmu na stres oksydacyjny i peroksydację lipidów u pacjentek ze stanem przedrzucawkowym. Jak wskazują dane demograficzne pacjentki, u których pojawia się nadciśnienie tętnicze w ciąży oraz stan przedrzucawkowy mają zwykle podniesiony poziom trójglicerydów i kwasów tłuszczowych. U kobiet ze stanem przedrzucawkowym obserwuje się również wyższe stężenia malonodialdehydu, produktu peroksydacji lipidów, reaktywnych związków kwasu tiobarbiturowego oraz niższe stężenia witaminy E i C, związków o działaniu antyoksydacyjnym. Świadczy to, iż organizm przeciwdziałając reakcjom peroksydacyjnym wykorzystuje większe ilości antyoksydantów [Gupta i wsp. 2009, Madazli i wsp. 1999]. Badano również wpływ suplementacji witaminą C i witaminą E ciężarnych kobiet w celu

prewencji stanu przedrzucawkowego. Zaobserwowano zmniejszenie ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego przy suplementacji tymi witaminami [Chappell i wsp. 1999], brak jednak potwierdzonych danych na temat skuteczności takiego postępowania [Polyzos i wsp. 2007].

Przyjmuje się, że łożysko pełni rolę głównego organu w patogenezie stanu przedrzucawkowego [Powe i wsp. 2011, Yamaguchi i wsp. 2009]. Wśród przyczyn powstawania stanu przedrzucawkowego wymienia się również brak równowagi w procesie angiogenezy w łożysku. W czasie rozwoju kosmówki, a następnie łożyska zachodzi proces angiogenezy, który jest regulowany produkcją czynników pro- i antyangiogennych. Powszechnie uważa się, iż stan przedrzucawkowy może być związany z niedotlenieniem łożyska, które jest wynikiem zaburzeń jego unaczynienia. W stanie przedrzucawkowym dochodzi do nadmiernej syntezy czynników antyangiogennych, takich jak kinaza tyrozynowa (sFlt-1 - *soluble fms-like tyrosine kinase-1*, sVEGFR-1), białka syntetyzowanego przez łożysko i powodującego dysfunkcję śródbłonna [Cerdeira i wsp. 2012]. Procesy prawidłowego unaczynienia łożyska kontrolowane są przez czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego A (VEGF-A - *vascular endothelial growth factor A*) oraz czynnik wzrostu łożyska 1 (PlGF - *human placental growth factor-1*), których ekspresja podlega zmianom w czasie ciąży. Są to dimeryczne glikoproteiny związane z angiogenezą [Powe i wsp. 2011]. Elementem związanym z PlGF i VEGF-A jest czynnik antyangiogeny: kinaza tyrozynowa (sFlt1), rozpuszczalna forma receptora endotelium, który wiąże w/w białka i może również być markerem diagnostycznym dla stanu przedrzucawkowego, podobnie jak stężenie PlGF. W ciąży przebiegającej prawidłowo stężenie sFlt1 są niskie do II trymestru, lecz rosną w III trymestrze ciąży. Wzrost sFlt1 jest konkurencyjny do poziomu PlGF i VEGF, co uważa się za proces fizjologiczny mający na celu kontrolę powstawania naczyń łożyskowych. Na podstawie prowadzonych badań można stwierdzić, iż stężenia wolnego, biologicznie aktywnego VEGF, jak również PlGF są obniżone u kobiet ze stanem przedrzucawkowym [Hertig i wsp. 2010, Moore Simas i wsp. 2007, Shenoy i wsp. 2010]. W przypadku stanu przedrzucawkowego mechanizmy antyangiogenne są nasilone. Rola sFlt1 została udowodniona w badaniach na zwierzętach, w których ciężarne samice szczurów zostały zainfekowane rekombinowanymi adenowirusami z zakodowanym genem sFlt1. W grupie badanej zaobserwowano objawy odpowiadające symptomom stanu przedrzucawkowego u kobiet - nadciśnienie oraz białkomocz [Hertig i wsp. 2010]. W patogenezę stanu przedrzucawkowego mogą być zaangażowane również inne czynniki antyangiogenne m.in. rozpuszczalna forma białka endogliny (sEng - *soluble endoglin*), receptora który odpowiada

za transformację czynnika wzrostu beta zlokalizowanego na komórkach endotelium [Hertig i wsp. 2010]. Jego wysokie stężenia mogą zakłócać wazodilatację i funkcjonowanie naczyń włosowatych. Zwiększone stężenie sEng jest możliwe do oznaczenia na kilka tygodni przed kliniczną diagnozą PE i jest dużo bardziej podwyższone u pacjentek, u których w późniejszym czasie stwierdzono ciężką postać stanu przedrzucawkowego. Jest to istotne w kontekście zagrożenia takimi jednostkami chorobowymi jak rzucawka lub zespół HELLP (*Hemolytic anemia, Elevated Liver enzyme, Low Platelets count*) – ciężka postać PE, objawiająca się uszkodzeniem nerek i wątroby, wykrzepianiem wewnątrznaczyniowym i zaburzeniami w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (ból głowy, drgawki, obrzęk mózgu) [Drost i wsp. 2010, Hertig i wsp. 2010, Jebbink i wsp. 2012, Shenoy i wsp. 2010].

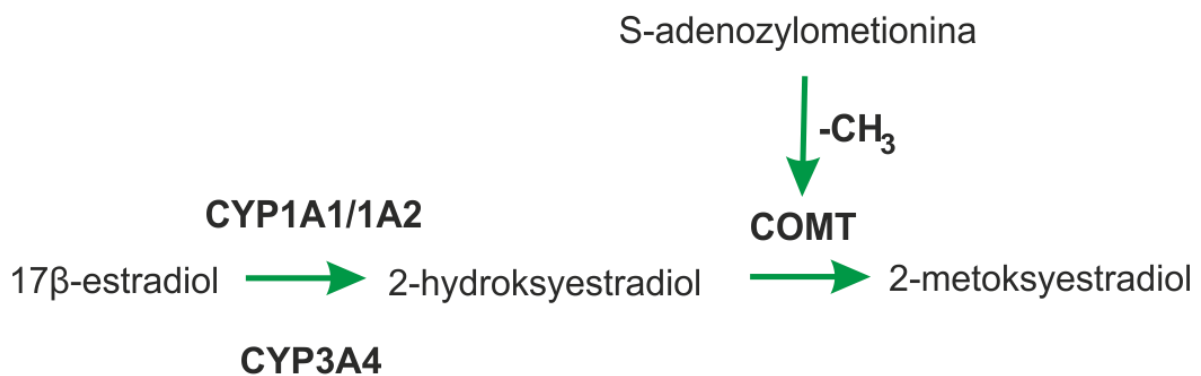
W przypadku rozwoju stanu przedrzucawkowego w łożysku dochodzi do zaburzenia poziomu cytokin prozapalnych i przeciwzapalnych. Do czynników pro- i przeciwzapalnych włączonych w etiologię stanu przedrzucawkowego zaliczyć można wahania poziomu interleukiny 6 (IL-6 – *interleukin 6*) i interleukiny 8 (IL-8 - *interleukin 8*) oraz czynnika martwicy guza (TNF- α - *tumor necrosis factor α*). Interleukina 6 jest to prozapalna, wielofunkcyjna cytokina, produkowana m.in. przez łożysko i wpływająca na odpowiedzi układu odpornościowego. Jest również związana z proliferacją trofoblastu i stresem oksydacyjnym. Badania potwierdzają wyższe poziomy IL-6 u kobiet ze stanem przedrzucawkowym w porównaniu do zdrowych ciężarnych [Wang i wsp. 1999, Xiao i wsp. 2012, Yamaguchi i wsp. 2009]. Następuje systemowa aktywacja maczynych komórek stanu zapalnego, takich jak granulocyty i monocyty. Zaobserwowano zwiększone uwalnianie do krwi rozpuszczalnej fosfolipazy A₂ - ważnego mediatora stanu zapalnego [Redman i wsp. 1999].

Istnieją także doniesienia na temat związku występowania stanu przedrzucawkowego z poziomem serotoniny, która może być związana z napięciem naczyniowym w pępowinie. Badania wskazują, że pacjentki, u których zdiagnozowano preeklampsję miały podniesiony poziom serotoniny w surowicy, a także wyższe poziomy jej metabolitu kwasu 5-hydroksyindolooctowego w moczu [Laskowska i wsp. 2001].

Jako marker diagnostyczny wymienia się również białko łożyskowe 13 (PP13 - *placental protein 13*), występujące w syncytiotrofoblastach. Białko to należy do rodziny galektyny i wiąże się z wodorowęglanami. Biologiczną funkcją białka 13 jest ułatwianie implantacji embrionu i wpływ na remodeling naczyń. Istnieją doniesienia, iż we wczesnym stadium ciąży (do 14 tygodnia) poziom PP13 był obniżony u kobiet, u których później zdiagnozowano stan przedrzucawkowy, w porównaniu do grupy kobiet, u których ciąża miała

przebieg prawidłowy. Być może PP13 mógłby służyć jako marker wczesnego stanu przedrzucawkowego [Hetig i wsp. 2010].

Kolejnym czynnikiem, którego zaburzenia związane są z występowaniem stanu przedrzucawkowego są estrogeny i metabolity estrogenów, które podczas ciąży są mediatorami adaptacji układu krążenia [Bottalico i wsp. 2004, Bręborowicz 2002, Dildy i wsp. 2007, Dragun i wsp. 2009, Ji Hyae i wsp. 2010, Kanasaki i wsp. 2008]. W badaniu prowadzonym przez amerykańskich naukowców wykazano, iż nieprawidłowości w procesie syntezy, metabolizmie oraz różnice w stężeniu estrogenów mogą odgrywać rolę w procesie patogenezy stanu przedrzucawkowego [Jobe i wsp. 2013]. Należy podkreślić możliwe działanie protekcyjne 2-metoksyestradiolu (2-ME - *methoxyestradiol*), który jest biologicznie aktywnym metabolitem 17 β -estradiolu.



Rycina 1. Schemat powstawania 2-metoksyestradiolu.

Związek 2-ME odgrywa ważną rolę w hamowaniu wzrostu komórek proliferacyjnych (komórek mięśni gładkich i komórek endotelium), ma właściwości antyangiogenne oraz stymulujące apoptozę, co może mieć również potencjalne znaczenie w terapii przeciwnowotworowej. Ponadto jest głównym endogennym metabolitem estradiolu, powstającym poprzez sekwencyjną konwersję estradiolu do 2-hydroksyestradiolu (2-HE) i 2-ME przy udziale cytochromu P450s i katecholo-*O*-metylotransferazy (COMT - *catechol-O-methyltransferase*) m.in. w łożysku (ryc. 1). Powstały tam metabolit estradiolu pełni rolę destabilizatora czynnika indukującego hipoksję (HIF)-1 α , regulującego efekty hipoksji w ekspresji genu poprzez zwiększanie transkrypcji genów docelowych, w tym sFlt1. Ta rola enzymu COMT w utrzymywaniu równowagi tlenowej jest istotna w patogenezie stanu przedrzucawkowego [Basini i wsp. 2007, Shenoy i wsp. 2010, Sutherland i wsp. 2007]. Efekt ten może być zależny od fenotypu enzymu COMT. Warto również zwrócić uwagę na zależności pomiędzy obecnością mutacji genu *COMT* i innymi genetycznymi defektami w

metabolizmie folianów, takimi jak polimorfizmu $677C>T$ *MTHFR* a rozwojem stanu przedrzucawkowego [Satoshi i wsp. 1997, Shenoy i wsp. 2010].

Jedną z ważniejszych aktywności 2-ME jest nasilanie procesu wazodilatacji, a dodatkowo hamowanie mechanizmów związanych z przepuszczalnością naczyń i angiogenezą, co może znaleźć terapeutyczne zastosowanie w leczeniu nadciśnienia tętniczego, nadciśnienia płucnego i stanu przedrzucawkowego. Wykazano iż 2-ME obniża stężenie HIF-1 α i sFlt1, ponadto hamuje wzrost komórek mięśni gładkich, blokuje syntezę wazokonstrykcyjnej endoteliny oraz wykazuje właściwości przeciwzapalne [Shenoy i wsp. 2010, Zacharia i wsp. 2002]. Dodatkowo 2-ME w komórkach warstwy ziarnistej obniża syntezę VEGF, głównego czynnika proangiogenego, poprzez inhibicję powstawania O₂ [Basini i wsp. 2007]. Badania przeprowadzone na myszach wykazują związek pomiędzy niedoborem enzymu COMT, który przyczynia się do obniżonego poziomu 2-ME i zwiększonego ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego. Poziomy COMT i 2-ME są znacznie niższe u kobiet z ciężką postacią preeklampsji. W opisywanym badaniu sugeruje się, iż 2-ME może być markerem diagnostycznym dla tego schorzenia, a także mógłby być wykorzystywany jako środek zapobiegający wystąpieniu stanu przedrzucawkowego lub też jako środek terapeutyczny [Dubey i wsp. 2009, Kanasaki i wsp. 2008]. Prowadzono także badania na szczurach, sprawdzając wpływ 17 β -estradiolu oraz 2-ME na produkcję NO wewnątrz naczyń krwionośnych. Wyniki pokazują, iż oba związki powodują zwiększoną bazową produkcję NO. Co istotnie, związki te nie wywierały działania feminizującego na szczury płci męskiej, co wskazuje na możliwość ich stosowania u mężczyzn w celach kardioprotekcyjnych [Fenoy i wsp. 2010].

1.2.1. Podłoże genetyczne stanu przedrzucawkowego

Istotne znaczenie w etiopatogenezie stanu przedrzucawkowego mają również czynniki genetyczne [Nilsson i wsp. 2004, Sohda i wsp. 1997]. Sugeruje się dziedziczenie autosomalne dominujące z niepełną penetracją lub dziedziczenie wieloczynnikowe. Badano przypadki rodzinnego występowania nadciśnienia tętniczego i stanu przedrzucawkowego u kobiet spokrewnionych ze sobą. W badaniu w populacji szwedzkiej siostr bliźniaczek zasugerowano możliwość rodzinnego występowania nadciśnienia ciążowego i stanu przedrzucawkowego [Ros i wsp. 2000]. Prawdopodobieństwo wystąpienia stanu przedrzucawkowego u kobiet z rodzin, gdzie już wcześniej pojawiało się to powikłanie jest 2 - 3 razy większe niż u pacjentek z rodzin bez obciążonego wywiadu w kierunku wystąpienia stanu przedrzucawkowego [Laivuori i wsp. 2003]. W Szwecji zaobserwowano, iż jeśli u matek występował stan

przedrzucawkowy, to istnieje o 70% większe ryzyko wystąpienia tego samego schorzenia u ich córek [Nilsson i wsp. 2004].

Istotne znaczenie ma również analiza genów kandydujących, które można podzielić na kilka grup. Są to geny związane z regulacją ciśnienia krwi (układ RAS), geny biorące udział w procesie angiogenezy, geny układu cytokin, stresu oksydacyjnego lub geny metabolizmu lipidów. Najistotniejsze wydają się być geny odpowiadające za funkcję śródbłonna naczyniowego i geny włączone w kaskadę krzepnięcia i fibrynolizy [Williams i wsp. 2011]. Jednym z tych genów jest gen endotelialnej syntazy NO, który wpływa na regulację ciśnienia krwi i funkcji łożyska. Istnieją doniesienia iż dysfunkcja endotelium matki jest istotnym elementem w stanie przedrzucawkowym, co znajduje wyraz w różnorodnych objawach klinicznych i wynikach badań biochemicznych u ciężarnych z nadciśnieniem. Gen kodujący eNOS jest polimorficzny. Najczęściej prowadzono analizę polimorfizmu funkcjonalnego, w którym występuje zamiana aminokwasu kwasu glutaminowego na kwas asparaginowy w łańcuchu białkowym w pozycji 298 cząsteczki enzymu. Badania sugerują, iż polimorfizm ten może mieć wpływ na odpowiedź organizmu na farmakoterapię stosowaną przypadku stanu przedrzucawkowego [Sandrim i wsp. 2010].

Warto także wspomnieć o związku pomiędzy występowaniem ciężkich postaci stanu przedrzucawkowego a trombofilią, która przyczynia się do wzrostu wykrzepiania wewnątrznaczyniowego. Do najczęstszych przyczyn trombofilii należą mutacje w genie czynnika V krzepnięcia (mutacja Leiden), polimorfizm genu protrombiny, enzymu reduktazy metylenotetrahydrofolianowej, uwarunkowany genetycznie niedobór endogennych inhibitorów krzepnięcia (białko S, białko C i antytrombina III). Mutacje te mogą powodować zakrzepicę w kosmkach łożyska i naczyniach spiralnych, co jest powodem zmniejszonego przepływu przez łożysko, zawałów łożyska i jego niewydolności wtórnej [Seremak-Mrozikiewicz i wsp. 2010]. Mutacja Leiden (*1691G>A*) jest częstą mutacją powodującą oporność na białko C. Występuje u blisko 60% pacjentek z incydentami zakrzepowymi w ciąży, intensywnie analizowane jest również znaczenie mutacji Leiden w etiologii stanu przedrzucawkowego [Morgan i wsp. 1999]. Interesującym zagadnieniem jest także powiązanie badań polimorfizmów genów kandydujących z farmakoterapią nadciśnienia tętniczego stanu przedrzucawkowego. W tym zakresie badany jest najczęściej polimorfizm genu konwertazy angiotensyny oraz, w przypadku kobiet ciężarnych, gen syntazy tlenu azotu. Warto również zwrócić uwagę na inne geny, takie jak gen enzymu katecholo-O-metylotransferazy oraz genom receptorów dopaminowych DRD1 i DRD4, które to również mogą odgrywać rolę w efektywności leczenia stanu przedrzucawkowego.

1.3. Farmakoterapia i profilaktyka stanu przedrzucawkowego

Terapia nadciśnienia tętniczego w ciąży oraz stanu przedrzucawkowego obejmuje wypoczynek, odpowiednią dietę oraz leczenie farmakologiczne. Jeśli nadciśnienie pojawiło się jeszcze przed ciążą, to stosowana farmakoterapia ma na celu zmniejszenie ryzyka wystąpienia ciężkiego nadciśnienia w ciąży, ale może nie zapobiec pojawieniu się nałożonego stanu przedrzucawkowego. Celem leczenia jest utrzymanie ciśnienia skurczowego poniżej 140 mmHg [Sambrook i wsp. 2008]. W chwili obecnej leki stosowane w terapii nadciśnienia przewlekłego i stanu przedrzucawkowego u ciężarnych można podzielić na kilka grup. Są to przede wszystkim leki α -adrenergiczne, leki blokujące obydwa receptory α i β adrenergiczne oraz blokery kanału wapniowego. U ciężarnych zdecydowanie najczęściej stosowana jest metyldopa, lek z grupy leków α -adrenergicznych.

Labetalol, lek α i β adrenergiczny, blokujący oba receptory stosowany jest w przypadku ciężkiego stanu przedrzucawkowego (200-1300 mg na dobę, podzielonych na 2-3 dawek). Jego efektywność i bezpieczeństwo zbliżone są do działania metyldopy. Leki β -adrenergiczne nie są stosowane ze względu na ich powiązania z niską masą urodzeniową oraz ryzykiem wystąpienia bradykardii u płodu. W terapii stanu przedrzucawkowego wykorzystuje się również leki z grupy antagonistów kanału wapniowego np. nitrendypinę, silnie wiążącą się z białkami osocza, która jest uważana za bezpieczną zarówno w czasie ciąży jak i w okresie karmienia piersią. W przypadku ciężkiego stanu przedrzucawkowego i zagrożenia wystąpienia rzucawką stosuje się również siarczany magnezu, w postaci dożylniej.

Lekami które mogą znaleźć zastosowanie w przypadku braku odpowiedzi na powyżej wymienione, są leki wazodilatacyjne. Hydralazyna, podawana dożylnie lub doustnie, która działa bezpośrednio na błonę mięśniową tętniczek, rozszerzając je, co zmniejsza opór obwodowy. Jednak efekty działania hydralazyny są krótkie, poza tym może powodować tachykardię. Inne leki z tej grupy, stosowany sporadycznie, to diazoksyd (silny wazodilatator, stosowany w nagłych przypadkach nadciśnienia, zwłaszcza w czasie porodu) oraz nitroprusydek sodu (stosowany jedynie w przypadkach nadciśnienia niepoddającego się leczeniu konwencjonalnemu).

Leki z grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny II są bezwzględnie przeciwwskazane w czasie ciąży ze względu na działanie teratogenne. Mogą one hamować wzrastanie płodu, powodować uszkodzenie nerek, anurię, a nawet śmierć płodu. Nie należy również stosować diuretyków, ze względu na to, iż mogą zmniejszać objętość krążącej krwi. Poza tym diuretyki z grupy tiazydów powodują zmniejszenie ilości produkowanego mleka, a w dużych dawkach całkowicie hamują laktację. Diuretyki pętlowe również mogą wywierać

podobne działanie [Bręborowicz 2002, Cooper i wsp. 2006, Ghuman i wsp. 2009, Hollier i wsp. 2001, Kean 2002, Madankumar 2003, Rosenthal i wsp. 2002, Sambrook i wsp. 2008, Sibai i wsp. 2005, Williams i wsp. 2012].

Ciekawą pracą związaną z leczeniem stanu przedrzucawkowego jest publikacja francuska, dotycząca wpływu powszechnie stosowanych leków obniżających ciśnienie krwi na poziom ET-1 [Dechanet i wsp. 2011]. Jak już wcześniej wspomniano, wysokie stężenie ET-1 wiąże się z nadmiernym skurczem naczyń macicy, co uważane jest za jedną z przyczyn występowania stanu przedrzucawkowego. Wykazano, iż metyldopa, hydralazyna i labetalol są efektywne w obniżaniu ciśnienia, jednak efekt ich działania jest przejściowy i nie zapobiega progresji ciężkiego nadciśnienia. Jedynie dihydropirydyny np. nifedypina częściowo rozkurczały naczynia macicy, znosząc działanie endoteliny 1 [Dechanet i wsp. 2011].

Od lat prowadzone są badania nad skutecznością profilaktyki wystąpienia stanu przedrzucawkowego. Najczęściej wykorzystuje się tutaj kwas acetylosalicylowy zwłaszcza u kobiet z wysokim ryzykiem pojawienia się stanu przedrzucawkowego. W terapii tej stosowane są niewielkie dawki kwasu acetylosalicylowego, zwykle 60-100 mg na dobę. Kwas acetylosalicylowy wywiera działanie poprzez różne mechanizmy, głównie poprzez zwiększenie stężenia prostacykliny i zmniejszanie syntezy tromboksanu A₂ w komórkach endotelium naczyń oraz poprzez zmniejszanie wrażliwości na angiotensynę II. Istnieją również doniesienia na temat skuteczności suplementacji wapniem (dawki do 2 g na dobę) w zapobieganiu występowania stanu przedrzucawkowego. Wyniki prowadzonych badań wskazują na obniżenie ryzyka pojawienia się stanu przedrzucawkowego u kobiet z grupy zwiększonego ryzyka i u pacjentek z wcześniejszymi epizodami stanu przedrzucawkowego. Mechanizm działania wapnia jest związany z obniżaniem kurczliwości naczyń. Badano także wpływ suplementacji tranem, progesteronem oraz czosnkiem, jednak nie otrzymano żadnych znaczących rezultatów. Ponieważ występowanie preeklampsji wiąże się ze stresem oksydacyjnym, testowano również różne substancje antyoksydacyjne, takie jak witamina C i witamina E, jednakże w tym przypadku również nie wykazano istotnego związku. Zaobserwowano jedynie, iż poziom witaminy C był niższy u kobiet ze stanem przedrzucawkowym [Chappell i wsp. 2002]. Należy również wspomnieć o związku pomiędzy ryzykiem wystąpienia stanu przedrzucawkowego a trombofilią i profilaktyką z zastosowaniem niskich dawek heparyny drobnocząsteczkowej. Podsumowując, w zapobieganiu występowania stanu przedrzucawkowego u kobiet z grupy zwiększonego ryzyka, rozsądnym wydaje się być stosowanie wapnia (do 2 g) i niskich dawek aspiryny. Można również rozważyć podawanie niskich dawek heparyny drobnocząsteczkowej u

pacjentek, u których wystąpił już wcześniej stan przedrzucawkowy z trombofilią oraz patologicznymi zmianami naczyniowymi łożyska lub po niepowodzeniu terapii wapniem i kwasem acetylosalicylowym [Dildy i wsp. 2007, Sibai i wsp. 2005].

W niektórych przypadkach stan przedrzucawkowy może wystąpić jeszcze do 48 godzin po porodzie, co wiąże się z ryzykiem wystąpienia obrzęku płuc, uszkodzenia nerek, rozwojem zespołu HELLP, rzucawki poporodowej i udaru mózgu, dlatego też pacjentki ze zdiagnozowanym stanem przedrzucawkowym muszą być dokładnie monitorowane w okresie połogu [Sibai i wsp. 2005]. W tabeli 1 oraz 2 przedstawiono najczęstsze grupy leków stosowanych w stanie przedrzucawkowym.

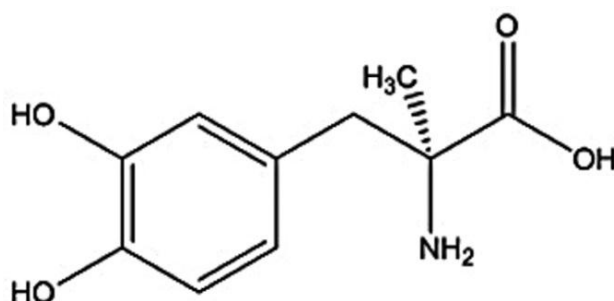
Tabela 1. Zestawienie grup leków o działaniu hipotensyjnym [Rosenthal i wsp. 2002, Szczepaniak-Chicheł i wsp. 2006].

Grupa farmakologiczna	Lek	Dawkowanie p.o.	Działania niepożądane
działające ośrodkowo	α -metyldopa	750-3000 mg	senność nastroje depresyjne ból, zawroty głowy
α i β -blokery	labetalol	200-1200 mg	bradykardia, zaburzenia przewodnictwa przedsionkowo-komorowego omdlenia
β -blokery	atenolol, metoprolol	50-100 mg 50-100 mg	
blokery kanałów wapniowych	nifedypina felodypina	15-30 mg 5 mg	obrzęki obwodowe, bóle głowy, zaczerwienienie twarzy, parestezje
wazodilatatory	dihydralazyna	75-150 mg	obrzęki obwodowe tachykardia zespół toczniopodobny
diuretyki	furosemid	różne	jako kontynuacja leczenia upośledzenie przepływu łożyskowego - ryzyko zaburzeń wzrostu płodu
inhibitory enzymu konwertującego angiotensynę	kaptopryl enalapryl	bezwzględnie przeciwwskazane działanie teratogenne ryzyko uszkodzenia nerek u płodu	
inhibitory receptorów angiotensynowych	losartan kandesartan		

Tabela 2. Zestawienie grup leków stosowanych dożylnie w terapii ciężkiej postaci stanu przedrzucawkowego [Leszczyńska-Gorzelał i wsp., 2009].

Lek/mechanizm działania	Dawkowanie i.v.	Działania niepożądane
siarczan magnezu antagonista wapnia rozszerza naczynia obwodowe łagodnie obniża ciśnienie krwi ośrodkowo – antagonistą NMDA – zmniejsza gotowość drgawkową	w leczeniu przeciwdrgawkowym: dawka wstępna 4 g w ciągu 5-10 min dawka podtrzymująca 1-2 g/godz.	osłabienie mięśni zaburzenia OUN
urapidyl bloker obwodowych receptorów α_1	6,25-12,5 mg w bolusie 3-24 mg/godz.	nudności, wymioty, bóle głowy, kołatanie serca
dihydralazyna rozszerza naczynia obwodowe	5 mg w bolusie 2-20 mg/godz. w pompie infuzyjnej	nudności, wymioty, bóle i zawroty głowy
labetalol α i β bloker	20 mg, przy braku odpowiedzi 20-80 mg/30 min dawka max 300 mg	zmęczenie, niedociśnienie ortostatyczne
nitrogliceryna rozszerza naczynia krwionośne	5 μ g/min infuzja ciągła do max 100 μ g/min	bóle i zawroty głowy, zaczerwienienie twarzy

1.3.1. Metyldopa (3-hydroksy- α -metylo-L-tyrozyna)



Rycina 2. Metyldopa – wzór strukturalny.

Metyldopa, pochodna katecholaminowa (ryc. 2), jest lekiem α_2 -adrenergicznym, o złożonym, ośrodkowym i obwodowym mechanizmie działania. W metabolizmie leku uczestniczy enzym COMT. Strukturalnym analogiem metyldopa jest dihydrofenyloalanina (DOPA), która różni się od metyldopa jedynie obecnością grupy metylowej w łańcuchu

bocznym. W metyldopa wyróżnia się centrum chiralne, dzięki czemu występuje w postaci izomeru S lub R, aktywność hipotensyjną wykazuje tylko izomer S.

Metyldopa jest prolekiem, który w ustroju jest przekształcany do α -metylnorepinefryny, aktywnego związku, który wykazuje powinowactwo do receptorów α -adrenergicznych. Jest tzw. fałszywym neuroprzekaznikiem, czyli działa konkurencyjnie w stosunku do noradrenaliny i adrenaliny, współzawodnicząc z nimi o miejsce w neuronach sekrecyjnych w układzie nerwowym ośrodkowym i obwodowym. Lek ten jest aktywnie transportowany do płynu mózgowo-rdzeniowego i mózgu, hamuje neurotransmisję norepinefrynową poprzez centra rdzeniowe, które regulują ciśnienie krwi. Następuje redukcja wypływu impulsów z układu współczulnego do serca i naczyń krwionośnych, co powoduje zmniejszenie ciśnienia krwi. Metyldopa jest również inhibitorem dekarboksylazy, która bierze udział w metabolizmie amin katecholowych. Działa na ośrodkowe receptory α_2 -adrenergiczne i obwodowe presynaptyczne receptory α_2 -adrenergiczne. Komórki trofoblastu również zawierają α_2 -adrenoreceptory, a aktywacja tych receptorów może modulować pracę międzykomórkowych przekazników takich jak cAMP [Gadkariem i wsp. 2009, Khalil i wsp. 2008, Sambrook i wsp., 2008].

W jednej ze starszych publikacji można znaleźć informacje, iż metyldopa posiada trzy profile działania: rozszerza naczynia ogólnoustrojowe co daje rezultat w postaci obniżenia ciśnienia krwi, zmniejsza zdolność baroreceptorów tętnicy szyjnej do kompensowania obniżonego ciśnienia oraz nie wpływa na odpowiedź układu krążenia na różne bodźce pobudzające [Mancia i wsp. 1980]. Ponadto pod wpływem działania metyldopa zmniejsza się aktywność reninową osocza [Weidmann i wsp. 1974].

Wchłanianie metyldopa z przewodu pokarmowego jest częściowe, lek odkłada się w ośrodkowym układzie nerwowym, ulega wydalaniu z moczem, w niewielkim stopniu przenika przez barierę łożyskową. Stymulacja receptorów obwodowych przez metyldopa hamuje uwalnianie noradrenaliny z neuronów synaptycznych, co powoduje rozkurcz naczyń krwionośnych i obniżenie ciśnienia krwi, a także zwolnienie częstości pracy serca. Stymulacja receptorów ośrodkowych powoduje osłabienie sympatykotonii, co daje trwały efekt obniżenia ciśnienia tętniczego i zmniejszenie oporu obwodowego.

Do objawów niepożądanych mogących wystąpić podczas stosowania metyldopa należą senność, zaburzenia funkcji poznawczych, ortostatyczne spadki ciśnienia, depresja, rzadziej niedokrwistość hemolityczna powodowana indukcją przeciwciał antygenów układu Rh oraz zapalenie wątroby [Bręborowicz 2000, Bręborowicz 2002, Ghuman i wsp. 2009, Sambrook i wsp. 2008, van Zwieten i wsp. 1984].

Dawka dobowa metyldopa wynosi od 750 do 3000 mg na dobę w 2-4 dawkach podzielonych [Rosenthal i wsp. 2002]. Lek można podać również w postaci parenteralnej w dawkach 250-500 mg (do 1000 mg) co 6 godzin w przypadku wystąpienia przełomu nadciśnieniowego [Seremak-Mrozikiewicz i wsp. 2004].

Metyldopa jest lekiem szczególnie efektywnym w przypadkach nadciśnienia łagodnego i średniego, dzięki czemu zmniejsza prawdopodobieństwo wystąpienia ciężkiej postaci nadciśnienia tętniczego. Wśród działań niepożądanych, które występowały u kobiet ciężarnych wymienia się głównie senność i nastroje depresyjne, niekiedy wymagające zaprzestania podawania leku. Ponadto, w czasie terapii metyldopa należy monitorować poziomy aminotransferaz ze względu na ryzyko uszkodzenia wątroby [Seremak-Mrozikiewicz i wsp., 2004]. Istnieją doniesienia wskazujące na fakt, że metyldopa nie ma wpływu na opór naczyń krążenia płodowego, jednak znacznie zmniejsza opór w przepływie krwi w macicy, co, jak sugerują autorzy, może poprawiać utlenienie i odżywienie płodu, korzystnie wpływając na jego rozwój [Günenç i wsp. 2002]. Metyldopa została uznana na podstawie randomizowanych badań klinicznych za pierwszy bezpieczny i skuteczny lek hipotensyjny dla kobiet w ciąży, zmniejszający umieralność płodów i jest lekiem pierwszego wyboru w leczeniu stanu przedzucawkowego u ciężarnych [Rosenthal i wsp. 2004, Seremak-Mrozikiewicz i wsp., 2004].

1.4. COMT - katecholo-*O*-metylotransferaza

1.4.1. COMT - występowanie i działanie

Enzym katecholo-*O*-metylotransferaza (COMT - *catechol-O-methyltransferase*) został po raz pierwszy opisany w latach 50-tych XX wieku. W latach późniejszych, do roku 1975 prowadzono badania dotyczące tego enzymu i jego inhibitorów, a pod koniec lat 80-tych scharakteryzowano jego dwie izoformy oraz opisano gen kodujący białko enzymatyczne [Männistö i wsp. 1999]. Przy udziale jonów Mg^{2+} enzym COMT katalizuje przeniesienie grupy metylowej z *S*-adenozylu-*L*-metioniny na jedną z grup hydroksylowych, najczęściej grupy 3'-hydroksylowej, substratu katecholowego (związek o strukturze pierścienia benzenowego z dwiema grupami hydroksylowymi). Aktywność COMT została potwierdzona w wielu tkankach, jak wątroba, nerki, nadnercza, mózg i dwunastnica [Dawling i wsp. 2001, Männistö i wsp. 1999, Worda i wsp. 2003].

Enzym COMT w organizmie ludzkim występuje w dwóch wariantach różniących się długością łańcucha białkowego: forma rozpuszczalna (*S*-COMT) lub związana z błoną (MB-

COMT). Forma rozpuszczalna S-COMT występuje głównie w tkankach peryferyjnych, a błonowa MB-COMT w tkance mózgowej [Nackley i wsp. 2009]. Oba warianty COMT kodowane są przez jeden gen zlokalizowany na chromosomie 22 w pozycji q11.1-q11.2 [Bertocci i wsp. 1991]. Białka enzymatyczne COMT różnią się 50 aminokwasami na N-końcu i składają się odpowiednio: S-COMT z 221 aminokwasów o masie 24,4 kDa, natomiast MB-COMT z 271 aminokwasów o masie 30,0 kDa. W większości tkanek ekspresji ulegają oba warianty COMT z dwóch różnych transkryptów mRNA: długiego i krótkiego. Gen *COMT* składa się z sześciu eksonów, z których pierwszy i drugi nie SA eksonami kodującymi. Kodony MB-ATG oraz S-ATG, odpowiedzialne za rozpoczęcie translacji obu form (MB i S) zlokalizowane są w eksonie 3. Gen zawiera również dwa funkcjonalne promotory: proksymalny (P1) dla S-COMT i dystalny (P2) dla MB-COMT [Lundström i wsp. 1995, Männisto i wsp. 1999, Palmatier i wsp. 1999, Tunbridge i wsp. 2008]. Substratami dla COMT są katecholaminy o aktywności hormonalnej i neurotransmisyjnej – dopamina, norepinefryna, epinefryna, katecholoestrogeny, ponadto kwas askorbowy oraz ksenobiotyczne substancje o strukturze katecholowej, w tym leki takie jak lewodopa i metyldopa [Kocabaş i wsp. 2001, Lim i wsp. 2010, Lundström i wsp. 1995, Männisto i wsp. 1999]. Ponadto COMT metabolizuje inne związki, jak trifenole, dobutaminę, izoprenalinę, benserazyd, karbidopę, flawonoidy i dihydroksypochodne tetrahydroksyzochinolonów [Männisto i wsp. 1999]. Główną funkcją COMT jest eliminacja aktywnych biologicznie lub toksycznych katecholi. Prawdopodobnie moduluje poziom dopaminy i norepinefryny w mózgu, co wiąże się z wpływem na procesy myślowe i nastrój, jak również poprzez regulację poziomu dopaminy, wpływa na funkcję nerek i przewodu pokarmowego. W czasie pierwszego trymestru ciąży, enzym COMT chroni łożysko i rozwijający się płód przed związkami hydroksylowymi, utworzonymi z węglowodorów arylowych, jak również pełni funkcję bariery pomiędzy krwią a tkankami, chroniąc je przed substancjami ksenobiotycznymi [Männisto i wsp. 1999]

Kanasaki i wsp. wykazali, że niedobór COMT indukuje zespół objawów fenotypowo podobny do objawów stanu przedrzucawkowego u ciężarnych myszy jako wynik braku 2-ME, naturalnego metabolitu estradiolu, którego stężenie wzrasta w III trymestrze prawidłowo przebiegającej ciąży. Podawanie 2-ME niwelowało objawy stanu przedrzucawkowego i hamowało łożyskową hipoksję, ekspresję podjednostki Hif1 α - *hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit*) oraz wzrost rozpuszczalnej formy receptora 1 dla czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (Flt1 - *vascular endothelial growth factor receptor 1*). Stężenie COMT oraz 2-ME było znacząco niższe u kobiet z ciężką postacią stanu przedrzucawkowego. Autorzy zasugerowali że myszy, u których zablokowano aktywność enzymu COMT (*Comt-null*) mogą

być modelem dla stanu przedrzucawkowego, a oznaczenie stężenia 2-ME może służyć jako marker w diagnostyce i leczeniu stanu przedrzucawkowego [Kanasaki i wsp., 2008].

Podsumowując, można powiedzieć, iż istnieje coraz więcej dowodów na temat znaczenia COMT w rozwoju prawidłowej ciąży. Enzym ten jest aktywny zarówno w łożysku jak i doczesnej, potwierdzono również jego ekspresję w błonach płodowych. Udowodniono jest, że nadciśnienie w ciąży wiąże się z obniżoną aktywnością COMT w łożysku, ponadto zaobserwowano redukcję ekspresji łożyskowego COMT w przypadkach ciężkiego stanu przedrzucawkowego, a gen *COMT* określa się jako gen podatności na występowanie stanu przedrzucawkowego. Obecność wariantów polimorficznych w genie *COMT* znacząco wpływa na jego aktywność i prawdopodobnie związana jest z rozwojem stanu przedrzucawkowego. Badania prowadzone w Norwegii udowodniły, że nosicielstwo haplotypu warunkującego niską aktywność enzymu COMT jest odpowiedzialne za występowanie nawracającego stanu przedrzucawkowego [Roten i wsp., 2011].

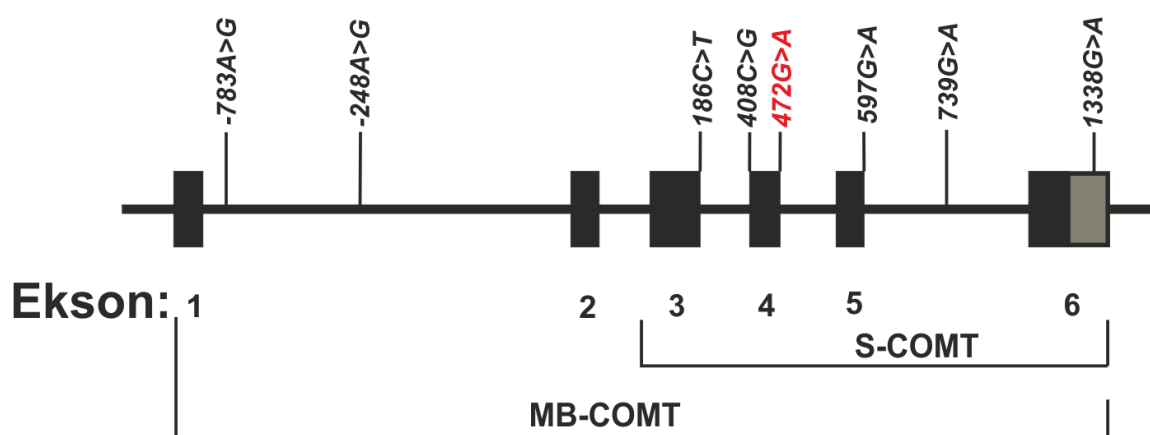
1.4.2. Warianty polimorficzne genu *COMT*

Warianty polimorficzne enzymu COMT są związane z wieloma zaburzeniami funkcjonowania organizmu, co potwierdzają liczne badania dotyczące etiologii różnych chorób. Wśród nich można wymienić zaburzenia neuropsychiatryczne związane z zaburzeniami wydzielania dopaminy i norepinefryny (schizofrenia, choroba afektywna, dwubiegunowa, zaburzenia obsesyjno-kompulsywne i lękowe, ADHD, uzależnienia, anoreksja, choroba Parkinsona). Polimorfizmy genu *COMT* mają też związek z występowaniem bólu przewlekłego, schorzeniami układu krążenia i nowotworami estrogenozależnymi [Männistö i wsp. 1999, Nackley i wsp. 2009].

