

**UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO
W POZNANIU
KLINIKA PERINATOLOGII I CHOROÓB KOBIECYCH**

**ANALIZA POLIMORFIZMÓW I EKSPRESJI GENÓW SYNTAZY METIONINY (MTR)
I REDUKTAZY SYNTAZY METIONINY (MTRR)
W PATOGENEZIE STANU PRZEDRZUCAWKOWEGO**

MGR FARM. DONATA DEKA-PAWLIK

PROMOTOR: PROF. DR HAB. N. MED. AGNIESZKA SEREMAK-MROZIKIEWICZ

POZNAŃ 2015

*Serdecznie dziękuję mojemu Promotorowi
Pani Prof. dr hab. n. med. Agnieszce Seremak-Mrozikiewicz
za możliwość realizacji pracy doktorskiej,
wsparcie merytoryczne oraz cenne uwagi i wszechstronną pomoc*

*Serdeczne podziękowania składam
Pani dr Annie Bogacz
za poświęcony czas, pomoc i wyrozumiałość*

*Dziękuję
Pani dr Grażynie Kurzawińskiej
oraz Pani dr Joannie Bartkowiak-Wieczorek
za wsparcie i życzliwość*

*Pamięci Pana Prof. dr hab. n. med. Przemysława M. Mrozikiewicza,
bez którego zaangażowania i wsparcia
realizacja pracy doktorskiej nie byłaby możliwa*

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
1. WSTĘP	7
1.1. Definicja i klasyfikacja nadciśnienia w ciąży	8
1.2. Patogeneza stanu przedzucawkowego	10
1.3. Predykcja stanu przedzucawkowego	12
1.4. Powikłania stanu przedzucawkowego.....	14
1.5. Czynniki ryzyka stanu przedzucawkowego	15
1.6. Leczenie stanu przedzucawkowego	17
1.7. Udział czynników genetycznych w etiologii stanu przedzucawkowego	20
1.8. Syntaza metioniny i reduktaza syntazy metioniny	24
1.9. Polimorfizm 2756A>G genu <i>MTR</i> oraz 66A>G genu <i>MTRR</i>	30
2. CEL PRACY	32
3. MATERIAŁ I METODY	33
3.1. Materiał	33
3.1.1. Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej	33
3.2. Metody	35
3.2.1. Izolacja DNA z krwi obwodowej.....	35
3.2.2. Izolacja RNA z łożyska	36
3.2.3. Analiza ilościowa i jakościowa uzyskanych preparatów DNA i RNA	36
3.2.4. Oznaczanie polimorfizmów 2756A>G genu <i>MTR</i> oraz 66A>G genu <i>MTRR</i>	37
3.2.5. Oznaczanie poziomu ekspresji mRNA genów <i>MTR</i> i <i>MTRR</i> w tkance łożyskowej	39
3.2.5.1. Odwrotna transkrypcja	39
3.2.5.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym.....	39
3.2.6. Analiza statystyczna	42
4. WYNIKI	43
4.1. Analiza parametrów klinicznych i biochemicznych badanych grup kobiet	43
4.2. Analiza badanych polimorfizmów genów <i>MTR</i> oraz <i>MTRR</i>	48
4.2.1. Analiza polimorfizmu 2756A>G genu <i>MTR</i>	48
4.2.2. Analiza polimorfizmu 66A>G genu <i>MTRR</i>	49
4.3. Rozkład częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli dla polimorfizmu 2756A>G genu <i>MTR</i>	50
4.4. Rozkład częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli dla polimorfizmu 66A>G genu <i>MTRR</i>	56