Jednym z najczęściej badanych polimorfizmów genetycznych COMT, jest opisany po raz pierwszy przez Lotta i wsp., funkcjonalny wariant *Val(108/158)Met* (rs4680) [Lotta i wsp., 1995]. Polimorfizm ten warunkuje zamiana nukleotydów guaniny na adeninę w eksonie 4 w pozycji 472 długiego mRNA i 322 krótkiego mRNA. Ten polimorfizm powoduje substytucję aminokwasu waliny na metioninę w kodonie 158 w formie błonowej MB-COMT oraz w kodonie 108 w formie rozpuszczalnej S-COMT [Liang i wsp. 2012, Männistö i wsp. 1999]. Zmiana na metioninę w łańcuchu białkowym enzymu powoduje zmniejszenie aktywności COMT w porównaniu z odmianą z obecnością waliny. W wyniku tej zamiany możemy wyróżnić trzy genotypy *COMT* – 472AA (*Met/Met*), który warunkuje powstanie enzymu o aktywności 3-4 mniejszej w porównaniu do enzymu uwarunkowanego obecnością genotypu 472GG (*Val/Val*) [Diatchenko i wsp. 2005, Liang i wsp. 2012]. Typ trzeci enzymu COMT

uwarunkowany jest obecnością genotypu heterozygotycznego *472GA* (*Val/Met*) przejawia aktywność pośrednią [OCD comt] [Annerbrink i wsp. 2008, Arinami i wsp. 2000, Hagen i wsp. 2007, Katerberg i wsp. 2009, Kocabaş i wsp. 2001, Roffman i wsp. 2008].

Poznano również wiele innych polimorfizmów w genie *COMT*. Do najczęściej opisywanych i badanych należą: *-783A>G* (rs737866) i *-248A>G* (rs6269) w intronie 1, *186C>T* (*His62His*, rs4633) w eksonie 3, dwa polimorfizmy w eksonie 4 *408C>G* (*Leu136Leu*, rs4818) oraz *472G>A* (*Val158Met*, rs4680), *597G>A* (rs769224) w eksonie 5, *739G>A* (rs165774) w intronie 5 oraz w regionie 3' genu polimorfizm *1338G>A* (rs16559) (ryc. 3) [Gaysina i wsp. 2013, Hill i wsp. 2011, Ji i wsp. 2012, Nackley i wsp. 2006].



Rycina 3. Schemat budowy genu *COMT*.

Badania amerykańskich naukowców wykazały, iż kobiety nosicielki genotypu *472AA* mają wyższy poziom 4-hydroksyestradolu (4-OHE2) w porównaniu do kobiet z obecnością genotypu typu dzikiego *472GG*, stąd mogą być bardziej narażone na ryzyko rozwoju raka piersi [Dawling i wsp. 2001]. Hipotezę tę potwierdzają również badania dotyczące populacji afrykańskich. Doniesienie dotyczące pacjentek z Ghany wykazuje, iż w populacji tej genotyp *472AA* o małej aktywności enzymu COMT występuje stosunkowo najrzadziej, co tłumaczy niską zapadalność na raka gruczołu sutkowego wśród tych kobiet w porównaniu do kobiet rasy kaukaskiej [Ameyaw i wsp. 2000].

W zależności od aktywności COMT w różnych temperaturach wyróżniono formę termostabilną o wysokiej aktywności ($COMT^H$, $COMT^*1$) związanej z nosicielstwem genotypu *472GG* oraz formę termolabilną o niskiej aktywności ($COMT^L$, $COMT^*2$) związanej z obecnością genotypu homozygotycznego *472AA* [Kocabaş i wsp. 2001, Lachman i wsp. 1996, Palmatier i wsp. 1999]. Forma o niskiej aktywności $COMT^*2$ jest związana ze

zmniejszonym ryzykiem wystąpienia raka piersi u kobiet w wieku przedmenopauzalnym [Hong i wsp. 2003].

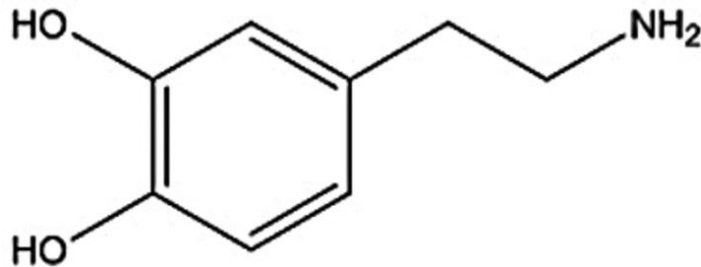
Aktywność i ekspresja COMT są ściśle związane z rozwojem nadciśnienia tętniczego oraz stanu przedrzucawkowego [Annerbrink i wsp. 2008]. Wiele badań wskazuje na związek wariantów polimorficznych genu *COMT* z nadciśnieniem tętniczym oraz wystąpieniem stanu przedrzucawkowego u ciężarnych kobiet. U kobiet, u których zdiagnozowano stan przedrzucawkowy częściej występował genotyp homozygotyczny 472AA (niższa aktywność enzymu COMT) i właśnie ten wariant polimorficzny może być czynnikiem wskazującym na zwiększone ryzyko wystąpienia schorzenia, a także wiązać się ze zwiększonym prawdopodobieństwem wystąpienia ciężkiej postaci stanu przedrzucawkowego. Na podstawie badań przeprowadzonych w populacji chińskiej u 187 pacjentek ze stanem przedrzucawkowym (189 kobiet zdrowych – grupa kontrolna) potwierdzono, iż gen *COMT* może być związany z podatnością na występowanie stanu przedrzucawkowego [Liang i wsp. 2012, Lim i wsp. 2010].

Ponieważ obecność genotypu 472GG wiąże się z większą aktywnością enzymu, jednocześnie wpływa na wzrost przemiany dopaminy. Allel 472G związany jest z formą COMT o większej aktywności enzymatycznej, dlatego też odmiana ta szybciej degraduje dopaminę, co zmniejsza jej stężenie w przestrzeni synaptycznej [Rosa i wsp. 2010]. Z kolei odmiana o niższej aktywności (472AA) wykazuje działanie protekcyjne przeciwko zawałowi mięśnia sercowego u pacjentów z podwyższonym ciśnieniem krwi. Efekt ten może być związany z wyższym stężeniem kardioprotekcyjnych estrogenów, które przy obecności COMT o mniejszej aktywności są wolniej metabolizowane, a więc pozostają dłużej w organizmie [Eriksson i wsp. 2004].

Zespół polskich naukowców badał zależność pomiędzy odmianą polimorficzną COMT a stężeniem hormonów estrogenowych, jednak nie udało się wykazać żadnych istotnych różnic. Prawdopodobnie badania powinny być kontynuowane na większej grupie pacjentek [Szyłło i wsp. 2006]. Z kolei doniesienie austriackie mówi, iż obecność genotypu 472AA wiązała się z wyższymi stężeniami 2-hydroksysteronu i 16 α -hydroksysteronu [Worda i wsp. 2003].

1.5. Receptory dopaminy

1.5.1. Dopamina – występowanie i działanie



Rycina 4. Dopamina – wzór strukturalny.

Dopamina (DA - 3,4-dihydroksyfenyloetyloamina) (ryc. 4) jest jednym z głównych katecholaminowych neuroprzekaźników w ośrodkowym układzie nerwowym. Dopamina jest prekursorem norepinefryny i epinefryny, jednocześnie metabolizowana jest przez enzym COMT do kwasu homowanilinowego [Arinami i wsp. 2000]. Dopamina moduluje wiele różnych funkcji w organizmie, takich jak: percepcja, emocje, zachowanie, aktywność lokomotoryczna, uczucie sytości i głodu oraz wpływa na funkcjonowanie układu endokrynnego. Reguluje także równowagę płynów i elektrolitów poprzez wpływ na transport jonowy w nabłonku układu pokarmowego i nerek [Asghar i wsp. 2011, Cheung i wsp. 1996]. Ponadto dopamina odpowiada za perystaltykę jelit oraz oddziałuje na układ sercowo-naczyniowy. Jest ważnym modulatorem poziomu sodu w organizmie i ciśnienia tętniczego, działając poprzez niezależny obwodowy układ dopaminergiczny. Dopamina syntetyzowana w proksymalnych kanalikach nerkowych, jest czynnikiem wazodilatacyjnym i natriuretycznym, dlatego też pełni ważną rolę parakrynną i autokrynną w regulacji pracy nerek, zwłaszcza w czasie zwiększonej podaży sodu. Ponadto zwiększa przepływ krwi w nerkach, zmniejsza nerkowy opór naczyniowy i działa diuretycznie. Dopamina jest włączona w regulację ciśnienia tętniczego na drodze kilku mechanizmów. Jednym z nich jest udział w eliminacji sodu w nerkach (regulacja długoterminowa nadciśnienia). Stąd szybszy katabolizm dopaminy w nerkach powoduje wzrost poziomu sodu i w konsekwencji wzrost ciśnienia tętniczego. Dopamina w postaci chlorowodoru jest stosowana w leczeniu w przypadku wstrząsu septycznego, kardiogennego i pourazowego [Emilien i wsp. 1999].

Zaburzenia w zakresie układu dopaminergicznego odgrywają rolę w etiologii chorób

psychiatrycznych (schizofrenia, autyzm, uzależnienia lekowe, choroba afektywna dwubiegunowa, mechanizm działania litu, choroba Parkinsona) [Asghar i wsp. 2011, Lee i wsp. 2011, Suwalska i wsp. 2006]. Badania wykazują, iż zaburzenia funkcjonowania receptorów dopaminowych i produkcji dopaminy mogą również odgrywać rolę w patogenezie nadciśnienia tętniczego przewlekłego [Zeng i wsp. 2007].

1.5.2. Receptory dopaminy - występowanie i działanie

Dopamina oddziałuje poprzez wiązanie się ze swoistymi receptorami dopaminy. Są to glikoproteiny, które należą do grupy α rodziny rodopsynowej receptorów błonowych sprzężonych z heterotrimerycznymi białkami regulatorowymi G, których struktura złożona jest z podjednostek α , β oraz γ [Jose i wsp. 2002, Pivonello i wsp. 2007, Banday i Lokhandwala 2008]. Wyróżniamy dwie grupy receptorów dopaminy: grupę D1, do której należą receptor D1 i D5 – stymulujące cyklazę adenylową oraz grupę D2, w której wyróżniamy receptor D2, D3 i D4 hamujące cyklazę adenylową [Asghar i wsp. 2011, Cipolletta i wsp. 2012, Fukunaga i wsp. 2012, Kim i wsp. 2007]. Sprzęganie i rozprzęganie pomiędzy receptorem D1 i białkiem G aktywuje lub dezaktywuje sygnalizację dopaminergiczną, co ma wpływ na rozszerzenie naczyń krwionośnych, hemostazę sodu i ciśnienie krwi [Lu i wsp. 2006, Kuzhikandathil i wsp. 2012].

Obecnie dopamina jest uważana za ważny regulator ciśnienia tętniczego krwi. Regulacja ta zachodzi na skutek bezpośredniego oddziaływania z naczyniami tętniczymi i żylnymi, co modyfikuje hemodynamikę pracy nerek. Dopamina oddziałuje również na równowagę płynów i elektrolitów [Zeng i wsp. 2007]. Warto również wspomnieć, iż obecność dopaminy opisano w łożysku, gdzie dopamina hamuje wydzielanie laktogenu z komórek trofoblastu [Vaillancourt i wsp. 1998].

Badania wykazały związek pomiędzy aktywnością receptorów dopaminy a rozwojem nadciśnienia tętniczego. Stymulacja receptora D1 wywołuje efekt natriuretyczny, poprzez zmniejszenie reabsorpcji sodu w kanalikach proksymalnych kłębuszków nerkowych. U pacjentów z nadciśnieniem wykazano upośledzenie tej funkcji [Beige i wsp. 2004, Zeng i wsp. 2007]. Prawdopodobnie dzieje się tak poprzez zaburzenie parowania się kompleksu receptora i jego enzymu efektorowego, sprzężonego z białkiem G [Beige i wsp. 2004]. Jedną z przyczyn upośledzenia aktywności białka receptorowego może być występowanie odmian polimorficznych w genie kodującym receptor. Jednym z badanych wariantów jest polimorfizm pojedynczego nukleotydu $-48A>G$, występujący w regionie promotorowym [Beige i wsp. 2004]. W piśmiennictwie można znaleźć badania dotyczące populacji rasy kaukaskiej i

azjatyckiej, w których badano wpływ polimorfizmu tego receptora na występowanie nadciśnienia tętniczego przewlekłego.

Receptory D1 i D5, kodowane przez geny pozbawione intronów, są homologiczne w 80%. Natomiast receptory D2, kodowane przez geny przerywane intronami, są homologiczne z receptorami D3 w 75% oraz z receptorami D4 w 53%. W każdej z tych grup receptorów mogą występować odmiany polimorficzne modyfikujące ich funkcjonowanie [Wong i wsp. 2000, Pivonello i wsp. 2007].

Uważa się, że dopamina oraz receptory D1 i D4 mogą być ściśle związane z rozwojem nadciśnienia tętniczego [Zeng i wsp. 2007, Zhao i wsp. 2012]. Receptory te występują głównie w naczyniach krwionośnych w nerkach, a dokładniej w kanalikach nerkowych i komórkach przykłębuszkowych, gdzie ma miejsce synteza, przechowywanie i uwalnianie reniny. Receptor D4 znajduje się także w mięśniu sercowym oraz jądrach ośrodkowego układu nerwowego [Bek i wsp. 2001, Wang i wsp. 2008, Zeng i wsp. 2008, Zeng i wsp. 2009]. Stymulacja receptora DRD1 agonistą - fenoldopamem zmniejsza ciśnienie krwi, podczas gdy inhibicja w/w receptora ekopipamem, długodziałającym antagonistą daje efekty przeciwstawne [Staessen i wsp. 2008]. Dopamina podawana w małych dawkach do systemu ogólnego lub do naczyń nerkowych zwiększa przepływ nerkowy i zmniejsza opór naczyniowy. Indukowana dopaminą wazodilatacja jest uwarunkowana aktywacją postsynaptycznych receptorów D1 [Banday i wsp. 2008]. Wiadomo iż, nerkowa dopamina poprzez receptory D1 pełni istotną rolę w utrzymaniu sodowej homeostazy i odpowiedniego ciśnienia krwi. Receptory D1 mogą również oddziaływać poprzez interakcję z układem renina-angiotensyna oraz układem sympatycznym [Zeng i wsp. 2008]. Badania udowodniły, że defekty nerkowych receptorów dopaminowych lub ich niedobór przyczyniają się do powstawania nadciśnienia [Zeng i wsp. 2008, Zeng i wsp. 2009].

Receptory D1 mogą również oddziaływać z innymi receptorami o funkcjach natriuretycznych i antynatriuretycznych np. receptorami angiotensynowymi AT1 i AT2. W przypadku pierwotnego nadciśnienia, nadciśnienia zależnego od spożycia soli oraz nadciśnienia spowodowanego otyłością jak również starzenia się organizmu, w połączeniu ze stresem oksydacyjnym poprzez ścieżkę kinaz PKC/GRK2/GRK4 powodują dysfunkcję receptora D1 i zwiększenie ciśnienia krwi [Asghar i wsp. 2011]. W badaniach przeprowadzonych w USA wykazano, że nadciśnienie tętnicze wrodzone jest związane z rozprzęgnięciem receptora D1 z białkiem G, co daje efekt zmniejszonej produkcji wtórnych przekazników oraz zmniejszonej inhibicji transporterów sodu w nefronach [Jose i wsp. 2002]. Badania przeprowadzone na myszach wykazały, iż receptory dopaminowe D4 regulują

ciśnienie krwi poprzez wazopresynę V1 oraz receptory angiotensynowe AT1 [Bek i wsp. 2001].

Istnieją także doniesienia dotyczące związku pomiędzy receptorami D1 a nadciśnieniem tętniczym w ciąży. W przypadku stanu przedzucawkowego ilość receptorów D1 w tętnicy pępowinowej jest mniejsza co powoduje upośledzenie prawidłowego napięcia jej ścian [de Almeida i wsp. 1994]. W ostatnich latach wskazano na znaczenie zaburzeń funkcji receptorów dopaminowych uwarunkowanych obecnością polimorfizmów genetycznych, co może odgrywać ważną rolę w powstawaniu nadciśnienia tętniczego i stanu przedzucawkowego.

1.5.3. Warianty polimorficzne genów receptorów *DRD1* i *DRD4*

Polimorfizmy genu receptora *DRD1*

Istnieją doniesienia o różnicach w działaniu receptorów D1 w zależności od obecności wariantów polimorficznych genu *DRD1*, jak również doniesienia dotyczące związku pomiędzy receptorami D1 a nadciśnieniem tętniczym w ciąży. Badania genetyczne doprowadziły do sklonowania i zlokalizowania na chromosomie 5 genu *DRD1* (5q35.1) i opisanie jego budowy (dwa eksony przedzielone jednym intronem). Opisano również warianty polimorficzne $-48A>G$ oraz $-94G>A$ w regionie promotorowym genu *DRD1* [Liu i wsp. 2006, Wong i wsp. 2000]. Polimorfizm genu *DRD1* dotyczy również regionu 5' i 3' regionu nietranslacyjnego oraz 5' regionu flankującego. Na podstawie dostępnych publikacji można zauważyć różnice w występowaniu wymienionych mutacji w zależności od pochodzenia etnicznego. Polimorfizmy genu *DRD1* były początkowo badane w etiologii chorób psychicznych, choroby alkoholowej, uzależnień narkotykowych, a dopiero następnie w związku z występowaniem nadciśnienia tętniczego [Asghar i wsp. 2011, Kim i wsp. 2007].

Badania w populacjach rasy kaukaskiej oraz azjatyckiej pokazują możliwy związek polimorfizmu $-48A>G$ genu receptora *DRD1* z rozwojem nadciśnienia tętniczego [Beige i wsp. 2004, Sato i wsp. 2000, Cipolletta i wsp. 2012].

Polimorfizmy genu receptora *DRD4*

Gen receptora *DRD4* zbudowany jest z 4 eksonów i zlokalizowany na chromosomie 11p15.5. Miejsce inicjacji transkrypcji tego genu składa się z 400-500 par zasad powyżej kodonu inicjacji translacji [Oak i wsp. 2000].

Również polimorfizmy receptora *DRD4* mogą mieć wpływ na ciśnienie tętnicze krwi. Stosunkowo często analizowanym polimorfizmem jest wariant w eksonie 3 o powtarzalnym

motywie długości 48 par zasad w rejonie kodującym trzecią pętlę cytoplazmatyczną. Wariant ten koduje sekwencję 16 aminokwasów zlokalizowaną w regionie, który wiąże się z białkiem G i wpływa na wewnątrzkomórkowy poziom cAMP. Ilość powtórzeń waha się od 2 do 10, w badanych populacjach rasy białej najczęściej występuje 4-7 powtórzeń. W doniesieniach amerykańskich można znaleźć informacje, iż długie warianty genu *DRD4* są związane z podwyższeniem wartości ciśnienia krwi [Oak i wsp. 2000, Sen i wsp. 2005, Wong i wsp. 2000].

W badaniach polimorfizmu genu receptora *DRD4* u kobiet z nadciśnieniem tętniczym w ciąży wykazano znaczący związek pomiędzy allelem *-521T* a wystąpieniem stanu przedrzucawkowego. Ponadto udowodniono, że genotyp homozygotyczny *-521TT* genu receptora *DRD4* może być markerem wskazującym na rozwój tej jednostki chorobowej [Korobochka i wsp. 2006].

Stan przedrzucawkowy jest często występującym powikłaniem u kobiet w ciąży, będąc niekiedy bezpośrednim zagrożeniem dla zdrowia i życia matki oraz płodu. Dlatego tak niezwykle ważna jest wczesna, odpowiednia diagnostyka, wyodrębnienie grup ryzyka kobiet narażonych na wystąpienie stanu przedrzucawkowego oraz prawidłowe leczenie. Wiąże się z tym poszukiwanie markerów, które w sposób szybki i jasny pozwolą na wyodrębnienie kobiet z grupy ryzyka jak również umożliwią łatwą diagnozę. Istnieją doniesienia naukowe podkreślające znaczenie badania poziomu lipidów, markerów stresu oksydacyjnego i dysfunkcji śródbłonna [Chappell i wsp. 2002]

Jako możliwą przyczynę rozwoju stanu przedrzucawkowego wskazuje się obecność polimorfizmów genetycznych enzymów i receptorów, które związane są z regulacją ciśnienia tętniczego krwi. Niektóre doniesienia sugerują, że ciężarne nosicielki polimorfizmów genów enzymu COMT oraz receptorów dopaminy DRD1 lub DRD4 są bardziej narażone na wystąpienie nadciśnienia tętniczego lub stanu przedrzucawkowego. W związku z tym postanowiono zbadać te zależności w populacji kobiet polskich, u których zdiagnozowano stan przedrzucawkowy i porównać otrzymane wyniki z dostępnymi danymi w literaturze polskiej i światowej.

2. CEL PRACY

Celem pracy była próba oceny udziału wybranych polimorfizmów genów *COMT*, *DRD1* i *DRD4* w etiologii i terapii stanu przedrzucawkowego w populacji kobiet z Wielkopolski.

Cel ten realizowano poprzez:

1. Analizę częstości występowania genotypów i alleli w grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym oraz zdrowych kobiet ciężarnych. Analizowano polimorfizmy genów:
 1. katecholo-*O*-metylotransferazy (*COMT*) - polimorfizm 472G>A
 2. receptora dopaminy 1 (*DRD1*) - polimorfizm -48A>G
 3. receptora dopaminy 4 (*DRD4*) - polimorfizm -521C>T
2. Analizę częstości współwystępowania genotypów wybranych polimorfizmów w badanych grupach
3. Analizę korelacji parametrów klinicznych i laboratoryjnych z występowaniem badanych polimorfizmów genetycznych
4. Analizę korelacji badanych polimorfizmów genetycznych z wielkością stosowanych dawek metyldopa

3. MATERIAŁ I METODYKA

Do badania włączono 98 ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym, oraz 120 zdrowych ciężarnych. Grupę badaną wyodrębniono spośród pacjentek hospitalizowanych w Klinice Perinatologii i Chorób Kobięcych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz w obrębie Poradni SPZOZ Ginekologiczno-Położniczego Szpitala, ul. Polna 33 w Poznaniu. Badanie przeprowadzono od lipca 2011 do lutego 2014. Na przeprowadzenie badań została udzielona zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu nr 527/11 (z dnia 16 czerwca 2011 r.).

Wszystkie pacjentki zostały poinformowane o celu i zakresie przeprowadzanych badań i wyraziły na nie świadomą, pisemną zgodę. Od każdej pacjentki pobrano próbkę krwi żyłnej w objętości około 5 ml, podczas rutynowych badań.

3.1. Charakterystyka grupy badanej

Grupę 98 kobiet z PE wyodrębniono według kryteriów zalecanych przez Amerykańskie Towarzystwo Położników i Ginekologów:

- wzrost ciśnienia tętniczego krwi do wartości $> 140/90$ mmHg,
- obecność białka w ilości $> 0,03$ g w badanej próbce moczu.

Kryteriami wyłączającymi z z grupy badanej były:

- nadciśnienie przewlekłe, choroby sercowo-naczyniowe, nefropatia, cukrzycą oraz inne schorzenia mogące indukować nadciśnienie,
- ciąża bliźniacza,
- rasa inna niż kaukaska.

Średni wiek pacjentek wynosił $30,1 \pm 5,5$ lat, średni wiek ciążowy $33,8 \pm 3,6$ tygodnia, średnia wartość skurczowego ciśnienia tętniczego $171,1 \pm 21,1$ mmHg, a średnia wartość rozkurczowego ciśnienia tętniczego $106,2 \pm 13,8$ mmHg. Dane przedstawiono w tabeli 3.

3.2. Charakterystyka grupy kontrolnej

Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 120 zdrowych ciężarnych z właściwym ciśnieniem tętniczym krwi.

Kryteriami wyłączającymi z grupy kontrolnej były:

- choroby internistyczne,
- nieprawidłowości chromosomalne lub wady rozwojowe płodu,
- ciąża bliźniacza,
- rasa inna niż kaukaska.

Średni wiek w tej grupie wynosił $28,7 \pm 4,8$ lat, średni wiek ciążowy $39,1 \pm 1,3$ tygodni, średnie skurczowe ciśnienie tętnicze $108,3 \pm 11,2$ mmHg a średnie rozkurczowe ciśnienie krwi $67,3 \pm 8,6$ mmHg. Dane przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Dane kliniczne pacjentek z grupy badanej z PE i grupy kontrolnej.

Analizowane zmienne	Grupa badana z PE n=98	Grupa kontrolna n=120	p
wiek (lata) średnia \pm SD zakres mediana	$30,1 \pm 5,5$ 18-45 30	$28,7 \pm 4,8$ 18-42 29	ns
tydzień zakończenia ciąży średnia \pm SD zakres mediana	$33,8 \pm 3,6$ 25-40 34	$39,1 \pm 1,3$ 37-42 39	<0,0001
RR syst. średnia \pm SD zakres mediana	$171,1 \pm 21,1$ 120-220 170	$108,3 \pm 11,2$ 90-130 110	<0,0001
RR diast. średnia \pm SD zakres mediana	$106,2 \pm 13,8$ 90-160 102,05	$67,3 \pm 8,6$ 50-80 70	<0,0001

3.3. Metodyka

3.3.1. Materiał badawczy

Od każdej z pacjentek pobrano z okolicy zgięcia łokciowego około 5 ml krwi żyłnej do próbek zawierających EDTA (etylenodwuaminocteroctan) w celu wykonania badań genetycznych. Pobrane próbki krwi do czasu izolacji były przechowywane w zamrażarce niskotemperaturowej w temperaturze -80°C .

3.3.2. Izolacja DNA

Pierwszym etapem badania była izolacja genomowego DNA z każdej próbki. W tym celu zastosowano technikę izolacji i oczyszczania DNA z krwi zestawem QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA). Poniżej przedstawiono poszczególne etapy procedury:

1. do 1,5 ml próbek pipetowano po 20 μl enzymu proteinazy K,
2. do każdej z próbek dodano następnie 200 μl krwi oraz 200 μl buforu AL po czym każdą wytrząsano za pomocą wytrząsarki

3. próbki inkubowano w temp. 56°C przez 10 min. a następnie krótko odwirowano
4. dodano 200 µl etanolu 96%, zmiksowano i przeniesiono całą zawartość do kolumnienek, które odwirowano (8 000 rpm)
5. po odwirowaniu przesącz usunięto a kolumnienki przeniesiono do czystych probówek i dodano do każdej 500 µl buforu AW1 a następnie próbki odwirowano (8 000 rpm)
6. po odwirowaniu przesącz usunięto a kolumnienki ponownie przeniesiono do świeżych probówek, dodano 500 µl buforu AW2 i odwirowano (3 min, 14 000 rpm)
7. ponownie umieszczono kolumnienki w świeżych probówkach i dodano 200 µl buforu AE, próbki inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 min i odwirowano (8 000 rpm)
8. próbki wyizolowanego i oczyszczonego DNA przechowywano do czasu analizy w zamrażarce niskotemperaturowej.

3.3.3. Oznaczanie jakości i ilości DNA za pomocą metod spektrofotometrycznych

Jakość otrzymanych preparatów DNA i zawartość DNA w preparatach obliczano za pomocą pomiaru absorbancji (A) przy długości fali 260 nm, określanej nazwą gęstość optyczna (OD – *optical density*) – jest to maksymalna absorpcja promieniowania UV przez DNA. Przyjęto, że jeśli A₂₆₀ wynosi 1 to stężenie dwuniciowego DNA równa się w przybliżeniu 50 µg/ml. Stężenie DNA obliczono mnożąc absorbancję przy długości fali 260 nm i rozcieńczenie przez 50. Stosunek A₂₆₀/A₂₈₀ jest często wykorzystywaną miarą czystości DNA, a dokładniej miarą zanieczyszczenia DNA białkami (280 nm to maksymalna absorpcja UV dla białek). Preparat DNA uznaje się za czysty jeśli wartości współczynnika A₂₆₀/A₂₈₀ wynoszą 1,8-2,0. Jeżeli próbka DNA zawiera zanieczyszczenia w postaci RNA to wartości współczynnika bliższe są wartości 2,0, natomiast jeśli występują w niej zanieczyszczenia białkowe to współczynnik jest niższy niż 1,8.

Mierząc absorpcję przy długości fali 230 nm można ocenić zanieczyszczenie preparatu węglowodorami, białkami lub fenolami, natomiast długość fali 325 nm pozwala ocenić zanieczyszczenia pochodzące od samej kuwety lub wytrącenia w roztworze. W przypadku przekroczenia w/w zakresów absorbancji próbki DNA izolowano ponownie. Otrzymane próbki DNA kontrolowano również w procesie elektroforezy na 0,8% żelach agarozowych. Genomowy DNA uwidacznia się jako jednolity prążek o wielkości około 50 kpz.

3.3.4. Reakcja PCR/RFLP

Do oznaczania wariantów polimorficznych wykorzystano reakcję łańcuchowej polimerazy – (PCR - *polymerase chain reaction*) oraz polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP - *restriction fragment length polymorphism*).

Technika PCR pozwala na szybką syntezę wielu kopii określonego fragmentu genomowego DNA. Reakcja łańcuchowej polimerazy polega na amplifikacji *in vitro* określonego odcinka kwasu dezoksyrybonukleinowego przez polimerazę DNA. Warunkiem tego procesu jest znajomość sekwencji krótkich odcinków DNA na końcach 5' i 3' tej części DNA, która ma być powielona. Do reakcji PCR niezbędne są poniższe składniki:

- matrycowy DNA, który będzie powielony,
- trifosforany nukleozydów: (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) – substraty dla polimerazy,
- startery o sekwencji komplementarnej do końcowych rejonów fragmentu DNA, który ma być powielony,
- termostabilna polimeraza DNA (oporna na wielokrotne podgrzewanie do 90°C): enzym, który łączy się ze starterami jednoniciowymi i syntetyzuje nić komplementarną do matrycy DNA,
- odpowiedni bufor, który zapewnia właściwe warunki reakcji.

Synteza określonego odcinka DNA zachodzi w czasie powtarzających się cykli, a każdy z nich dzieli się na następujące etapy:

- denaturacji matrycowego DNA – w temperaturze powyżej 90°C dochodzi do pęknięcia wiązań wodorowych pomiędzy zasadami azotowymi DNA, a w konsekwencji do jego rozdelenia się na dwie pojedyncze nici, które są właściwą matrycą,
- przyłączenia starterów do matrycy w miejscach komplementarnych po obniżeniu temperatury do 40°C - 70°C (zależy od długości i sekwencji nukleotydowej starterów),
- wydłużania starterów – w temperaturze około 72°C, w której polimeraza DNA wykazuje największą aktywność i syntetyzuje nową nić począwszy od startera przyłączonego do jednoniciowej matrycy.

Aby uzyskać określoną ilość kopii odcinków DNA, cykl PCR należy wielokrotnie powtórzyć, zwykle około 30 do 40 razy [Studzińska i inni 2008].

Technika RFLP pozwala wykryć mutacje w danej sekwencji DNA. Po namnożeniu odpowiedniego fragmentu DNA hydrolizuje się go za pomocą enzymów restrykcyjnych. Są to białka, które rozpoznają, a następnie przecinają określoną krótką sekwencję. Jeśli w obrębie sekwencji występuje mutacja uwidoczni się to we wzorze prążków, powstałych po rozdzielaniu produktów reakcji PCR – RFLP w żelu.

3.3.5. Elektroforeza

Elektroforeza pozioma w żelu agarozowym jest to metoda używana do identyfikacji i rozdzielania fragmentów DNA lub RNA. W metodzie tej do barwienia cząstek stosuje się bromek etydyny, a wizualizuje się je w świetle ultrafioletowym.

Termin elektroforeza oznacza przemieszczanie się naładowanych cząsteczek w polu elektrycznym. Pierwsze próby rozdzielenia cząsteczek DNA przeprowadzono w roztworach wodnych, jednak nie było to efektywne, ze względu na problemy z rozdzieleniem fragmentów DNA. Elektroforeza w żelu pozwala na lepszy rozdział cząsteczek o różnej długości, krótsze migrują przez strukturę żelu szybciej niż dłuższe. W metodzie tej można wykorzystywać żele agarozowe i poliakryloamidowe, o różnych stężeniach. Stężenie żelu określa wielkość cząsteczek DNA, które mają być rozdzielone. Po przeprowadzonej elektroforezie wizualizuje się prążki DNA za pomocą roztworu bromku etydyny i światła UV [Brown 2012].

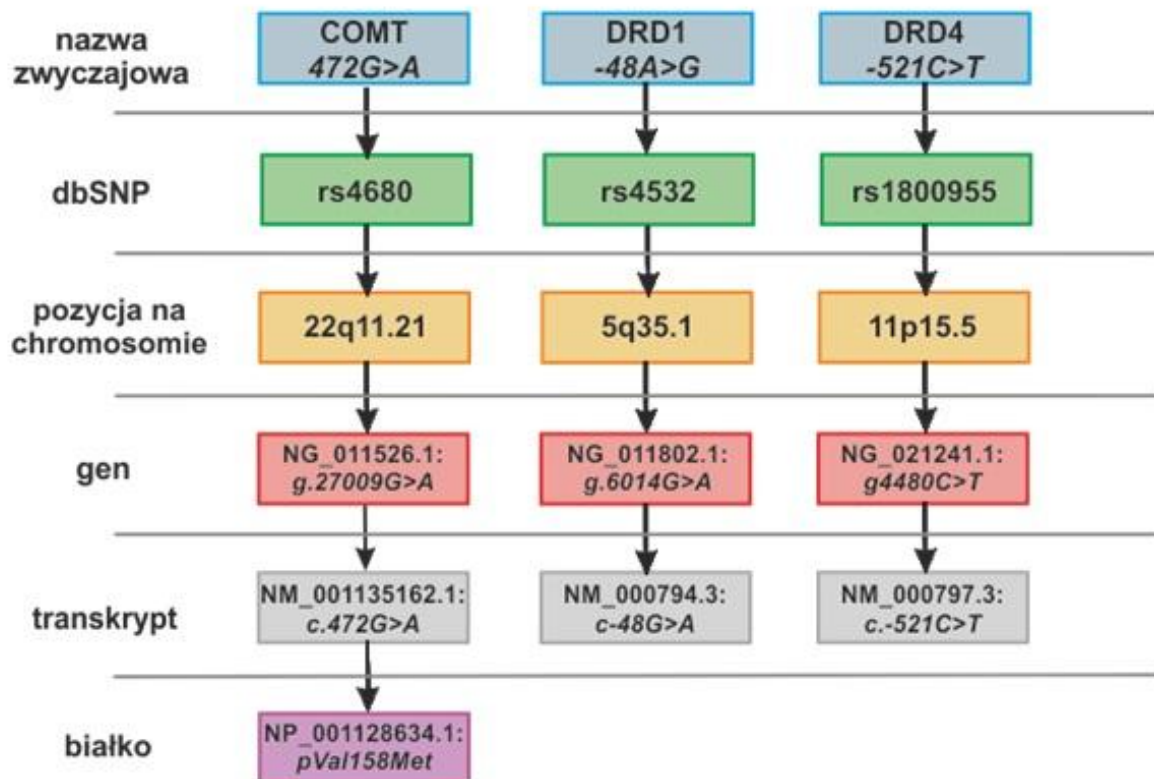
3.4. Aparatura stosowana w badaniach

W pracy wykorzystano aparaturę, która umożliwiła wykonanie wszystkich koniecznych procedur: izolacji DNA, pomiaru ilościowego DNA, reakcji PCR, RFLP a także oceny wyników tych reakcji:

- pipety z nastawialną objętością (Eppendorf, USA),
- wirówka Centrifuge 5804 R (Eppendorf, USA),
- waga laboratoryjna (Radwag, Polska),
- ciepłarka (Mettler, Niemcy),
- zamrażarka niskotemperaturowa (Snijders, Holandia),
- kuchenka mikrofalowa 3D Power (Daewoo, Korea Pd),
- wytrząsarka WL-1 (Biomix, Polska),
- termocykler (Bio-Rad, USA),
- spektrofotometr BioPhotometer (Eppendorf, USA),
- komora do elektroforezy poziomej (Scie-Plas, Anglia),
- aparat do elektroforezy poziomej EV231 (Consort, Belgia),
- mieszadło magnetyczne MS11H (Wigo, Polska),
- komputerowy system wizualizacji i analizy obrazu UV UVI-KS4000/Image PC (Syngen Biotech, USA),
- lodówka (Ardo, Polska),
- zamrażarka (Liebherr, Niemcy),
- komora laminarna (UVP, USA).

3.5. Analiza genetyczna polimorfizmów

W grupie badanej i kontrolnej oznaczono częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmów genów *COMT*, *DRD1* i *DRD4*. Dokładną charakterystykę badanych w pracy polimorfizmów przedstawiono na ryc. 5.



Rycina 5. Charakterystyka badanych w pracy polimorfizmów. Nazwy polimorfizmów podano zgodnie z zaleceniami HGVS (*Human Genome Variation Society*), dbSNP - nr w bazie danych NCBI.

3.5.1. Polimorfizm 472G>A (*Val108/158Met*) genu *COMT*

W celu przeprowadzenia reakcji PCR przygotowywano 2 μ l genomowego DNA, 2 μ l buforu z Mg^{2+} 10x (Novazym), 1 μ l 5mM dNTP (TIBMolBiol, Niemcy), 0,2 μ l starterów F i R (TIBMolBiol, Niemcy) oraz 0,2 μ l 5U Taq polimerazy (Novazym, Polska), mieszaninę uzupełniono sterylną wodą do objętości 20 μ l. Startery zawierają sztuczne miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym *Bst*UI (*Bsh1236I*). Ich sekwencję zaprojektowano używając program Primer3: F5' –CAG CGG ATG GTG GAT TTC GCT CGC-3' oraz R5' – GCT GTG AGA CCC TCA CTG AGC TG-3', a miejsca zmienione pogrubiono i podkreślono (tab. 4).

Reakcję przeprowadzano następujących warunkach: denaturacja wstępna 95°C 5 minut, następnie 35 cykli obejmujących denaturację właściwą 95°C 50 sek, hybrydyzację starterów 63°C 30 sek, elongację 72°C 45 sek oraz końcową syntezę w 72°C przez 5 min. Reakcję przeprowadzano przy użyciu termocyklera (Dyad DNA Engine, BioRad, USA).

Następnie przeprowadzono elektroforezę produktu PCR na 2% żelu agarozowym w buforze 1xTBE (10xTBE, 0,89M Tris, 0,89 M kwas borowy, 0,02 M EDTA pH 8,0), aby potwierdzić uzyskanie fragmentu COMT o wielkości 229 par zasad.

Do wyboru odpowiedniego enzymu restrykcyjnego i ustalenia miejsc hydrolizy w produkcji PCR używano internetowej bazy danych enzymów restrykcyjnych (<http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>) oraz programu odnajdującego miejsca restrykcyjne (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).

Produkt poddawano następnie hydrolizie restrykcyjnej enzymem *Bst*UI. Do hydrolizy restrykcyjnej pobrano 15 µl uzyskanego we wcześniejszej reakcji PCR produktu, 1 µl enzymu *Bst*UI (*Bsh*1236I) (10U/ µl) (ThermoScientific, USA), 2 µl buforu R (10x) i uzupełniono sterylną wodą do objętości 20 µl. Uzyskaną mieszaninę inkubowano przez 16 godzin w temperaturze 37°C w cieplarni (Memmert, Niemcy) po czym inaktywowano enzym w temperaturze 65°C przez 20 minut.

Próbki nanoszono na 2,5% żel agarozowy i przeprowadzano rozdział elektroforetyczny w buforze TBE przez 2 godziny. Żele barwiono bromkiem etydyny, wizualizowano w świetle UV i dokumentowano systemem UVI-KS4000i/Image PC (UVItec Limited, Wielka Brytania). Uzyskiwano 3 genotypy: homozygota *GG*, heterozygota *GA* oraz homozygota zmutowana *AA* (tab. 5)

3.5.2. Polimorfizm -48A>G genu *DRD1*

Do reakcji PCR używano 25 ng genomowego DNA, 2,5 µl buforu 10 x Taq Bufor (TibMolBiol, Niemcy), 2,5 mM MgCl₂ (TibMolBiol, Niemcy), 0,25 mM dNTP (TibMolBiol, Niemcy), 0,45 µM startera F i R (TIBMolBiol, Niemcy) o następującej sekwencji F: 5'-GGC TTT CTG GTG CCC AAG ACA GTG-3' oraz R: 5'-AGC ACA GAC CAG CGT GTT CCC CA-3'(wg Sato i wsp. 2000) (tab. 4) oraz 1U Taq polimerazy (TibMolBiol, Niemcy). Objętość końcowa reakcji PCR wynosiła 25 µl. Warunki reakcji dla tego polimorfizmu to: denaturacja wstępna 95°C 4 minuty, następnie 35 cykli (95°C 30 sek., 68°C 30 sek., 72°C 1 minuta.) po tym synteza końcowa 72°C 10 min. Reakcję przeprowadzano w termocyklerze Dyad DNA Engine, (Bio-Rad, USA). Produkt PCR wielkości 404 par hydrolizowano enzymem restrykcyjnym *Dde*I (ThermoScientific, USA). Do tej reakcji pobrano 19 µl uzyskanego we

wcześniejszej reakcji PCR produktu, 2,5 µl buforu 2,5 µl sterylnej wody oraz 1 µl enzymu i inkubowano mieszaninę w temperaturze 37°C w cieplarni (Mettler, Niemcy), a następnie inaktywowano enzym 20 minut w 65°C. Po dodaniu buforu obciążającego nakładano próbki na 2% żel agarozowy (TIBMolBiol, Niemcy). Elektroforezę prowadzono w buforze 1 x TBE przy napięciu 110V przez 2 godziny i uzyskane wyniki dokumentowano za pomocą systemu UVI-KS4000/Image PC (Syngen Biotech, USA). Po hydrolizie uzyskano następujące fragmenty dla alleli: A – 219, 143, 42 pz G – 261, 143 pz (tab. 5).

3.5.3. Polimorfizm -521C>T genu *DRD4*

Reakcję PCR dla polimorfizmu -521C>T genu *DRD1* przygotowano w objętości 25 µl. W skład mieszaniny wchodziło: 25 ng genomowego DNA, 2,5 µl buforu 10 x Taq Bufor (TibMolBiol, Niemcy), 2,5 mM MgCl₂ (TibMolBiol, Niemcy), 0,25 mM dNTP (TibMolBiol, Niemcy), 0,45 µM startera F i R (TIBMolBiol, Niemcy) o następującej sekwencji F: 5' - CGG GGG CTG ACC ACC AGA GGC TGC -3' oraz R: 5' - GCA TCG ACG CCA GCG CCA TCC TAC -3' (wg Prasad i wsp. 2008) (tab. 4) i 1U Taq polimerazy (TibMolBiol, Niemcy). Reakcję przeprowadzano w następujących warunkach: denaturacja wstępna 95°C 4 minuty, następnie 35 cykli obejmujących denaturację właściwą 95°C 1min., wiązanie starterów 68°C 1 min., syntezę 72°C 1 minuta., po tym następowała synteza końcowa 72°C 10 min. Reakcję przeprowadzano używając termocyklera Dyad DNA Engine, (Bio-Rad, USA). Produkt PCR wielkości 404 par zasad poddawano hydrolizie enzymem restrykcyjnym *NsbI* (*FspI*) (ThermoScientific, USA). Do reakcji hydrolizy używano 19 µl produktu uzyskanego w reakcji PCR, 2,5 µl buforu (Tango) 2,5µl sterylnej wody oraz 1 µl enzymu inkubowano mieszaninę w temperaturze 37°C w cieplarni (Mettler, Niemcy), a następnie inaktywowano enzym 20 minut w 65°C. Próbkę rozdzielano na 2% żelu agarozowym (TIBMolBiol, Niemcy) i przeprowadzono elektroforezę w buforze 1 x TBE przy napięciu 110V przez 2 godziny. Uzyskane wyniki dokumentowano (UVI-KS4000/Image PC (Syngen Biotech, USA). Po hydrolizie restrykcyjnej uzyskano następujące fragmenty dla genotypów: *CC* (285 pz), *CT* (285 pz, 176 pz, 109 pz), *TT* (176 pz, 109 pz) (tab. 5).

Tabela 4. Sekwencje stosowanych w pracy starterów.

Gen	Polimorfizm	Sekwencja starterów	Literatura
COMT	472G>A (rs4680)	PR.F: 5' –CAG CGG ATG GTG GAT TTC GCT <u>CGC</u> -3' PR.R: 5' – GCT GTG AGA CCC TCA CTG AGC TG-3'	program: Primer3
DRD1	-48A>G (rs4532)	PR. F: 5'-GGC TTT CTG GTG CCC AAG ACA GTG-3' PR. R: 5'-AGC ACA GAC CAG CGT GTT CCC CA-3'	Sato i wsp. 2000
DRD4	-521C>T (rs1800955)	PR.F: 5' –CGG GGG CTG ACC ACC AGA GGC TGC-3' PR.R: 5' – GCA TCG ACG CCA GCG CCA TCC TAC C-3'	Prasad i wsp. 2008

Tabela 5. Wielkości fragmentów po reakcji hydrolizy oraz stosowane enzymy restrykcyjne przy oznaczeniu polimorfizmów genetycznych badanych genów.

Polimorfizm	Enzym restrykcyjny (producent)	Rozpoznawana sekwencja	Produkt PCR	Fragmenty uzyskane po hydrolizie
COMT 472G>A	<i>Bst</i> UI (<i>Bsh</i> 1236I) (ThermoScientific)	5'...C G↓C G...3' 3'...G C↑G C...5'	229 pz	GG (206 pz, 23pz) GA (229 pz, 206 pz, 23 pz) AA (229 pz)
DRD1 -48A>G	<i>Hpy</i> F3I (<i>Dde</i> I) (ThermoScientific)	5'...C↓T N A G...3' 3'...G A N T↑C...5'	404 pz	AA (219 pz, 143 pz, 42 pz) AG (261 pz, 219 pz, 143 pz, 42 pz) GG (261 pz, 143 pz)
DRD4 -521C>T	<i>Nsb</i> I (<i>Fsp</i> I) (ThermoScientific)	5'...TGC↓GCA...3' 3'...ACG↑CGT...5'	285 pz	CC (285 pz) CT (285 pz, 176 pz, 109 pz) TT (176 pz, 109 pz)

3.6. Oprogramowanie komputerowe oraz biologiczne bazy danych

- program statystyczny SPSS 22.0 PL dla Windows
- Primer3 <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/input.html>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> – National Center for Biotechnology Information (PubMed, OMIM, SNP, Blast)
- <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>
- <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

3.7. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną uzyskanych w pracy wyników przeprowadzono z wykorzystaniem programu statystycznego SPSS 22.0 PL dla Windows. W edytorze danych umieszczono zarówno dane kliniczne pacjentek jak i uzyskane w badaniach molekularnych genotypy badanych polimorfizmów.

Analizując dane kliniczne pacjentek obliczano średnią arytmetyczną, to jest sumę wszystkich wartości dzielonych przez ich liczbę, odchylenie standardowe (\pm SD - *standard deviation*) mówiące o mierze rozproszenia wartości indywidualnych wokół średniej próby. Określano również zakres wartości obserwowanych obliczając wartości maksymalne i minimalne oraz podawano wartość mediany – miary tendencji centralnych i obrazu rozkładu zmiennych porządkowych. Do weryfikacji hipotezy o nieistotności różnicy badanego rozkładu zmiennej z rozkładem normalnym używano test Kołmogorova-Smirnova z poprawką Lillieforsa. Dla dwóch zmiennych niepowiązanych w skali interwałowej z rozkładem normalnym i o równych wariancjach stosowano test t-Studenta dla grup niezależnych. W przypadku braku normalności rozkładu analizę oparto na testach nieparametrycznych. Podczas wnioskowania statystycznego wykorzystywano test Manna-Whitneya oraz test chi kwadrat dla trendu.

Analizę statystyczną dla więcej niż dwóch zmiennych przeprowadzono za pomocą analizy wariancji testu Kruskala-Wallisa. Wartości średnie danych klinicznych pomiędzy poszczególnymi grupami porównywano jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA. Wszystkie wyniki przyjęto za istotne statystycznie przy wartościach $p < 0,05$.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników badań genetycznych polegała na porównaniu częstości genotypów alleli oraz pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną (test chi kwadrat oraz test Fishera), a także do obliczeniu współczynnika ryzyka (WR) przy uwzględnieniu odpowiednich przedziałów ufności (95%PU). Tutaj także za istotne statystycznie przyjęto te o wartościach $p < 0,05$.

Wartości obserwowane porównywano z wartościami oczekiwanymi, które wyznaczano na podstawie częstości występowania alleli danego polimorfizmu zgodnie z prawem Hardy'ego – Weinberga, przedstawianego za pomocą następującego równania:

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

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

$$p = nA/2N = 2nAA + nAa/2N$$

$$q = na/2N = 2naa + nAa/2N$$

gdzie A oraz a oznaczają allele danego genu . Zgodność z prawem Hardy’ego–Weinberga w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej sprawdzono testem chi kwadrat.

Po oznaczeniu wszystkich badanych polimorfizmów wyznaczono ich wzajemne korelacje, które porównywano za pomocą testu dokładnego Fishera (*Fisher Exact Probability Test*) oraz testem chi-kwadrat.

4. WYNIKI

4.1. Charakterystyka porównawcza danych klinicznych i parametrów biochemicznych badanych grup kobiet

Pacjentki porównano pod względem wzrostu i masy ciała. Średnia wartość wzrostu w grupie badanej wynosiła $165,2 \pm 6,7$ cm w porównaniu do grupy kontrolnej $167,4 \pm 4,9$ cm ($p=0,011$). Średnia wartość masy ciała przed ciążą w grupie badanej wynosiła $66,8 \pm 17,5$ kg w porównaniu do grupy kontrolnej $60,3 \pm 9,4$ kg ($p=0,004$). Średnia wartość masy ciała pod koniec ciąży to $81,8 \pm 16,9$ kg oraz $75,3 \pm 10,5$ kg, odpowiednio w grupie badanej oraz kontrolnej ($p=0,001$).

Obie grupy porównano również pod względem wartości parametrów biochemicznych. Na podstawie obliczonych średnich można zaobserwować, iż stężenie hemoglobiny u kobiet z grupy badanej wynosiło $7,23 \pm 1,51$ mmol/L, w grupie kontrolnej natomiast stężenie było niższe i wynosiło $6,72 \pm 0,79$ mmol/L ($p=0,003$). Poziom erytrocytów również był nieco niższy w grupie kontrolnej i wynosił $3,68 \pm 0,45$ T/L, w grupie badanej - $3,82 \pm 0,49$ T/L ($p=0,001$). Średnia ilość leukocytów była wyższa w grupie kontrolnej - $16,83 \pm 4,82$ G/L, w porównaniu do grupy badanej - $12,97 \pm 4,51$ G/L.

Wartości hematokrytu wynosiły u kobiet z grupy badanej $0,33 \pm 0,04$ L/L oraz u kobiet z grupy kontrolnej $0,32 \pm 0,04$ L/L ($p=0,051$). Ostatnim ocenianym parametrem krwi było średnie stężenie płytek krwi, było ono większe dla grupy zdrowych ciężarnych $207,38 \pm 50,72$ G/L, w grupie ciężarnych z PE wynosi ono $194,77 \pm 68,00$ G/L ($p=0,08$).

W grupie kontrolnej 55,8% kobiet rodziło po raz pierwszy, podczas gdy w grupie badanej wartość ta stanowi 60,2% (ns). U 85,8% zdrowych kobiet ciąża zakończyła się porodem samoistnym drogami natury, u 10,0% wykonano cesarskie cięcie, a u 4,2% zastosowano inny rodzaj porodu operacyjnego (kleszcze, wyciągacz próżniowy).

W grupie badanej aż u 88,8% pacjentek ciążę zakończono cesarskim cięciem, tylko 11,2% urodziło samoistnie ($p<0,0001$). Wszystkie parametry przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Wybrane dane kliniczne pacjentek z grupy badanej z PE i grupy kontrolnej.

Analizowane zmienne	Grupa badana z PE n=98	Grupa kontrolna n=120	P
wzrost (cm) średnia ± SD zakres mediana	165,2 ± 6,7 140-180 165	167,4 ± 4,9 150-180 168	0,011
masa przed ciążą (kg) średnia ± SD zakres mediana	66,8 ± 17,5 42-150 64	60,3 ± 9,4 40-97 59,5	0,004
masa pod koniec ciąży (kg) średnia ± SD zakres mediana	81,8 ± 16,9 50-157 78,25	75,3 ± 10,5 52-106 75	0,001
Hb (mmol/L) średnia ± SD zakres mediana	7,23 ± 1,51 4,8-13,6 7,20	6,72 ± 0,79 4,5-8,8 6,77	0,003
E (T/L) średnia ± SD zakres mediana	3,82 ± 0,49 2,56-4,95 3,92	3,68 ± 0,45 2,5-4,81 3,68	0,001
L (G/L) średnia ± SD zakres mediana	12,97 ± 4,51 6,2-25,4 12,42	16,83 ± 4,82 8,27-29,48 16,23	<0,0001
Htk (L/L) średnia ± SD zakres mediana	0,33 ± 0,04 0,23-0,43 0,34	0,32 ± 0,04 0,22-0,42 0,32	0,051
Pl (G/L) średnia ± SD zakres mediana	194,77 ± 68,00 47-352 198,00	207,38 ± 50,72 114-314,6 206,95	0,080
pierwiastki wieloródki	59 (60,2%) 39 (39,8%)	67 (55,8%) 53 (44,2%)	0,300
sposób zakończenia ciąży poród samoistny drogami natury cięcie cesarskie	11 (11,2%) 87 (88,8%)	103 (85,8%) 12 (10,0%)	<0,0001
inne porody operacyjne (kleszcze, wyciągacz próżniowy)		5 (4,2%)	-

4.2. Analiza parametrów biochemicznych kobiet w grupie badanej

W grupie badanej oznaczono następujące parametry biochemiczne w surowicy krwi: mocznik, kwas moczowy, białko całkowite, BUN (azot mocznikowy) oraz poziom białka w moczu.

W analizowanej grupie kobiet z PE zwracają uwagę podwyższona średnia wartość kwasu moczowego w surowicy $6,64 \pm 1,32$ mg/dL, w przypadku kobiet z ciężką postacią PE wartość ta jest jeszcze wyższa ($6,90 \pm 1,21$ mg/dL), średnia wartość białka całkowitego w surowicy w dolnej granicy normy $5,68 \pm 0,76$ g/L dla całej grupy badanej i $5,61 \pm 0,63$ g/L dla podgrupy z ciężką postacią PE oraz duże średnie wartości białkomoczu (odpowiednio $302,04 \pm 191,60$ mg/dL i $487,76 \pm 48,46$ mg/dL). Wartości te przedstawiono w poniższej tabeli 7.

Tabela 7. Parametry biochemiczne pacjentek z grupy badanej z PE i z podgrupy z ciężką postacią PE.

Parametry biochemiczne	Grupa badana z PE n = 98	Grupa badana z ciężką postacią PE n = 49	P
mocznik (mg/dL) średnia + SD zakres mediana	$30,65 \pm 14,25$ 12,57 - 92,52 28,07	$30,99 \pm 13,20$ 14,20 – 81,60 28,30	0,42
kwas moczowy (mg/dL) średnia + SD zakres mediana	$6,64 \pm 1,32$ 3,57 - 8,4 6,64	$6,90 \pm 1,21$ 4,42 – 9,43 6,88	0,11
białko całkowite (g/L) średnia + SD zakres mediana	$5,68 \pm 0,76$ 2,9-8,76 5,63	$5,61 \pm 0,63$ 4,24 – 7,50 5,59	0,31
BUN (mg/dL) średnia + SD zakres mediana	$15,08 \pm 5,59$ 7,26-31,88 14,27	$15,04 \pm 5,23$ 7,91 – 27,35 13,78	0,49
białkomocz (mg/dL) średnia + SD zakres mediana	$302,04 \pm 191,60$ 75 - 500 225	$487,76 \pm 48,46$ 300 – 500 500	<0,0001

4.3. Analiza danych klinicznych noworodków z grupy badanej i kontrolnej

W grupie kontrolnej średnia masa ciała noworodka wynosiła $3454,43 \pm 403,12$ g, podczas gdy w grupie badanej wartość ta była niższa i wynosiła $1873,59 \pm 835,60$ g. Porównano również wartości skali Apgar. W grupie badanej kobiet z PE wartości te wynoszą $7,19 \pm 2,81$ w 1 minucie i $8,44 \pm 1,65$ w 5 minucie, wyższe wartości natomiast zaobserwowano u noworodków z grupy kobiet zdrowych, odpowiednio $9,54 \pm 1,04$ oraz $9,91 \pm 0,51$.

Średnie parametry gazometryczne w grupie kontrolnej to $7,33 \pm 0,09$ (pH żyłne) i $7,31 \pm 0,09$ (pH tętnicze), podczas gdy w grupie badanej wartości te wynoszą $7,27 \pm 0,10$ i $7,25 \pm 0,09$.

Kolejnym badanym parametrem była masa łożyska, która w grupie kontrolnej wynosiła średnio $601,14 \pm 121,55$ g, natomiast w grupie badanej $445,38 \pm 190,40$ g (tab. 8).

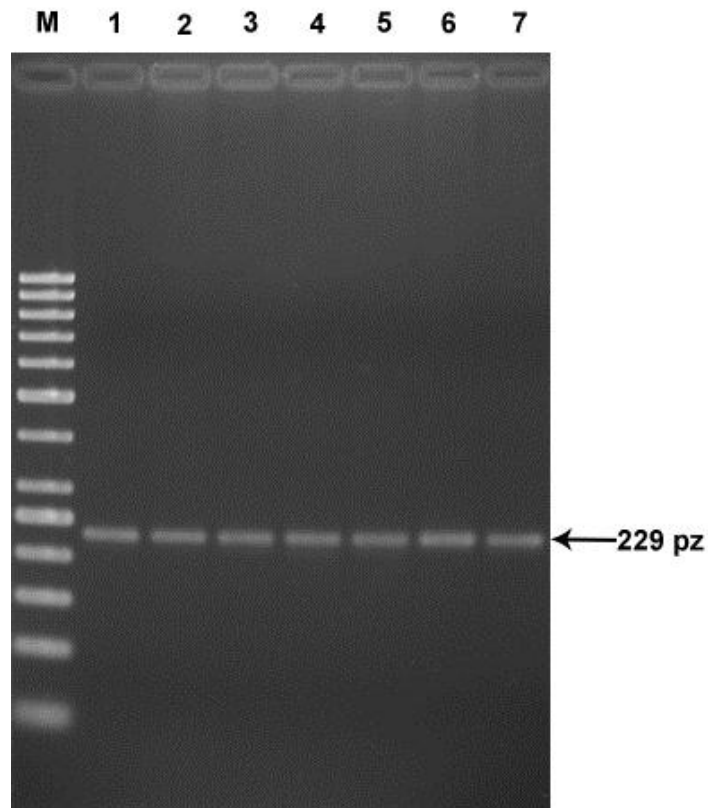
Tabela 8. Dane kliniczne noworodków z grupy badanej z PE i grupy kontrolnej.

Dane kliniczne noworodków	grupa badana z PE n = 98	grupa kontrolna n = 120	p
masa (g) średnia \pm SD zakres mediana	$1873,59 \pm 835,60$ 510-3940 1820	$3454,43 \pm 403,12$ 2560-4640 3430	<0,0001
Ap 1 średnia \pm SD zakres mediana	$7,19 \pm 2,81$ 1-10 8	$9,54 \pm 1,04$ 5-10 10	<0,0001
Ap 5 średnia \pm SD zakres mediana	$8,44 \pm 1,65$ 3-10 9	$9,91 \pm 0,51$ 7-10 10	<0,0001
pH żyłne średnia \pm SD zakres mediana	$7,27 \pm 0,10$ 6,69-7,40 7,28	$7,33 \pm 0,09$ 7,12-7,55 7,33	0,16853
pH tętnicze średnia \pm SD zakres mediana	$7,25 \pm 0,09$ 6,8-7,42 7,27	$7,31 \pm 0,09$ 7,07-7,46 7,33	0,00144
masa łożyska (g) średnia \pm SD zakres mediana	$445,38 \pm 190,40$ 150-1300 415	$601,14 \pm 121,55$ 450-1000 600	<0,0001

4.4. Analiza wyników badań genetycznych

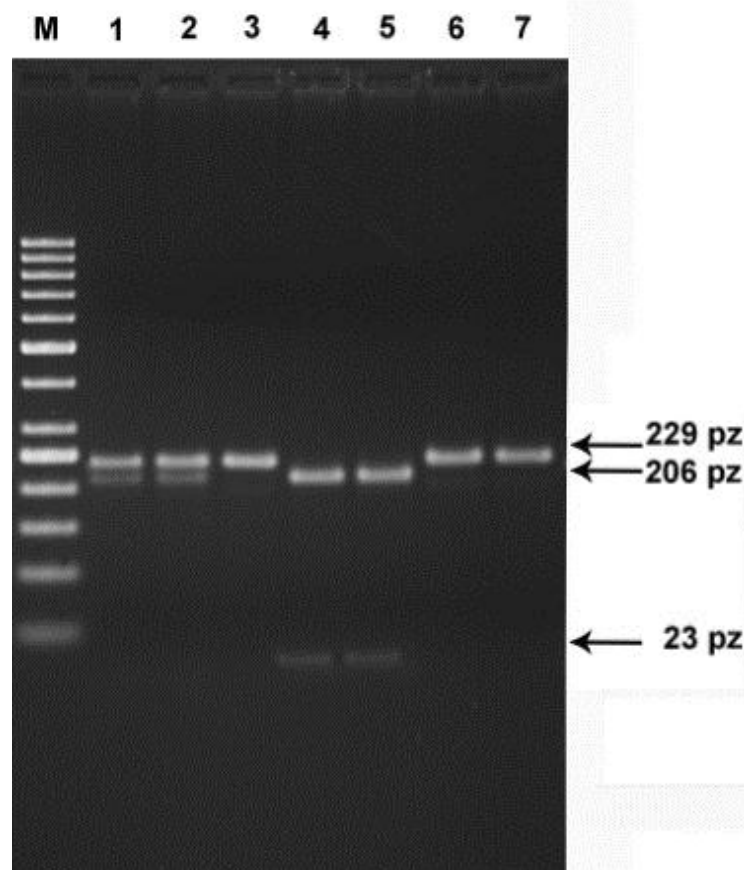
4.4.1. Polimorfizm 472G>A (*Val108/158Met*) genu *COMT*

Fotografia 1 przedstawia produkt reakcji PCR o wielkości 229 pz dla polimorfizmu 472G>A genu *COMT*. Produkt PCR nakładano na 2% żel agarozowy i przeprowadzano elektroforezę przy napięciu 110V przez 2 godziny.



Fotografia 1. Rozdział elektroforetyczny produktu reakcji PCR w 2% żelu agarozowym dla polimorfizmu 472G>A genu *COMT*. M-marker wielkości DNA 50 pz (Fermentas); tory 1-7 - produkty PCR.

Na fotografii 2 widać uzyskany rozkład genotypów po procesie hydrolizy przy zastosowaniu enzymu restrykcyjnego *BstUI* (*Bsh1236I*) (Fermentas, Litwa). Wyniki enzymatycznej hydrolizy uwidoczniono na 2,75% żelu agarozowym. Dla genotypu homozygotycznego niezmutowanego 472GG uzyskiwano dwa prążki wielkości 206 i 23 pz (miejsce restrykcyjne dla enzymu), pojedynczy prążek 229 pz odczytywano jako obecność genotypu homozygotycznego zmutowanego 472AA, natomiast w przypadku obecności genotypu heterozygotycznego 472GA po reakcji hydrolizy uwidoczniano wszystkie trzy prążki o wielkości 229, 206 oraz 23 pz (fot. 2).



Fotografia 2. Produkty uzyskane po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *BstUI* (*Bsh1236I*). M-marker wielkości 50 pz. Prążki: 4, 5 - homozygoty GG; 1, 2 - heterozygoty GA; 3, 6, 7 - homozygoty AA.

W przeprowadzonej analizie pokazano, że genotyp heterozygotyczny 472GA (*Val/Met*) występował z porównywalną częstością w grupie badanej (50,0%) jak i kontrolnej (50,8%). Częstość występowania genotypu 472GG (*Val/Val*) wynosiła 28,6% w grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym oraz 26,7% w grupie kobiet zdrowych. Genotyp 472AA (*Met/Met*) odpowiednio 21,4% i 22,5%. Analiza częstości występowania alleli dla tego polimorfizmu wykazała podobną częstość allela typu dzikiego 472G w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej (53,6 vs. 52,1%, WR=1,06, ns). Rozkład genotypów w obu badanych grupach był zgodny z równowagą Hardy’ego-Weinberga (tab. 9).

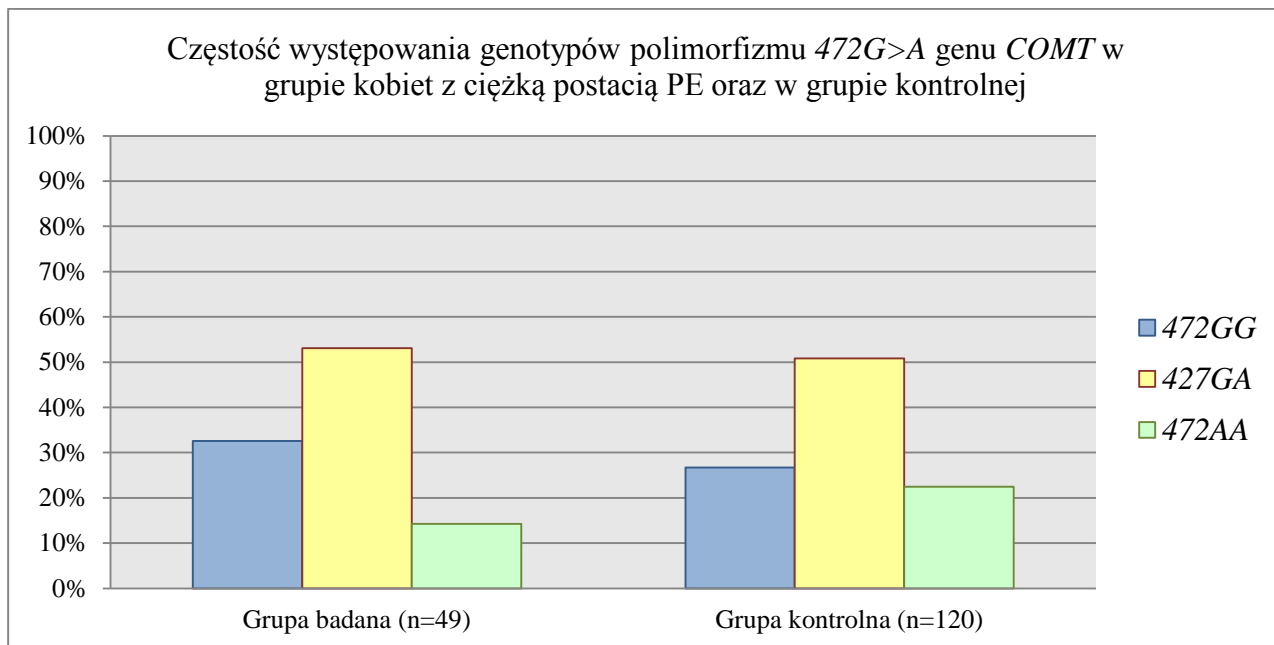
Tabela 9. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 472G>A genu *COMT* w grupie kobiet z PE oraz w grupie kontrolnej.

COMT 472G>A	Grupa badana z PE (n=98)		Grupa kontrolna (n=120)		WR	95%PU	p
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)			
Genotypy							
472GG	28 (28,6)	28,7	32 (26,7)	27,1	1,10	0,61-2,00	0,44
472GA	49 (50,0)	49,7	61 (50,8)	49,9	0,97	0,57-1,65	0,50
472AA	21 (21,4)	21,6	27 (22,5)	23,0	0,94	0,49-1,79	0,49
Suma	98 (100,0)	100,0	120 (100,0)				
Allele							
472G	105 (53,6)	—	125 (52,1)	—	1,06	0,73-1,55	0,41
472A	91 (46,4)	—	115 (47,9)	—	0,94	0,65-1,37	0,41
Suma	196 (100,0)		240 (100,0)				

W czasie analizy częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 472G>A genu *COMT* w podgrupie z ciężkim stanem przedrzucawkowym oraz w całej w grupie kontrolnej interesująca obserwacją było odnotowanie większej częstości występowania genotypu zmutowanego 472AA w grupie kontrolnej (14,3 vs. 22,5% w grupie kontrolnej, ns). Podobnie większą częstość występowania zmutowanego allela 472A odnotowano w grupie kontrolnej zdrowych kobiet ciężarnych (40,8 vs. 47,9%, ns) (tab. 10, ryc. 6).

Tabela 10. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 472G>A genu *COMT* w grupie kobiet z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.

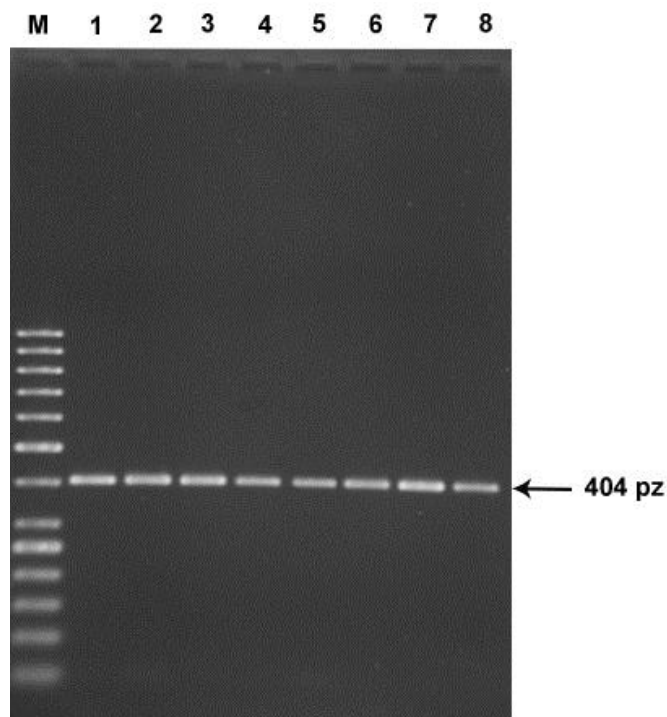
COMT 472G>A	Grupa badana z ciężką postacią PE (n=49)		Grupa kontrolna (n=120)		WR	95%PU	p
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)			
Genotypy							
472GG	16 (32,6)	35,1	32 (26,7)	27,1	1,33	0,60-2,89	0,27
472GA	26 (53,1)	48,3	61 (50,8)	49,9	1,09	0,53-2,25	0,46
472AA	7 (14,3)	16,6	27 (22,5)	23,0	0,57	0,19-1,49	1,15
Suma	49 (100,0)	100,0	120 (100,0)	100,0			
Allele							
472G	58 (59,2)	—	125 (52,1)	—	1,33	0,81-2,21	0,14
472A	40 (40,8)	—	115 (47,9)	—	0,75	0,45-1,24	0,14
Suma	98 (100,0)		240 (100,0)				



Rycina 6. Częstość występowania genotypów polimorfizmu 472G>A genu *COMT* w grupie kobiet z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.

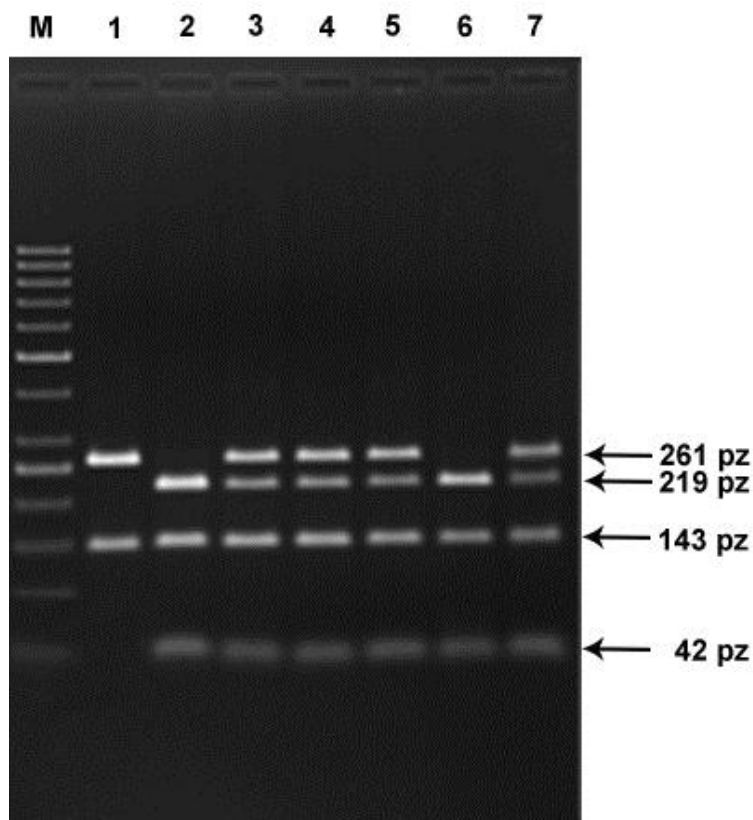
4.4.2 Polimorfizm -48A>G genu *DRD1*

Produkt reakcji PCR dla polimorfizmu -48A>G genu *DRD1* przedstawiono na fotografii 3. Po elektroforezie w 2% żelu agarozowym uzyskiwano produkt wielkości 404 pz.



Fotografia 3. Rozdział elektroforetyczny produktu reakcji PCR w 2% żelu agarozowym dla polimorfizmu -48A>G genu *DRD1*. M - marker wielkości DNA 50 pz (Fermentas); tory 1 - 8 – produkty PCR.

Uzyskany rozkład genotypów po procesie hydrolizy restrykcyjnej przy zastosowaniu enzymu restrykcyjnego *HpyF3I* (*DdeI*) (ThermoScientific) przedstawiono na fotografii 4. Enzym ten w przypadku genotypu -48AA posiadał dwa miejsca restrykcyjne we fragmencie 404 pz uzyskanym po reakcji PCR i dlatego uzyskiwano na żelu agarozowym trzy prążki wielkości 219, 143 i 42 pz. Dla genotypu -48GG istniało jedno miejsce restrykcyjne (261 i 143 pz), natomiast w przypadku obecności genotypu heterozygotycznego -48AG po reakcji hydrolizy uwidoczniano cztery prążki o wielkości 261, 219, 143 oraz 42 pz (fot. 4).



Fotografia 4. Produkty uzyskane po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *HpyF3I* (*DdeI*). M - marker wielkości 50 pz (Fermentas); tory: 2, 6 - homozygoty AA; 3, 4, 5, 7 - heterozygoty AG; 1 - homozygota GG.

Po przeprowadzeniu analizy PCR/RFLP w grupach kobiet ze stanem przedrzucawkowym i w grupie kontrolnej uzyskano częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu -48A>G genu *DRD1* dla każdej z pacjentek. Genotyp heterozygotyczny -48AG występował w grupie badanej z częstością 45,9% a w grupie kontrolnej 50,8% i jest on w obu grupach najczęściej występującym. W grupie badanej częściej występował genotyp -48AA w porównaniu do grupy kontrolnej (43,9 vs. 35,0%,

WR=1,45, ns). Zmutowany genotyp *-48GG* występował w obu grupach najrzadziej, odpowiednio u 10 pacjentek z grupy badanej (10,2%) i u 17 z grupy kontrolnej (14,2%). Obserwowany rozkład alleli dla tego polimorfizmu wyglądał następująco: allel *-48A* 66,8% vs. 60,4% w grupie kontrolnej, a allel *-48G* odpowiednio 33,2% i 39,6%. Rozkład genotypów w obu grupach jest zgodny z równowagą Hardy’ego-Weinberga (tab. 11).

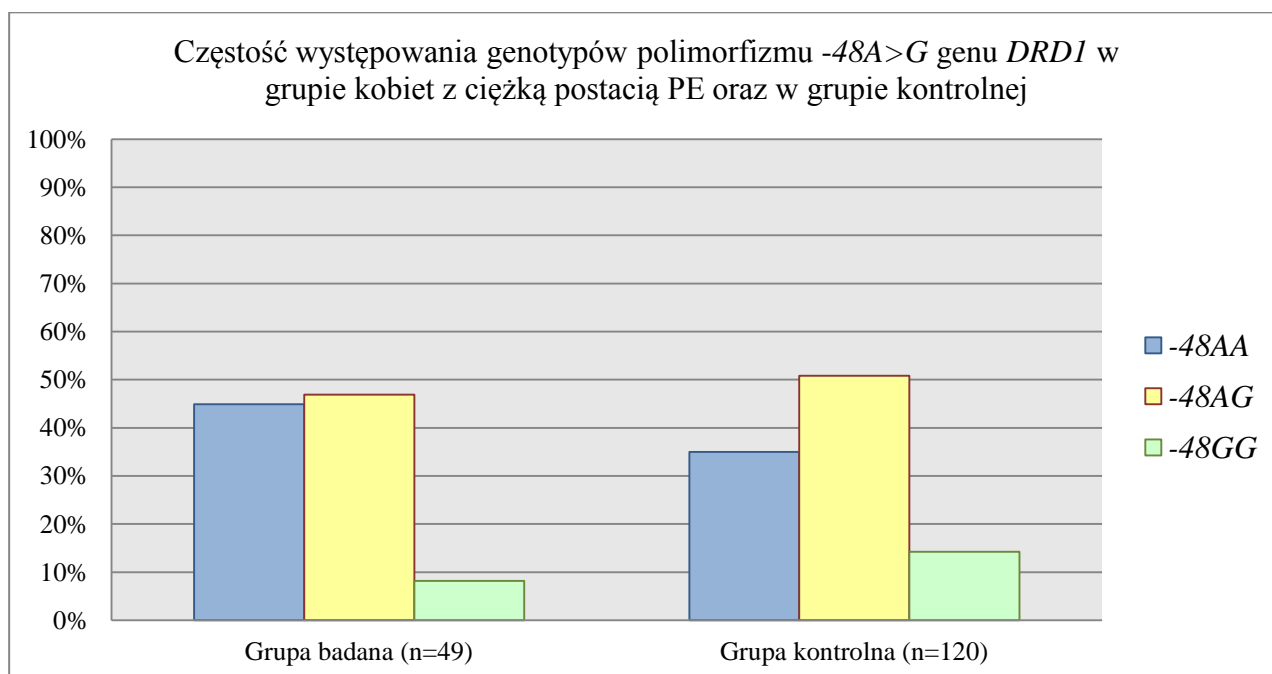
Tabela 11. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-48A>G* genu *DRD1* w grupie kobiet z PE oraz w grupie kontrolnej.

-48A>G DRD1	Grupa badana z PE (n=98)		Grupa kontrolna (n=120)		WR	95%PU	p
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)			
Genotypy							
-48AA	43 (43,9)	44,7	42 (35,0)	36,5	1,45	0,84-2,51	0,12
-48AG	45 (45,9)	44,3	61 (50,8)	47,8	0,82	0,48-1,45	0,28
-48GG	10 (10,2)	11,0	17 (14,2)	15,7	0,69	0,30-1,58	0,25
Suma	98 (100,0)	100,0	120 (100,0)	100,0			
Allele							
-48A	131 (66,8)	—	145 (60,4)	—	1,32	0,89-1,96	0,10
-48G	65 (33,2)	—	95 (39,6)	—	0,76	0,51-1,12	0,10
Suma	196 (100,0)		240 (100,0)				

Genotyp zmutowany *-48GG* częściej występował w grupie kontrolnej w porównaniu do podgrupy z ciężką postacią PE (8,2 vs. 14,2% w grupie kontrolnej, ns). Również częstość występowania zmutowanego allela *-48G* była większa w grupie kontrolnej (31,6 vs. 39,6%, ns) (tab. 12, ryc. 7).

Tabela 12. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-48A>G$ genu *DRD1* w grupie kobiet z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.