4.5. Porównanie parametrów klinicznych i biochemicznych oraz ich związek z genotypami badanego polimorfizmu 2756 A>G genu <i>MTR</i>	63
4.6. Porównanie parametrów klinicznych i biochemicznych oraz ich związek z genotypami badanego polimorfizmu 66A>G genu <i>MTRR</i>	73
4.7. Analiza poziomu ekspresji mRNA <i>MTR</i> i <i>MTRR</i> w tkance łożyskowej	83
4.8. Analiza zależności pomiędzy genotypami polimorfizmów genów <i>MTR</i> i <i>MTRR</i> a ich poziomem ekspresji w łożysku	88
5. DYSKUSJA	90
5.1. Związek hiperhomocysteinemii ze stanem przedrzucawkowym	90
5.2. Polimorfizmy genetyczne o potencjalnym wpływie na stężenie homocysteiny i rozwój stanu przedrzucawkowego	93
5.2.1. Polimorfizm 2756A>G genu <i>MTR</i>	95
5.2.2. Polimorfizm 66A>G genu <i>MTRR</i>	98
5.2.3. Inne polimorfizmy o potencjalnym znaczeniu w rozwoju stanu przedrzucawkowego	101
5.2.3.1. Polimorfizmy genu <i>MTHFR</i>	101
5.2.3.2. Polimorfizm genu <i>TCN2</i>	103
5.2.3.3. Polimorfizmy genu <i>DHFR</i>	104
5.2.3.4. Polimorfizm genu <i>MTHFD1</i>	104
5.3. Poziom ekspresji mRNA genu <i>MTR</i> oraz <i>MTRR</i> w łożysku	105
5.3.1. Ekspresja mRNA genu <i>MTR</i>	105
5.3.2. Ekspresja mRNA genu <i>MTRR</i>	109
5.4. Polimorfizmy genów <i>MTR</i> i <i>MTRR</i> w predykcji i profilaktyce stanu przedrzucawkowego	111
6. WNIOSKI	113
7. PIŚMIENNICTWO	114
8. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	125
9. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	127
10. WYKAZ TABEL I RYCIN	129

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACE	-	konwertaza angiotensyny I (ang. <i>angiotensin I converting enzyme</i>)
ACOG	-	Amerykańskie Towarzystwo Położników i Ginekologów (ang. <i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>)
ARDS		zespół ostrej niewydolności oddechowej (ang. <i>acute respiratory distress syndrome</i>)
AT1		receptor typu I angiotensyny II (ang. <i>angiotensin II receptor type I</i>)
BCRP		białko oporności raka piersi (ang. <i>breast cancer resistance protein</i>)
BMI		wskaźnik masy ciała (ang. <i>body mass index</i>)
CBS		β -syntaza cystationiny (ang. <i>cystathionine β-synthase</i>)
CTLA4		antygen 4 cytotoksycznego limfocytu T (ang. <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>)
DIC		roziane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe (ang. <i>disseminated intravascular coagulation</i>)
DNA		kwasy deoksyrybonukleinowe (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
E		rzucawka (ang. <i>eclampsia</i>)
eNOS		syntaza tlenku azotu śródbłonkowa (ang. <i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
ESH/ESC		Europejskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego/Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (ang. <i>European Society of Hypertension/European Society of Cardiology</i>)
GAPDH		gen referencyjny dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa (ang. <i>glyceraldehydephosphate dehydrogenase</i>)
GFR		filtracja kłębuszkowa (ang. <i>glomerular filtration rate</i>)
GH		nadciśnienie ciążowe izolowane (ang. <i>gestational hypertension</i>)
HELLP		zespół HELLP (ang. <i>hemolysis-elevated liver enzymes-low platelets</i>)
HIV		ludzki wirus niedoboru odporności (ang. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HLA-C		układ zgodności tkankowej C (ang. <i>human leukocyte antigen-C</i>)
HLA-G		układ zgodności tkankowej G (ang. <i>human leukocyte antigen-G</i>)
IFN-γ		interferon γ (ang. <i>interferon-γ</i>)
IL-1β		interleukina 1 β (ang. <i>interleukin-1β</i>)
IL-2		interleukina 2 (ang. <i>interleukin-2</i>)
IL-4		interleukina 4 (ang. <i>interleukin-4</i>)
IL-10		interleukina 10 (ang. <i>interleukin 10</i>)
IUGR		ograniczenie wzrastania wewnątrzmacicznego (ang. <i>intrauterine growth restriction</i>)
KIR		receptor immunoglobulino-podobny (ang. <i>killer-cell immunoglobulin-like receptor</i>)
LD		niezrównoważenie sprzężeń (ang. <i>linkage disequilibrium</i>)
MAP		średnie ciśnienie tętnicze krwi (ang. <i>mean arterial pressure</i>)
MDR1		gen oporności wielolekowej 1 (ang. <i>multidrug resistance-1</i>)
mRNA		kwasy rybonukleinowe informacyjne (ang. <i>messenger ribonucleic acid</i>)