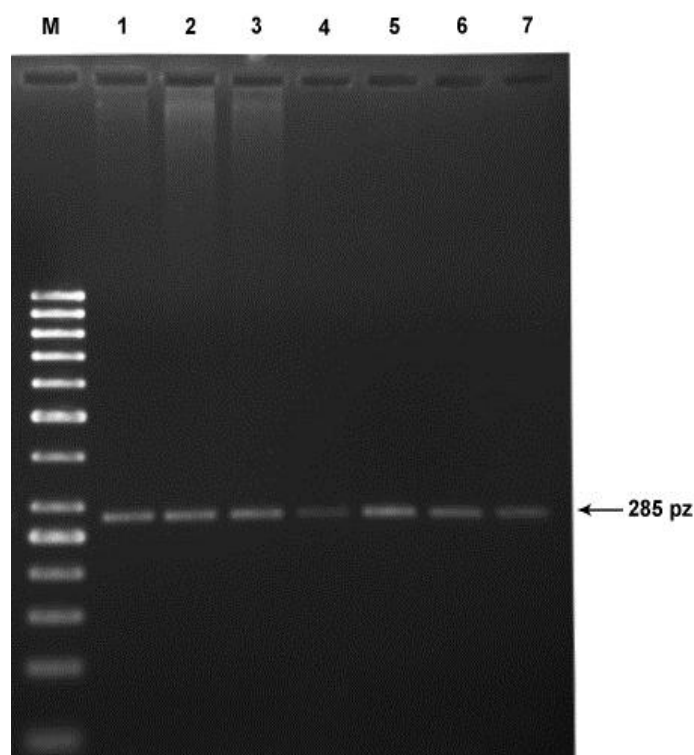
-48A>G DRD1	Grupa badana z ciężką postacią PE (n=49)		Grupa kontrolna (n=120)		WR	95%PU	p
	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>			
Genotypy							
-48AA	22 (44,9)	46,8	42 (35,0)	36,5	1,51	0,72-3,14	0,15
-48AG	23 (46,9)	43,2	61 (50,8)	47,8	0,86	0,41-1,76	0,38
-48GG	4 (8,2)	10,0	17 (14,2)	15,7	0,54	0,14-1,78	0,21
Suma	49 (100,0)	100,0	120 (100,0)	100,0			
Allele							
-48A	67 (68,4)	—	145 (60,4)	—	1,41	0,84-2,42	0,11
-48G	31 (31,6)	—	95 (39,6)	—	0,71	0,41-1,19	0,11
Suma	98 (100,0)		240 (100,0)				



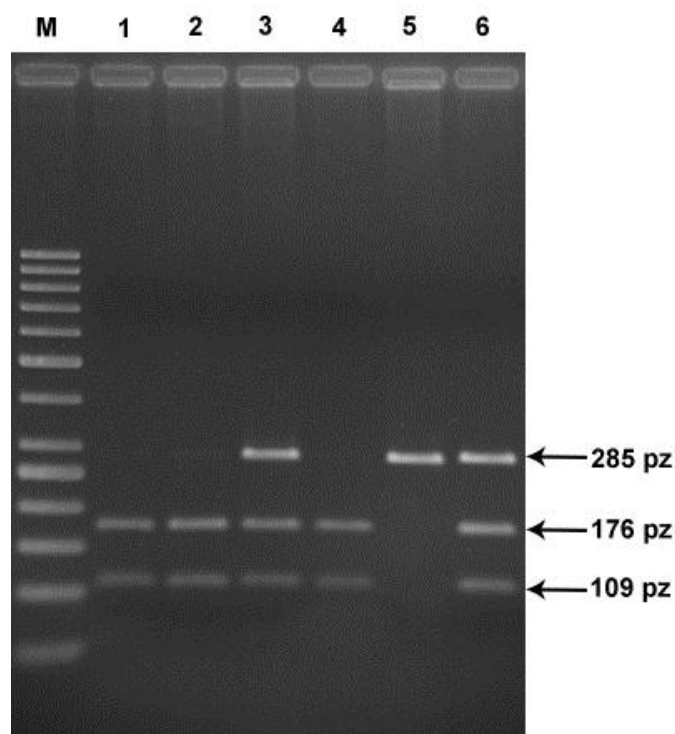
Rycina 7. Częstość występowania genotypów polimorfizmu $-48A>G$ genu *DRD1* w grupie kobiet z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.

4.4.3 Polimorfizm -521C>T genu *DRD4*

W zakresie genu *DRD4* analizowano polimorfizm -521C>T. Poniższa fotografia żelu agarozowego przedstawia produkt o wielkości 285 pz po reakcji PCR (fot. 5). Przykładowy rozkład genotypów tego polimorfizmu po procesie hydrolizy na 2% żelu agarozowym po zastosowaniu enzymu restrykcyjnego *NsbI* (*FspI*) przedstawiono na fotografii 6. Dla genotypu homozygotycznego niezmutowanego -521CC nie istniało miejsce restrykcyjne rozpoznawane przez enzym i uzyskiwano pojedynczy prążek o wielkości 285 pz. Przy obecności genotypu homozygotycznego zmutowanego -521TT uzyskiwano dwa prążki wielkości 176 i 109 pz, natomiast w przypadku obecności genotypu heterozygotycznego -521CT po hydrolizie uwidoczniano wszystkie trzy prążki o wielkości 285, 176 oraz 109 pz (fot. 6).



Fotografia 5. Rozdział elektroforetyczny produktu reakcji PCR w 2% żelu agarozowym dla polimorfizmu -521C>T genu *DRD4*. M-marker wielkości DNA 50 pz; tory 1-7 – produkty PCR.



Fotografia 6. Produkty uzyskane po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *NsbI* (*FspI*). M - marker wielkości 50 pz, tory: 5-homozygota *CC*; 3,6 heterozygoty *CT*; 1,2,4 homozygoty *TT*.

Analizując częstość występowania genotypów w badanych grupach w zakresie polimorfizmu *-521C>T* genu *DRD4* stwierdzono nieznacznie częstsze występowanie genotypu *-521CC* w grupie kontrolnej (17,4% vs. 20,0% w grupie kontrolnej, $WR=0,84$, $p=ns$) oraz podobną dla obu grup częstość występowania genotypu heterozygotycznego *-521CT* (46,9 vs. 46,7% w grupie kontrolnej). Zmutowany genotyp *-521TT* występował nieznacznie częściej w grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym (35,7 vs. 33,3% w grupie kontrolnej, $WR=1,11$, ns). Zaobserwowano również nieznaczną przewagę występowania allela dzikiego *-521C* w grupie kontrolnej (43,3 vs. 40,8% w grupie badanej) oraz zmutowanego allela *-521T* w grupie kobiet z PE (59,2%) w porównaniu z grupą kontrolną (56,7%) ($p=ns$) (tab. 13).

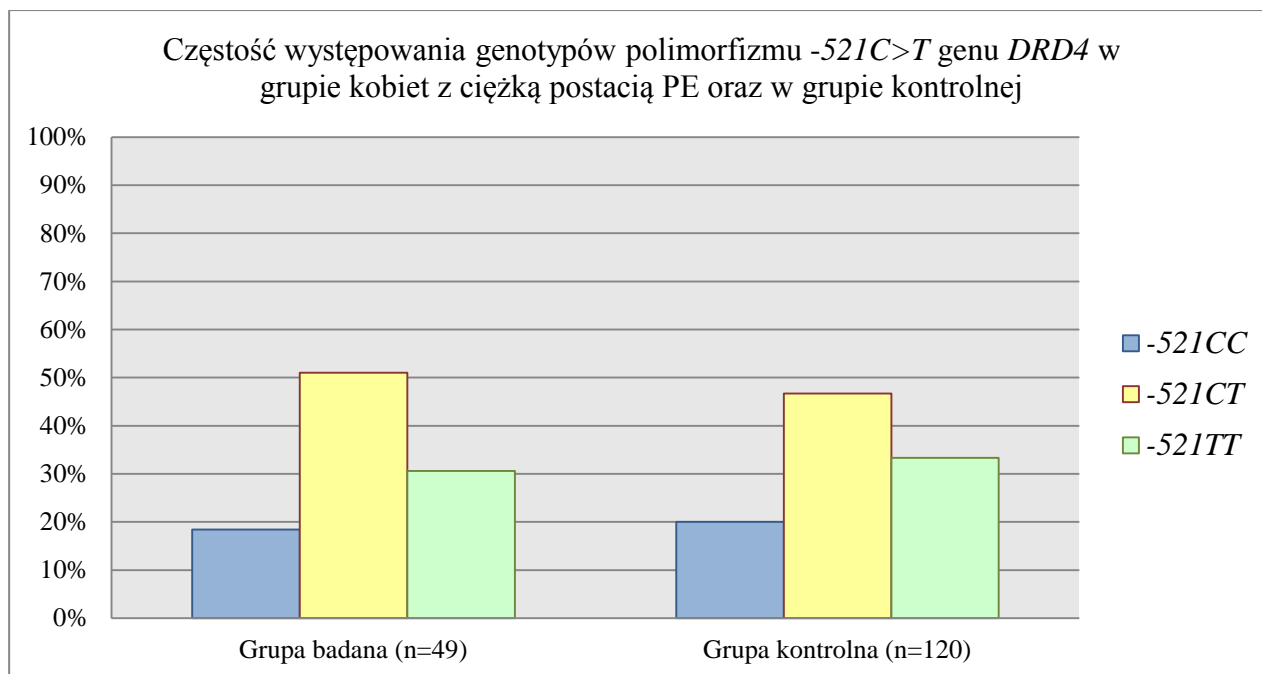
Tabela 13. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-521C>T$ genu *DRD4* w grupie kobiet z PE oraz w grupie kontrolnej.

-521C>T DRD4	Grupa badana z PE (n=98)		Grupa kontrolna (n=120)		WR	95%PU	p
	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>			
Genotypy							
-521CC	17 (17,4)	16,7	24 (20,0)	18,8	0,84	0,42-1,67	0,37
-521CT	46 (46,9)	48,3	56 (46,7)	49,1	1,01	0,59-1,72	0,54
-521TT	35 (35,7)	35,0	40 (33,3)	32,1	1,11	0,63-1,95	0,41
Suma	98 (100,0)	100,0	120 (100,0)	100,0			
Allele							
-521C	80 (40,8)	—	104 (43,3)	—	0,90	0,61-1,32	0,33
-521T	116 (59,2)	—	136 (56,7)	—	1,11	0,76-1,63	0,33
Suma	196 (100,0)		240 (100,0)				

W czasie analizy frekwencji genotypów w podgrupie z ciężką postacią PE w porównaniu do całej grupy kontrolnej zaobserwowano podobną częstość występowania zmutowanego genotypu $-521TT$ (30,6 vs. 33,3% w grupie kontrolnej, ns) oraz zmutowanego allela $-521T$ (56,1 vs. 56,7% w grupie kontrolnej, ns) (tab. 14, ryc. 8).

Tabela 14. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-521C>T$ genu *DRD4* w grupie kobiet z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.

-521C>T DRD4	Grupa badana z ciężką postacią PE (n=49)		Grupa kontrolna (n=120)		WR	95%PU	p
	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>			
Genotypy							
-521CC	9 (18,4)	19,3	24 (20,0)	18,8	0,90	0,34-2,23	0,49
-521CT	25 (51,0)	49,2	56 (46,7)	49,1	1,19	0,58-2,44	0,36
-521TT	15 (30,6)	31,5	40 (33,3)	32,1	0,88	0,39-1,89	0,44
Suma	49 (100,0)	100,0	120 (100,0)	100,0			
Allele							
-521C	43 (43,9)	—	104 (43,3)	—	1,02	0,62-1,68	0,51
-521T	55 (56,1)	—	136 (56,7)	—	0,98	0,59-1,61	0,51
Suma	98 (100,0)		240 (100,0)				



Rycina 8. Częstość występowania genotypów polimorfizmu $-521C>T$ genu *DRD4* w grupie kobiet z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.

4.4.4. Współwystępowanie badanych polimorfizmów w grupach kobiet ze stanem przedrzucawkowym i w grupie kontrolnej

W poniższej tabeli zestawiono współwystępowanie genotypów polimorfizmu $472G>A$ *COMT* oraz $-48A>G$ *DRD1* pomiędzy analizowanymi grupami kobiet – kontrolną i badaną. Na podstawie tej analizy można stwierdzić, iż w obydwu grupach najliczniej zaobserwowano współwystępowanie genotypów heterozygotycznych $472GA$ / $-48AG$. W grupie badanej kombinację jednoczesnego współwystępowania takich właśnie genotypów odnotowano w 22,45%, natomiast w grupie kontrolnej w 22,50%. Warto również zwrócić uwagę na różnicę pomiędzy współwystępowaniem genotypów homozygotycznych niezmutowanych $472GG$ / $-48AA$ w obu grupach – w grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym odnotowano 14,29%, a w grupie kobiet zdrowych 6,67% (WR=2,33, $p=0,051$, PU 0,86-6,70). Być może jednoczesne występowanie dwóch homozygot przyczynia się do zwiększonej predyspozycji do stanu przedrzucawkowego. Zaobserwowano również częstsze współwystępowanie w grupie kontrolnej genotypów $472GG$ / $-48GG$ (1,02 vs. 4,17% w grupie kontrolnej, WR=0,24, $p=0,16$, PU 0,005-2,18) oraz $472AA$ / $-48AG$ (10,20 vs. 15,50%, WR=0,79, $p=0,38$, PU 0,30-2,00) (tab. 15).

Tabela 15. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 472G>A *COMT* oraz -48A>G *DRD1* pomiędzy badanymi grupami kobiet.

			<i>DRD1 -48A>G</i>			<i>Suma</i>
			<i>-48AA</i>	<i>-48AG</i>	<i>-48GG</i>	
Grupa badana z PE <i>n=98</i>	COMT <i>472G>A</i>	472GG	14 (14,29)	13 (13,26)	1 (1,02)	28 (28,57)
		472GA	20 (20,41)	22 (22,45)	7 (7,14)	49 (50,00)
		472AA	9 (9,18)	10 (10,20)	2 (2,04)	21 (21,43)
		Suma	43 (43,88)	45 (45,92)	10 (10,20)	98 (100,00)
Grupa kontrolna <i>n=120</i>	COMT <i>472G>A</i>	472GG	8 (6,67)	19 (15,83)	5 (4,17)	32 (26,67)
		472GA	24 (20,00)	27 (22,50)	10 (8,33)	61 (50,83)
		472AA	10 (8,33)	15 (15,50)	2 (1,67)	27 (22,50)
		Suma	42 (35,00)	61 (50,83)	17 (14,17)	120 (100,00)

W dalszym etapie pracy analizowano współwystępowanie genotypów polimorfizmu 472G>A *COMT* oraz -521C>T *DRD4*. W obu badanych grupach kobiet ze stanem przedrzucawkowym i w grupie kontrolnej najliczniej współwystępowała kombinacja genotypów heterozygotycznych 472GA / -521CT obydwu badanych polimorfizmów genów *COMT* oraz *DRD4*. W grupie badanej ze stanem przedrzucawkowym częstość występowania wynosiła 19,39%, w grupie kontrolnej natomiast 26,67% (WR=0,66, p=0,14, PU 0,33-1,32).

W grupie ze stanem przedrzucawkowym zaobserwowano natomiast częstsze współwystępowanie genotypów 472AA / -521CT z obecnością trzech zmutowanych alleli badanych polimorfizmów (13,27 vs. 8,33% w grupie kontrolnej, WR=1,68, p=0,17, PU 0,64-4,50).

Inna ciekawą obserwacją było częstsze współwystępowanie genotypów 472AA / -521CC w grupie kontrolnej zdrowych kobiet ciężarnych (5,83 vs. 1,02% w grupie kontrolnej, WR=0,16, p=0,06, PU 0,004-1,34) (tab. 16).

Tabela 16. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów 472G>A COMT oraz -521C>T DRD4 pomiędzy badanymi grupami kobiet.

			DRD4 -521C>T			Suma
			-521CC	-521CT	-521TT	
Grupa badana z PE <i>n=98</i>	COMT 472G>A	472GG	3 (3,06)	14 (14,28)	11 (11,22)	28 (28,57)
		472GA	13 (13,27)	19 (19,39)	17 (17,35)	49 (50,00)
		472AA	1 (1,02)	13 (13,27)	7 (7,14)	21 (21,43)
		Suma	17 (17,35)	46 (46,94)	35 (35,71)	98 (100,00)
Grupa kontrolna <i>n=120</i>	COMT 472G>A	472GG	5 (4,17)	14 (11,67)	13 (10,83)	32 (26,67)
		472GA	12 (10,00)	32 (26,67)	17 (14,17)	61 (50,83)
		472AA	7 (5,83)	10 (8,33)	10 (8,33)	27 (22,50)
		Suma	24 (20,00)	56 (46,67)	40 (33,33)	120 (100,00)

Następnie analizowano współwystępowanie genotypów badanych polimorfizmów obydwu genów receptorów DRD: -48A>G DRD1 oraz -521C>T DRD4 pomiędzy grupą badaną i kontrolną. Najciekawszą obserwacją w tym etapie było odnotowanie częstszego współwystępowania genotypów -48AA / -521CT w grupie badanej kobiet ze stanem przedrzucawkowym (23,47 vs. 15,84% w grupie kontrolnej, WR=1,63, p=0,11, PU 0,78-3,41) oraz współwystępowania genotypów heterozygotycznych -48AG / -521CT w grupie kontrolnej zdrowych kobiet ciężarnych (25,00 vs. 18,37% w grupie kontrolnej, WR=0,67, p=0,16, PU 0,33-1,36). Być może takie współwystępowanie dwóch heterozygot może mieć właściwości protekcyjne.

W grupie badanej kobiet ze stanem przedrzucawkowym najrzadziej obserwowano współwystępowanie genotypów homozygotycznych -48GG / -521TT w 2,04%, natomiast w grupie kontrolnej współwystępowanie genotypów homozygotycznych -48GG / -521CC w 3,34% (tab. 17).

Tabela 17. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *-48A>G DRD1* oraz *-521C>T DRD4* pomiędzy badanymi grupami kobiet.

			<i>DRD4 -521C>T</i>			<i>Suma</i>
			<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	
<i>Grupa badana z PE n=98</i>	<i>DRD1 -48A>G</i>	<i>-48AA</i>	5 (5,10)	23 (23,47)	15 (15,31)	43 (43,88)
		<i>-48AG</i>	9 (9,18)	18 (18,37)	18 (18,37)	45 (45,92)
		<i>-48GG</i>	3 (3,06)	5 (5,10)	2 (2,04)	10 (10,20)
		<i>Suma</i>	17 (17,34)	46 (46,94)	35 (35,72)	98 (100,00)
<i>Grupa kontrolna n=120</i>	<i>DRD1 -48A>G</i>	<i>-48AA</i>	7 (5,83)	19 (15,84)	16 (13,33)	42 (35,00)
		<i>-48AG</i>	13 (10,83)	30 (25,00)	18 (15,00)	61 (50,83)
		<i>-48GG</i>	4 (3,34)	7 (5,83)	6 (5,00)	17 (14,17)
		<i>Suma</i>	24 (20,00)	56 (46,67)	40 (33,33)	120 (100,00)

4.4.5. Analiza danych klinicznych pacjentek w zależności od poszczególnych genotypów

4.4.5.1. Dane kliniczne pacjentek w zależności od genotypu polimorfizmu *COMT* 472G>A

Nie odnotowano różnic w średnim wieku badanych kobiet z grupy PE w zależności od poszczególnych genotypów polimorfizmu 472G>A *COMT*. W przeprowadzonej analizie polimorfizmu 472G>A *COMT* nie zaobserwowano również zależności średniego wzrostu (472GG 165,89 vs. 472GA 164,14 vs. 472AA 166,75 cm, ns) oraz średniej masy ciała przed zajściem w ciążę (472GG 67,9 vs. 472GA 65,9 vs. 67,4 kg, ns). W momencie zakończenia ciąży największą masę ciała zaobserwowano w grupie ciężarnych z genotypem 472GG 84,4 kg; a najmniejszą w grupie ciężarnych z genotypem 472AA 78,11 kg, ns.

Ciekawą obserwacją było odnotowanie najniższych wartości ciśnienia tętniczego krwi skurczowego i rozkurczowego w podgrupie ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym z genotypem 472AA (odpowiednio ciśnienie skurczowe 163,1 mmHg oraz rozkurczowe 101,9 mmHg). Najwyższe ciśnienie skurczowe i rozkurczowe odnotowano u kobiet ze stanem przedrzucawkowym nosicielek genotypu 472GG (odpowiednio ciśnienie skurczowe 174,5 mmHg oraz rozkurczowe 107,5 mmHg, ns).

Następnie przeanalizowano parametry biochemiczne krwi i moczu. Zaobserwowano porównywalne średnie wartości hemoglobiny (472GG 7,14 vs. 472GA 7,11 vs. 472AA 7,63 mmol/L, ns), erytrocytów (472GG 3,86 vs. 472GA 3,82 vs. 472AA 3,79 T/L, ns), leukocytów (472GG 13,57 vs. 472GA 12,76 vs. 472AA 12,70 G/L, ns) oraz hematokrytu (472GG 0,33 vs. 472GA 0,33 vs. 472AA 0,33 L/L, ns). Najwyższe stężenie płytek krwi oznaczono u kobiet z genotypem 472GA ($204,41 \pm 67,63$ G/L), najniższe dla genotypu 472AA $173,54 \pm 68,89$ G/L, ns.

Analiza parametrów biochemicznych pokazała najwyższe średnie stężenie mocznika w podgrupie ciężarnych z genotypem 472GG, gdzie wartość ta wynosiła 33,83 mg/dL, natomiast najniższa w przypadku podgrupy ciężarnych nosicielek genotypu 472GA (28,37 mg/dL, ns). Wartości średniego stężenia kwasu moczowego wynosiły odpowiednio: 6,58 mg/dL w podgrupie 472GG 6,72 mg/dL w podgrupie 472GA oraz 6,47 mg/dL w podgrupie 472AA, ns. W czasie dalszej analizy odnotowano najwyższe średnie stężenie białka całkowitego w podgrupie 472AA 5,77 g/L, natomiast najniższą w podgrupie 472GG 5,62 g/L, ns. Średnie wartości BUN przedstawiały się odpowiednio: dla genotypu 472GG 17,71 mg/dL, dla genotypu 472GA 13,76 mg/dL oraz dla genotypu 472AA 14,42, ns. Oznaczono i porównano także średni poziom białkomoczu w badanej grupie ciężarnych ze stanem

przedrzucawkowym. Najwyższe średnie stężenie zaobserwowano u ciężarnych z genotypem 472GA 317,86 mg/dL, najniższe u ciężarnych z genotypem 472AA 246,43 mg/dL, ns.

Ostatnią wartością, którą analizowano była średnia, dobowa dawka metyldopy w badanej grupie ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym w zależności od oznaczonych genotypów polimorfizmu 472G>A *COMT*. Najwyższa średnia dobowa dawka metyldopa została zastosowana w podgrupie ciężarnych z genotypem niezmutowanym 472GG i wynosiła 1566,3 mg, najniższa natomiast u ciężarnych z genotypem 472AA (1452,4 mg), co koreluje z wartościami nadciśnienia tętniczego krwi, które u kobiet z genotypem homozygotycznym 472AA było najniższe. Dane zaprezentowano w tabeli 18.

Tabela 18. Dane kliniczne pacjentek z grupy badanej z PE w zależności od genotypów polimorfizmu *COMT* 472G>A.

Dane kliniczne pacjentek	COMT 472G>A			p
	genotyp			
	472GG	472GA	472AA	
wiek (lata) średnia ± SD zakres mediana	28,6±5,6 21-42 27,5	31,2±5,3 22-45 30,5	29,3±5,2 18-38 31	0,10
wzrost (cm) średnia ± SD zakres mediana	165,9±7,0 140-175 168	164,1±6,4 149-176 164	166,7±6,8 152-180 167,5	0,28
masa ciała przed ciążą (kg) średnia ± SD zakres mediana	67,9±23,6 46-150 65	65,9±14,1 42-108 62,5	67,4±15,8 49-104 68	0,89
masa ciała w ciąży (kg) średnia ± SD zakres mediana	84,4 ± 21,1 53-157 80,25	81,9 ± 13,9 55-115 80	78,1 ± 15,1 50-110 75,5	0,45
RR syst. średnia ± SD zakres mediana	171,1 ± 19,4 140-210 167,5	174,5 ± 21,4 120-220 170	163,1 ± 21,2 140-220 160	0,12
RR diast. średnia ± SD zakres mediana	107,3 ± 13,6 90-140 110	107,5 ± 14,6 90-160 110	101,9 ± 11,8 90-130 100	0,27

Tabela 18. cd. Dane kliniczne pacjentek z grupy badanej z PE w zależności od genotypów polimorfizmu *COMT 472G>A*.

Dane kliniczne pacjentek	<i>COMT 472G>A</i>			<i>p</i>
	<i>genotyp</i>			
	<i>472GG</i>	<i>472GA</i>	<i>472AA</i>	
Hb (mmol/L) średnia ± SD zakres mediana	7,14 ± 1,12 5,2-10,9 7	7,11 ± 1,59 4,8-13,6 6,9	7,63 ± 1,77 5,21-11,7 7,2	0,40
E (T/L) średnia ± SD zakres mediana	3,86 ± 0,42 2,83-4,44 3,99	3,82 ± 0,54 2,6-4,95 3,84	3,79 ± 0,50 2,56-4,65 3,82	0,90
L (G/L) średnia ± SD zakres mediana	13,57 ± 5,06 7,2-25,4 12,7	12,76 ± 4,29 6,2-25,29 12,6	12,70 ± 4,41 7,7-22,95 11,3	0,73
Htk (L/L) średnia ± SD zakres mediana	0,33 ± 0,04 0,23-0,40 0,34	0,33 ± 0,04 0,23-0,43 0,33	0,33 ± 0,04 0,24-0,39 0,34	0,86
PI (G/L) średnia ± SD zakres mediana	193,78 ± 66,64 71-320 199	204,41 ± 67,63 70-352 214	173,54 ± 68,89 47-307 177	0,22
mocznik (mg/dL) średnia ± SD zakres mediana	33,83 ± 15,93 14,3-81,6 29,73	28,37 ± 13,54 14,2-92,52 27	31,11 ± 13,04 12,57-58,57 28,58	0,28
kwasicz moczowy (mg/dL) średnia ± SD zakres mediana	6,58 ± 1,34 4,8-10,48 6,47	6,72 ± 1,29 4,42-9,43 6,6	6,47 ± 1,42 3,57-9 7	0,77
białko całkowite (g/L) średnia ± SD zakres mediana	5,62 ± 0,66 4,24-6,68 5,56	5,67 ± 0,82 2,9-8,76 5,68	5,77 ± 0,74 4,28-7,29 5,99	0,75
BUN (mg/dL) średnia ± SD zakres mediana	17,71 ± 6,37 10,69-31,88 15,56	13,76 ± 4,33 7,91-21,94 12,87	14,42 ± 7,34 7,26-27,35 12,5	0,09
białkomocz (mg/dL) średnia ± SD zakres mediana	316,07 ± 205,84 75-500 500	317,86 ± 191,21 75-500 500	246,43 ± 170,16 75-500 150	0,33
dawka metyldopy (mg) średnia ± SD zakres mediana	1544,6 ± 601,1 750-3000 1500	1566,3 ± 583,6 250-3000 1500	1452,4 ± 620,6 500-3000 1500	0,76

Poniżej przedstawiono dane kliniczne pacjentek z grupy kontrolnej w zależności od ich genotypów polimorfizmu *472G>A COMT*. Nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych pomiędzy średnimi wartościami wieku (*472GG* 28,1 vs. *472GA* 28,7 vs. *472AA* 29,7 lat) oraz wzrostu (*472GG* 166,4 vs. *472GA* 167,7 vs. *472AA* 167,7 cm) u pacjentek z grupy kontrolnej. Również średnie wartości masy ciała przed ciążą oraz w momencie jej zakończenia nie różniły się w zależności od poszczególnych genotypów. Pacjentki z genotypem *472GG* miały nieznacznie niższą masę ciała $58,9 \pm 7,8$ kg przed ciążą i $72,8 \pm 9,9$ kg w momencie jej zakończenia, najwyższą masę miały kobiety z genotypem *472GA* $61,3 \pm 10,9$ kg przed zajściem w ciążę, natomiast kobiety z genotypem *472AA* miały najwyższą masę w momencie ukończenia ciąży $77,2 \pm 9,5$ kg.

Wartości parametrów ciśnienia krwi były bardzo zbliżone dla poszczególnych genotypów i wynosiły dla ciśnienia skurczowego w przypadku genotypu *472GG* 107,9 mmHg, dla heterozygotycznego genotypu *472GA* 108,6 mmHg oraz dla genotypu zmutowanego *472AA* 108,2 mmHg (ns). Podobnie średnie wartości ciśnienia rozkurczowego były porównywalne w podgrupach w zależności od oznaczonego genotypu (*472GG* 67,9 vs. *472GA* 67,1 vs. *472AA* 67,0 mmHg).

Następnie porównano średnie wartości parametrów biochemicznych krwi. Porównując wartości hemoglobiny, średnie wartości erytrocytów, wartości leukocytów oraz hematokrytu nie stwierdzono żadnych różnic statystycznie istotnych pomiędzy poszczególnymi podgrupami kobiet z grupy kontrolnej. Nieznacznie różniły się średnie wartości płytek krwi (*472GG* 190,48 vs. *472GA* 220,46 vs. *472AA* 222,46 G/L, $p=0,02$). Wszystkie parametry zaprezentowano w tabeli 19.

Tabela 19. Dane kliniczne pacjentek z grupy kontrolnej w zależności od genotypów polimorfizmu *COMT 472G>A*.

Grupa kontrolna - dane kliniczne i laboratoryjne	<i>COMT 472G>A</i>			<i>p</i>
	<i>genotyp</i>			
	<i>472GG</i>	<i>472GA</i>	<i>472AA</i>	
wiek (lata) średnia ± SD zakres mediana	28,1 ± 5,2 20 - 42 28	28,7 ± 4,6 18 - 41 29	29,7 ± 4,7 19 - 39 29	0,40
wzrost (cm) średnia ± SD zakres mediana	166,4 ± 5,1 160 - 180 165	167,7 ± 5,2 150 - 178 168	167,7 ± 4,4 160 - 175 168	0,44
masa ciała przed ciążą (kg) średnia ± SD zakres mediana	58,9 ± 7,9 46 - 80 58	61,3 ± 10,9 40 - 97 60	59,9 ± 6,9 50 - 82 60	0,51
masa ciała w ciąży (kg) średnia ± SD zakres mediana	72,8 ± 9,9 54 - 97 70	75,8 ± 11,2 52 - 106 75	77,2 ± 9,5 59 - 97 76	0,25
RR syst. średnia ± SD zakres mediana	107,9 ± 10,2 90 - 130 110	108,6 ± 11,2 90 - 130 110	108,2 ± 12,7 90 - 130 110	0,96
RR diast. średnia ± SD zakres mediana	67,9 ± 8,8 50 - 80 70	67,1 ± 8,3 50 - 80 70	67,0 ± 9,1 50 - 80 60	0,89
Hb (mmol/L) średnia ± SD zakres mediana	6,76 ± 0,80 4,67 - 7,98 6,825	6,71 ± 0,79 4,92 - 8,8 6,63	6,69 ± 0,80 4,5 - 7,88 6,84	0,93
E (T/L) średnia ± SD zakres mediana	3,66 ± 0,44 2,5 - 4,41 3,64	3,68 ± 0,45 2,57 - 4,81 3,7	3,69 ± 0,47 2,52 - 4,49 3,7	0,96
L (G/L) średnia ± SD zakres mediana	16,13 ± 4,63 9,46 - 29,48 15,365	17,42 ± 5,18 8,27 - 28,66 16,95	16,34 ± 4,14 10,7 - 25,2 15,89	0,40
Htk (L/L) średnia ± SD zakres mediana	0,32 ± 0,04 0,23 - 0,396 0,3225	0,32 ± 0,04 0,238 - 0,42 0,32	0,32 ± 0,04 0,219 - 0,39 0,322	0,90
PI (G/L) średnia ± SD zakres mediana	190,48 ± 44,97 116 - 314 188,5	220,46 ± 49,49 129 - 368 213	222,46 ± 63,76 114 - 381 208,7	0,02*

4.4.5.2. Dane kliniczne pacjentek w zależności od genotypu polimorfizmu *DRD1* -48A>G

W tabeli 20 przedstawiono dane kliniczne pacjentek ze stanem przedrzucawkowym porównane w zależności od genotypów polimorfizmu -48A>G receptora *DRD1*. Średnia wartość wieku (-48AA 29,6 vs. -48AG 30,5 vs. -48GG 30,0 lat, ns) oraz wzrostu (-48AA 164,0 vs. -48AG 166,4 vs. -48GG 164,8 cm, ns) badanych pacjentek PE w poszczególnych podgrupach nie różniły się pomiędzy sobą. Najwyższą masę ciała przed zajściem w ciążę zaobserwowano u pacjentek z genotypem -48AG (69,6 kg), najniższą natomiast u pacjentek z genotypem -48GG (64,0 kg). W przypadku masy ciała w momencie zakończenia ciąży pacjentki z genotypem -48GG również miały najwyższą masę (84,6 kg), najniższą (75,0 kg) pacjentki z genotypem -48AA.

Ciekawe spostrzeżenia dotyczyły wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w zależności od genotypów badanego polimorfizmu. Średnie skurczowe ciśnienie tętnicze krwi było wyższe u pacjentek z genotypem homozygotycznym zmutowanym -48GG (173,0 mmHg) oraz heterozygotycznym -48AG (174,1 mmHg), a najniższe u pacjentek z genotypem homozygotycznym niezmutowanym -48AA (167,4 mmHg, ns). Podobną tendencję obserwowano w przypadku średnich wartości ciśnienia rozkurczowego (-48AA 104,1 vs. -48AG 108,0 vs. -48GG 107,5, ns). Następnymi analizowanymi danymi były parametry biochemiczne krwi. Najwyższe średnie stężenie hemoglobiny 7,7 mmol/L oznaczono w przypadku pacjentek z genotypem -48GG, najniższe 7,1 mmol/L u pacjentek z genotypem homozygotycznym -48AA. Średni poziom erytrocytów, leukocytów, hematokrytu oraz płytek nie różniły się znacznie (ns) pomiędzy podgrupami wyznaczonymi w zależności od genotypów badanego polimorfizmu. Najwyższe stężenia mocznika oznaczono u pacjentek z genotypem heterozygotycznym -48AG 32,67 mg/dL, najniższe u pacjentek z genotypem homozygotycznym zmutowanym -48GG – 23,32 mg/dL. Wartości kwasu moczowego były nieznacznie niższe u kobiet z genotypem -48GG i wynosiły średnio 5,84 mg/dL, dla pozostałych dwóch grup były one zbliżone i wynosiły odpowiednio 6,70 mg/dL oraz 6,74 mg/dL, odpowiednio dla pacjentek z genotypami -48AA i -48AG. Wartości stężenia białka całkowitego w przypadku pacjentek z genotypem -48GG wynosiły 6,07 g/L, najniższa wartość 5,61 g/L oznaczona została u pacjentek z genotypem -48AG. Średnia wartość BUN dla kobiet z grupy -48AG wynosiła 15,38 mg/dL, a dla kobiet z grupy -48GG 12,61 mg/dL. Dla tej grupy stwierdzono również niższy średni poziom białkomoczu 275,00 mg/dL, najwyższy 305,81 mg/dL oznaczono w grupie z genotypem -48AA. Porównano również średnią dobową dawkę metyldopy. Dawki te były porównywalne w badanych podgrupach (-48AA 1534,9 vs. -48AG 1566,7 vs. -48GG 1400,0 mg, ns) (tab. 20).

Tabela 20. Dane kliniczne pacjentek z grupy badanej z PE w zależności od genotypów polimorfizmu *-48A>G DRD1*.

Dane kliniczne pacjentek	<i>DRD1 -48A>G</i>			<i>p</i>
	<i>genotyp</i>			
	<i>-48AA</i>	<i>-48AG</i>	<i>-48GG</i>	
wiek (lata) średnia ± SD zakres mediana	29,6 ± 5,8 21-45 29	30,5 ± 5,2 18-42 30	30,0 ± 5,6 22-43 30,5	0,74
wzrost (cm) średnia ± SD zakres mediana	164,0 ± 6,3 149-176 165	166,4 ± 7,2 140-180 166	164,8 ± 5,1 155-171 164,5	0,27
masa ciała przed ciążą (kg) średnia ± SD zakres mediana	64,3 ± 18,9 42-150 62	69,6 ± 17,6 46-128 65	64,0 ± 10,1 50-77 62,5	0,36
masa ciała w ciąży (kg) średnia ± SD zakres mediana	79,5 ± 18,4 50-157 78	84,6 ± 16,3 55-139,5 81	79,5 ± 11,4 67-105 35	0,35
RR syst. średnia ± SD zakres mediana	167,4 ± 19,7 120-210 165	174,1 ± 22,9 140-220 170	173,0 ± 17,7 140-200 170	0,32
RR diast. średnia ± SD zakres mediana	104,1 ± 14,9 90-160 100	108,0 ± 12,9 90-140 110	107,5 ± 12,8 90-120 110	0,39
Hb (mmol/L) średnia ± SD zakres mediana	7,05 ± 1,62 4,8-13,6 6,9	7,30 ± 1,40 5,1-12,9 7,24	7,72 ± 1,57 6-11,7 7,55	0,42
E (T/L) średnia ± SD zakres mediana	3,70 ± 0,49 2,56-4,53 3,71	3,91 ± 0,49 2,83-4,91 4,02	3,98 ± 0,46 3,47-4,95 4,03	0,09
L (G/L) średnia ± SD zakres mediana	12,63 ± 4,91 6,97-25,4 11,3	13,39 ± 4,43 6,2-25,29 12,59	12,63 ± 3,04 8,35-17,19 12,51	0,71
Htk (L/L) średnia ± SD zakres mediana	0,32 ± 0,04 0,23-0,43 0,33	0,33 ± 0,04 0,23-0,4 0,34	0,35 ± 0,03 0,29-0,4 0,35	0,13
PI (G/L) średnia ± SD zakres mediana	190,89 ± 66,88 69-320 198	196,23 ± 70,47 47-352 198	205,01 ± 67,29 118-304 196,05	0,83

Tabela 20. cd Dane kliniczne pacjentek z grupy badanej z PE w zależności od genotypów polimorfizmu *-48A>G DRD1*.

Dane kliniczne pacjentek	<i>DRD1 -48A>G</i>			<i>p</i>
	<i>genotyp</i>			
	<i>-48AA</i>	<i>-48AG</i>	<i>-48GG</i>	
mocznik (mg/dL) średnia ± SD zakres mediana	30,12 ± 11,24 14,20-61,14 29,02	32,67 ± 17,41 12,57- 92,52 28,21	23,32 ± 8,19 16,60-43,64 19,93	0,17
kwas moczowy (mg/dL) średnia ± SD zakres mediana	6,70 ± 1,33 4,6-10,48 6,53	6,74 ± 1,35 3,57-9,43 6,4	5,84 ± 0,92 4,5-7,21 5,71	0,14
białko całkowite (g/L) średnia ± SD zakres mediana	5,65 ± 0,75 4,29-8,76 5,59	5,61 ± 0,78 5,36-7,5 5,55	6,07 ± 0,55 5,2-7,29 6,13	0,21
BUN (mg/dL) średnia ± SD zakres mediana	15,02 ± 5,49 7,26-28,55 14,66	15,38 ± 5,86 7,34-31,88 14,11	12,61 ± 5,56 8,1-20,38 10,98	0,67
białkomocz (mg/dL) średnia ± SD zakres mediana	305,81 ± 188,73 150-500 300	304,44 ± 197,23 75-500 300	275 ± 195,79 75-500 150	0,89
dawka metyldopy (mg) średnia ± SD zakres mediana	1534,9 ± 591,6 500-3000 1500	1566,7 ± 608,7 250-3000 1500	1400,0 ± 555,3 750-2500 1500	0,73

W tabeli 21 przedstawiono dane kliniczne kobiet z grupy kontrolnej w zależności od genotypów polimorfizmu *-48A>G DRD1*. Jako pierwsze porównano średni wiek i wzrost kobiet. Obserwowano zbliżone do siebie wartości średnich w zakresie wieku (*-48AA* 28,9 vs. *-48AG* 28,8 vs. *-48GG* 28,2) i wzrostu (*-48AA* 167,5 vs. *-48AG* 167,1 vs. *-48GG* 168,2) kobiet w grupie kontrolnej. W przypadku masy ciała zaobserwowano pewnie rozbieżności. Największą masę ciała 64,4 kg przed ciążą oraz 79,5 kg w momencie zakończenia ciąży miały pacjentki z genotypem zmutowanym *-48GG*. Najniższą masę natomiast przed zajściem w ciążę 59,1 kg oraz w momencie zakończenia ciąży 75,1 kg potwierdzono u pacjentek z genotypem *-48AA*.

Wartości średniego ciśnienia krwi były podobne w poszczególnych podgrupach. Średnie ciśnienie skurczowe wynosiło odpowiednio 109,3 mmHg u kobiet z genotypem *-48AA*, 107,7 mmHg u kobiet z genotypem *-48AG* oraz 108,24 mmHg u kobiet z genotypem *-48GG*. Średnie ciśnienie rozkurczowe wynosiło 67,62 mmHg dla genotypu *-48AA*, 66,80 mmHg dla genotypu *-48AG* oraz 68,53 mmHg dla genotypu *-48GG*. Oznaczono również parametry biochemiczne krwi. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pomiędzy

poszczególnymi grupami kobiet w zakresie wartości stężeń hemoglobiny, liczby erytrocytów, leukocytów oraz wartości hematokrytu. Najwyższą średnią wartość liczby płytek krwi obserwowano w podgrupie kobiet z genotypem *-48GG* 224,4 G/L, najniższą natomiast wartość 207,3 G/L dla kobiet z genotypem *-48AG* (tab. 21).

Tabela 21. Dane kliniczne pacjentek z grupy kontrolnej w zależności od genotypów polimorfizmu -48A>G DRD1.

Grupa kontrolna – dane kliniczne i laboratoryjne	DRD1 -48A>G			p
	genotyp			
	-48AA	-48AG	-48GG	
wiek (lata) średnia ± SD zakres mediana	28,9 ± 4,9 19 - 41 28,00	28,8 ± 4,5 19 - 42 29,00	28,2 ± 5,3 18 - 36 29,00	0,89
wzrost (cm) średnia ± SD zakres mediana	167,5 ± 5,4 150 - 180 168,00	167,1 ± 4,5 160 - 177 168,00	168,2 ± 5,6 160 - 178 168,00	0,72
masa ciała przed ciążą (kg) średnia ± SD zakres mediana	59,1 ± 7,0 46 - 75 59,50	60,1 ± 9,0 46 - 92 58,00	64,4 ± 14,2 40 - 97 63,00	0,14
masa ciała w ciąży (kg) średnia ± SD zakres mediana	75,1 ± 9,8 57 - 93 75,00	74,4 ± 9,7 54 - 104 74,00	79,5 ± 14,2 52 - 106 79,00	0,21
RR syst. średnia ± SD zakres mediana	109,3 ± 12,1 90 - 130 110,00	107,7 ± 10,5 90 - 130 110,00	108,2 ± 11,9 90 - 130 105,00	0,78
RR diast. średnia ± SD zakres mediana	67,6 ± 8,5 50 - 80 70,00	66,8 ± 8,7 50 - 80 70,00	68,5 ± 8,3 60 - 80 70,00	0,74
Hb (mmol/L) średnia ± SD zakres mediana	6,73 ± 0,7 5,19 - 8,8 6,68	6,67 ± 0,83 4,5 - 8,23 6,80	6,87 ± 0,88 5,21 - 8,15 6,95	0,64
E (T/L) średnia ± SD zakres mediana	3,68 ± 0,42 2,63 - 4,75 3,63	3,64 ± 0,43 2,5 - 4,54 3,70	3,8 ± 0,57 2,8 - 4,81 3,82	0,45
L (G/L) średnia ± SD zakres mediana	17,11 ± 4,7 9,46 - 28,66 16,51	16,76 ± 4,74 9,62 - 29,48 16,10	16,38 ± 5,59 8,27 - 28,09 14,80	0,86
Htk (L/L) średnia ± SD zakres mediana	0,32 ± 0,04 0,24 - 0,42 0,32	0,32 ± 0,04 0,219 - 0,4 0,32	0,33 ± 0,04 0,25 - 0,4 0,33	0,58
PI (G/L) średnia ± SD zakres mediana	215,87 ± 45,86 129 - 381 207,00	207,33 ± 56,56 114 - 362 206,00	224,4 ± 56,88 165 - 368 203,00	0,46

4.4.5.3. Dane kliniczne pacjentek w zależności od genotypu polimorfizmu *DRD4 -521C>T*

W dalszym etapie porównano dane kliniczne i laboratoryjne pacjentek w zależności od genotypów polimorfizmu *DRD4 -521C>T*. Średnia wieku (-521CC 30,3 vs. -521CT 29,7 vs. -521TT 30,4 lat. ns) oraz wzrostu (-521CC 164,5 vs. -521CT 166,5 -521TT 163,9 cm, ns) pacjentek w poszczególnych podgrupach nie różniły się statystycznie istotnie.

Również masa ciała przed ciążą (-521CC 67,2 vs. -521CT 66,9 vs. -521TT 66,4 kg, ns) oraz w momencie zakończenia ciąży (-521CC 83,3 vs. -521CT 83,0 vs. -521TT 79,6 kg, ns) nie różnił się istotnie pomiędzy podgrupami.

Podobnie nie odnotowano znaczących różnic pomiędzy wartościami średniego ciśnienia skurczowego (-521CC 173,5 vs. -521CT 170,3 vs. 170,9 mmHg, ns) oraz rozkurczowego (-521CC 107,1 vs. -521CT 105,9 vs. -521TT 106,1 mmHg, ns) w podgrupach badanych pacjentek z PE.

Pacjentki porównano również po względem parametrów biochemicznych krwi i moczu. Średnie stężenie hemoglobiny, płytek krwi, liczba erytrocytów, leukocytów oraz wartości hematokrytu również były zbliżone pomiędzy poszczególnymi podgrupami kobiet z PE, jednak odnotowano różnice statystycznie istotne pomiędzy wartościami erytrocytów i hematokrytu. Zwraca uwagę fakt różnic statystycznie istotnych przy porównaniu średnich wartości białka całkowitego w surowicy pomiędzy podgrupami pacjentek z PE. W podgrupie z genotypem -521CC zaobserwowano najwyższe wartości białka w surowicy (6,17 g/L). Mniejsze wartości odnotowano w podgrupie z genotypem -521CT (5,57 g/L) oraz z genotypem -521TT (5,59 g/L, p=0,02).

Stężenia mocznika było podobne we wszystkich grupach 31,32 mg/dL dla genotypu -521CC, 29,96 mg/dL dla genotypu -521CT oraz 30,89 dla genotypu -521TT (ns).

Średnie wartości kwas moczowego oraz BUN w surowicy krwi nie różniły się statystycznie istotnie. Natomiast odnotowano wyższe stężenie białka w moczu w podgrupie z genotypem -521CC (310,29 mg/dL) oraz -521CT (322,83 mg/dL) w porównaniu do najniższych wartości dla genotypu -521TT (270,71 mg/dL). Ostatnim parametrem była średnia dawka metyldopy – najwyższą stosowano u pacjentek z genotypem -521CT (1570,7 mg), najniższą u pacjentek z genotypem -521CC (1500,0 mg), jednakże różnice te nie były statystycznie istotne (tab. 22).

Tabela 22. Dane kliniczne pacjentek z grupy badanej z PE w zależności od genotypu polimorfizmu *DRD4 -521C>T*.

Dane kliniczne pacjentek	<i>DRD4 -521 C>T</i>			<i>p</i>
	<i>genotyp</i>			
	<i>-521CC</i>	<i>-521CT</i>	<i>-521TT</i>	
wiek (lata) średnia ± SD zakres mediana	30,3 ± 5,4 22 - 42 29,00	29,7 ± 5,4 18 - 43 29,50	30,44 ± 5,8 22 - 45 30,50	0,82
wzrost (cm) średnia ± SD zakres mediana	164,5 ± 8,9 140 - 176 166,00	166,5 ± 5,4 155 - 180 166,50	163,9 ± 6,8 149 - 175 164,00	0,20
masa ciała przed ciążą (kg) średnia ± SD zakres mediana	67,2 ± 11,51 46 - 90 65,00	66,9 ± 18,91 49 - 150 62,00	66,4 ± 18,76 42 - 128 63,00	0,98
masa ciała w ciąży (kg) średnia ± SD zakres mediana	83,3 ± 13,55 55 - 110,5 80,00	83,0 ± 16,99 62 - 157 82,00	79,6 ± 18,37 50 - 139,5 76,00	0,62
RR syst. średnia ± SD zakres mediana	173,5 ± 19,4 140 - 210 170,00	170,3 ± 21,2 140 - 220 170,00	170,9 ± 22,3 120 - 220 165,00	0,87
RR diast. średnia ± SD zakres mediana	107,1 ± 13,9 90 - 140 100,00	105,9 ± 15,3 90 - 160 105,00	106,1 ± 11,9 90 - 120 105,00	0,96
Hb (mmol/L) średnia ± SD zakres mediana	6,92 ± 1,57 5,2 - 11,7 6,70	7,47 ± 1,58 5,21 - 13,6 7,36	7,07 ± 1,39 4,8 - 11,4 6,99	0,34
E (T/L) średnia ± SD zakres mediana	3,64 ± 0,42 2,96 - 4,38 3,70	3,95 ± 0,45 2,56 - 4,91 4,06	3,75 ± 0,55 2,6 - 4,95 3,93	0,05
L (G/L) średnia ± SD zakres mediana	11,3 ± 2,97 7 - 16,3 10,94	13,24 ± 4,77 6,2 - 25,29 12,85	13,39 ± 4,67 7,63 - 25,4 12,42	0,26
Htk (L/L) średnia ± SD zakres mediana	0,31 ± 0,04 0,25 - 0,38 0,31	0,34 ± 0,04 0,24 - 0,43 0,34	0,32 ± 0,05 0,23 - 0,4 0,32	0,04

Tabela 22. cd Dane kliniczne pacjentek z grupy badanej z PE w zależności od genotypu polimorfizmu *DRD4 -521C>T*.

Dane kliniczne pacjentek	<i>DRD4 -521 C>T</i>			<i>p</i>
	<i>genotyp</i>			
	<i>-521CC</i>	<i>-521CT</i>	<i>-521TT</i>	
PI (G/L) średnia ± SD zakres mediana	205,56 ± 69,2 94 - 309 192,50	185,18 ± 65,61 47 - 292 202,00	202,43 ± 70,77 81 - 352 198,00	0,42
mocznik (mg/dL) średnia ± SD zakres mediana	31,32 ± 18,66 15,2 - 92,52 26,28	29,96 ± 14,05 12,57 - 81,6 27,56	30,89 ± 12,29 14,2 - 61,14 29,40	0,93
kwaz moczowy (mg/dL) średnia ± SD zakres mediana	6,81 ± 1,13 4,83 - 8,5 7,09	6,5 ± 1,28 3,57 - 9,43 6,47	6,71 ± 1,48 4,41 - 10,48 6,69	0,66
białko całkowite (g/L) średnia ± SD zakres mediana	6,17 ± 0,94 4,5 - 8,76 6,15	5,57 ± 0,72 2,9 - 7,29 5,57	5,59 ± 0,62 4,36 - 6,68 5,48	0,02*
BUN (mg/dL) średnia ± SD zakres mediana	12,92 ± 4,24 7,91 - 20,38 12,00	16,14 ± 6,71 8,1 - 31,88 15,32	15,09 ± 5,19 7,26 - 28,55 14,27	0,36
białkomocz (mg/dL) średnia ± SD zakres mediana	310,29 ± 190,82 75 - 500 300,00	322,83 ± 190,53 75 - 500 500,00	270,71 ± 194,74 75 - 500 150,00	0,47
dawka metyldopy (mg) średnia ± SD zakres mediana	1500,0 ± 612,4 500-3000 1500	1570,7 ± 595,5 500-300 1500	1507,1 ± 592,5 250-3000 1500	0,86

W tabeli 23 przedstawiono dane kliniczne pacjentek z grupy kontrolnej w zależności od rodzaju oznaczonego genotypu. Średnia wieku (-521CC 29,5 vs. -521CT 28,4 vs. -521TT 28,8 lat, ns) oraz wzrostu (-521CC 168,6 vs. -521CT 167,4 vs. -521TT 166,6 cm, ns) obliczona dla pacjentek w zależności od genotypów polimorfizmu -521C>T nie różniła się statystycznie istotnie. Najmniejszą masą ciała charakteryzowały się kobiety z genotypem -521CT, średnia masa przed ciążą wynosiła w tej grupie 58,61 kg, natomiast w momencie zakończenia ciąży 73,75 kg (p=0,007). Największą masę obliczono dla pacjentek z genotypem -521CC, odpowiednio 65,58 kg oraz 79,79 kg dla masy ciała przed zajściem w ciążę oraz w momencie zakończenia ciąży, była to różnica znamienna statystycznie (p=0,007). Wartości skurczowego (-521CC 111,0 vs. -521CT 106,6 vs. -521TT 109,1 mmHg, ns) oraz rozkurczowego (-521CC 68,5 vs. -521CT 66,6 vs. -521TT 67,6 mmHg, ns) ciśnienia nie różniły się znamiennie.

Kolejnymi parametrami były parametry biochemiczne krwi. Porównując je nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie. Średnie stężenia hemoglobiny wahały się pomiędzy 6,87 mmol/L a 6,55 mmol/L (ns). Średnia liczba erytrocytów, leukocytów, płytek krwi oraz wartość hematokrytu były do siebie zbliżone (tab. 23).

Tabela. 23. Dane kliniczne pacjentek z grupy kontrolnej w zależności od genotypu polimorfizmu *DRD4 -521C>T*.

Dane kliniczne pacjentek	<i>DRD4 -521 C>T</i>			<i>p</i>
	<i>Genotyp</i>			
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	
wiek (lata) średnia ± SD zakres mediana	29,5 ± 4,83 19 - 39 29,50	28,4 ± 4,26 18 - 41 29,00	28,8 ± 5,38 19 - 42 28,50	0,65
wzrost (cm) średnia ± SD zakres mediana	168,6 ± 4,66 159 - 178 169,50	167,4 ± 5,45 150 - 180 168,00	166,6 ± 4,4 160 - 175 165,50	0,28
masa ciała przed ciążą (kg) średnia ± SD zakres mediana	65,58 ± 11,61 52 - 97 63,00	58,61 ± 8,95 40 - 92 58,00	59,6 ± 7,34 46 - 82 59,50	0,007*
masa ciała w ciąży (kg) średnia ± SD zakres mediana	79,79 ± 12,6 59 - 106 79,50	73,75 ± 10,58 52 - 104 73,00	74,9 ± 8,38 57 - 97 75,00	0,06
RR syst. średnia ± SD zakres mediana	111,0 ± 11,13 90 - 130 110,00	106,6 ± 10,83 90 - 130 105,00	109,1 ± 11,6 90 - 130 110,00	0,23
RR diast. średnia ± SD zakres mediana	68,5 ± 8,27 60 - 80 70,00	66,6 ± 8,8 50 - 80 70,00	67,6 ± 8,47 50 - 80 70,00	0,63
Hb (mmol/L) średnia ± SD zakres mediana	6,87 ± 0,87 4,67 - 8,15 7,09	6,78 ± 0,72 4,99 - 8,23 6,82	6,55 ± 0,82 4,5 - 8,8 6,47	0,21
E (T/L) średnia ± SD zakres mediana	3,79 ± 0,5 2,57 - 4,81 3,87	3,68 ± 0,42 2,5 - 4,58 3,69	3,6 ± 0,46 2,52 - 4,75 3,54	0,27
L (G/L) średnia ± SD zakres mediana	17,17 ± 4,82 10,89 - 28,09 16,79	17,03 ± 5,22 8,27 - 29,48 16,24	16,36 ± 4,28 9,46 - 28,66 16,00	0,75
Htk (L/L) średnia ± SD zakres mediana	0,33 ± 0,04 0,23 - 0,4 0,34	0,33 ± 0,04 0,23 - 0,41 0,32	0,32 ± 0,04 0,219 - 0,42 0,31	0,25
PI (G/L) średnia ± SD zakres mediana	223,35 ± 61,78 114 - 381 213,00	205,67 ± 45,79 116 - 336 197,00	216,41 ± 56,83 114 - 368 206,95	0,35

4.4.6. Analiza danych klinicznych noworodków w zależności od rodzaju oznaczonego genotypu u badanych kobiet

4.4.6.1. Dane kliniczne noworodków w zależności od genotypu polimorfizmu COMT 472G>A

W tabeli 24 przedstawiono dane kliniczne noworodków kobiet z grupy badanej z PE w zależności od genotypów polimorfizmu *COMT* 472G>A. Największą masę noworodków potwierdzono w grupie matek 472AA (2013,24 g), a najmniejszą w grupie kobiet z genotypem 472GA (1761,33 ± 798,60 g), różnice pomiędzy grupami nie były statystycznie istotne. Kolejnym badanym parametrem była ocena w skali Apgar w 1 i 5 minucie życia. Najwyższą średnią wartość w pierwszej minucie obliczono dla grupy kobiet nosicielek genotypu homozygotycznego 472GG (7,44 ± 2,89), a najniższą dla grupy kobiet nosicielek genotypu heterozygotycznego 472GA (7,06 ± 2,87) (ns). Najwięcej punktów Apgar w 5 minucie otrzymały noworodki kobiet z genotypem homozygotycznym zmutowanym 472AA (8,52 ± 1,57), oraz z genotypem homozygotycznym 472GG (8,48 ± 1,83), natomiast w grupie z genotypem heterozygotycznym 472GA wartość ta wynosi 8,39 ± 1,63 co koreluje z najniższą ilością punktów w 1 minucie. Kolejne wartości dotyczą pH tętniczego i żylnego, również w tym przypadku nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych pomiędzy średnimi wartościami pH. Obserwowane pH tętnicze dla noworodków kobiet z genotypem heterozygotycznym 472GA wynosiło 7,27 ± 0,06, dla noworodków kobiet z genotypem homozygotycznym 472AA 7,24 ± 0,13 oraz dla noworodków kobiet z genotypem homozygotycznym 472GG 7,24 ± 0,10. Natomiast pH żyłne wahało się pomiędzy 7,24 ± 0,15 do 7,27 ± 0,08. Porównano także masę łożyska, najwyższą 498,68 ± 164,37 g odnotowano w przypadku noworodków kobiet nosicielek genotypu homozygotycznego 472AA, najniższą 421,46 ± 177,69 g u noworodków kobiet z genotypem heterozygotycznym 472GA. Żadne z przedstawianych różnic nie były statystycznie istotne (tab. 24).

Tabela 24. Dane kliniczne noworodków kobiet z grupy badanej z PE w zależności od ich genotypów polimorfizmu *COMT 472G>A*.

Dane kliniczne noworodków	<i>COMT 472G>A</i>			<i>p</i>
	<i>genotyp</i>			
	<i>472GG</i>	<i>472GA</i>	<i>472AA</i>	
masa noworodka (g) średnia ± SD zakres mediana	1976,32 ± 902,00 910 - 3940 1820	1761,33 ± 798,60 510 - 3800 1640	2013,24 ± 842,71 580 - 3930 1950	0,40
Ap 1' średnia ± SD zakres mediana	7,44 ± 2,89 1 - 10 9	7,06 ± 2,87 0 - 10 8	7,19 ± 2,71 1 - 10 8	0,86
Ap 5' średnia ± SD zakres mediana	8,48 ± 1,83 4 - 10 9	8,39 ± 1,63 3 - 10 9	8,52 ± 1,57 5 - 10 9	0,94
pH tętnicze średnia ± SD zakres mediana	7,24 ± 0,10 6,95 - 7,31 7,27	7,26 ± 0,06 7,08 - 7,34 7,27	7,24 ± 0,13 6,8 - 7,42 7,27	0,76
pH żyłne średnia ± SD zakres mediana	7,27 ± 0,08 7,03 - 7,24 7,29	7,27 ± 0,07 7,09 - 7,40 7,28	7,24 ± 0,15 6,69 - 7,37 7,29	0,39
masa łożyska (g) średnia ± SD zakres mediana	450,8 ± 227,90 160 - 1300 410	421,46 ± 177,69 200 - 1010 395	498,68 ± 164,37 150 - 840 500	0,32

W grupie kontrolnej największą masę noworodka odnotowano w grupie kobiet z genotypem *472GA* (3508,03 ± 424,66 g), a najniższą 3379,06 ± 374,40 g w grupie kobiet z genotypem *472GG*. Analizując wartości skali Apgar nie stwierdzono istotnych różnic zarówno w 1 jak i w 5 minucie, średnia wartość punktowa dla noworodków we wszystkich analizowanych podgrupach kobiet osiągała wartości powyżej 9. Również analiza średnich wartości pH tętniczego pokazała, że we wszystkich analizowanych podgrupach kobiet wartości pH dla noworodków są podobne i wahają się od 7,28 do 7,29 dla wszystkich genotypów.

Wartości średnie pH żylnego wahały się natomiast od 7,27 do 7,29 dla każdej podgrupy kobiet. Średnia masa łożyska pomiędzy grupami kobiet nosicielek poszczególnych genotypów również nie różniła się istotnie i wynosiła 631 ± 119,13 g dla podgrupy z genotypem heterozygotycznym *472GA*, 601,87 ± 107,63 g dla podgrupy z genotypem homozygotycznym *472GG* oraz 614,07 ± 132,41 dla podgrupy z genotypem homozygotycznym *472AA* (tab. 25).

Tabela 25. Dane kliniczne noworodków kobiet z grupy kontrolnej w zależności od ich genotypów polimorfizmu *COMT 472G>A*.

Dane kliniczne noworodków	<i>COMT 472G>A</i>			<i>p</i>
	<i>genotyp</i>			
	<i>472GG</i>	<i>472GA</i>	<i>472AA</i>	
masa noworodka (g)				
średnia ± SD	3379,06 ± 374,40	3508,03 ± 424,66	3422,63 ± 381,72	0,31
zakres	2560 - 4210	2770 - 4640	2790 - 4460	
mediana	3335	3440	3430	
Ap 1'				
średnia ± SD	9,66 ± 1,03	9,57 ± 0,99	9,78 ± 0,58	0,63
zakres	5 - 10	5 - 10	8 - 10	
mediana	10	10	10	
Ap 5'				
średnia ± SD	9,91 ± 0,39	9,89 ± 0,64	10 ± 0,0	0,60
zakres	8 - 10	6 - 10	10 - 10	
mediana	10	10	10	
pH tętnicze				
średnia ± SD	7,28 ± 0,12	7,29 ± 0,1	7,29 ± 0,08	0,97
zakres	6,93 - 7,47	7,04 - 7,46	7,07 - 7,4	
mediana	7,30	7,29	7,32	
pH żyłne				
średnia ± SD	7,29 ± 0,10	7,29 ± 0,09	7,27 ± 0,09	0,61
zakres	6,99 - 7,45	7,05 - 7,55	7,12 - 7,47	
mediana	7,28	7,29	7,26	
masa łożyska (g)				
średnia ± SD	601,87 ± 107,63	631,31 ± 119,13	614,07 ± 132,41	0,51
zakres	450 - 890	450 - 1000	450 - 850	
mediana	600	600	570	

4.4.6.2. Dane kliniczne noworodków w zależności od genotypu polimorfizmu *DRD1 - 48A>G*

W czasie analizy danych klinicznych noworodków kobiet z grupy badanej z PE w zależności od genotypów polimorfizmu *DRD1 -48A>G* największą średnią masę noworodków obserwowano w przypadku kobiet z podgrupy *-48AA* ($1956,93 \pm 799,99$ g), najmniejszą w podgrupie *-48GG* gdzie wynosiła ona $1656 \pm 636,21$ g, ns. Średnia punktacja w skali Apgar była najwyższa w przypadku podgrupy *-48GG*, zarówno w 1 jak i w 5 minucie, odpowiednio $7,7 \pm 2,45$ oraz $8,6 \pm 1,17$, a najniższa w podgrupie *-48GA*, odpowiednio $7,03 \pm 3,12$ i $8,17 \pm 2,06$. Wartości pH tętniczego nieznacznie różniły się pomiędzy grupami, najwyższe $7,27 \pm 0,06$ stwierdzono w podgrupie *-48GA*, najniższe $7,22 \pm 0,07$ w podgrupie *-48GG*. Również wartości pH żylnego były bardzo zbliżone i wynosiły $7,25 \pm 0,12$ dla podgrupy *-48AG* oraz $7,27 \pm 0,06$ dla podgrupy *-48AA*. Największą średnią masę łożyska odnotowano w przypadku noworodków pacjentek z genotypem *-48AA* – $480 \pm 213,82$ g,

najniższą – $389 \pm 100,27$ g w przypadku noworodków pacjentek z genotypem *-48GG*. Wszystkie obserwowane różnice nie były statystycznie istotne (tab. 26).

Tabela 26. Dane kliniczne noworodków kobiet z grupy badanej z PE w zależności od ich genotypów polimorfizmu *-48A>G DRD1*.

Dane kliniczne noworodków	<i>DRD1 -48A>G</i>			<i>p</i>
	<i>genotyp</i>			
	<i>-48AA</i>	<i>-48AG</i>	<i>-48GG</i>	
masa noworodka (g) średnia ± SD zakres mediana	1956,93 ± 799,99 630 - 3620 1870	1840,07 ± 914,54 510 - 3940 1645	1656 ± 636,21 580 - 2540 1525	0,56
Ap 1' średnia ± SD zakres mediana	7,23 ± 2,62 0 - 10 8	7,03 ± 3,12 1 - 10 8	7,7 ± 2,45 2 - 10 9	0,79
Ap 5' średnia ± SD zakres mediana	8,67 ± 1,25 5 - 10 9	8,17 ± 2,06 3 - 10 9	8,60 ± 1,17 6 - 10 9	0,35
pH tętnicze średnia ± SD zakres mediana	7,27 ± 0,06 7,07 - 7,42 7,28	7,23 ± 0,11 6,8 - 7,34 7,26	7,22 ± 0,07 7,11 - 7,29 7,23	0,08
pH żyłne średnia ± SD zakres mediana	7,28 ± 0,06 7,07 - 7,37 7,28	7,25 ± 0,12 6,69 - 7,40 7,28	7,27 ± 0,08 7,16 - 7,37 7,27	0,36
masa łożyska (g) średnia ± SD zakres mediana	481,55 ± 213,82 200 - 1300 450	421,50 ± 177,19 160 - 870 380	389 ± 100,27 150 - 500 395	0,22

Następnie analizowano dane kliniczne noworodków kobiet z grupy kontrolnej zdrowych kobiet ciężarnych w zależności od genotypów polimorfizmu *-48A>G DRD1*. Średnia masa noworodków nie różniła się istotnie pomiędzy poszczególnymi podgrupami i wahała się pomiędzy $3418,05 \pm 331,20$ g a $3508,81 \pm 482,34$ g. Również średnia wartość oceny w skali Apgar noworodków pomiędzy poszczególnymi badanymi podgrupami nie różniła się istotnie, zarówno w 1 jak i 5 minucie punktacja Apgar sięgała powyżej 9. Podobnie wartości pH były porównywalne i wynosiły od 7,28 do 7,29 dla pH tętniczego oraz od 7,28 do 7,30 dla pH żylnego. Najmniejszą średnią masę łożyska odnotowano dla noworodków matek nosicielek genotypu heterozygotycznego *-48AG* – $611,48 \pm 113,78$ g, największą dla matek nosicielek genotypu *-48GG* – $641,76 \pm 109,50$ g, różnice pomiędzy badanymi podgrupami nie były statystycznie istotne (tab. 27).

Tabela 27. Dane kliniczne noworodków kobiet z grupy kontrolnej w zależności od ich genotypów polimorfizmu *DRD1 -48A>G*.

Dane kliniczne noworodków	<i>DRD1 -48A>G</i>			<i>p</i>
	<i>genotyp</i>			
	<i>-48AA</i>	<i>-48AG</i>	<i>-48GG</i>	
masa noworodka (g) średnia ± SD zakres mediana	3508,81 ± 482,34 2790 - 4640 3480,00	3418,05 ± 331,2 2560 - 4230 3430,00	3450,59 ± 433,93 2770 - 4210 3430,00	0,53
Ap 1' średnia ± SD zakres mediana	9,74 ± 0,73 6 - 10 10,00	9,52 ± 1,12 5 - 10 10,00	9,82 ± 0,39 9 - 10 10,00	0,35
Ap 5' średnia ± SD zakres mediana	9,9 ± 0,62 6 - 10 10,00	9,9 ± 0,47 7 - 10 10,00	10 ± 0,0 10 - 10 10,00	0,76
pH tętnicze średnia ± SD zakres mediana	7,29 ± 0,09 7,11 - 7,43 7,29	7,29 ± 0,11 6,93 - 7,47 7,30	7,28 ± 0,08 7,14 - 7,42 7,30	1,00
pH żyłne średnia ± SD zakres mediana	7,3 ± 0,07 7,12 - 7,43 7,29	7,28 ± 0,1 6,99 - 7,47 7,28	7,29 ± 0,11 7,06 - 7,55 7,30	0,65
masa łożyska (g) średnia ± SD zakres mediana	622,38 ± 131,07 450 - 1000 590,00	611,48 ± 113,78 450 - 890 600,00	641,76 ± 109,5 470 - 860 600,00	0,65

4.4.6.3. Dane kliniczne noworodków w zależności od genotypu polimorfizmu *DRD4 -521C>T*

Największa średnia masa noworodków obserwowana była w podgrupie matek z genotypem *-521TT* – 2015,91 ± 807,66 g, najmniejsza natomiast 1742 ± 791,01 g w podgrupie matek z genotypem *-521CT*, ns. Punktacja w skali Apgar w 1 minucie była najwyższa dla noworodków w podgrupie matek nosicielek genotypu zmutowanego *-521TT* - 7,5 ± 2,95, najniższa natomiast w podgrupie matek nosicielek genotypu *-521CC* - 6,25 ± 3,24, ns. W 5 minucie najwyższe wartości obliczono w podgrupie matek z genotypem *-521CT* - 8,53 ± 1,44, a najniższe w podgrupie matek z genotypem *-521CC* - 8,06 ± 2,05, ns. Odnotowano średnie wartości pH tętniczego pomiędzy 7,27 ± 0,07 do 7,24 ± 0,07, a pH żylnego od 7,29 ± 0,07 do 7,25 ± 0,08, różnice nie były statystycznie istotne. Ostatnim badanym parametrem była masa łożyska, najwyższa w przypadku podgrupy z genotypem *-521TT* - 488,75 ± 215 g, najniższa natomiast 408,13 ± 163,59 g dla podgrupy *-521CC* (tab. 28).

Tabela 28. Dane kliniczne noworodków kobiet z grupy badanej z PE w zależności od ich genotypów polimorfizmu *DRD4 -521C>T*.

Dane kliniczne noworodków	<i>DRD4 -521 C>T</i>			<i>p</i>
	<i>genotyp</i>			
	<i>-521CC</i>	<i>-521CT</i>	<i>-521TT</i>	
masa noworodka (g)				
średnia ± SD	1941,25 ± 1001,17	1742 ± 791,01	2015,91 ± 807,66	0,34
zakres	580 - 3800	510 - 3930	670 - 3940	
mediana	1960,00	1580,00	1905,00	
Ap 1'				
średnia ± SD	6,25 ± 3,24	7,29 ± 2,54	7,5 ± 2,95	0,33
zakres	1 - 10	1 - 10	0 - 10	
mediana	6,50	8,00	9,00	
Ap 5'				
średnia ± SD	8,06 ± 2,05	8,53 ± 1,44	8,5 ± 1,75	0,61
zakres	3 - 10	5 - 10	4 - 10	
mediana	8,50	9,00	9,00	
pH tętnicze				
średnia ± SD	7,24 ± 0,07	7,24 ± 0,1	7,27 ± 0,07	0,28
zakres	7,08 - 7,34	6,8 - 7,35	6,98 - 7,42	
mediana	7,25	7,27	7,28	
pH żyłne				
średnia ± SD	7,25 ± 0,08	7,25 ± 0,11	7,29 ± 0,07	0,19
zakres	7,13 - 7,37	6,69 - 7,37	7,03 - 7,4	
mediana	7,25	7,28	7,31	
masa łożyska (g)				
średnia ± SD	408,13 ± 163,59	427,39 ± 178,37	488,75 ± 215	0,27
zakres	150 - 750	160 - 1010	200 - 1300	
mediana	380,00	405,00	450,00	

Najwyższą średnią masę noworodków obserwowano w podgrupie kobiet z genotypem *-521CC* - 3517,13 ± 389,09 g, najniższą w podgrupie kobiet z genotypem *-521TT* - 3408,75 ± 381,85 g, ns. Najwyższą średnią punktację w skali Apgar stwierdzono dla noworodków z podgrupy kobiet z genotypem *-521TT* – w 1 minucie - 9,78 ± 0,48, w 5 minucie – 10 ± 0,0. Najniższa średnia punktacja w skali Apgar odnotowana została u noworodków z podgrupy kobiet z genotypem *-521CC* - 9,42 ± 1,44 oraz 9,79 ± 0,72. Średnie wartości pH tętniczego i żylnego były bardzo zbliżone i wahały się od 7,3 ± 0,1 do 7,27 ± 0,09 dla pH tętniczego oraz 7,3 ± 0,1 do 7,28 ± 0,08 dla pH żylnego. Najwyższą średnią masę łożyska stwierdzono w grupie z genotypem *-521CC* - 654,17 ± 145,15 g, najniższą w grupie z genotypem *-521TT* - 601,5 ± 107,5 g (tab. 29).

Tabela 29. Dane kliniczne noworodków kobiet z grupy kontrolnej w zależności od ich genotypów polimorfizmu *DRD4 -521C>T*.

Dane kliniczne noworodków	<i>DRD4 -521 C>T</i>			<i>p</i>
	<i>genotyp</i>			
	<i>-521CC</i>	<i>-521CT</i>	<i>-521TT</i>	
masa noworodka (g)				
średnia ± SD	3517,13 ± 389,09	3460,18 ± 426,19	3408,75 ± 381,85	0,58
zakres	2790 - 4230	2770 - 4640	2560 - 4500	
mediana	3465,00	3430,00	3405,00	
Ap 1'				
średnia ± SD	9,42 ± 1,44	9,64 ± 0,88	9,78 ± 0,48	0,33
zakres	5 - 10	6 - 10	8 - 10	
mediana	10,00	10,00	10,00	
Ap 5'				
średnia ± SD	9,79 ± 0,72	9,91 ± 0,55	10 ± 0,0	0,27
zakres	7 - 10	6 - 10	10 - 10	
mediana	10,00	10,00	10,00	
pH tętnicze				
średnia ± SD	7,27 ± 0,09	7,28 ± 0,1	7,3 ± 0,1	0,65
zakres	7,07 - 7,43	6,93 - 7,46	7,07 - 7,47	
mediana	7,29	7,30	7,31	
pH żyłne				
średnia ± SD	7,28 ± 0,09	7,3 ± 0,1	7,28 ± 0,08	0,73
zakres	7,05 - 7,44	6,99 - 7,55	7,12 - 7,45	
mediana	7,28	7,29	7,28	
masa łożyska (g)				
średnia ± SD	654,17 ± 145,15	617,68 ± 113,49	601,5 ± 107,5	0,23
zakres	450 - 1000	450 - 890	450 - 850	
mediana	650,00	600,00	565,00	

4.4.7 Analiza otrzymywanych dawek leku metyldopa u kobiet z grupy badanej w zależności od rodzaju genotypu

W grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym przeprowadzono analizę wielkości otrzymywanej dawki leku metyldopa w zależności od nosicielstwa poszczególnych genotypów badanych polimorfizmów genów *COMT*, *DRD1* oraz *DRD4*. W tym celu dla każdego badanego polimorfizmu grupę badaną z PE podzielono najpierw na trzy podgrupy w zależności od nosicielstwa genotypu homozygotycznego typu dzikiego, heterozygotycznego oraz homozygotycznego zmutowanego. Kobiety z grupy badanej otrzymywały w/w lek w dawkach od 750 mg do 3000 mg. Wobec tego w obrębie każdej podgrupy analizowano procent kobiet które otrzymywały dawkę metyldopa ≤ 1000 mg, dawkę 1500 mg oraz dawkę 2000-3000 mg leku.

Analiza dawek metyldopa w zależności od genotypu polimorfizmu genu *COMT 472G>A*

W grupie pacjentek nosicielek homozygotycznego genotypu niezmutowanego *472GG* *COMT* najniższą dawkę metyldopa poniżej 1000 mg otrzymywało 25,81% pacjentek, u 40,74% zastosowano dawkę 1500 mg, natomiast u 22,50% podano lek w największych dawkach, przekraczających 2000 mg. W grupie kobiet z genotypem *472GA* rozkład dawek przedstawiał się następująco – 48,38% miało zastosowaną dawkę w wysokości nie przekraczającej 1000 mg, 37,04% z nich podano 1500 mg, a u 60,00% stosowano dawki od 2000 mg do 3000 mg. U 25,81% ciężarnych z genotypem homozygotycznym zmutowanym *472AA* stosowano najmniejszą dawkę metyldopa tylko do 1000 mg. Najwyższe dawki metyldopa stosowano u nosicielek genotypu heterozygotycznego *472GA* (60,00% dla genotypu *472GA* vs. 22,50% dla genotypu *472GG* vs. 17,50% dla genotypu *472AA*). Obserwowane różnice nie były statystycznie istotne (tab. 30).

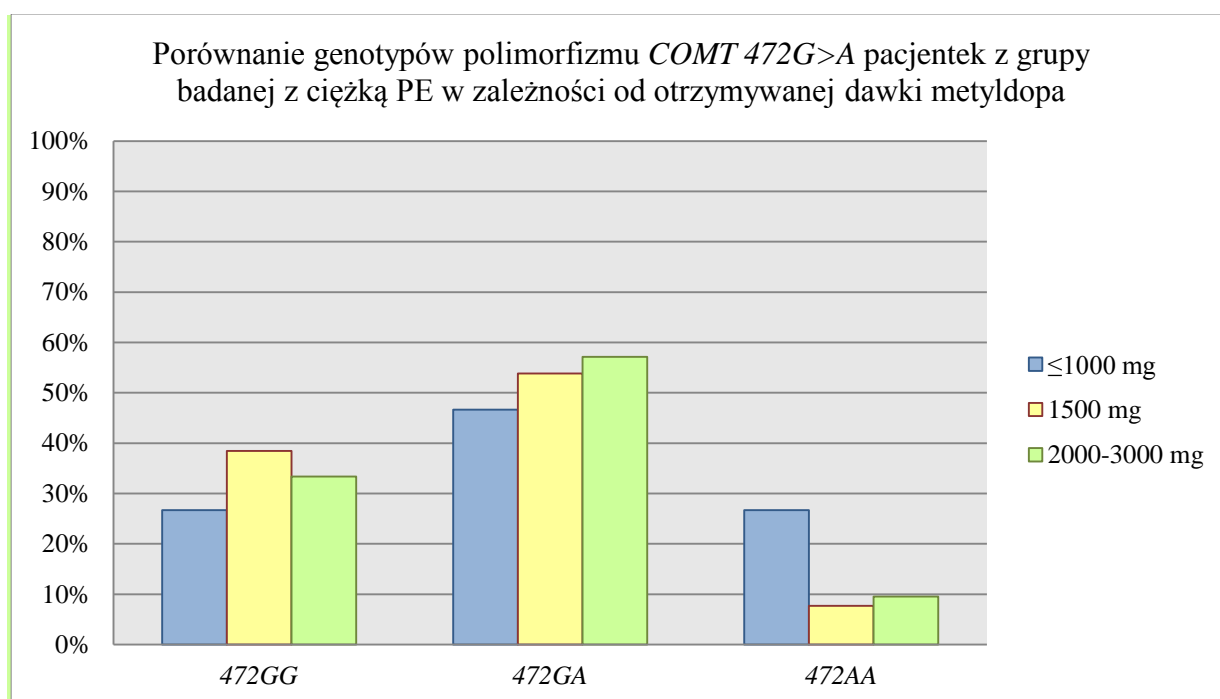
Tabela 30. Porównanie genotypów polimorfizmu *COMT 472G>A* pacjentek z grupy badanej z PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

Dawka metyldopa	≤ 1000 mg	1500 mg	2000 - 3000 mg
Genotyp	n (%)	n (%)	n (%)
472GG	8 (25,81)	11 (40,74)	9 (22,50)
472GA	15 (48,38)	10 (37,04)	24 (60,00)
472AA	8 (25,81)	6 (22,22)	7 (17,50)
Suma	31 (100,0)	27 (100,0)	40 (100,0)

Następnie przeprowadzono analizę kobiet ciężarnych z ciężką postacią stanu przedrzucawkowego podzielonych na podgrupy w zależności od poszczególnych genotypów polimorfizmu *COMT* 472G>A. Analiza ta pokazała, że u kobiet nosicielek genotypu zmutowanego 472AA najczęściej stosowano najmniejszą dawkę leku metyldopa ≤ 1000 mg (26,67% vs. 7,69% pacjentek z dawką 1500 mg vs. 9,52% z dawką powyżej 2000 mg. W przypadku tej analizy warto również zwrócić uwagę na wysoki czynnik ryzyka WR=3,78 (p=0,12, PU 0,53-28,98) (tab. 31, ryc. 9).

Tabela 31. Porównanie genotypów polimorfizmu *COMT* 472G>A pacjentek z grupy badanej z ciężką PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

<i>dawka metyldopa</i>	≤ 1000 mg	1500 mg	2000 - 3000 mg
<i>genotyp</i>	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>
472GG	4 (26,67)	5 (38,46)	7 (33,34)
472GA	7 (46,66)	7 (53,85)	12 (57,14)
472AA	4 (26,67)	1 (7,69)	2 (9,52)
Suma	15 (100,00)	13 (100,00)	21 (100,00)



Rycina 9. Porównanie genotypów polimorfizmu *COMT* 472G>A pacjentek z grupy badanej z ciężką PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

Analiza dawek metyldopa w zależności od genotypu polimorfizmu genu *DRD1 -48A>G*

Analiza polimorfizmu *DRD1 -48A>G* pokazała, że w przypadku pacjentek, nosicielek genotypu homozygotycznego niezmutowanego *-48AA* 41,94% otrzymało dawkę metyldopy w wysokości do 1000 mg, 48,15% otrzymało dawkę 1500 mg, natomiast 42,50% podawano dawkę od 2000 mg do 3000 mg. Wśród kobiet, nosicielek genotypu heterozygotycznego *-48AG*, 45,16% stosowano lek w wysokości do 1000 mg, u 37,04% stosowano dawkę metyldopa 1500 mg, natomiast aż 52,50% ciężarnych stosowało dawkę od 2000 mg do 3000 mg. W grupie ciężarnych nosicielek genotypu homozygotycznego zmutowanego *-48GG* dawkę do 1000 mg zastosowano u 12,90% ciężarnych, u 14,81% ciężarnych z tej podgrupy zastosowano dawkę 1500 mg, natomiast u 0,50% ciężarnych zastosowano wysokie dawki metyldopa, powyżej 2000 mg (tab. 32).