MTHFR	reduktaza metylenotetrahydrofolianowa (ang. <i>methylenetetrahydrofolate reductase</i>)
NBDs	domeny wiążące nukleotydy (ang. <i>nucleotide-binding domains</i>)
NK	komórki NK (ang. <i>natural killers</i>)
OD	gęstość optyczna (ang. <i>optical density</i>)
p	istotność statystyczna (ang. <i>statistical significance</i>)
PAI 1	inhibitor aktywacji plazminogenu 1 (ang. <i>plasminogen activator-inhibitor-1</i>)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	stan przedrzucawkowy (ang. <i>preeclampsia</i>)
P-gp	glikoproteina P (ang. <i>P-glycoprotein</i>)
PIGF	łożyskowy czynnik wzrostu (ang. <i>placenta growth factor</i>)
P.U.	przedział ufności (ang. <i>confidence interval</i>)
RAS	układ renina-angiotensyna (ang. <i>renin-angiotensin system</i>)
RFLP	analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RNA	kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
RPF	przepływ osocza przez nerki (ang. <i>renal plasma flow</i>)
SD	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>)
SEM	błąd standardowy (ang. <i>standard error</i>)
sEng	rozpuszczalna forma endogliny (ang. <i>soluble endoglin</i>)
sFlt-1	rozpuszczalna forma receptora dla VEGF (ang. <i>soluble fms-like tyrosine kinase</i>)
SAM	S-adenozylometionina (ang. <i>S-adenosylmethionine</i>)
SAH	S-adenozylhomocysteina (ang. <i>S-adenosylhomocysteine</i>)
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
T_m	temperatura topnienia (ang. <i>melting temperature</i>)
TMDs	domeny transbłonowe (ang. <i>transmembrane domains</i>)
TNF-α	czynnik martwicy nowotworów α (ang. <i>tumor necrosis factor-α</i>)
VEGF	czynnik wzrostu śródbłónka naczyń (ang. <i>vascular endothelial growth factor</i>)
W.R.	współczynnik ryzyka, iloraz szans (ang. <i>odds ratio</i>)

1. WSTĘP

Stan przedrzucawkowy (PE – *preeclampsia*) to powikłanie występujące w przebiegu około 5-10% wszystkich ciąż. Zaliczane jest ono do jednej z głównych przyczyn zgonów pacjentek ciężarnych, płodów i noworodków na całym świecie. Zaobserwowano siedmiokrotnie większą częstość występowania stanu przedrzucawkowego w krajach rozwijających się w porównaniu do krajów rozwiniętych [1]. W Polsce częstość występowania stanu przedrzucawkowego ocenia się na 6-8% wszystkich ciężarnych [2]. Nieustannie więc prowadzone są badania mające na celu jednoznaczne ustalenie mechanizmu powstawania i stanu przedrzucawkowego, co pomogłoby w udoskonaleniu metod leczenia i zapobiegania tego schorzenia. Rozróżnić należy nadciśnienie tętnicze przewlekłe od postaci nadciśnienia tętniczego ujawniającego się w związku z przebiegiem ciąży. Wśród tych ostatnich uwagę zwraca stan przedrzucawkowy i rzucawka (E - *eclampsia*) ze względu na wysokie ryzyko powikłań.

Przypadki stanu przedrzucawkowego i jego następstwa były opisywane już przez starożytnych Egipcjan, Indian i Chinów. Pomimo faktu, iż uczeni tamtych czasów nie wyodrębnili tego schorzenia, to senność i bóle głowy u ciężarnej połączone z drgawkami uznawane były za złe czynniki rokownicze [3]. Rzucawka była utożsamiana z padaczką aż do roku 1739 kiedy to ówczesny badacz François Boissier de Sauvages opisał i wyodrębnił te dwie jednostki chorobowe. Zwrócił uwagę, że rzucawka ujawnia się tylko w czasie ciąży, podczas gdy napady padaczki mogą występować w przebiegu całego życia. Dwadzieścia lat później ten sam naukowiec określił objawy towarzyszące rzucawce lub będące jej zwiastunem: krwotoki i silne bóle oraz ściśle powiązał tą chorobę z przebiegiem ciąży. Kolejnym przełomem było stwierdzenie przez Levera obecności białka w moczu u pacjentki cierpiącej na rzucawkę w roku 1843 [4]. Na przełomie kolejnych lat powstało wiele teorii dotyczących etiologii zatrucia ciążowego jak ówczesnie określano to schorzenie. Była to teoria „jadów łożyskowych”, „czynnika zakaźnego”. Zainteresowanie budziła także „teoria płodowa” upatrująca przyczynę w kumulacji metabolitów płodu oraz „teoria matczyzna” określająca chorobę jako efekt uszkodzenia nerkowych naczyń krwionośnych [5].

Pomimo intensywnie prowadzonych na szeroką skalę badań nad patomechanizmem powstawania stanu przedrzucawkowego, podłoże tego schorzenia nie zostało dotąd wyjaśnione w sposób dokładny i jednoznaczny. Obecnie istnieje kilka teorii dotyczących etiologii nadciśnienia ciążowego. Niemniej jednak za najważniejszą uważa się niedokrwienie

łożyska jako efekt nieprawidłowej implantacji trofoblastu do ścian macicznych tętnic spiralnych [6]. Potwierdzają to światowe organizacje naukowe, których przedmiotem działania i zainteresowania jest nadciśnienie w ciąży, w tym również Amerykańskie Towarzystwo Położników i Ginekologów (ACOG – *American College of Obstetricians and Gynecologists*) [1].

1.1. Definicja i klasyfikacja nadciśnienia w ciąży

Stan przedrzucawkowy rozpoznaje się w przypadku stwierdzenia nadciśnienia tętniczego po 20 tygodniu ciąży, któremu towarzyszy białkomocz. W przypadku braku proteinurii do postawienia diagnozy upoważnia wystąpienie przynajmniej jednego z następujących symptomów: trombocytopenii, zaburzeń czynności wątroby, nerek, obrzęku płuc, poważnych zaburzeń ze strony układu nerwowego oraz wzroku. Definicja stanu przedrzucawkowego została poszerzona przez ACOG w zaleceniach z 2013 roku w celu poprawienia rozpoznawalności i zmniejszenia śmiertelności z powodu tego schorzenia. Weześniej stan przedrzucawkowy możliwy był do rozpoznania dopiero przy równoczesnym stwierdzeniu nadciśnienia i proteinurii [1]. W przebiegu eklampsji obserwujemy wystąpienie tzw. napadów typu *grand mal* czyli uogólnionych drgawek toniczno-klonicznych, ujawniających się jako następstwo nieprawidłowości w przebiegu stanu przedrzucawkowego [7, 8].

Nadciśnienie tętnicze w przebiegu ciąży obejmuje szereg jednostek, w związku z tym niejednokrotnie klasyfikacja nadciśnienia w przebiegu ciąży jest złożona. Również diagnostyka i wdrożenie odpowiedniego postępowania terapeutycznego jest trudnym problemem. W związku z tym szereg organizacji dokonało próby podziału i klasyfikacji nadciśnienia w ciąży. Według najnowszych wytycznych ACOG z 2013 roku w grupie schorzeń nadciśnienia tętniczego w ciąży rozróżniamy [1, 9]:

1. **nadciśnienie tętnicze ciążowe** - jest to nadciśnienie tętnicze pojawiające się po 20 tygodniu ciąży i zanikające po porodzie, przy braku białkomoczu i objawów narządowych charakteryzujących stan przedrzucawkowy
2. **stan przedrzucawkowy/rzucawka** - podstawą stwierdzenia stanu przedrzucawkowego jest pojawienie się ciśnienia tętniczego $\geq 140/90$ mmHg po 20 tygodniu ciąży u kobiet z wcześniejszym ciśnieniem prawidłowym, wraz z towarzyszącym białkomoczem (≥ 300 mg białka w dobowej zbiorce moczu lub współczynnik białko/kreatynina $\geq 0,3$). Wartości ciśnienia tętniczego muszą być potwierdzone dwukrotnym pomiarem z zachowaniem przynajmniej czterogodzinnego