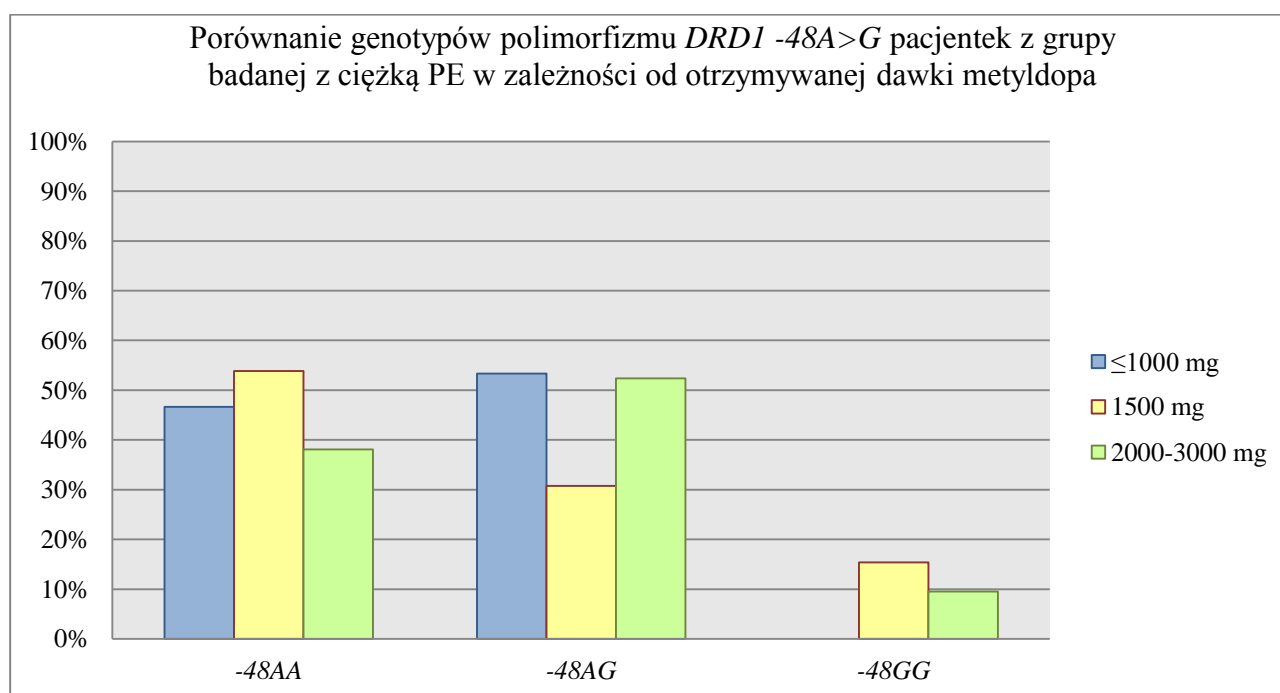
Tabela 32. Porównanie genotypów polimorfizmu *DRD1 -48A>G* pacjentek z grupy badanej z PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

<i>dawka metyldopa</i>	<i>≤1000 mg</i>	<i>1500 mg</i>	<i>2000 - 3000 mg</i>
<i>genotyp</i>	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>
<i>-48AA</i>	13 (41,94)	13 (48,15)	17 (42,50)
<i>-48AG</i>	14 (45,16)	10 (37,04)	21 (52,50)
<i>-48GG</i>	4 (12,90)	4 (14,81)	2 (0,50)
<i>Suma</i>	31 (100,00)	27 (100,00)	40 (100,00)

Analiza podgrupy ciężarnych z ciężką postacią stanu przedrzucawkowego nie wykazała zależności przyjmowanej dawki leku metyldopa od nosicielstwa poszczególnych genotypów polimorfizmu *-48A>G DRD1* (tab. 33, ryc. 10).

Tabela 33. Porównanie genotypów polimorfizmu *DRD1 -48A>G* pacjentek z grupy badanej z ciężką PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

<i>dawka metyldopa</i>	≤ 1000 mg	1500 mg	2000 - 3000 mg
<i>genotyp</i>	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>
-48AA	7 (46,67)	7 (53,85)	8 (38,10)
-48AG	8 (53,33)	4 (30,77)	11 (52,38)
-48GG	0 (0,00)	2 (15,38)	2 (9,52)
Suma	15 (100,00)	13 (100,00)	21 (100,00)



Rycina 10. Porównanie genotypów polimorfizmu *DRD1 -48A>G* pacjentek z grupy badanej z ciężką PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

Analiza dawek metyldopa w zależności od genotypu polimorfizmu -521C>T

Na podstawie uzyskanych wyników dotyczących polimorfizmu genu receptora DRD4 można sugerować, iż w przypadku pacjentek, u których oznaczono genotyp typu homozygotycznego -521CC większość z nich (22,58%) otrzymywała dawkę metyldopa do 1000 mg, 14,81% ciężarnych dawkę 1500 mg, a 15,00% dawkę 2000-3000 mg na dobę. W grupie kobiet z genotypem heterozygotycznym -521CT 47,50% stosowała dawki od 2000 mg do 3000 mg, nieco więcej 55,56% dawkę 1500 mg, a najniższe dawki, do 1000 mg otrzymało 38,71% pacjentek. Wśród kobiet z genotypem homozygotycznym zmutowanym -521TT

37,50% otrzymało najwyższe dawki metyldopa 2000-3000 mg, 29,63% dawkę metyldopa 1500 mg, a dawkę najmniejszą do 1000 mg otrzymywało 38,71% pacjentek. Można zatem stwierdzić, w grupie pacjentek z genotypem -521CC stosowano głównie niskie dawki leku hipotensyjnego (tab. 34).

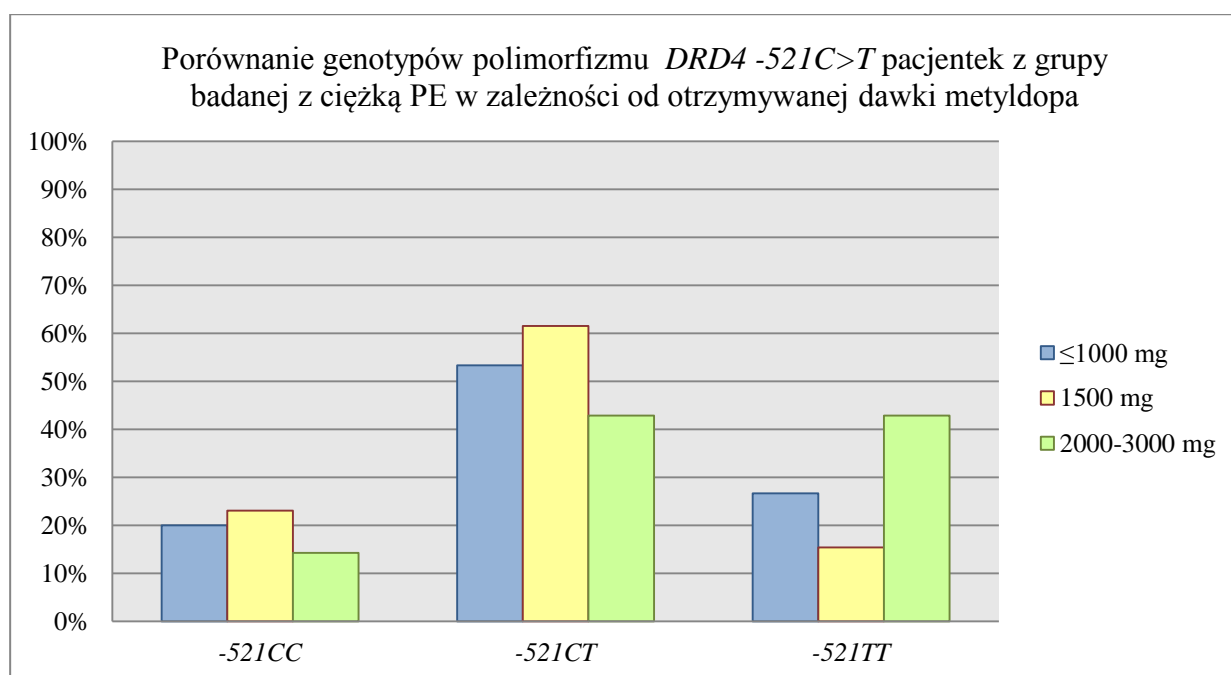
Tabela 34. Porównanie genotypów polimorfizmu *DRD4 -521C>T* pacjentek z grupy badanej z PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

<i>dawka metyldopa</i>	≤ 1000 mg	1500 mg	2000 - 3000 mg
<i>genotyp</i>	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>
<i>-521CC</i>	7 (22,58)	4 (14,81)	6 (15,00)
<i>-521CT</i>	12 (38,71)	15 (55,56)	19 (47,50)
<i>-521TT</i>	12 (38,71)	8 (29,63)	15 (37,50)
<i>Suma</i>	31 (100,00)	27 (100,00)	40 (100,00)

W czasie analizy podgrupy kobiet z ciężką postacią stanu przedrzucawkowego pokazano, że u 20,00%, kobiet z genotypem -521CC dawkę metyldopa do 1000 mg, u 23,08% stosowano dawkę 1500 mg, dawkę 2000-3000 mg stosowano u 14,28% pacjentek. W podgrupie kobiet z genotypem heterozygotycznym -521CT dawkę do 1000 mg stosowano u 53,33% kobiet ciężarnych, dawkę 1500 mg stosowano u 61,54% ciężarnych, a dawkę 2000-3000 mg stosowano u 42,86% kobiet z ciężką postacią PE. Zwracał uwagę fakt, że najwięcej kobiet z genotypem homozygotycznym zmutowanym -521TT przyjmowało dawkę największą leku metyldopa (42,86%) w porównaniu do kobiet nosicielek genotypu heterozygotycznego -521CT (15,38%) oraz genotypu homozygotycznego niezmutowanego -521CC (26,67%). Należy również podkreślić, iż w przypadku analizy tego polimorfizmu uzyskano wysoki czynnik ryzyka (WR=2,75, p=0,09, PU 0,67-11,70) (tab. 35, ryc. 11).

Tabela 35. Porównanie genotypów polimorfizmu *DRD4 -521C>T* pacjentek z grupy badanej z ciężką PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

<i>dawka metyldopa</i>	<i>≤1000 mg</i>	<i>1500 mg</i>	<i>2000 - 3000 mg</i>
<i>genotyp</i>	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>	<i>n (%)</i>
<i>-521CC</i>	3 (20,00)	3 (23,08)	3 (14,28)
<i>-521CT</i>	8 (53,33)	8 (61,54)	9 (42,86)
<i>-521TT</i>	4 (26,67)	2 (15,38)	9 (42,86)
<i>Suma</i>	15 (100,00)	13 (100,00)	21 (100,00)



Rycina 11. Porównanie genotypów polimorfizmu *DRD4 -521C>T* pacjentek z grupy badanej z ciężką PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Występowanie stanu przedrzucawkowego ciągle jeszcze wiąże się ze zwiększoną zachorowalnością matek, płodów i noworodków. Wiadomo również, że nieleczony stan przedrzucawkowy może stanowić bezpośrednie zagrożenie dla życia matki i płodu. W związku z tym intensywnie poszukuje się szybkich i prostych w wykonaniu testów, które pozwolą nie tylko odpowiednio wcześnie diagnozować stan przedrzucawkowy, ale również wyodrębnić kobiety z grupy ryzyka w celu wdrożenia wcześniejszej profilaktyki. Obecnie wiele mówi się na temat znaczenia markerów biochemicznych lub też testów biofizycznych, które pozwalałyby na szybkie wykrycie stanu przedrzucawkowego. Ważne, aby testy te były odpowiednio czułe i specyficzne. Powinny również charakteryzować się niskimi kosztami, aby umożliwić ich szerokie zastosowanie w położnictwie. Ponadto, sposób pobrania markerów powinien być jak najprostszy, stąd też do powszechnie stosowanych markerów należą te, które można oznaczyć w surowicy krwi lub w moczu.

Istnieje wiele publikacji, których autorzy poszukują biomarkerów służących do wykrywania stanu przedrzucawkowego. Ich wybór oparty jest na obserwacji procesów patofizjologicznych zachodzących w organizmie ciężarnej kobiety, jak dysfunkcja komórek śródbłonna naczyń lub zaburzenia kaskady krzepnięcia. W trakcie tych patologicznych procesów do surowicy krwi uwalniane są różne czynniki, które mogą posłużyć do wczesnego wykrywania lub określania ciężkości stanu przedrzucawkowego.

W piśmiennictwie można znaleźć wiele doniesień mówiących o wykorzystaniu jako markerów diagnostycznych polimorfizmów genów kandydujących do udziału w patogenezie poronień nawracających, porodu przedwczesnego, hipotrofii płodu, osteopenii i osteoporozy, raka piersi. Obecność niektórych wariantów polimorficznych ma wpływ na wzrost zachorowalności oraz ciężkości przebiegu danej jednostki chorobowej [Tempfer i wsp. 2004]. Istnieją również doniesienia mówiące o wykorzystaniu jako markerów diagnostycznych polimorfizmów genów niektórych enzymów lub receptorów biorących udział w patomechanizmie stanu przedrzucawkowego. Wśród polimorfizmów, które mogą mieć związek z etiologią stanu przedrzucawkowego wymienia się warianty genetyczne angiotensynogenu, receptorów dla angiotensyny typu 1 i 2, czynnika martwicy nowotworów alfa, syntazy tlenku azotu, reduktazy metylenotetrahydrofolianowej oraz czynnika V krzepnięcia Leiden [Liang i wsp. 2012]. Wskazuje się również możliwy udział polimorfizmów genetycznych enzymu COMT oraz receptorów dopaminy w rozwoju nadciśnienia tętniczego oraz stanu przedrzucawkowego u kobiet ciężarnych. Niestety, dane

dostępne w literaturze nie są jednoznaczne, stąd też w niniejszej pracy podjęto próbę zbadania ewentualnego wpływu wybranych polimorfizmów genetycznych na występowanie stanu przedrzucawkowego. Ponadto próbowano ustalić zależność wielkości stosowanej dawki metyldopy od badanych polimorfizmów.

5.1. UDZIAŁ POLIMORFIZMU 472G>A *COMT* W ETIOLOGII STANU PRZEDRZUCAWKOWEGO

W wielu publikacjach analizowano zależność pomiędzy wariantami polimorficznymi genu *COMT*, a rozwojem nadciśnienia tętniczego przewlekłego w populacji ogólnej. Natomiast stosunkowo nieliczne opracowania dotyczą związku polimorfizmu *COMT* z etiologią nadciśnienia tętniczego w ciąży oraz stanu przedrzucawkowego. Enzym *COMT* pełni jednak ważną rolę w patomechanizmie stanu przedrzucawkowego, gdyż metabolizuje katecholaminy i estrogeny, związki silnie zaangażowane w etiologię stanu przedrzucawkowego. Wyniki przedstawiające wpływ polimorfizmu 472G>A (*Val158Met*) *COMT* na rozwój stanu przedrzucawkowego nie są jednoznaczne.

W badaniu Liang i wsp. w populacji chińskiej oceniono częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Val158Met* genu *COMT* u 187 pacjentek ze stanem przedrzucawkowym oraz u 189 kobiet stanowiących grupę kontrolną. Wykazano istotnie wyższą częstość występowania zmutowanego genotypu 472AA oraz allela 472A w grupie badanej ($p<0,05$). Współczynnik ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego u pacjentek będących nosicielkami genotypu homozygotycznego 472AA wynosił 2,395 (95%PU 1,061-5,408). Co więcej, u otyłych kobiet nosicielek zmutowanego genotypu homozygotycznego 472AA odnotowano wyższe wartości rozkurczowego ciśnienia tętniczego w trakcie ciąży w porównaniu do nosicielek genotypu homozygotycznego typu dzikiego 472GG ($p=0,034$) [Liang i wsp.].

W publikacji Lim i wsp. w grupie kobiet koreańskich wykazano związek pomiędzy obecnością zmutowanego genotypu 472AA *COMT* i zwiększonym ryzykiem wystąpienia stanu przedrzucawkowego [Lim i wsp. 2010]. Analizowano częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmów *Val158Met* genu *COMT* oraz -34T>C genu *CYP17A1* u 164 pacjentek ze stanem przedrzucawkowym oraz u 182 zdrowych kobiet. Współczynnik ryzyka rozwoju stanu przedrzucawkowego, ciężkiego stanu przedrzucawkowego oraz stanu przedrzucawkowego z towarzyszącą hipotrofią płodu u kobiet będących nosicielkami zmutowanego genotypu homozygotycznego 472AA genu *COMT* wynosił odpowiednio 1,97 (95%PU 1,02-3,83), 3,29 (95%PU 1,60-6,77) oraz 4,05 (95%PU 1,78-9,22). Nie odnotowano

natomiast istotnych różnic w częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu - $34T>C$ genu *CYP17A1* pomiędzy analizowanymi grupami. Wyniki badania jasno wskazują na wpływ polimorfizmu $472G>A$ (*Val158Met*) genu *COMT* w zwiększonej podatności na rozwój stanu przedrzucawkowego [Lim i wsp. 2010].

Również Hill i wsp. w grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym z Chile, badali związek pomiędzy polimorfizmami genetycznymi genów *COMT* oraz *MTHFR*. Wśród badanych pacjentek wyodrębniono występowanie trzech haplotypów: *ACCG*, *ATCA* oraz *GCGG*, których obecność korespondowała z niską, średnią i wysoką aktywnością enzymu *COMT*. Analiza wykazała różnice pomiędzy grupami – haplotyp *ACCG* częściej występował w grupie zdrowych ciężarnych, podczas gdy haplotyp *ATCA* i *GCGG* częściej u kobiet ze stanem przedrzucawkowym. Można więc założyć, iż haplotyp *ACCG* ma działanie protekcyjne i związany jest ze zmniejszonym ryzykiem wystąpienia stanu przedrzucawkowego, natomiast ryzyko wystąpienia tego powikłania wzrasta w zależności od obecności innych haplotypów [Hill i wsp. 2011].

Kolejną ciekawą pracą na temat związku polimorfizmów *COMT* z występowaniem stanu przedrzucawkowego jest doniesienie Vazquez-Alaniz i wsp. dotyczące kobiet z populacji meksykańskiej. W pracy badano jednoczesny wpływ polimorfizmu $472G>A$ genu *COMT* oraz polimorfizmu $677C>T$ genu *MTHFR* na występowanie stanu przedrzucawkowego i nadciśnienia tętniczego u kobiet ciężarnych. Wyniki sugerują, iż genotyp homozygotyczny zmutowany $472AA$ może być niezależnym czynnikiem ryzyka nadciśnienia tętniczego w ciąży. Ryzyko to zwiększa się, jeśli genotyp homozygotyczny zmutowany $472AA$ *COMT* współwystępuje z genotypem zmutowanym $677TT$ *MTHFR* [Vazquez-Alaniz i wsp. 2014].

W przypadku populacji kaukaskich zamieszkujących Europę różnice te nie są już tak wyraźne. Jedną z prac badającą zależność pomiędzy występowaniem stanu przedrzucawkowego a wariantami polimorficznymi genu *COMT* w populacji kobiet europejskich jest praca Roten i wsp. dotycząca pacjentek norweskich. W grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym wyodrębniono dwie podgrupy: pacjentki, u których stan przedrzucawkowy wystąpił tylko w jednej ciąży oraz pacjentki, u których stan przedrzucawkowy odnotowano w kolejnych ciążach. W badaniu Roten i wsp. oznaczono trzy haplotypy powstałe z 2 SNPs (rs6269, rs4680) – *GG* o wysokiej aktywności, *AA* o średniej aktywności oraz *AG* o niskiej aktywności. W tym badaniu również uwzględniono, iż w populacji europejskiej istnieją trzy głównie haplotypy *COMT*. Haplotypy te przyjęto w oparciu o pracę Diatchenko i wsp., w której badano związek odmian polimorficznych enzymu

z wrażliwością na ból. Haplotypy te oznaczono jako LPS (niska wrażliwość na ból, *Low Pain Sensitivity*), APS (średnia wrażliwość na ból, *Average Pain Sensitivity*) oraz HPS (wysoka wrażliwość na ból, *High Pain Sensitivity*). Istnieje odwrócona korelacja pomiędzy aktywnością enzymu a wrażliwością na ból, zatem forma HPS odpowiada odmianie *COMT* o niskiej aktywności, a haplotyp LPS odpowiada *COMT* o wysokiej aktywności [Diatchenko i wsp., 2005, Roten i wsp. 2011]. Dane dotyczące jedynie polimorfizmu 472G>A są porównywalne z wynikami niniejszej pracy i potwierdzają możliwy wpływ badanego polimorfizmu *COMT* na występowanie stanu przedrzucawkowego. W doniesieniu naukowców norweskich wykazano, iż obecność haplotypu o niskiej aktywności wiąże się z występowaniem stanu przedrzucawkowego, w grupie kobiet, u których stan przedrzucawkowy występował w przypadku więcej niż jednej ciąży. Ponadto zasugerowano, iż przy analizie wpływu odmian polimorficznych enzymu *COMT* na występowanie stanu przedrzucawkowego być może lepiej jest analizować haplotypy niż pojedyncze polimorfizmy [Roten i wsp. 2011].

W dyskusji do wyników publikacji opisanych powyżej, pozostają rezultaty prezentowanej rozprawy gdzie pokazano możliwy ochronny udział zmutowanych wariantów polimorfizmu 472G>A *COMT* w stosunku do rozwoju stanu przedrzucawkowego. W badaniach dotyczących populacji azjatyckich wyraźnie pokazano wpływ zmutowanego allele 472A na zwiększone ryzyko wystąpienia stanu przedrzucawkowego (genotyp 472AA występował znacznie częściej u kobiet z grup badanych niż u kobiet zdrowych) [Lim i wsp., Liang i wsp.]. W niniejszej pracy w grupie badanej kobiet z PE częstość występowania genotypu homozygotycznego zmutowanego 472AA obserwowano u 21,4% pacjentek z grupy badanej PE oraz u 22,5% pacjentek z grupy kontrolnej. Natomiast w ciężkiej postaci stanu przedrzucawkowego odnotowano, iż genotyp homozygotyczny zmutowany 472AA częściej występował w grupie kontrolnej (22,5%) w porównaniu do grupy badanej (14,3%). Różnica ta nie jest istotna statystycznie, jednak przewaga genotypu 472AA u zdrowych ciężarnych może wskazywać modulujące działanie tego polimorfizmu na rozwój ciężkiej postaci PE.

Również wyniki badania w populacji kobiet z Chile jednoznacznie sugerują modulacyjną i ochronną rolę polimorfizmu Val158Met *COMT* w stosunku do ryzyka rozwoju stanu przedrzucawkowego. Celem analizy Pérez-Sepúlveda i wsp. była ocena zależności między osoczowym stężeniem 2-metoksyestradiolu (2-ME) we wczesnym etapie ciąży a ryzykiem rozwoju stanu przedrzucawkowego u kobiet z Chile. Autorzy analizowali również korelację stężenia 2-ME z obecnością polimorfizmu 472G>A (Val158Met) genu *COMT*. Do badania włączono 13 pacjentek z preeklampsją oraz 72 zdrowych ciężarnych stanowiących

grupę kontrolną. Osoczowe stężenie 2-ME oceniano między 11 a 14 tc. Po porodzie od każdej z kobiet pobierano fragment łożyska, który stanowił materiał do izolacji DNA. Wykazano że u pacjentek, u których rozwinął się stan przedzucawkowy stężenie 2-ME w surowicy oceniane między 11-14 tc. było statystycznie niższe niż w grupie kontrolnej ($p<0,05$). Co więcej, zaobserwowano wyższą częstość występowania genotypów zawierających co najmniej jeden zmutowany allel u zdrowych ciężarnych (grupa badana 23,1% vs. 66,6% w grupie kontrolnej, $p=0,0041$). Również wyniki badania w populacji kobiet z Chile jednoznacznie sugerują modulacyjną i ochronną rolę polimorfizmu *Val158Met* *COMT* w stosunku do ryzyka rozwoju stanu przedzucawkowego. Celem analizy Pérez-Sepúlveda i wsp. była ocena zależności między osoczowym stężeniem 2-metoksyestradiolu (2-ME) we wczesnym etapie ciąży a ryzykiem rozwoju stanu przedzucawkowego u kobiet z Chile. Autorzy analizowali również korelację stężenia 2-ME z obecnością polimorfizmu *472G>A* (*Val158Met*) genu *COMT*. Do badania włączono 13 pacjentek z preeklampsją oraz 72 zdrowych ciężarnych stanowiących grupę kontrolną. Osoczowe stężenie 2-ME oceniano między 11 a 14 tc. Po porodzie od każdej z kobiet pobierano fragment łożyska, który stanowił materiał do izolacji DNA. Wykazano że u pacjentek, u których rozwinął się stan przedzucawkowy stężenie 2-ME w surowicy oceniane między 11-14 tc. było statystycznie niższe niż w grupie kontrolnej ($p<0,05$). Co więcej, zaobserwowano wyższą częstość występowania genotypów zawierających co najmniej jeden zmutowany allel u zdrowych ciężarnych (grupa badana 23,1% vs. 66,6% w grupie kontrolnej, $p=0,0041$) [Pérez-Sepúlveda i wsp. 2012].

Jak już wspomniano wcześniej, zmiany w łożysku odgrywają dużą rolę w etiopatogenezie stanu przedzucawkowego. Jednym ze związków syntetyzowanych w łożysku, którego obniżone stężenie może mieć związek z patogenezą PE jest 2-metoksyestradiol. W łożyskach kobiet ciężarnych ze stanem przedzucawkowym oznaczono niskie stężenia 2-ME oraz *COMT*, w porównaniu do łożysk zdrowych ciężarnych [Maynard i wsp. 2009]. Prawdopodobnie, w przypadku obecności genotypu zmutowanego *472AA* genu *COMT*, kiedy dochodzi do zmniejszenia syntezy 2-ME w łożysku, organizm kobiety indukuje mechanizmy kompensacyjne, równoważąc ewentualne niedobory zapobiegając w ten sposób wystąpieniu stanu przedzucawkowego [Pérez-Sepúlveda i wsp. 2012].

W analizie polimorfizmu *472G>A* genu *COMT* zwraca uwagę również fakt niewielkiej ilości badań dotyczących związku tego wariantu ze stanem przedzucawkowym u kobiet ciężarnych rasy kaukaskiej. Problem ten dodatkowo wymaga analizy w większych liczebnie grupach pacjentek ciężarnych ze stanem przedzucawkowym (tab. 36).

Tabela 36. Zestawienie wyników badań dotyczących częstości występowania polimorfizmu 472G>A COMT u pacjentek ze stanem przedrzucawkowym.

Populacja		Liczba n mężczyźni/kobiety	COMT 472G>A			Allele (%)	
			Genotypy			472G	472A
			Wart. obserw. (%)				
			472GG	472GA	472AA		
kaukaska (Norwegia) [Roten i wsp. 2011]	PE nawracająca	136 0/136	28,0	46,0	27,0	50,0	50,0
	PE nienawracająca	1003 0/1003	18,0	48,0	35,0	42,0	58,0
kaukaska (Polska, Poznań) [Marek 2014]		98 0/98	28,6	50,0	21,4	53,6	46,4
meksykańska (Metysi) [Vazquez-Alaniz i wsp. 2014]		113 0/113	38,9	46,0	15,0	62,0	38,0
chińska [Liang i wsp. 2012]		187 0/187	52,9	36,4	10,7	71,1	28,9
koreańska [Lim i wsp. 2010]		164 0/164	42,7	43,9	13,4	64,6	35,4

Częstość występowania polimorfizmu 472G>A COMT w populacjach zdrowych osób

Istnieje wiele doniesień naukowych dotyczących częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 472G>A COMT w różnych populacjach osób zdrowych. W pracy Palmatier i wsp. można znaleźć dane na temat grup etnicznych ze wszystkich kontynentów. Analiza danych pozwala stwierdzić, iż w populacjach rasy kaukaskiej najczęściej występującym jest genotyp heterozygotyczny 472GA. Z podobną częstością występują pozostałe genotypy homozygotyczny niezmutowany 472GG oraz homozygotyczny zmutowany 472AA. Nieco inaczej wyglądają dane dotyczące populacji rasy azjatyckiej (populacja chińska i koreańska) oraz populacji rasy czarnej (populacje afrykańskie) – w tych populacjach najczęściej występującym jest genotyp homozygotyczny niezmutowany 472GG a najrzadziej występującym genotyp homozygotyczny zmutowany 472AA (tab. 37) [Palmatier i wsp. 1999].

Również wyniki prezentowane w prezentowanej pracy nie odbiegają od doniesień dostępnych w literaturze. Najczęściej występującym genotypem w grupie kontrolnej

zdrowych kobiet ciężarnych był genotyp heterozygotyczny 472GA (50,8%). Wynik ten jest porównywalny z danymi pochodzącymi z innych badan dotyczących rasy kaukaskiej (56,0%; 46,5%, 47,0%, 54,0%) [Szyłło i wsp. 2007, Białecka i wsp. 2008, Ameyaw i wsp. 2000] oraz populacji meksykańskiej (52%) [Vasquez-Alaniz i wsp. 2014], różni się natomiast od rezultatów otrzymanych w badaniach przeprowadzonych w populacji chińskiej, koreańskiej i afrykańskiej, w których to dominującym genotypem jest genotyp homozygotyczny 472GG [Liang i wsp. 2012, Yeh i wsp. 2010, Lim i wsp. 2010, Ameyaw i wsp. 2000] .

W pracy przedstawianej obecnie częstość występowania genotypu niezmutowanego 472GG w grupie kontrolnej wynosiła 26,7%, a genotypu homozygotycznego zmutowanego 472AA wynosiła 22,5%. Podobne rezultaty otrzymano w pracy Szyłło i wsp. oraz Ameyaw i wsp. dotyczącej populacji kaukaskiej w USA (odpowiednio 24,0% oraz 20,0%; 24,0% oraz 22,0%) [Szyłło i wsp. 2007, Ameyaw i wsp. 2000], jak również w publikacjach Białeckiej i wsp. oraz Ameyaw i wsp. dotyczącej populacji kaukaskiej w Wielkiej Brytanii i Irlandii Północnej gdzie częstość występowania genotypu 472GG wynosiła 22,4% oraz 22,0%, a genotyp 472AA występował w 31,1% oraz 31,0% [Białecka i wsp. 2008, Ameyaw i wsp. 2000].

W poniższej tabeli przedstawiono różnice w występowaniu polimorfizmu *COMT* w zależności od grupy etnicznej pacjentów (tab. 37).

Tabela 37. Zestawienie wyników badań dotyczących częstości występowania polimorfizmu *COMT 472G>A* w populacjach osób zdrowych.

Populacja	Liczba <i>n</i> mężczyźni/kobiety	<i>COMT 472G>A</i>			Allele (%)	
		Genotypy Wart. obserw. (%)			472G	472A
		472GG	472GA	472AA		
kaukaska (UK) [Ameyaw i wsp. 2000]	265	22,0	47,0	31,0	45,5	54,5
kaukaska (USA) [Ameyaw i wsp. 2000]	129	24,0	54,0	22,0	51,0	49,0
kaukaska (Norwegia) [Roten i wsp. 2011]	2269 0/2269	19,0	50,0	31,0	44,0	56,0
kaukaska (Polska, Łódź) [Szyłło i wsp. 2007]	197 0/197	24,0	56,0	20,0	52,0	48,0
kaukaska (Polska, Szczecin) [Białecka i wsp. 2008]	357 207/150	22,4	46,5	31,1	45,7	54,3
kaukaska (Polska, Poznań) [Marek 2014]	120 0/120	26,7	50,8	22,5	52,1	47,9
meksykańska (Metysi) [Vazquez-Alaniz i wsp. 2014]	194 0/194	41,0	52,0	7,0	67,0	33,0
chińska [Liang i wsp. 2012]	189 0/189	62,4	32,8	4,8	78,8	21,2
chińska [Yeh i wsp. 2010]	558 0/558	50,0	41,8	8,2	70,9	29,1
koreańska [Lim i wsp. 2010]	182 0/182	52,8	41,2	6,0	73,4	26,6
afrykańska (Ghana) [Ameyaw i wsp. 2000]	195 100/95	55,0	39,0	6,0	74,5	25,5

5.2. UDZIAŁ POLIMORFIZMU *-48A>G* GENU RECEPTORA *DRD1* W ETIOLOGII STANU PRZEDRZUCAWKOWEGO

Kolejnymi wariantami, które badano w niniejszej pracy były polimorfizmy genów receptorów dopaminy *DRD1* i *DRD4*.

Badania w populacji japońskiej wykazały zależność pomiędzy występowaniem nadciśnienia a wariantem polimorficznym receptora *DRD1 -48A>G*. W pracy Sato i wsp. 2000, dotyczącej pacjentów japońskich, obserwowano większą częstość występowania allele typu dzikiego *-48A* w 84% oraz mniejszą częstość allele zmutowanego *-48G* w 16% dla grupy badanej, oraz odpowiednio 92% i 8% dla grupy kontrolnej. Autorzy odnotowali również, w grupie pacjentów z nadciśnieniem, korelację pomiędzy obecnością zmutowanego allele *-48G*

a podwyższonym ciśnieniem diastolitycznym [Sato i wsp. 2000].

Inne badanie prowadzone w dwóch grupach pacjentów z populacji japońskiej: 131 osób z nadciśnieniem tętniczym oraz 136 osób, które stanowiły grupę kontrolną z prawidłowymi wartościami ciśnienia krwi, sugerują, iż osoby będące nosicielami allele *-48G* mają najwyższe wartości ciśnienia krwi, podczas gdy osoby z genotypem *-48GG* wykazują wartości najniższe (jednakże ten genotyp występował najrzadziej). Jednocześnie wykazano, iż wśród populacji japońskiej przeważają osoby z genotypem *-48AA* [Beige i wsp. 2004].

Wśród doniesień naukowych znaleźć można również pracę amerykańską, w której również analizowano polimorfizm *-48A>G* w grupie Afroamerykanów oraz grupie rasy białej. Wykazano, iż allele *-48G* częściej występuje w populacji osób białych w porównaniu do populacji afroamerykańskiej. Potwierdzono, iż osoby z genotypem *-48AG* mają wyższe ciśnienie krwi niż osoby z genotypem *-48AA* [Lu i wsp. 2006].

Niestety w pracach dotyczących populacji kaukaskiej wyniki są odmienne. Badano dwa polimorfizmy genu *DRD1* *-48A>G* oraz *-94G>A* i nie wykazano związku pomiędzy ich występowaniem a nadciśnieniem tętniczym. Potwierdzono jedynie częstsze występowanie genotypu *AG* i *GG* w stosunku do populacji japońskiej [Beige i wsp. 2004].

W doniesieniu autorów z Włoch zbadano zależność pomiędzy polimorfizmem receptora *DRD1* *-48A>G* a upośledzoną funkcją nerek pacjentów z nadciśnieniem tętniczym. Wyniki sugerują, iż pacjenci z genotypem *-48AA* są bardziej narażeni na uszkodzenie nerek i zaburzenie ich funkcji filtrującej [Cipolletta i wsp. 2012]. Z kolei w doniesieniu tureckim, dotyczącym badania genotypu w grupie 100 osób pod kątem występowania polimorfizmu *-48A>G* otrzymano wyniki wskazujące, iż wyższe wartości ciśnienia tętniczego krwi występowały u pacjentów z genotypem *-48GG* a najniższe w przypadku genotypu *-48AA* [Gönen i wsp. 2007]. Również badania w populacji z USA sugerują, iż allele *-94A* może być markerem ułatwiającym przewidywanie sprawności funkcji nerek u osób z postępującymi schorzeniami tego narządu [Fung i wsp. 2009].

W przypadku analizowania wyników dotyczących tego polimorfizmu warto wspomnieć o pracy Tencomnao i Boonmalert 2009. Autorzy tej pracy na podstawie analizy dostępnych publikacji wykazują, iż w niektórych pracach przedstawiono nieprawidłowe rezultaty. Wynika to z błędnego odczytania w niektórych pracach allele *-48G*, jako *-48A*. W przypadku tego polimorfizmu warto zwrócić uwagę na metodykę i ewentualne różnice w wynikach, aby uniknąć błędnej interpretacji wyników [Tencomnao i Boonmalert 2009].

Niektóre dane dotyczące częstości występowania polimorfizmu $-48A>G$ genu receptora DRD1 u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i stanem przedzrzucawkowym zostały przedstawione w tabeli 38.

Tabela 38. Zestawienie wyników badań dotyczących częstości występowania polimorfizmu $-48A>G$ genu *DRD1* u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i stanem przedzrzucawkowym.

<i>Populacja</i>	<i>Liczba n mężczyźni/kobiety</i>	<i>DRD1 -48A>G</i>			<i>Allele (%)</i>	
		<i>Genotypy</i>			<i>-48A</i>	<i>-48G</i>
		<i>Wart. obserw. (%)</i>				
		<i>-48AA</i>	<i>-48AG</i>	<i>-48GG</i>		
kaukaska [Beige i wsp. 2004]	493 247/246	38,1	51,3	10,5	63,0	37,0
kaukaska (Polska, Poznań) [Marek 2014]	98 0/98	43,9	45,9	10,2	66,8	33,2
japońska [Sato i wsp. 2000]	131 85/46	71,0	27,0	2,0	84,0	16,0

Częstość występowania polimorfizmu $-48A>G$ genu DRD1 w populacjach osób zdrowych

Analiza danych z piśmiennictwa dotyczących populacji rasy kaukaskiej pokazuje, że genotyp $-48AG$ *DRD1* pojawia się w tych populacjach najczęściej. W pracy Beige i wsp. genotyp ten występował z częstością 51,2%. Wyniki te są zbliżone do frekwencji uzyskanej w niniejszym badaniu (50,8%). Najrzadziej występującym genotypem w populacjach kaukaskich jest genotyp homozygotyczny zmutowany $-48GG$ - odpowiednio 11,5% oraz 14,2% [Beige i wsp. 2004, Marek 2014 – badanie własne].

W przypadku populacji azjatyckich wyniki są nieco odmienne i tak genotyp homozygotyczny niezmutowany $-48AA$ występuje najczęściej: populacja koreańska – 83%, populacja japońska – 83,0% i 85,1%, populacja chińska – 78,1% i 71,0%. Genotyp homozygotyczny zmutowany $-48GG$ występuje w tych populacjach bardzo rzadko - 0% [Kang i wsp. 2008, Kojima i wsp. 1999, Sato i wsp. 2000] oraz 2,9% i 3,0% [Zhao i wsp. 2011, Liu i wsp. 2006] (tab. 39).

Tabela 39. Zestawienie wyników badań dotyczących częstości występowania polimorfizmu -48A>G genu *DRD1* w populacjach osób zdrowych.

Populacja	Liczba n mężczyźni/kobiety	DRD1 -48A>G			Allele (%)	
		Genotypy			-48A	-48G
		Wart. obserw. (%)				
		-48AA	-48AG	-48GG		
kaukaska [Beige i wsp. 2004]	209 125/84	37,3	51,2	11,5	64,0	36,0
kaukaska (Polska, Poznań) [Marek 2014]	120 0/120	35,0	50,8	14,2	60,4	39,6
koreańska [Kang i wsp. 2008]	94 51/43	83,0	17,0	0	92,0	8,0
japońska [Kojima i wsp. 1999]	148 73/75	85,1	14,9	0	93,0	7,0
japońska [Sato i wsp. 2000]	136 103/33	83,0	17,0	0	92,0	8,0
chińska [Zhao i wsp. 2011]	347 252/95	78,1	19,0	2,9	87,6	12,4
chińska [Liu i wsp. 2006]	425 245/180	71,0	26,0	3,0	84,0	16,0

5.3. UDZIAŁ POLIMORFIZMU -521C>T GENU RECEPTORA *DRD4* W ETIOLOGII STANU PRZEDZRUCAWKOWEGO

Ostatnim z badanych był polimorfizm -521C>T genu receptora *DRD4*. Jest to receptor należący do typu D2 receptora dopaminowego, a jego polimorfizm również może być związany ze stanem przedzrucawkowym. Jak już wspomniano wcześniej, dopamina syntetyzowana jest w łożysku, gdzie oddziałuje poprzez receptory dopaminowe typu 2, do których należy receptor *DRD4*. Ponieważ dopamina hamuje wydzielanie laktogenu z łożyska, a jednocześnie obserwuje się obniżone stężenie laktogenu w przypadku stanu przedzrucawkowego, może istnieć związek pomiędzy polimorfizmem receptora *DRD4* a rozwojem tego powikłania [Vaillancourt i wsp. 1998, Korobochka i wsp. 2006]. Zasadnym też wydaje się powiązanie polimorfizmu receptora *DRD4* ze stanem przedzrucawkowym na podstawie badań prowadzonych na myszach gdzie wykazano, iż aktywność receptora *DRD4* wpływa na podwyższone ciśnienie tętnicze krwi [Bek i wsp. 2001].