odstępu czasowego. W przypadku braku proteinurii do rozpoznania stanu przedrzucawkowego niezbędne jest potwierdzenie obok opisanego wyżej nadciśnienia przynajmniej jednego z następujących symptomów: trombocytopenii (ilość płytek krwi $<100\ 000/\mu\text{L}$), dysfunkcji nerek (stężenie kreatyniny w osoczu $>1,1\ \text{mg/dL}$ lub podwojenie stężenia kreatyniny w osoczu niezwiązane z chorobą nerek), upośledzenia funkcji wątroby (podwojenie stężenia transaminaz wątrobowych), obrzęku płuc, zaburzeń mózgowych i wzrokowych. Rzucawkę cechuje występowanie drgawek toniczno-klonicznych jako następstwo nadciśnienia tętniczego, które są często poprzedzone objawami zwiastunowymi (silne bóle głowy, dysrefleksja autonomiczna)

3. **stan przedrzucawkowy nałożony na przewlekłe nadciśnienie tętnicze**
4. **nadciśnienie tętnicze przewlekłe** - jest określane jako nadciśnienie tętnicze (ciśnienie tętnicze $\geq 140/90\ \text{mmHg}$ potwierdzone przynajmniej dwukrotnym pomiarem z zachowaniem odpowiedniego odstępu czasowego) rozpoznawane przed ciążą lub przed 20 tygodniem jej trwania.

Podobną klasyfikację w 2011 roku przedstawiło Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne (ESC – *European Society of Cardiology*). Zgodnie z wytycznymi tej organizacji wśród zaburzeń nadciśnienia w ciąży wyróżniamy [10]:

1. **nadciśnienie tętnicze istniejące przed ciążą** - jest rozpoznawane przed ciążą lub przed 20 tygodniem jej trwania i zazwyczaj trwa powyżej 42 dnia połogu, zaburzeniu temu może towarzyszyć białkomocz
2. **ciążowe nadciśnienie tętnicze** - pojawia się po 20 tygodniu trwania ciąży i w większości przypadków zanika w przeciągu 42 dni połogu. Stan, w którym występuje dodatkowo białkomocz ($\geq 0,3\ \text{g/dzień}$ w dobowej zbiorce moczu) określany jest jako stan przedrzucawkowy
3. **nadciśnienie tętnicze istniejące przed ciążą z nałożonym nadciśnieniem ciążowym wraz z białkomoczem**
4. **nadciśnienie tętnicze niesklasyfikowane przed porodem** - jest to nadciśnienie tętnicze stwierdzone po 20 tygodniu ciąży przy jednoczesnym braku informacji o wcześniejszych wartościach ciśnienia tętniczego. W celu właściwej diagnostyki niezbędna jest więc ponowna ocena, która winna być dokonana najwcześniej w 42 dniu połogu.

Badania wskazują na stan przedzucawkowy nałożony na nadciśnienie tętnicze przewlekłe, jako zaburzenie w najwyższym stopniu zagrażające życiu i zdrowiu zarówno matki jak i dziecka [7].

Inny podział nadciśnienia w ciąży uwzględnia wartości ciśnienia tętniczego krwi. Zgodnie z nim wyróżniamy postać ciężką i umiarkowaną. Ta pierwsza charakteryzuje się wartościami BP $\geq 160/110$ mmHg, natomiast w formie umiarkowanej wartości te kształtują się na poziomie 140-159/90-109 mmHg [9]. Europejskie Towarzystwo Nadciśnienia również stworzyło klasyfikację odnoszącą się do stopnia ciężkości nadciśnienia w ciąży. Zgodnie z tymi wytycznymi jest ono rozpoznawane przy wartości ciśnienia skurczowego ≥ 140 mmHg i/lub ciśnienia rozkurczowego ≥ 90 mmHg. O postaci umiarkowanej schorzenia mówimy przy stanie 140-159/90-109 mmHg, natomiast o formie ciężkiej $\geq 160/110$ mmHg [10]. Białkomocz na poziomie ≥ 5 g/dobę upoważnia do stwierdzenia ciężkiego stanu przedzucawkowego [11].