Obecnie doniesienia na temat wpływu polimorfizmu -521C>T *DRD4* na występowanie stanu przedzrucawkowego są nieliczne. W badaniu przeprowadzonym przez kanadyjskich naukowców Villancourt i wsp. w roku 1998, wykazano, iż w przypadku

pacjentek ze stanem przedzucawkowym, ilość receptorów dopaminowych w łożysku była obniżona w porównaniu do zdrowych ciężarnych [Vaillancourt i wsp. 1998]. Te wahania poziomu ekspresji dopaminy u zdrowych kobiet ciężarnych oraz ciężarnych ze stanem przedzucawkowym wydają się przemawiać za znaczącym wpływem dopaminy na funkcjonowanie łożyska [Korobochka i wsp. 2006].

Korobochka i wsp. przeprowadzili badanie prospektywne w oparciu o analizę 50 rodzin (pacjentka oraz oboje jej rodziców) mające na celu ocenę znaczenia polimorfizmu -521C>T genu *DRD4* w rozwoju stanu przedzucawkowego (FBAT - *family-based association test*). Analiza obejmowała także ocenę stężenia aminotransferazy asparaginowej oraz wartości skurczowego ciśnienia tętniczego. Odnotowano istotną statystycznie korelację (przekazywanie zmutowanego allela -521T od rodzica będącego nosicielem genotypu heterozygotycznego córce, u której rozwinęła się preeklampsja) między analizowanym polimorfizmem a ryzykiem rozwoju stanu przedzucawkowego ($p=0,019$). Ponadto odnotowano statystycznie istotną korelację między allelem -521T a stężeniem aminotransferazy asparaginowej ($p=0,039$) oraz wartościami skurczowego ciśnienia tętniczego ($p=0,036$). Polimorfizm -521C>T, który redukuje aktywność transkrypcyjną genu *DRD4* wydaje się zwiększać ryzyko rozwoju stanu przedzucawkowego. Co więcej, autorzy sugerują, iż nosicielstwo zmutowanego genotypu homozygotycznego -521TT może być markerem ciężkiego stanu przedzucawkowego [Korobochka i wsp. 2006].

Badanie przeprowadzone przez naukowców izraelskich pokazuje również, iż u pacjentek nosierek genotypu -521TT *DRD4*, można spodziewać się zmniejszonej liczby receptorów *DRD4* oraz podwyższonego ciśnienia krwi. Polimorfizm ten wiąże się również z podwyższonym poziomem transaminazy asparaginianowej, co może sugerować, iż obecność genotypu homozygotycznego -521TT *DRD4* mogłaby również być markerem poziomu zaawansowania stanu przedzucawkowego, a jednocześnie markerem ułatwiającym wyodrębnienie pacjentek bardziej narażonych na to powikłanie [Korobochka i wsp. 2006].

Wyniki dotyczące rozkładu genotypów i alleli w poszczególnych badanych populacjach przedstawiono w tabeli 40.

Tabela 40. Zestawienie wyników badań dotyczących częstości występowania polimorfizmu -521C>T genu *DRD4* u pacjentek ze stanem przedrzucawkowym.

<i>Populacja</i>	<i>Liczba n mężczyźni/kobiety</i>	<i>DRD4 -521C>T</i>			<i>Allele (%)</i>	
		<i>Genotypy</i>			<i>-521C</i>	<i>-521T</i>
		<i>Wart. obserw. (%)</i>				
		<i>-521CC</i>	<i>-521CT</i>	<i>-521TT</i>		
izraelska [Korobochka i wsp. 2006]	50 0/50	28,1	49,5	22,5	52,8	47,2
kaukaska (Polska, Poznań) [Marek 2014]	98 0/98	17,4	46,9	35,7	40,8	59,2

Częstość występowania polimorfizmu -521C>T genu DRD4 w populacjach zdrowych osób

W powyższej rozprawie w grupie zdrowych kobiet ciężarnych częstość występowania genotypu homozygotycznego -521CC wynosiła 20,0%, heterozygotycznego -521CT 46,7% oraz genotypu homozygotycznego zmutowanego -521TT wynosiła 33,3%. Natomiast obserwowana częstość allela -521C to 43,3% oraz zmutowanego allela -521T to 56,7%. Wartości te nie odbiegają od wartości obserwowanych w innych populacjach. Zarówno w badaniu Jönsson i wsp. dotyczącej populacji kaukaskiej jak i w pracach naukowców z krajów azjatyckich genotyp heterozygotyczny -521CT w grupach kontrolnych występuje najczęściej. Najrzadziej oznaczany był genotyp homozygotyczny niezmutowany -521CC. Jedynie w populacji koreańskiej występuje on z tą samą częstością co genotyp homozygotyczny zmutowany -521TT [Jönsson i wsp. 2001, Nakajima i wsp.2007, Okuyama i wsp. 1999, Mitsuyasu 1999, Prasad i wsp. 2008, Kang i wsp. 2008] . Wyniki dotyczące rozkładu genotypów i alleli w poszczególnych badanych populacjach przedstawiono w tabeli 41.

Tabela 41. Zestawienie wyników badań dotyczących częstości występowania polimorfizmu -521C>T genu *DRD4* w populacjach osób zdrowych.

Populacja	Liczba n meżczyźni/kobiety	<i>DRD4 -521C>T</i>			Allele (%)	
		Genotypy			-521C	-521T
		Wart. obserw. (%)				
		-521CC	-521CT	-521TT		
kaukaska [Jönsson i wsp. 2001]	388 216/172	15,0	54,0	31,0	42,0	58,0
kaukaska (Polska, Poznań) [Marek 2014]	120 0/120	20,0	46,7	33,3	43,3	56,7
japońska [Nakajima i wsp. 2007]	569 285/285	16,0	50,0	34,0	41,0	59,0
japońska [Okuyama i wsp. 1999]	269 165/104	14,0	53,0	33,0	41,0	59,0
japońska [Mitsuyasu 1999]	80	17,9	46,3	35,8	41,0	59,0
indyjska [Prasad i wsp. 2008]	225 76/149	18,0	44,0	38,0	40,0	60,0
koreańska [Kang i wsp. 2008]	94 51/43	23,4	53,2	23,4	50,0	50,0

5.4. KORELACJA POSZCZEGÓLNYCH GENOTYPÓW BADANYCH POLIMORFIZMÓW GENU ENZYMU *COMT* I GENÓW RECEPTORÓW DOPAMINY *DRD1* I *DRD4* Z DANymi BIOCHEMICZNYMI BADANYCH PACJENTEK I ICH NOWORODKÓW

W niniejszym badaniu przeprowadzono również analizę porównawczą parametrów biochemicznych i danych klinicznych kobiet z grupy badanej z PE, kobiet z grupy kontrolnej oraz ich noworodków, w zależności od częstości występowania genotypów polimorfizmu genu *COMT* 472G>A i genów receptorów dopaminy *DRD1* i *DRD4*. Warto podkreślić, iż jest to badanie nowatorskie, dotychczas w populacjach kobiet z rasy kaukaskiej nie prowadzono podobnych analiz.

W przypadku polimorfizmu 472G>A genu *COMT* zaobserwowano, iż kobiety z grupy badanej, które były nosicielkami genotypu homozygotycznego zmutowanego 472AA miały niższe wartości ciśnienia tętniczego krwi (ciśnienie skurczowe 163,1 mmHg, ciśnienie rozkurczowe 101,9 mmHg) w porównaniu do kobiet z genotypem heterozygotycznym 472GA (ciśnienie skurczowe 174,5 mmHg, ciśnienie rozkurczowe 107,5 mmHg) i genotypem homozygotycznym 472GG (ciśnienie skurczowe 171,1 mmHg, ciśnienie rozkurczowe 107,3 mmHg). Ponadto w tej samej podgrupie kobiet z genotypem 472AA odnotowano niższe

wartości białkomoczu (246,43 mg/dL vs 317,86 mg/dL i 316,07 mg/dL). Różnice te nie były istotne statystycznie, jednak obserwowana tendencja może sugerować wpływ polimorfizmu genu *COMT* na obserwowane wartości parametrów klinicznych badanych pacjentek.

Analiza porównawcza wartości parametrów biochemicznych i danych klinicznych kobiet i noworodków z grupy badanej i grupy kontrolnej, w zależności od rodzaju genotypu -48 A>G *DRD1* nie wykazała żadnych różnic. Możliwe, iż polimorfizm ten nie ma wpływu na parametry kliniczne i biochemiczne pacjentek.

Dla polimorfizmu genu -521C>T *DRD4* również obliczono średnie wartości parametrów biochemicznych. Zaobserwowano statystycznie istotne różnice w przypadku dwóch zmiennych. Pierwsza, w grupie kobiet z PE to stężenie białka całkowitego, które w grupie kobiet z genotypem -521CC wynosiło 6,2 g/L, a w przypadku genotypu -521TT – 5,6 g/L (p=0,02). Druga zmienna to masa ciała przed ciążą w grupie kobiet zdrowych, która w przypadku kobiet z genotypem homozygotycznym -521CC wynosiła 65,6 kg, a u kobiet z genotypem homozygotycznym -521TT – 59,6 kg (p=0,007). Być może odmiana polimorficzna genu receptora DRD4 -521TT ma modulujący wpływ na parametry kliniczne i biochemiczne pacjentek ze stanem przedrzucawkowym.

W przypadku analizy parametrów biochemicznych zdrowych ciężarnych oraz danych klinicznych noworodków kobiet z obu grup nie zaobserwowano żadnych istotnych różnic.

5.5. ZNACZENIE WARIANTÓW POLIMORFICZNYCH W FARMAKOTERAPII NADCIŚNIENIA TĘTNICZEGO I STANU PRZEDRZUCAWKOWEGO

Wiele prowadzonych obecnie badań z zakresu farmakogenetyki dotyczy enzymów, które metabolizują leki stosowane w nadciśnieniu tętniczym. Badania pokazują, iż warianty polimorficzne tych enzymów mogą mieć wpływ na procesy przemian farmakokinetycznych i farmakodynamicznych leków w organizmie człowieka. Analiza wariantów genów kodujących enzymy umożliwia lepsze zrozumienie różnic dotyczących odpowiedzi organizmu na podawanie leków hipotensyjnych i wyjaśnia dlaczego u niektórych pacjentów stosowane standardowe dawki nie wywierają oczekiwanego efektu terapeutycznego.

Jednym z przykładów wpływu polimorfizmu genetycznego na metabolizm leków jest polimorfizm N-acetylotransferazy (NAT). Enzym odpowiada za procesy acetylacji, które włączane są w II fazę biotransformacji leków. Sama reakcja acetylacji polega na przenoszeniu rodników acetylowych na cząsteczki zawierające w swojej strukturze grupę -NH₂, -OH lub -SH [Chlebowska i wsp. 2006]. Wyróżnia się dwa izoenzymy: N-acetylotransferazę 1 (NAT1) i N-acetylotransferazę 2 (NAT2). NAT1 katalizuje reakcje acetylacji struktur aryloaminowych

np. kwasy p-aminosalicylowego i kwasu p-aminobenzoowego, podczas gdy NAT2 acetyluje takie związki jak izoniazyd, kofeinę i sulfasalazynę [Sekine i wsp. 2001]. Szybkość acetylacji jest uwarunkowana genetycznie i zależy od punktowych mutacji genu kodującego N-acetylotransferazę. Zmienność genetyczna powoduje powstanie dwóch fenotypów: szybkiej (*FA - fast acetylation*) i wolnej acetylacji (*SA - slow acetylation*). Acetylacja szybka odpowiada dwóm genotypom: hetero- i homozygotycznemu dominującemu, podczas gdy acetylach wolna uwarunkowana jest obecnością genotypu homozygotycznego z dwoma recesywnymi allelami wolnego metabolizmu. Ta osobnicza zmienność może w znaczący sposób wpływać na skuteczność terapii lekami, które są metabolizowane przez enzym NAT i stosowane w dawkach standardowych. W przypadku osób z fenotypem wolnym acetylacji mogą wystąpić nasilone objawy niepożądane, u osób z fenotypem szybkim acetylacji zastosowana farmakoterapia może być nieskuteczna. Szybkość acetylacji jest zróżnicowana etnicznie. W populacji kaukaskiej występuje 49-62,2% osób z wolnym fenotypem acetylacji, natomiast w populacjach rasy azjatyckiej od 5 do 34%. Enzym NAT metabolizuje wiele leków m.in.: acebutalol, kofeinę, hydralazynę, benzodiazepiny. Osoby z wolnym fenotypem acetylacji są predysponowane do wystąpienia powikłań polekowych związanych z kumulacją leku w organizmie np. hydralazyna może spowodować powstanie zespołu tocznia polekowego. Fenotyp acetylacji wiąże się również z zapadalnością na niektóre choroby np. u osób z wolnym fenotypem acetylacji stwierdza się częstsze występowanie łuszczycy i raka pęcherza moczowego. Z kolei w przypadku osób z szybkim fenotypem acetylacji częściej występuje samoistny toczeń rumieniowy i reumatoidalne zapalenie stawów [Chlebowska i wsp. 2006].

Innym ważnym etapem w biotransformacji leków i ksenobiotyków, na który wpływ ma obecność mutacji i polimorfizmów genetycznych jest proces metylacji. Badania farmakogenetyczne tego etapu oparte są na systematycznym poszukiwaniu wariantów genetycznych włączonych w proces metabolizmu leków lub substancji endogennych i ich analizowaniu pod kątem ewentualnych implikacji klinicznych i terapeutycznych [Weinshilboum i wsp. 1999]. Reakcje sprzęgania z grupą metylową są również istotnym szlakiem w procesie transformacji wielu egzogennych i endogennych związków chemicznych, takich jak neurotransmitery, lub hormony. Proces metylacji opisano po raz pierwszy ponad 100 lat temu, po przeprowadzeniu badań na psach, którym podawano pirydynę, a w ich moczu oznaczano stężenie N-metylopirydyny. Dzięki analizie farmakogenetycznej enzymów z grupy metylotransferaz (grupa obecnie liczy więcej niż 100 enzymów) zidentyfikowano i scharakteryzowano funkcjonalnie ważne mutacje genetyczne

katecholo-*O*-metylotransferazy (COMT), metylotransferazy tiopurynowej oraz histamino-*N*-metylotransferazy. Polimorfizm metylotransferazy tiopurynowej, który został zbadany jako jeden z pierwszych, odpowiada za klinicznie istotne różnice w toksyczności i efektywności terapeutycznej leków tiopurynowych, takich jak 6-merkaptopuryna [Weinshilboum i wsp. 1999].

Gen kodujący enzym COMT, którego polimorfizmy genetyczne i ich ewentualny wpływ na efektywność leczenia metyldopa analizowano w niniejszej pracy był jednym z pierwszych analizowanych genów enzymów z grupy aminotransferaz [Weinshilboum i wsp. 1999]. Polimorfizmy genetyczne enzymu COMT mogą mieć istotny wpływ na stężenia niektórych leków, uwzględniając różnice pomiędzy poszczególnymi reakcjami metylacji związków katecholowych. Opisana została znacząca korelacja pomiędzy poziomem aktywności enzymu COMT w erytrocytach a stosunkiem 3-*O*-metyldopa oraz L-dopa u pacjentów z chorobą Parkinsona. W tej grupie pacjentów stosowano L-dopa, dla którego to leku reakcja *O*-metylacji jest głównym szlakiem metabolicznym. Podobną korelację odnotowano pomiędzy aktywnością COMT w erytrocytach i stosunkiem pomiędzy metylowanymi metabolitami a lekiem podstawowym – metyldopa i jej innymi metabolitami [Weinshilboum i wsp. 1999]. Obecność wariantów polimorficznych genu *COMT* odgrywa rolę nie tylko w różnicach w biotransformacji leków, ale również może być potencjalnym czynnikiem ryzyka w patofizjologii niektórych chorób. Ponieważ katecholaminy pełnią w organizmie funkcję neurotransmitterów, pierwotnie powiązano modyfikacje aktywności enzymu COMT z chorobami neuropsychiatrycznymi, takimi jak schizofrenia lub choroba Parkinsona. Później powiązano różnice w aktywności enzymu COMT również z ryzykiem wystąpienia nowotworu piersi [Weinshilboum i wsp. 1999].

Innymi genami kandydującymi i ich wariantami polimorficznymi, które mogą przyczyniać się modyfikacji odpowiedzi farmakologicznej są geny z układu renina-angiotensyna, gen α -adducyny, gen receptora β 1-adrenergicznego, podjednostki α białka Gs lub podjednostki β 3-białka G [Janowska i Głuszek 2004, Schelleman i wsp. 2006]. Jedna z publikacji pokazuje zależność pomiędzy efektywnością terapii lekiem losartan (inhibitor enzymu konwertującego angiotensynę) u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym a obecnością wariantów polimorficznych genu kodującego ten enzym. Wyniki badań sugerują związek pomiędzy występowaniem polimorfizmów tego genu a efektem hipotensyjnym losartanu po 8 tygodniach leczenia [Makowiecka-Cieśla i wsp. 2007].

W literaturze naukowej można również znaleźć doniesienia o możliwym związku polimorfizmów genetycznych z wielkością stosowanych dawek leków w farmakoterapii stanu

przedrzucawkowego. W badaniu przeprowadzonym przez Sandrim i wsp. analizowano wpływ różnych haplotypów genu *eNOS* na leczenie stanu przedrzucawkowego oraz nadciśnienia tętniczego przewlekłego u ciężarnych. W przypadku braku odpowiedzi na metyldopę pacjentki otrzymywały metyldopa w dawkach 1000-1500 mg na dobę oraz nifedypinę w dawce 40-60 mg/dzień i/lub hydralazynę 5-30 mg/dzień. Wykazano, iż polimorfizm *eNOS* nie ma wpływu na farmakoterapię kobiet z przewlekłym nadciśnieniem tętniczym, ale modyfikuje odpowiedź na leczenie kobiet ze stanem przedrzucawkowym. Spośród leków, które podawano pacjentkom, odmiany polimorficzne genu *eNOS* nie wpływały na leczenie metyldopa, prawdopodobnie dlatego, iż mechanizm działania tego leku nie ma związku z produkcją NO. Natomiast mechanizmy działania leków hydralazyna i nifedypina są związane z syntezą i uwalnianiem tlenku azotu, zatem polimorfizm genu *eNOS* może modyfikować ich działanie [Sandrim i wsp. 2010].

W związku z powyższymi doniesieniami w niniejszej pracy postanowiono zbadać ewentualny wpływ polimorfizmów genu *COMT* oraz genów receptorów *DRD1* i *DRD4* na wielkość stosowanych dawek metyldopa u ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym. Metyldopa jest lekiem powszechnie stosowanym u ciężarnych, u których występuje nadciśnienie tętnicze przewlekłe lub stan przedrzucawkowy. Terapia tym lekiem powinna być dobierana indywidualnie, ponieważ istnieje wiele różnic w metabolizmie i dawce, przy której osiąga się pożądany efekt terapeutyczny.

Metyldopa wykazuje działanie poprzez trzy szlaki metaboliczne: sprzęganie z siarczanami katalizowane przez sulfotransferazę fenolową, O-metylację katalizowaną przez *COMT* oraz dekarboksylację przy udziale dekarboksylazy aromatycznych L-aminokwasów. Metylacja metyldopy prowadzi do powstania 3-O-metylo- α -metyldopa, dekarboksylacja przekształca metyldopa do postaci α -metyldopaminy, która może podlegać również sprzęganiu z siarczanami dając siarczan α -metyldopaminy. Badania metabolizmu metyldopy sugerują, iż różnice w dostępności donoru siarczanowego-3'-fosfoadenozyno-5'-fosfosiarczanu do reakcji z sulfotransferazą fenolową mogą powodować indywidualne zmiany w metabolizmie metyldopy. Procent metyldopy i α -metyldopy wydalanych z moczem jako siarczany maleje wraz ze wzrostem podawanej dawki metyldopy. Ponadto zaobserwowano, iż aktywność *COMT* w erytrocytach skorelowana jest ze stopniem, do którego lek ulega O-metylacji, wiadomo także, iż aktywność enzymu *COMT* w erytrocytach odpowiada aktywności tego enzymu w tkankach odpowiadających za metabolizm leków [Campbell i wsp. 1985]. Indywidualne różnice w aktywności tych enzymów mogą być związane z różnicami w metabolizmie metyldopy u poszczególnych pacjentów [Campbell i

wsp. 1984, Campbell i wsp. 1985].

Przynajmniej trzy czynniki odpowiadają za różnice w metabolizmie leku metyldopa. Są to: różnice w stężeniu i aktywności enzymów (COMT lub sulfotransferaza fenolowa), różnice w absorpcji leku oraz różnice w dostępności siarczanów [Campbell i wsp. 1985]. W przypadku enzymu COMT różnice w aktywności mogą być determinowane genetycznie. Już w latach 80-tych XX wieku wskazano, iż indywidualne odmienności w aktywności enzymów są częściowo odpowiedzialne za różnice w metabolizmie metyldopy, częściowo więc mogą wpływać na efekt terapeutyczny leku [Campbell i wsp. 1984].

Analiza danych w niniejszym opracowaniu pokazuje, iż wysokie dawki leku hipotensyjnego metyldopa podawano najczęściej kobietom o genotypie homozygotycznym *472GG* oraz heterozygotycznym *472GA*, natomiast dawki najniższe, tylko do 1000 mg metyldopa na dobę stosowano głównie w grupie kobiet z genotypem homozygotycznym *472AA*. Możliwy umiarkowany związek był jeszcze bardziej widoczny w czasie analizy dawek u kobiet z ciężkim stanem przedrzucawkowym, gdzie wśród kobiet z genotypem homozygotycznym zmutowanym *472AA* 26,67% przyjmowało dawkę najniższą leku metyldopa, dawkę 1500 mg przyjmowało tylko 7,69% pacjentek, a dawki powyżej 2000 mg stosowano u 9,52% kobiet z tym genotypem. (WR=3,78, p=0,12, PU 0,53-28,98).

Prawdopodobnie polimorfizm *-521C>T DRD4* również może mieć wpływ na dawkę leku metyldopa. W prezentowanym badaniu zaobserwowano, iż ciężarne z genotypem homozygotycznym zmutowanym *-521TT* otrzymywały najwyższe dawki metyldopa (42,86%) w porównaniu do pacjentek z genotypem homozygotycznym niezmutowanym *-521CC* (26,67%) oraz genotypem heterozygotycznym *-521CT* (15,38%) (WR=2,75, p=0,09, PU 0,67-11,70)

Wyniki sugerują możliwą zależność stosowanej u ciężarnej ze stanem przedrzucawkowym dawki metyldopa od nosicielstwa genotypów *-472AA COMT* oraz *-521TT DRD4*.

5.6. PODSUMOWANIE

Na podstawie analizy dostępnych publikacji naukowych wydaje się, iż enzym katecholo-*O*-metylotransferaza oraz receptory dopaminy DRD1 i DRD4 mogą odgrywać rolę w patogenezie nadciśnienia tętniczego oraz stanu przedrzucawkowego. Co więcej, polimorfizmy genetyczne, które modyfikują aktywność enzymu COMT oraz receptorów dopaminy DRD1 i DRD4 mogą przyczyniać się do większej lub mniejszej podatności na wystąpienie tych powikłań, ich różnego przebiegu oraz odpowiedzi na leczenie farmakologiczne. Na uwagę zasługuje fakt stosunkowo dużej liczby publikacji wiążących te polimorfizmy z nadciśnieniem tętniczym, nieliczne natomiast pozostają prace dotyczące związku wariantów polimorficznych ze stanem przedrzucawkowym, zwłaszcza w przypadku polimorfizmów receptorów dopaminowych w populacji kaukaskiej. W niniejszej rozprawie próbowano również ustalić związek pomiędzy odmianami polimorficznymi enzymu COMT oraz receptorów DRD1 i DRD4 a stosowaną dawką leku metyldopa.

Uzyskane wyniki sugerują możliwy związek pomiędzy badanymi polimorfizmami *472G>A COMT*, *-48A>G DRD1* oraz *-521C>T DRD4* a występowaniem stanu przedrzucawkowego i jego leczeniem. Natomiast, aby w pełni ocenić wpływ polimorfizmów genetycznych na metabolizm i efekt terapeutyczny leku metyldopa u kobiet ze stanem przedrzucawkowym, należałoby również zbadać polimorfizmy dwóch pozostałych enzymów, biorących udział w przemianach tego leku – sulfotransferazy fenolowej oraz dekarboksylazy aromatycznych L-aminokwasów. Prawdopodobnie, współistnienie polimorfizmów genetycznych wszystkich trzech enzymów wpływa na aktywność farmakologiczną leku metyldopa.

Stan przedrzucawkowy jest złożonym powikłaniem, należącym do chorób uwarunkowanych wieloczynnikowo. W etiologii tych chorób polimorfizmy genetyczne odgrywają dużą rolę i w przyszłości mogą być wykorzystane jako markery wczesnej predykcji. Wyłonienie jednoznacznych i tanich w oznaczeniu markerów biologicznych, ułatwiłoby diagnostykę jak również profilaktykę stanu przedrzucawkowego. Niewątpliwie badania tego typu należy kontynuować w większych liczebnie grupach ciężarnych.

6. WNIOSKI

1. Wyniki pracy sugerują możliwy ochronny udział zmutowanego allela *472A COMT* oraz zmutowanego allela *-48G DRD1* u matki w patogenezie ciężkiej postaci stanu przedrzucawkowego.
2. Obecność zmutowanego genotypu *472AA* polimorfizmu *472G>A COMT* może wiązać się z obniżeniem ciśnienia skurczowego, rozkurczowego oraz wartości białkomoczu u kobiet ze stanem przedrzucawkowym.
3. Analiza dawki metylodopa w zależności od występowania badanych polimorfizmów sugeruje możliwy modulujący wpływ genotypu *472AA COMT* oraz *-521TT DRD4* na wielkość stosowanej dawki leku w ciężkiej postaci PE.
4. Obecność zmutowanego genotypu *-521TT DRD4* może wpływać na obniżenie wartości białka w surowicy krwi u kobiet ze stanem przedrzucawkowym.
5. Obserwowana częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów genów *COMT* i receptorów dopaminy *DRD1* oraz *DRD4* jest podobna do rozkładu tych polimorfizmów w innych populacjach rasy kaukaskiej.

7. PIŚMIENNICTWO

1. de Almeida JA, Cavallotti C, Peréira Leite L, Ricci A, Zaccheo D, Amenta F. Loss of dopamine D1-like receptors in the umbilical artery of pre-eclamptic subjects. *J Auton Pharmacol*. 1994, 14, 353-363.
2. Ameyaw MM, Syvänen AC, Ulmanen I, Ofori-Adjei D, McLeod HL. Pharmacogenetics of catechol-O-methyltransferase: frequency of low activity allele in a Ghanaian population. *Hum Mutat*. 2000, 16, 445-446.
3. Annerbrink K, Westberg L, Nilsson S, Rosmond R, Holm G, Ericsson E. Catechol-O-methyltransferase val158-met polymorphism is associated with abdominal obesity and blood pressure in men. *Met Clin Exp*. 2008, 577, 708-711.
4. Arinami T, Ishiguro H, Onaivi ES. Polymorphism in genes involved in neurotransmission in relation to smoking. *Eur J Pharmacology*. 2000, 410, 215-226.
5. Asghar M, Tayebati SK, Lokhandwala MF, Hussain T. Potential dopamine-1 receptor stimulation in hypertension management. *Curr Hypertens Rep*. 2011, 13, 294-302.
6. Beige J, Bellmann A, Sharma AM, Gebner. Ethnic origin determines the impact of genetic variants in dopamine receptor gene (DRD1) concerning essential hypertension. *A J Hypert*. 2004, 17, 1184-1187.
7. Bek M, Zheng S, Asico LD, Grandy DK, Rubinstein M, Carey RM, Eisner GM, Jose PA. D4 dopamine receptor regulates blood pressure via V1 vasopressin and AT1 receptors. *A J Hypert*. 2001, 14, 213-214.
8. Bell MJ. A historical overview of preeclampsia-eclampsia. *J Obstet Gyn Neonatal Nurs*. 2010, 39, 510-518.
9. Bertocci B, Miggiano V, Da Prada M, Dembic Z, Lahm HW, Malherbe P. Human catechol-O-methyltransferase: cloning and expression of the membrane-associated form. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991, 88, 1416-1420.
10. Białecka M, Kurzawski M, Kłodowska-Duda G, Opala G, Tan EK, Drozdziak M. The association of functional catechol-O-methyltransferase haplotypes with risk of Parkinson's disease, levodopa treatment response and complications. *Pharm Genom*. 2008, 18, 815-821.
11. Bottalico B, Larsson I, Brodzki J, Hernandez-Andrade E, Casslén B, Marsál K, Hansson SR. Norepinephrine transporter (NET), serotonin transporter (SERT), vascular monoamine transporter (VMAT2) and organic cation transporters (OCT1, 2 and EMT) in human placenta from pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Placenta*. 2004, 25, 518-529.
12. Bręborowicz GH, Szymczak M. Nadciśnienie tętnicze. W: Ciąża wysokiego ryzyka. Pod red.: Bręborowicz GH. Ośrodek Wydawnictw Naukowych Poznań. 2000, 759-786.
13. Bręborowicz GH, Choroby matki wnikające przebieg ciąży. W: Położnictwo. Podręcznik dla położnych i pielęgniarek. Pod red.: Bręborowicz GH. Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa. 2002, 294-313.
14. Brown TA. Analiza DNA. W: Genomy. Pod red.: Brown TA. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa. 2012, 31-62.
15. Campbell NRC, Dunnette JH, Mwaluko G, Van Loon J, Weinshilboum RM. Platelet phenol sulfotransferase and erythrocyte catechol-O-methyltransferase activities: correlation with methyl dopa metabolism. *Clin Pharmacol Ther*. 1984, 35, 55-63.
16. Campbell NRC, Sundaram RS, Werness PG, Van Loon J. Sulfate and methyl dopa metabolism: metabolite patterns and platelet phenol sulfotransferase activity. *Clin Pharmacol Ther*. 1985, 37, 308-315.
17. Cerdeira AS i Karumanchi SA. Angiogenic factors in preeclampsia and related

- disorders. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012, 23, 1-18.
18. Chappell LC, Seed PT, Briley AL, Kelly FJ, Lee R, Hunt BJ, Parmar K, Bewley SJ, Shennan AH, Steer PJ, Poston L. Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *Lancet.* 1999, 354, 810-816.
 19. Chappell LC, Seed PT, Briley A, Kelly FJ, Hunt BJ, Charnock-Jones S, Mallet AL, Poston L. A longitudinal study of biochemical variables in women at risk of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2002, 187, 127-136.
 20. Cheung P-Y, Barrington KJ. Renal dopamine receptors: mechanisms of actions and developmental aspects. *Cardiovascular Res.* 1996, 31, 2-6.
 21. Cichon S, Nöthen MM, Stöber G, Schroers R, Albus M, Maier W, Rietschel M, Körner J, Weigelt B, Franzek E, Wildenauer D, Fimmers R, Propping P. Systematic screening for mutations in the 5'-regulatory region of the human dopamine D₁ receptor (DRD1) gene in patients with schizophrenia and bipolar affective disorder. *Am J Med Genetics.* 1996, 67, 424-428.
 22. Cifková R, Czarnecka D, Kawecka-Jaszcz K. Nadciśnienie tętnicze a ciąża. *Chor Serca Naczyń.* 2005, 2, 65-71.
 23. Cipolletta E, Ciccarelli M, Izzo R, Finelli R, Trimarco B, Iaccarino G. A polymorphism within the promoter of the dopamine receptor D1 (*DRD1* -48A/G) associates with impaired kidney function in white hypertensive patients. *Transl Med.* 2012, 2, 10-19.
 24. Dawling S, Roodi N, Mernaugh R, L, Wang X, Parl F, F. Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms. *Cancer Res.* 2001, 61, 6716-6722.
 25. Debbané M, Glaser B, David M, K, Feinstein C, Eliez S. Psychotic symptoms in children and adolescents with 22q11.2 deletion syndrome: Neuropsychological and behavioral implications. *Schizophrenia Res.* 2006, 84, 187-193.
 26. Dechanet C, Fort A, Barbero-Camps E, Dechaud H, Richard S, Virsolvy A. Endothelin-dependent vasoconstriction in human uterine artery: application to preeclampsia. *Plos One.* 2011, 6, e16540. doi:10.1371/journal.pone.0016540.
 27. Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, Goldman D, Xu K, Shabalina SA, Shagin D, Max MB, Makarov SS, Maixner W. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Gen.* 2005, 14, 135-143.
 28. Dragun D, Haase-Fielitz A. Low catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyestradiol in preeclampsia: more than a unifying hypothesis. *Nephrol Dial Transplant.* 2009, 24, 31-33.
 29. Drost JT, Maas AHEM, van Eyck J, van der Schouw Y. Preeclampsia as a female-specific risk factor for chronic hypertension. *Maturitas.* 2010, 67, 321-326.
 30. Emilien G, Maloteaux JM, Geurts M, Hoogenberg K, Cragg S. Dopamine receptors – physiological understanding to therapeutic intervention potential. *Pharmacol Ther.* 1999, 84, 133-156.
 31. Eriksson AE, Skrtic S, Niklason A, Mattsson Hulten L, Wiklund O, Hedner T, Ohlsson C. Association between low activity genotype of catechol – O – methyltransferase and myocardial infarction in a hypertensive population. *Eur Heart J.* 2004, 25, 386-391.
 32. Fenoy FJ, Hernandez ME, Hernandez M, Quesada T, Salom MG, Hernandez I. Acute effects of 2-methoxyestradiol on endothelial aortic NO release in male and ovariectomized female rats. *Nitric Oxide.* 2010, 23, 12-19.
 33. Franchim CS, Sass N, Mattar R, Pendeloski KPT, Hsu Lin L, Torloni MR, Daher S. Inflammatory mediators gene polymorphisms in preeclampsia. *Hypertens Preg.* 2011, 30, 338-346.
 34. Fukunaga K, Shioda N. Novel dopamine D2 receptor signaling through proteins

- interacting with the third cytoplasmic loop. *Mol Neurobiol.* 2012, 45, 144-152.
35. Fung MM, Rana BK, Tang CM, Shiina T, Nievergelt CM, Rao F, Salem RM, Waalen J, Ziegler MG, Insel PA, O'Connor DT. Dopamine D1 receptor (DRD1) genetic polymorphism: pleiotropic effects on heritable renal traits. *Kidney Int.* 2009, 76, 1070-1080.
 36. Gadkariem EA, Ibrahim KEE, Kamil NAA, Haga MEM, El-Obeid HA. A new spectrophotometric method for the determination of methyl dopa. *Saudi Pharm J.* 2009, 17, 289-293.
 37. Gaysina D, Xu MK, Barnett JH, Croudace TJ, Wong A, Richards M, Jones PB. The catechol-*O*-methyltransferase gene (*COMT*) and cognitive function from childhood through adolescence. *Biol Psychol.* 2013, 92, 359-364.
 38. Ghuman N, Rheiner J, Tendler BE, White WB. Hypertension in the postpartum woman: clinical update for the hypertension specialist. *J Clin Hypert.* 2009, 11, 726-731.
 39. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008, 294, 541-550.
 40. Gong M, Hubner N. Molecular genetics of human hypertension. *Clin Science.* 2006, 110, 315-326.
 41. Gönen H, Kayhan Z, Ataç FB, Yazici AC, Şahin FI. Genetic variants account for differences in responses in blood pressure and blood flow values to laryngoscopy/intubation/extubation. *Turk J Med Science.* 2007, 37, 273-280.
 42. Gupta S, Aziz N, Sekhon L, Agarwal R, Mansour G, Li J, Agarwal A. Lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia. *Obst Gyn Surv.* 2009, 64, 750-760.
 43. Güneç O, Çiçek N, Görkemli H, Çelik C, Acar A, Akyürek C. The effect of methyl dopa treatment on uterine, umbilical and fetal middle cerebral artery blood flows in preeclamptic patients. *Arch Gynecol Obstet.* 2002, 266, 141-144.
 44. Hagen K, Pettersen E, Stovner LJ, Skorpen F, Holmen J, Zwart JA. High systolic blood pressure is associated with Val/Val genotype in the catechol-*O*-methyltransferase gene. The Nord-Trøndelag Health Study (HUNT). *Am J Hypertens.* 2007, 20, 21-26.
 45. Hansson SR, Chen Y, Brodzki J, Chen M, Hernandez-Adrade E, Inman JM, Kozhich OA, Larsson I, Marsál K, Medstrand P, Xiang CC, Brownstein MJ. Gene expression profiling of human placentas from preeclamptic and normotensive pregnancies. *Mol Hum Reprod.* 2006, 12, 169-179.
 46. Hertig A, Liere P. New markers in preeclampsia. *Clin Chim Acta.* 2010, 411, 1591-1595.
 47. Hill LD, York TP, Kusanovic JP, Gomez R, Eaves LJ, Romero R, Strauss JF. Epistasis between *COMT* and *MTHFR* in maternal-fetal dyads increases risk for preeclampsia. *Plos One.* 2011, 6, e16681. doi:10.1371/journal.pone.0016681.
 48. Hollier L, M, Ramin S, M, Gilstrap III L, C. Antihypertensive medications in pregnant women with chronic hypertension. *Prim Care Update for Ob/Gyns.* 2001, 8, 175-177.
 49. Hong Ch-CH, Thompson HJ, Jiang Ch, Hammond GL, Tritchler D, Yaffe M, Boyd N, F. Val158Met polymorphism in Catechol-*O*-methyltransferase gene associated with risk factors for breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent.* 2003, 12, 838-847.
 50. Janowska K, Głuszek J. Czy geny mają wpływ na odpowiedź hipotensyjną w leczeniu nadciśnienia tętniczego? *Nadciśn Tętn.* 2004, 8, 355-363.
 51. Jebbink J, Wolters A, Fernando F, Afink G, van der Post J, Ris-Stalpers C. Molecular genetics of preeclampsia and HELLP syndrome – A review. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012, 1822, 1960-1969.
 52. Ji Y, Biernacka J, Snyder K, Drews M, Pellemounter LL, Colby C, Wang L, Mrazek DA, Weinshilboum RM. Catechol *O*-methyltransferase pharmacogenomics and

- selective serotonin reuptake inhibitor response. *Pharmacogenomics J.* 2012, 12, 78-85.
53. Jobe SO, Tyler CT, Magness RR. Aberrant synthesis, metabolism and plasma accumulation of circulating estrogens and estrogen metabolites in preeclampsia. *Hypertension.* 2013, 61, 480-487.
 54. Jönsson EG, Ivo R, Forslund K, Mattila-Evenden M, Rylander G, Cichon S, Propping P, Nöthen MM, Åsberg M, Sedval GC. No association between a promoter dopamine D4 receptor gene variant and schizophrenia. *Am J Med Gen.* 2001, 105, 525-528.
 55. Jose PA, Eisner GM, Felder RA. Dopamine receptor – coupling defect in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2002, 4, 237-244.
 56. Kanasaki K, Palmsten K, Sugimoto H, Ahmad S, Hamano Y, Xie L, Parry S, Augustin HG, Gattone VH, Folkman J, Strauss JF, Kalluri R. Deficiency in catechol – O – methyltransferase and 2 – methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature.* 2008, 6, 1117-1121.
 57. Kang SG, Lee HJ, Choi JE, Park JM, Park JH, Han C, Kim YK, Kim SH, Lee MS, Joe SH, Jung IK, Kim L. Association study between antipsychotics-induced restless legs syndrome and polymorphisms of dopamine D1, D2, D3, and D4 receptor genes in schizophrenia. *Neuropsychobiology.* 2008, 57, 49-54.
 58. Katerberg H, Cath DC, Denys DAJP, Heutink P, Polman A, van Nieuwerburgh FCW, Deforce DLD, Bochdanovits Z, van Balkom AJLM, den Boer JA. The Role of COMT Val¹⁵⁸Met Polymorphism in the Phenotypic Expression of Obsessive-Compulsive Disorder. *Am J Medical Genetics part B.* 2009, 153, 167-176.
 59. Kean L. Managing hypertension in pregnancy. *Curr Obstet Gynecol.* 2002, 12, 104-110.
 60. Keyes LE, Armaza JF, Niermeyer S, Vargas E, Young DA, Moore LG. Intrauterine growth restriction, preeclampsia and intrauterine mortality at high altitude in Bolivia. *Pediatr Res.* 2003, 54, 20-25.
 61. Khalil A, Muttukrishna S, Harrington K, Jauniaux E. Effect of antihypertensive therapy with alpha methyl dopa on levels of angiogenic factors in pregnancies with hypertensive disorders. *Plos One.* 2008, 3, e2766. doi:10.1371/journal.pone.0002766.
 62. Kim DJ, Park BL, Yoon S, Lee H-K, Joe K-H, Cheon Y-H, Gwon D-H, Cho S-N, Lee HW, NamGung S, Shin HD. 5' UTR polymorphism of dopamine receptor D1 (DRD1) associated with severity and temperament of alcoholism. *Bioch Bioph Res Commun.* 2007, 357, 1135-1141.
 63. Kocabaş NA, Karakaya AE, Cholerton S, Şardaş Ş. Catechol-O-methyltransferase (COMT) genetic polymorphism in a Turkish population. *Arch Toxicol.* 2001, 75, 407-409.
 64. Kojima H, Ohmori O, Shinkai T, Terao T, Suzuki T, Abe K. Dopamine D1 Receptor Gene Polymorphism and Schizophrenia in Japan. *Am J Med. Gen.* 1999, 88, 116-119.
 65. Korobochka R, Gritsenko I, Gonen R, Ebstein RP, Ohel G. Association between a functional dopamine D4 receptor promoter region polymorphism (-C521T) and pre-eclampsia: a family-based study. *Mol. Hum. Reprod.* 2006, 12, 85-88.
 66. Kuzhikandathil EV, Kortagere S. Identification and characterization of a novel class of atypical dopamine receptor agonists. *Pharmacol Res.* 2012, 29, 2264-2275.
 67. Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu Y, Szumlanski C, Weinshilboum RM. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential applications to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenet Genomics.* 1996, 6, 243-250.
 68. Laivuori H, Kaaja R, Ylikorkala O, Hiltunen T, Kontula K. 677 C→T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and preeclampsia. *Obstet Gynec.* 2000, 96, 277-280.
 69. Laivuori H, Lahermo P, Ollikainen V, Widen E, Häivä-Mällinen L, Sundström H,

- Laitinen T, Kaaja R, Ylikorkala O, Kere Y. Susceptibility loci for preeclampsia on chromosomes 2p25 and 9p13 in finnish families. *Am J Hum Genet.* 2003, 72, 168–177.
70. Laskowska M, Laskowska K, Oleszczuk J. Serotonin in pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet.* 2001, 75, 83-84.
 71. Lee KY, Joo EJ, Ji YI, Kim DH, Park J, Chung IW, Lee SI, Joo YH, Ahn YW, Song JY, Kim YS. Associations between DRDs and schizophrenia in a Korean population: multi-stage association analyses. *Exp Mol Med.* 2011, 43, 44-52.
 72. Leszczyńska-Gorzela B, Poniedziałek-Czajkowska E. Rzucałka w ciąży – aktualny problem kliniczny. *Perinatol Neonatol Ginekol.* 2009, 2, 94-101.
 73. Liang S, Liu X, Fan P, Liu R, Zhang J, He G, Liu Y, Bai H. Association between Val158Met functional polymorphism in the COMT gene and risk of preeclampsia in a Chinese population. *Arch Med Research.* 2012, 43, 154-158.
 74. Lim S, Ha J, Choi SW, kang SG, Shin YC. Association study on pathological gambling and polymorphisms of dopamine D1, D2, D3 and D4 receptor genes in a Korean population. *J Gambl Stud.* 2012, 28, 481–491.
 75. Lim JH, Kim DJ, Kim SY, Park SY, Han HW, Han JY, Lee SW, Yang JH, Ryu HM. Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase and cytochrome P450c17 α in preeclampsia. *Pharmacogenet Genomics.* 2010, 20, 605-610.
 76. Limosin F, Loze JY, Rouillon F, Adès J, Gorwood P. Association between dopamine receptor D1 gene DdeI polymorphism and sensation seeking in alcohol-dependent men. *Alcohol Clin Exp Res.* 2000, 27, 1226-1228.
 77. Liu HC, Chen CK, Leu SJ, Wu HT, Lin S, K. Association between dopamine receptor D1 A-48G polymorphism and methamphetamine abuse. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2006, 60, 226-231.
 78. Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melén K, Julkunen I, Taskinen J. Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry.* 1995, 34, 4202-4210.
 79. Lu Y, Zhu H, Wang X, Snieder H, Huang Y, Harshfield GA, Treiber FA, Dong Y. Effects of dopamine receptor type 1 and Gs protein subunit gene polymorphisms on blood pressure at rest and in response to stress. *Am J Hypertension.* 2006, 19, 832-836.
 80. Lundström K, Tenhunen J, Tilgmann C, Karhunen T, Panula P, Ulmanen I. Cloning, expression and structure of catechol – O – methyltransferase. *Biochim Biophys Acta.* 1995, 1251, 1-10.
 81. Madankumar R. An overview of hypertensive disorders in women. *Prim Care Update for Ob/Gyns.* 2003, 10, 14-18.
 82. Madazli R, Benian A, Gümüştaş K, uzun H, Ocak V, Aksu F. Lipid peroxidation and antioxidants in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999, 85, 205-208.
 83. Makowiecka-Cieśla M, Januszewicz A, Adler G, Bińczak-Kuleta A, Gorący I, Kaczmarczyk M, Janas J, Prejbisz A, Kubaszek A, Ciechanowicz A. Polimorfizm I/D genu ACE a działanie hipotensyjne losartanu u chorych na pierwotne nadciśnienie tętnicze. *Arterial Hypertens.* 2007, 11, 6, 498–504.
 84. Mancina G, Ferrari A, Gregdrini L, Bianchini C, Terzoli L, Leonetti G, Zanchetti A. Methyl dopa and Neural Control of Circulation in Essential Hypertension. *Am J Cardiol.* 1980, 45, 1237-1243.
 85. Maynard SE, Thandhani R. Pregnancy and the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2009, 20, 14-22.
 86. Männistö PT, Kaakkola S. Catechol – O – methyltransferase (COMT): Biochemistry, Molecular Biology, Pharmacology and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol Rev.* 1999, 51, 593-625.