1.2. Patogeneza stanu przedzucawkowego

Właściwe i dokładne poznanie etiologii stanu przedzucawkowego wydaje się być kluczowe dla odpowiedniego zapobiegania i leczenia tego schorzenia. Od wielu lat prowadzone są więc intensywne badania, które wskazały kilka teorii dotyczących mechanizmu powstawania i rozwoju stanu przedzucawkowego (Rycina 1). Większość badaczy zgodnie podkreśla istotne znaczenie niedokrwienia i niedotlenienia łożyska jako efekt nieprawidłowego jego rozwoju. Fizjologicznie w początkowym etapie powstawania łożyska następuje inwazja trofoblastu w ścianę tętnic spiralnych macicy. W wyniku przebudowy ścian naczyń wysokoprzepływowe i niskooporowe naczynia spiralne nabierają cech niskoprzepływowych i wysokooporowych. W patomechanizmie stanu przedzucawkowego upośledzona implantacja trofoblastu uniemożliwia właściwą przebudowę naczyń krwionośnych, które pozostają zwężone i nie są w stanie zapewnić odpowiedniego przepływu krwi. Wraz z przebiegiem ciąży płód nie jest odpowiednio zaopatrywany w tlen oraz substancje odżywcze [12].

W etiologii stanu przedzucawkowego istotną rolę odgrywa zaburzenie równowagi między czynnikami proangiogennymi, jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF - *vascular endothelial growth factor*), łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF - *placental growth factor*) i antyangiogennymi rozpuszczalna forma receptora kinazy (sFlt-1 - *soluble fms-like tyrosine kinase*), rozpuszczalna endoglina (sEng - *soluble endoglin*). Czynnik VEGF pełni swoją funkcję w wielu tkankach organizmu ludzkiego, natomiast aktywność PIGF

ograniczona jest do łożyska. Niemniej jednak odpowiednie stężenia obu powyższych białek zapewniają prawidłowy rozwój naczyń krwionośnych a zwłaszcza śródbłónka naczyniowego i w konsekwencji również prawidłowy rozwój łożyska [13]. Większość analiz wskazuje na obniżony poziom czynników proangiogennych oraz podwyższone stężenie czynników antyangiogennych u kobiet ze stanem przedrzucawkowym w porównaniu ze zdrowymi ciężarnymi [14]. Podjęte zostały natomiast próby wytłumaczenia zjawiska zaburzenia równowagi między czynnikami proangiogennymi i antyangiogennymi. Uważa się, że niedokrzwione komórki trofoblastu reagują na ten stan nadprodukcją antyangiogennego sFlt1. Czynnikiem ten z kolei wiąże proangiogeny VEGF oraz w mniejszym stopniu PlGF, powodując obserwowane u pacjentek z preeklampsją obniżenie ich stężenia [15, 16].

Za niedostateczną inwazję trofoblastu do ścian tętnic spiralnych prawdopodobnie mogą być również odpowiedzialne czynniki genetyczne i immunologiczne. Jako czynniki immunologiczne wskazywane są zaburzenia równowagi między elementami modulującymi właściwą odpowiedź immunologiczną matki. W prawidłowo rozwijającej się ciąży w odpowiedzi na antygeny HLA-G płodu układ immunologiczny kobiety stymuluje odpowiedź typu humoralnego związaną z wydzielaniem cytokin Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13). Odpowiedź typu komórkowego połączona z uwalnianiem cytokin Th1 (IFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-2, IL-12,) jest natomiast zahamowana. Odwrotna sytuacja będąca skutkiem zaburzonej ekspresji antygeny HLA-G w trofoblaście, jest obserwowana w ciąży powikłanej stanem przedrzucawkowym [17]. Zbyt niski poziom ekspresji antygeny HLA-G prowadzi także do zaburzenia aktywności komórek NK (*natural killers*) wpływających na inwazję trofoblastu oraz proces przebudowy naczyń [18].

Kolejnym ważnym elementem w etiologii stanu przedrzucawkowego jest dysfunkcja śródbłónka naczyniowego. Nieprawidłowa inwazja trofoblastu, nieadekwatna przebudowa naczyń i ich wysoka oporność oraz następnie niedotlenienie powoduje wystąpienie zjawiska stresu oksydacyjnego oraz peroksydację lipidów. Obserwujemy zwiększenie uwalniania substancji naczyniokurczących (endotelin i tromboksanu) oraz obniżenie wydzielania substancji wazodilatacyjnych (tlenek azotu i prostacykliny) jako następstwo zmniejszonego przepływu maciczo-łożyskowego. Bezpośrednim skutkiem powyższych zmian jest już pojawienie się nadciśnienia oraz białkomoczu [6].

Prowadzonych jest wiele badań mających na celu poznanie innych aspektów patogenezy stanu przedrzucawkowego. Analizom poddawane są substancje produkowane przez ludzkie łożysko oraz występujących we krwi. Cowans i wsp. zauważyli istotny spadek stężenia białka PP13 (*placental protein 13*) między 9 a 12 tygodniem ciąży w przypadkach

powikłanych później stanem przedrzucawkowym [19]. Ponadto, zwiększony poziom fibronektyny i neuroprzekaźnika neurokininy B jest również powiązany z występowaniem tej jednostki chorobowej [20, 21]. Warte uwagi są wyniki badań nad stężeniem homocysteiny u kobiet ze stanem przedrzucawkowym. Wang i wsp. wykazali zależność między zjawiskiem hiperhomocysteinemii a pojawieniem się stanu przedrzucawkowego. Wystarczająco wcześnie obserwowane zmiany pozwalają wysunąć hipotezę o znaczeniu tego białka jako markera choroby [22, 23].



Rycina 1. Wieloczynnikowe podłoże stanu przedrzucawkowego [opracowanie własne].

1.3. Predykcja stanu przedrzucawkowego

Aktualnie prowadzone badania nastawione są na identyfikację czynników predysponujących do rozwoju stanu przedrzucawkowego. Znajomość tych zmiennych pozwala na wyodrębnienie grup ryzyka kobiet narażonych na wystąpienie stanu przedrzucawkowego i dostosowanie odpowiedniego postępowania w ramach działań profilaktycznych. Nadal trwają poszukiwania idealnego biochemicznego markera stanu przedrzucawkowego o wysokiej specyficzności i czułości. Ważnymi cechami takiego

wskaźnika powinna być również prostota oznaczania oraz niska cena, co zapewniłoby masową dostępność. Oznaczanie jego poziomu w pierwszych 20 tygodniach ciąży pozwoliłoby określić ryzyko rozwoju tej jednostki. Do chwili obecnej wskazano kilkanaście możliwych markerów, jednak stopień zaawansowania badań nie pozwala na ich powszechne stosowanie [1].

W wielu przypadkach zaobserwowano istotnie niższe stężenie VEGF w osoczu kobiet u których następnie rozwinął się stan przedzucawkowy wobec zdrowych ciężarnych. Fakt ten był możliwy do wykrycia już w II trymestrze ciąży [24, 25]. Pomiary stężenia czynnika PIGF mogą także dostarczyć ważnych informacji o przebiegu ciąży. Fizjologicznie poziom tego białka wzrasta w dwóch pierwszych trymestrach aż do osiągnięcia maksimum pomiędzy 29 a 32 tygodniem ciąży. W przypadkach powikłanych później stanem przedzucawkowym obserwujemy znacznie niższy poziom PIGF już od 13 do 16 tygodnia [26].

Innym potencjalnym markerem wystąpienia stanu przedzucawkowego jest aktywina A. W warunkach fizjologicznych poziom tego białka rośnie w przebiegu ciąży aż do 38 tygodnia, natomiast pomiędzy 38 a 41 tygodniem obserwujemy spadek stężenia. Istotnie podwyższona ilość aktywiny A charakteryzuje ciężarne, u których w przebiegu ciąży rozwija się PE. Podobnie zwiększony poziom inhibiny A może być wskaźnikiem predykcyjnym wystąpienia tego schorzenia [27]. Szczególną uwagę należy zwrócić na stężenia aktywiny A oraz inhibiny A w przebiegu ciąży, gdyż ich czułość jako markerów stanu przedzucawkowego wynosi nawet 93%, a specyficzność osiąga wartość do 98%.