87. Mitsuyasu H, Ozawa H, Takeda Y, Fukumaki Y. Novel polymorphisms in the upstream region of the human dopamine D4 receptor (DRD4) gene. *J Hum Genet.* 1999, 44, 416-418.
88. Misener VL, Luca P, Azeke O, Crosbie J, Waldman I, Tannock R, Roberts W, Malone M, Schachar R, Ickowicz A, Kennedy JL, Barr CL. Linkage of the dopamine receptor D1 gene to attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry.* 2004, 9, 500-509.
89. Moore Simas TA, Crawford SL, Solitro MJ, Frost SC, Meyer BA, Maynard SE. Angiogenic factors for the prediction of preeclampsia in high-risk women. *Am J Obstet Gynecol.* 2007, 197, 244e1-244e8.
90. Morgan T, Ward K. New insights into the genetics of preeclampsia. *Semin perinatol.* 1999, 23, 14-23.
91. Nackley AG, Shabalina SA, Lambert JE, Conrad MS, Gibson DG, Spiridonov AN, Satterfield SK, Diatchenko L. Low enzymatic activity haplotypes of the human catechol-O-methyltransferase gene: enrichment for marker SNPs. *Plos One.* 2009, 4, DOI: 10.1371/journal.pone.0005237.
92. Nakajima M, Hattori E, Yamada K, Iwayama Y, Toyota T, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Sugihara G, Hashimoto K, Watanabe H, Iyo M, Hoshika A, Yoshikawa T. Association and synergistic interaction between promoter variants of the DRD4 gene in Japanese schizophrenics. *J Hum Genet.* 2007, 52, 86-91.
93. Nilsson E, Ros Salonen H, Cnattingius S, Lichtenstein P. The importance of genetic and environmental effects for pre-eclampsia and gestational hypertension: a family study. *Int J Obst Gyn.* 2004, 111, 200-206.
94. Oak JN, Oldenhof J, Van Tol HHM. The dopamine D4 receptor: one decade of research. *Eur J Pharm.* 2000, 405, 303-327.
95. Okuyama Y, Ishiguro H, Toru M, Arinami T. A genetic polymorphism in the promoter region of DRD4 associated with expression and schizophrenia. *Bioch. Bioph. Res Commun.* 1999, 258, 292-295.
96. Palmatier MA, Kang AM, Kidd KK. Global variation in the frequencies of functionally different catechol-O-methyltransferase alleles. *Biol Psychiatry.* 1999, 46, 557-567.
97. Pérez-Sepúlveda A, Torres MJ, Valenzuela FJ, Larrain R, Figueroa-Diesel H, Galaz J, Nien JK, Serra R, Michea L, Illanes SE. Low 2-methoxyestradiol levels at the first trimester of pregnancy with the development of pre-eclampsia. *Prenat Diagn.* 2012, 32, 1053-1058.
98. Polyzos NP, Mauri D, Tsappi M, Tzioras S, Kamposioras K, Cortinovic I, Casazza G. Combined vitamin C and E supplementation during pregnancy for preeclampsia prevention: a systematic review. *Obs Gyn Survey.* 2007, 62, 202-206.
99. Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for the later cardiovascular disease. *Circulation.* 2011, 123, 2856-2869.
100. Prasad P, Prasanna Kumar KM, Ammini AC, Gupta A, Gupta R, Thelma BK. Association of dopaminergic pathway gene polymorphisms with chronic renal insufficiency among Asian Indians with type-2 diabetes. *BMC Genet.* 2008, 9:26, doi:10.1186/1471-2156-9-26.
101. Redman CWG, Sacks GP, Sargent IL. Preeclampsia: an excessive maternal inflammatory response to pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999, 180, 499-506.
102. Redman WC, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science.* 2005, 308, 1592-1594.
103. Roberts JM, Lain KY. Recent insights into the pathogenesis of pre-eclampsia. *Placenta.* 2002, 23, 359-372.
104. Roffman JL, Weiss AP, Deckersbach T, Freudenreich O, Henderson DC, Wong DH,

- Halsted CH, Goff DC. Interactive Effects of COMT Val108/158Met and MTHFR C677T on Executive Function in Schizophrenia. *Am J Med Gen Part B*. 2008, 147B, 990-995.
105. Ros SH, Lichtenstein P, Lipworth L, Cnattingius S. genetic effects on the liability of developing pre-eclampsia and gestational hypertension. *Am J Med Genet*. 2000, 91, 256-260.
 106. Rosa EC, Dickinson D, Apud J, Weinberger DR, Elvevåg B. COMT Val158Met polymorphism, cognitive stability and cognitive flexibility: an experimental examination. *Behav Brain Funct*. 2010, 6:53, doi: 10.1186/1744-9081-6-53.
 107. Rosenthal T, Oparil S. The effect of antihypertensive drugs on the fetus. *J Hum Hyp*. 2002, 16, 293-298.
 108. Roten LT, Fenstad MH, Forsmo S, Johnson MP, Moses EK, Austgulen R, Skorpen F. A low COMT activity haplotype is associated with recurrent preeclampsia in a Norwegian population cohort (HUNT2). *Mol. Hum. Reprod*. 2011, 17, 439-446.
 109. Saczko Z, Saczko J, Kulbacka J, Chwiłkowska A, Żórawski K. Nadciśnienie tętnicze u kobiet w ciąży. Etiopatogeneza. *Arterial Hypertens*. 2009, 13, 199-205.
 110. Sambrook AL, Small RC. The treatment of hypertension in pregnancy. *Anaesth Intensive Care Med*. 2008, 9, 128-131.
 111. Sandrim VC, Palei ACT, Luizon MR, Izidoro-Toled TC, Cavalli RC, Tanus-Santo JE. eNOS haplotypes affect the responsiveness to antihypertensive therapy in preeclampsia but not in gestational hypertension. *Pharmacogenomics J*. 2010, 10, 40-45.
 112. Sato M, Soma M, Nakayama T, Konmatsuse K. Dopamine D1 receptor gene polymorphism is associated with essential hypertension. *Hypertension*. 2000, 36, 183-186.
 113. Schwartz GL, Turner ST. Pharmacogenetics of antihypertensive drug responses. *Am J Pharmacogenomics*. 2004, 4, 151-160.
 114. Sen S, Nesse R, Sheng L, Stoltenberg SF, Gleiberman L, Burmeister M, Weder AB. Association between a dopamine-4 receptor polymorphism and blood pressure. *Am J Hypertens*. 2005, 18, 1206-1210.
 115. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K. Metyldopa w leczeniu nadciśnienia u kobiet ciężarnych. *Ginekol Pol*. 2004, 75, 160-165.
 116. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Mrozikiewicz P. Znaczenie trombofilii wrodzonych w położnictwie. W: Wybrane zagadnienia diagnostyki molekularnej w położnictwie. Pod red.: Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Mrozikiewicz P. Skrypt diagnosty, zesz. 2, 2010, 16-45.
 117. Shenoy V, Kanasaki K, Kalluri R. Pre-eclampsia: connecting angiogenic and metabolic pathways. *Trends Endocrinol Metab*. 2010, 21, 529-536.
 118. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005, 365, 785-799.
 119. Sohda S, Arinami T, Hamada H, Yamada N, Hamaguchi H, Kubo T. Metylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia. *J Med Genet*. 1997, 34, 525-526.
 120. Staessen JA, Kuznetsova T, Zhang H, Maillard M, Bochud M, Hasenkamp S, Westerkamp J, Richart T, Thijs L, Li Z, Brand-Herrmann SM, Burnier M, Brand E. Blood pressure and renal sodium handling in relation to genetic variation in the DRD1 promoter and GRK4. *Hypertension*. 2008, 51, 1643-1650.
 121. Studzińska A, Tyburski J, Daca P, Tretyn A. PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategie monitorowania przebiegu reakcji. *Biotechnologia*. 2008, 1, 71-85.
 122. Sutherland TE, Anderson LR, Hughes RA, Altmann E, Schuliga M, Ziogas J, Steward AG. 2-Methoxyestradiol – a unique blend of activities generating a new class of anti-tumour/anti-inflammatory agents. *Drug Discov Today*. 2007, 12, 577-584.

123. Suwalska A, Rybakowski J, Dmitrzak-Węglarz M, Czerski P, Skibińska M, Leszczyńska-Rodziewicz A, Permoda-Osip A, Hauser J. Działanie profilaktyczne litu w chorobie dwubiegunowej a polimorfizmy genów receptorów dopaminergicznych typu 2. *Farmakoter Psychiatr Neurol.* 2006, 2, 79-85.
124. Szczepaniak-Chicheł L, Bręborowicz G, Tykarski A. Leczenia nadciśnienia tętniczego u kobiet w ciąży. *Nadciśn tętn.* 2006, 10, 83-98.
125. Szegedi A, Rujescu D, Tadic A, Müller MJ, Kohlen R, Stassen HH, Dahmen N. The catechol-O-methyltransferase Val108/158Met polymorphism affects short term treatment response to mirtazapine, but not to paroxetine in major depression. *Pharmacogenomics J.* 2005, 5, 49-53.
126. Szyłło K, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Przybyłowska K, Lewy J, Kulig B. Ryzyko występowania raka endometrium w kontekście wpływu polimorfizmów genów CYP19 i COMT. *Pol Merk Lek.* 2007, XXII, 208-210.
127. Szyłło K, Smolarz B, Romanowicz-Makowska H, Przybyłowska K, Kulig B. Analiza polimorfizmów genów CYP19 i COMT i poziomu hormonów estrogenowych. *Gin Prakt.* 2006, 88, 2, 24-27.
128. Tempfer CB, Schneeberger C, Huber JC. Applications of polymorphisms and pharmacogenomics in obstetrics and gynecology. *Pharmacogenomics.* 2004, 5, 57-65.
129. Tencomnao T, Boonmalert R. Misgenotyping of dopamine receptor D1 gene -48A/G polymorphism. *Am J Med Gen part B.* 2009, 150, 447-449.
130. Thompson PA, Shields PG, Freudenheim JL, Stone A, Vena JE, Marshall JR, Graham S, Laughlin R, Nemoto T, Kadlubar FF, Ambrosone CB. Genetic polymorphisms in catechol-O-methyltransferase, menopausal status, and breast cancer risk. *Cancer Res.* 1998 15, 58, 2107-2110.
131. Tunbridge EM, Harrison PJ, Warden DR, Johnston C, Refsum H, Smith AD. Polymorphisms in the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene influence total homocysteine levels. *Am J Med Gen Part B.* 2008, 147, 996-999.
132. Vaillancourt C, Petit A, Bélisle S. Expression of Human Placental D₂-dopamine receptor during normal and abnormal pregnancies. *Placenta.* 1998, 19, 73-80.
133. VanWijk MJ, Kublickiene K, Boer K, VanBavel E. Vascular function in preeclampsia. *Cardiovasc Res.* 2000, 47, 38-48.
134. Vazquez-Alaniz F, Lumbreras-Márquez MI, Sandoval-Carrillo AA, Aguilar-Durán M, Méndez-Hernández EM, Barraza-Salas M, Castellanos-Juárez FX, Salas-Pacheco JM. Association of COMT G675A and MTHFR C677T polymorphisms with hypertensive disorders of pregnancy in Mexican mestizo population. *Pregnancy Hypertension. An International Journal of Women's Cardiovascular Health.* 2014, 4, 59-64.
135. Wang X, Villar VAM, Armando I, Eisner GM, Felder RA. Dopamine, kidney and hypertension: studies in dopamine receptor knockout mice. *Pediatr Nephrol.* 2008, 23, 2131-2149.
136. Wang Y, Alexander JS. Placental pathophysiology in preeclampsia. *Patophysiology.* 2000, 6, 261-270.
137. Weidmann P, Hirsch D, Maxwell MH, Okun R, Schroth P. Plasma Renin and Blood Pressure During Treatment with Methyldopa. *Am J Cardiol.* 1974, 34, 671-676.
138. Weinshilboum RM, Otterness DM, Szumlanski CL. Methylation pharmacogenetics: Catechol-O-methyltransferase, Thiopurine methyltransferase, Histamine N-methyltransferase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999, 39, 19-52.
139. Williams PJ, Broughton Pipkin F. The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011, 25, 405-417.
140. Williams PJ, Morgan J. The role of genetics in pre-eclampsia and potential pharmacogenomic interventions. *Pharmacogenomics Pers Med.* 2012, 5, 37-51.

141. Wong A HC, Buckle CE, Van Tol HHM. Polymorphisms in dopamine receptors: what do they tell us? *Eur J Pharm.* 2000, 410, 183-203.
142. Worda C, Sator MO, Schneeberger C, Jantschev T, Ferlitsch K, Huber JC. Influence of the catechol-O-methyltransferase (COMT) codon 158 polymorphism on estrogen levels in women. *Hum. Reprod.* 2003, 18, 262-266.
143. XiaY, Kellems RE. Is preeclampsia an autoimmune disease? *Clin Immunol.* 2009, 133, 1-12.
144. Xiao JP, Yin YX, Gao YF, Lau S, Shen F, Zhao M, Chen Q. The increased maternal serum levels of IL-6 are associated with the severity and onset of preeclampsia. *Cytokine.* 2012, 60, 856-860.
145. Yamaguchi I, Flynn JT. Pathophysiology of Hypertension. W: Pediatric nephrology. Pod red.: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, Yoshikawa N. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg 2009, 1485-1518,
146. Yeh TK, Yeh TC, Weng CF, Shih B-F, Tsao HJ, Hsiao CH, Chuang FT, Hu CY, Chang CY. Association of polymorphisms in genes involved in the dopaminergic pathway with blood pressure and uric acid levels in Chinese females. *J Neural Transmission.* 2010, 117, 1371-1376.
147. Zacharia LC, Jackson EK, Gillespie DG, Dubey RK. Catecholamines block -hydroxyestradiol-induced antimitogenesis in mesangial cells. *Hypertension.* 2002, 39, 854-859.
148. Zeng C, Zhang M, Asico LD, Eisner GM, Jose PA. The dopaminergic system in hypertension. *Clin Sci.* 2007, 112, 583-597.
149. van Zwieten PA, Tiioolen MJMC, Timmermans PBMWM. The hypotensive activity and side effects of methyldopa, clonidine and guanfacine. *Hypertension.* 1984, 6, 1128-1133.

8. STRESZCZENIE W J. POLSKIM

Wstęp: W ostatnich latach zwrócono uwagę na możliwy udział czynników genetycznych w etiologii stanu przedzucawkowego. Sugeruje się, iż polimorfizmy genetyczne niektórych enzymów lub receptorów również mogą mieć związek ze zwiększonym ryzykiem rozwinięcia się stanu przedzucawkowego. Wśród tych polimorfizmów wymienia się polimorfizm genu enzymu katecholo – *O* – metylotransferazy (COMT) oraz genów receptorów dopaminy DRD1 i DRD4.

Cel: Celem pracy była próba oceny udziału wybranych polimorfizmów genów *COMT*, *DRD1* i *DRD4* w etiologii i terapii stanu przedzucawkowego w populacji kobiet z Wielkopolski. Cel ten realizowano poprzez analizę częstości występowania genotypów i alleli genów: *COMT* - polimorfizm *472G>A*, receptora *DRD1* - polimorfizm *-48A>G* oraz receptora *DRD4* - polimorfizm *-521C>T* w grupie kobiet ze stanem przedzucawkowym oraz zdrowych kobiet ciężarnych. Ponadto przeprowadzono analizę częstości współwystępowania genotypów wybranych polimorfizmów w badanych grupach i zbadano korelację parametrów klinicznych i laboratoryjnych z występowaniem badanych polimorfizmów genetycznych. Dodatkowo przeanalizowano związek występowania badanych polimorfizmów genetycznych z wysokością stosowanych dawek metyldopa.

Material i metody: Do badania włączono 98 ciężarnych ze stanem przedzucawkowym oraz 120 zdrowych ciężarnych. Wszystkie polimorfizmy oznaczano metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) oraz polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP).

Średni wiek pacjentek w grupie badanej wynosił $30,1 \pm 5,5$ lat, średni wiek ciążowy $33,8 \pm 3,6$ tygodnia, średnia wartość skurczowego ciśnienia tętniczego $171,1 \pm 21,1$ mmHg, a średnia wartość rozkurczowego ciśnienia tętniczego $106,2 \pm 13,8$ mmHg.

Średni wiek w grupie kontrolnej wynosił $28,7 \pm 4,8$ lat, średni wiek ciążowy $39,1 \pm 1,3$ tygodni, średnie skurczowe ciśnienie tętnicze $108,3 \pm 11,2$ mmHg a średnie rozkurczowe ciśnienie krwi $67,3 \pm 8,6$ mmHg.

Wyniki: W czasie analizy częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu *472G>A* genu *COMT* w podgrupie z ciężkim stanem przedzucawkowym oraz w całej w grupie kontrolnej interesująca obserwacją było odnotowanie większej częstości występowania genotypu

zmutowanego 472AA w grupie kontrolnej (22,5% vs. 14,3% w grupie badanej). Podobnie większą częstość występowania zmutowanego allele 472A odnotowano w grupie kontrolnej zdrowych kobiet ciężarnych w porównaniu do grupy kobiet z ciężką postacią PE (47,9% vs. 40,8%). W zakresie polimorfizmu *DRD1* genotyp zmutowany -48GG częściej występował w grupie kontrolnej w porównaniu do podgrupy z ciężką postacią PE (14,2% vs. 8,2%). Również częstość występowania zmutowanego allele -48G była większa w grupie kontrolnej niż w grupie badanej (39,6% vs. 31,6%). W czasie analizy frekwencji genotypów polimorfizmu receptora *DRD4* w podgrupie z ciężką postacią PE w porównaniu do całej grupy kontrolnej zaobserwowano, iż genotyp -521TT występował nieznacznie częściej w grupie kontrolnej (33,3% vs. 30,6% w grupie badanej).

Analizując dane kliniczne pacjentek ze stanem przedrzucawkowym w zależności od oznaczonych genotypów zaobserwowano, iż pacjentki nosicielki genotypu homozygotycznego zmutowanego 472AA genu *COMT* miały niższe wartości ciśnienia tętniczego krwi (ciśnienie skurczowe 163,1 mmHg oraz ciśnienie rozkurczowe 101,9 mmHg) oraz niższe stężenie białka w moczu (246,43 mg/dL), w porównaniu do kobiet nosicielek genotypów 472AA i 472GA (ciśnienie skurczowe odpowiednio 171,1 mmHg i 174,5 mmHg oraz ciśnienie rozkurczowe odpowiednio 107,3 mmHg i 107,5 mmHg; białkomocz odpowiednio 316,07 mg/dL i 317,86 mg/dL). Ponadto, u pacjentek, u których oznaczono genotyp homozygotyczny zmutowany -521TT i genotyp heterozygotyczny -521CT obserwowano niższe stężenia białka całkowitego w surowicy (odpowiednio 5,59 g/L i 5,57 g/L) w porównaniu do nosicielek genotypu -521CC (6,17 g/L) ($p=0,02$).

Analizując wielkość stosowanych dawek metyldopa zaobserwowano, iż nosicielki genotypu homozygotycznego zmutowanego 472AA w grupie kobiet z ciężką postacią PE otrzymywały najniższe dawki leku, do 1000 mg (26,67% vs. 7,69% pacjentek z dawką 1500 mg vs. 9,52% z dawką powyżej 2000 mg), przy wysokim współczynniku ryzyka $WR=3,78$ ($p=0,12$).

W przypadku analizy polimorfizmu *DRD1* -48A>G nie udało się ustalić żadnej istotnej zależności pomiędzy rodzajem genotypu a stosowaną dawką metyldopa. Analizując wpływ rodzaju genotypu polimorfizmu *DRD4* -521C>T na dawkę metyldopa można zaobserwować, iż w przypadku pacjentek z ciężką PE, u których oznaczono genotyp typu homozygotycznego zmutowanego -521TT większość z nich otrzymało najwyższe dawki metyldopa 2000-3000 mg (42,86%) w porównaniu do kobiet nosicielek genotypu heterozygotycznego -521CT (15,38%) oraz genotypu homozygotycznego niezmutowanego -521CC (26,67%). W przypadku tego polimorfizmu również uzyskano wysoki współczynnik ryzyka $WR=2,75$ ($p=0,09$).

Wnioski:

1. Wyniki pracy sugerują możliwy ochronny udział zmutowanego allela *472A COMT* oraz zmutowanego allela *-48G DRD1* u matki w patogenezie ciężkiej postaci stanu przedrzucawkowego.
2. Obecność zmutowanego genotypu *472AA* polimorfizmu *472G>A COMT* może wiązać się z obniżeniem ciśnienia skurczowego, rozkurczowego oraz wartości białkomoczu u kobiet ze stanem przedrzucawkowym.
3. Analiza dawki metyldopa w zależności od występowania badanych polimorfizmów sugeruje możliwy modulujący wpływ genotypu *472AA COMT* oraz *-521TT DRD4* na wielkość stosowanej dawki leku w ciężkiej postaci PE.
4. Obecność zmutowanego allela *-521T DRD4* może wpływać na obniżenie wartości białka w surowicy krwi u kobiet ze stanem przedrzucawkowym.
5. Obserwowana częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów genów *COMT* i receptorów dopaminy *DRD1* oraz *DRD4* jest podobna do rozkładu tych polimorfizmów w innych populacjach rasy kaukaskiej.

9. STRESZCZENIE W J. ANGIELSKIM

SUMMARY

Introduction: Recently, the researchers have considered the possible involvement of genetic factors in the aetiology of preeclampsia. It is suggested that genetic polymorphisms of certain enzymes or receptors may be associated with an increased risk of developing preeclampsia. Among these polymorphisms, the polymorphism of the gene of the catechol-*O*-methyltransferase (*COMT*) and genes of the dopamine receptors *DRD1* and *DRD4* are mentioned.

Aim of the study: The aim of the study was the attempt to evaluate the impact of the selected genes' polymorphisms (*COMT*, *DRD1* and *DRD4*) in the aetiology and therapy of preeclampsia in the population of women from Great Poland (Wielkopolska).

This aim was achieved by the analysis of the frequency of genotypes and alleles of the genes: *COMT* – polymorphism 472G>A, dopamine receptor *DRD1* – polymorphism -48A>G and dopamine receptor *DRD4* – polymorphism -521C>T in the group of women with preeclampsia and in the group of healthy pregnant women. Additionally, the analysis of the co-frequency of the genotypes of these polymorphisms in both groups was conducted. Also, the correlation of the clinical and laboratory parameters with the occurrence of the tested polymorphisms and the correlation between the selected genetic polymorphisms with the dosages of methyl dopa were determined.

Material and methods: Ninety-eight pregnant women with preeclampsia and 120 healthy pregnant women were selected for this study. All polymorphisms were identified using polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism technique (PCR - RFLP).

The average age of the patients with PE was $30,1 \pm 5,5$ years, the average week gestation was $33,8 \pm 3,6$, the average systolic blood pressure was $171,1 \pm 21,1$ mmHg and the diastolic blood pressure was $106,2 \pm 13,8$ mmHg.

The average age of the healthy pregnant women was $28,7 \pm 4,8$ years, the average week gestation was $39,1 \pm 1,3$, the average systolic blood pressure was $108,3 \pm 11,2$ mmHg and diastolic blood pressure was $67,3 \pm 8,6$ mmHg.

Results: The analysis of the frequency of the genotypes of the *472G>A COMT* polymorphism in the group of women with severe preeclampsia and in the control group revealed that the mutated genotype *472AA* in the control group occurred more often than in the group of women with severe PE (22,5% vs 14,3%). The higher occurrence of the mutated allele *472A* was determined in the control group in comparison with the group of women with severe PE as well (47,9% vs 40,8%). As for the polymorphism of *DRD1* receptor, the mutated genotype *-48GG* was presented more often in the control group than in the group with severe PE (14,2% vs 8,2%). Also, the frequency of the mutated allele *-48G* was higher in the control group (39,6% vs 31,6% in the group with severe PE). While analyzing the occurrence of the genotype of the polymorphism *DRD4* the slightly higher amount of the homozygous genotype *-521TT* was observed in the group with severe PE in comparison with the control group (33,3% vs 30,6%).

The analysis of the clinical results of the patients with PE due to their determined genotypes revealed that patients with the homozygous genotype *472AA* of the *COMT* gene, had lower blood pressure (systolic blood pressure 163,1 mmHg and diastolic blood pressure 101,9 mmHg) and lower levels of the protein in the urine sample (246,43 mg/dL) in comparison to the women with *472AA* and *472GA* genotypes (systolic blood pressure 171,1 mmHg and 174,5 mmHg respectively, diastolic blood pressure 107,3 mmHg and 107,5 mmHg respectively; level of the protein in the urine 316,07 mg/dL i 317,86 mg/dL respectively). Moreover, in the patients with mutated homozygous genotype *-521TT* and heterozygous genotype *-521CT* of *DRD4* lower concentrations of the serum total protein were observed (5,59 g/L and 5,57 g/L respectively vs 6,17 g/L in the patients with *-521CC* genotype, $p=0,02$).

The analysis of the dosages of the methyldopa used in the treatment showed that the women with the homozygous mutated genotype *472AA* of *COMT* in the group with severe PE, received the lowest dosages of the medicine, not more than 1000 mg (26,67% vs 7,69% of patients with 1500 mg vs 9,52% of patients with the dosages from 2000 mg to 3000 mg), $OD= 3,78$ ($p=0,12$). The same type of analyze due to the *DRD1* gene polymorphism did not show any significant differences between the dosages of methyldopa which were used. As for the *DRD4 -521C>T* polymorphism, the results suggested that the presence of the homozygous genotype *-521TT* in the group of women with severe PE may have impact on the dosage of the methyldopa - the majority of the women with this genotype received the highest dosages of methyldopa 2000-3000 mg (42,86%) in comparison with the women with heterozygous genotype *-521CT* (15,38%) and with homozygous non-mutated genotype *-521CC* (26,67%), with the high odds ratio $OD=2,75$ ($p=0,09$).

Conclusions:

1. The results suggest the possible protective role of the mutated allele *472A COMT* and mutated allele *-48G DRD1* in the mother in the pathogenesis of the severe preeclampsia.
2. Presence of the mutated genotype *472AA* of the *COMT* polymorphism might be connected with lowering the systolic blood pressure, diastolic blood pressure and the levels of the protein in the urine sample in the women with preeclampsia.
3. The analyze of the dosages of the methyldopa depending on the presence of the examined polymorphism suggests possible modulating effect of the genotype *472AA COMT* and *-521TT DRD4* on the dose of the methyldopa used to treat the severe preeclampsia.
4. Presence of the mutated allele *-521T DRD4* might lower the serum total protein levels in the women with preeclampsia.
5. The observed frequency of the genotypes and alleles of the examined polymorphisms of the *COMT* and dopamine receptors *DRD1* and *DRD4* genes is similar to the distribution of these polymorphisms in the other Caucasian populations.

10. SPIS TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII

SPIS TABEL

- Tabela 1.** Zestawienie grup leków o działaniu hipotensyjnym [Rosenthal i Oparil 2002, Szczepaniak-Chicheł i wsp. 2006].
- Tabela 2.** Zestawienie grup leków stosowanych dożylnie w terapii ciężkiej postaci stanu przedrzucawkowego [Leszczyńska-Gorzela i wsp., 2009].
- Tabela 3.** Dane kliniczne pacjentek z grupy badanej z PE i grupy kontrolnej.
- Tabela 4.** Sekwencje stosowanych w pracy starterów.
- Tabela 5.** Wielkości fragmentów po reakcji hydrolizy oraz stosowane enzymy restrykcyjne przy oznaczeniu polimorfizmów genetycznych badanych genów.
- Tabela 6.** Wybrane dane kliniczne pacjentek z grupy badanej z PE i grupy kontrolnej.
- Tabela 7.** Parametry biochemiczne pacjentek z grupy badanej z PE i z podgrupy z ciężką postacią PE.
- Tabela 8.** Dane kliniczne noworodków z grupy badanej z PE i grupy kontrolnej.
- Tabela 9.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $472G>A$ genu *COMT* w grupie kobiet z PE oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 10.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $472G>A$ genu *COMT* w grupie kobiet z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 11.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-48A>G$ genu *DRD1* w grupie kobiet z PE oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 12.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-48A>G$ genu *DRD1* w grupie kobiet z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 13.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-521C>T$ genu *DRD4* w grupie kobiet z PE oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 14.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-521C>T$ genu *DRD4* w grupie kobiet z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 15.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów $472G>A$ *COMT* oraz $-48A>G$ *DRD1* pomiędzy badanymi grupami kobiet.
- Tabela 16.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów $472G>A$ *COMT* oraz $-521C>T$ *DRD4* pomiędzy badanymi grupami kobiet.
- Tabela 17.** Współwystępowanie genotypów polimorfizmów $-48A>G$ *DRD1* oraz $-521C>T$ *DRD4* pomiędzy badanymi grupami kobiet.
- Tabela 18.** Dane kliniczne pacjentek z grupy badanej z PE w zależności od genotypów polimorfizmu *COMT* $472G>A$.
- Tabela 19.** Dane kliniczne pacjentek z grupy kontrolnej w zależności od genotypów polimorfizmu *COMT* $472G>A$.
- Tabela 20.** Dane kliniczne pacjentek z grupy badanej z PE w zależności od genotypów polimorfizmu $-48A>G$ *DRD1*.
- Tabela 21.** Dane kliniczne pacjentek z grupy kontrolnej w zależności od genotypów polimorfizmu $-48A>G$ *DRD1*.
- Tabela 22.** Dane kliniczne pacjentek z grupy badanej z PE w zależności od genotypu polimorfizmu *DRD4* $-521C>T$.
- Tabela 23.** Dane kliniczne pacjentek z grupy kontrolnej w zależności od genotypu polimorfizmu *DRD4* $-521C>T$.
- Tabela 24.** Dane kliniczne noworodków kobiet z grupy badanej z PE w zależności od ich genotypów polimorfizmu *COMT* $472G>A$.
- Tabela 25.** Dane kliniczne noworodków kobiet z grupy kontrolnej w zależności od ich

genotypów polimorfizmu *COMT 472G>A*.

Tabela 26. Dane kliniczne noworodków kobiet z grupy badanej z PE w zależności od ich genotypów polimorfizmu *-48A>G DRD1*.

Tabela 27. Dane kliniczne noworodków kobiet z grupy kontrolnej w zależności od ich genotypów polimorfizmu *DRD1 -48A>G*.

Tabela 28. Dane kliniczne noworodków kobiet z grupy badanej z PE w zależności od ich genotypów polimorfizmu *DRD4 -521C>T*.

Tabela 29. Dane kliniczne noworodków kobiet z grupy kontrolnej w zależności od ich genotypów polimorfizmu *DRD4 -521C>T*.

Tabela 30. Porównanie genotypów polimorfizmu *COMT 472G>A* pacjentek z grupy badanej z PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

Tabela 31. Porównanie genotypów polimorfizmu *COMT 472G>A* pacjentek z grupy badanej z ciężką PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

Tabela 32. Porównanie genotypów polimorfizmu *DRD1 -48A>G* pacjentek z grupy badanej z PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

Tabela 33. Porównanie genotypów polimorfizmu *DRD1 -48A>G* pacjentek z grupy badanej z ciężką PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

Tabela 34. Porównanie genotypów polimorfizmu *DRD4 -521C>T* pacjentek z grupy badanej z PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

Tabela 35. Porównanie genotypów polimorfizmu *DRD4 -521C>T* pacjentek z grupy badanej z ciężką PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

Tabela 36. Zestawienie wyników badań dotyczących częstości występowania polimorfizmu *472G>A COMT* u pacjentek ze stanem przedzucawkowym.

Tabela 37. Zestawienie wyników badań dotyczących częstości występowania polimorfizmu *COMT 472G>A* w populacjach osób zdrowych.

Tabela 38. Zestawienie wyników badań dotyczących częstości występowania polimorfizmu *-48A>G* genu *DRD1* u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym i stanem przedzucawkowym.

Tabela 39. Zestawienie wyników badań dotyczących częstości występowania polimorfizmu *-48A>G* genu *DRD1* w populacjach osób zdrowych.

Tabela 40. Zestawienie wyników badań dotyczących częstości występowania polimorfizmu *-521C>T* genu *DRD4* u pacjentek ze stanem przedzucawkowym.

Tabela 41. Zestawienie wyników badań dotyczących częstości występowania polimorfizmu *-521C>T* genu *DRD4* w populacjach osób zdrowych.

SPIS RYCIN

Rycina 1. Schemat powstawania 2-metoksyestradiolu.

Rycina 2. Metyldopa – wzór strukturalny.

Rycina 3. Schemat budowy genu *COMT*.

Rycina 4. Dopamina – wzór strukturalny.

Rycina 5. Charakterystyka badanych w pracy polimorfizmów. Nazwy polimorfizmów podano zgodnie z zaleceniami HGVS (Human Genome Variation Society), dbSNP - nr w bazie danych NCBI

Rycina 6. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *472G>A* genu *COMT* w grupie kobiet z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.

Rycina 7. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *-48A>G* genu *DRD1* w grupie kobiet z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.

Rycina 8. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *-521C>T* genu *DRD4* w grupie kobiet z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.

Rycina 9. Porównanie genotypów polimorfizmu *COMT 472G>A* pacjentek z grupy badanej z ciężką PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

Rycina 10. Porównanie genotypów polimorfizmu *DRD1* -48A>G pacjentek z grupy badanej z ciężką PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

Rycina 11. Porównanie genotypów polimorfizmu *DRD4* -521C>T pacjentek z grupy badanej z ciężką PE w zależności od otrzymywanej dawki metyldopa.

SPIS FOTOGRAFII

Fotografia 1. Rozdział elektroforetyczny produktu reakcji PCR w 2% żelu agarozowym dla polimorfizmu 472G>A genu *COMT*. M-marker wielkości DNA 50 pz (Fermentas); tory 1-7 - produkty PCR.

Fotografia 2. Produkty uzyskane po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *BstUI* (*Bsh1236I*). M-marker wielkości 50 pz. Prążki: 4, 5 - homozygoty GG; 1, 2 - heterozygoty GA; 3, 6, 7 - homozygoty AA.

Fotografia 3. Rozdział elektroforetyczny produktu reakcji PCR w 2% żelu agarozowym dla polimorfizmu -48A>G genu *DRD1*. M - marker wielkości DNA 50 pz (Fermentas); tory 1 - 8 – produkty PCR.

Fotografia 4. Produkty uzyskane po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *HpyF3I* (*DdeI*). M - marker wielkości 50 pz (Fermentas); tory: 2, 6 - homozygoty AA; 3, 4, 5, 7 - heterozygoty AG; 1 - homozygota GG.

Fotografia 5. Rozdział elektroforetyczny produktu reakcji PCR w 2% żelu agarozowym dla polimorfizmu -521C>T genu *DRD4*. M-marker wielkości DNA 50 pz; tory 1-7 – produkty PCR.

Fotografia 6. Produkty uzyskane po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *NsbI* (*FspI*). M - marker wielkości 50 pz, tory: 5-homozygota CC; 3,6 heterozygoty CT; 1,2,4 homozygoty TT.