Badania wskazują również na możliwe znaczenie sEng jako biomarkera stanu przedzucawkowego. Zmiany stężenia tego białka korelują bowiem z występowaniem oraz nasileniem stanu przedzucawkowego. Rozpuszczalna endogлина została wykryta w syncytiotrofoblastie oraz śródbłonku. Działa ona jako koreceptor dla transformującego czynnika wzrostu ($TGF-\beta$ – *transforming growth factor β*). Kompleks tych dwóch elementów reguluje proces angiogenezy, różnicowanie komórek śródbłonka i napięcie naczyń krwionośnych. Fizjologicznie stężenie rozpuszczalnej endogliny znacznie spada pomiędzy I a II trymestrem. Zjawiska tego nie obserwujemy w grupie pacjentek ciężarnych, u których rozwinię się stan przedzucawkowy [28]. Levine i wsp. udowodnili, że istotnie podwyższony poziom tego białka można wykryć nawet 8 tygodni przed pojawieniem się obrazu klinicznego stanu przedzucawkowego. Dodatkowo analizy wykazują związek między stężeniem sEng, a stopniem nasilenia choroby [14].

Jednym z objawów zwiastujących wystąpienie stanu przedzucawkowego może być podniesienie stężenia kwasu moczowego we krwi. Badacze sugerują, że jest to lepszy

wykładnik zagrożenia dla płodu niż obserwacja wzrostu wartości ciśnienia tętniczego. Pojawienie się zwiększonego poziomu kwasu moczowego jest bowiem konsekwencją niedotlenienia, następczej kwasicy oraz zaburzeń funkcji nerek. Czynniki te jak wiadomo wskazują na rozwój ciężkiej postaci stanu przedrzucawkowego [29].

Kolejnym elementem w predykcji stanu przedrzucawkowego jest ultrasonograficzny pomiar przepływu krwi w tętnicach macicznych. Wiadomo bowiem, że jedną z głównych przyczyn stanu przedrzucawkowego jest niewłaściwa implantacja trofoblastu do ścian tętnic spiralnych, prowadząca do niedokrwienia łożyska. W celu określenia ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego określany jest przepływ krwi w tętnicach macicznych. Martin i wsp. wykorzystali technikę kolorowego Dopplera i wyznaczyli wartość wskaźnika pulsacji (PI – *pulsatility index*) w tętnicach macicznych w predykcji stanu przedrzucawkowego. Czułość tej techniki predykcji jest duża w około 22-24 tygodniu ciąży [30, 31].

Przydatnym parametrem predykcyjnym stanu przedrzucawkowego może być również średnie ciśnienie tętnicze krwi (MAP – *mean arterial pressure*) wyznaczone w II trymestrze ciąży. Wskaźnik ten jest definiowany jako średnie ciśnienie tętnicze w trakcie pojedynczego cyklu pracy serca i ma zastosowanie do określania perfuzji narządowej. Według niektórych autorów MAP mierzony między 11 a 13 tygodniem ciąży jest najbardziej wiarygodnym wskaźnikiem wystąpienia zarówno wczesnej jak i późnej postaci stanu przedrzucawkowego, a także ciążowego nadciśnienia tętniczego [32, 33].

Badacze podkreślają, że odpowiednim rozwiązaniem problemu predykcji stanu przedrzucawkowego może okazać się wprowadzenie testów przesiewowych, które łączyłyby pomiar stężenia kilku omówionych wskaźników z badaniem ultrasonograficznym przepływu krwi przez tętnice maciczne [31]. Niemniej jednak czynniki genetyczne również mogą mieć znaczenie w predykcji PE [7].

1.4. Powikłania stanu przedrzucawkowego

Stan przedrzucawkowy jest schorzeniem wielonarządowym wymagającym ścisłego monitorowania pacjentki, ze zwróceniem uwagi na podawane przez ciężarną objawy kliniczne. Szczególnie należy zwracać uwagę na wystąpienie silnego bólu w nadbrzuszu, intensywnych bólów głowy czy zaburzeń widzenia.

Ciężka postać stanu przedrzucawkowego charakteryzująca się nadciśnieniem tętniczym na poziomie $\geq 160/110$ mmHg i/lub proteinurią ≥ 5 g/dobę niesie ze sobą poważne zagrożenie dla matki oraz płodu. Jako następstwo może się bowiem pojawić hipotrofia płodu, przedwczesne oddzielenie łożyska, obumarcie wewnątrzmaciczne płodu. Powikłaniami

ciężkiej postaci stanu przedrzucawkowego są też rzucawka (*eclampsia*), stan rzucawkowy (*status eclampticus*) oraz zespół HEELP (*hemolysis-elevated liver enzymes-low plateletes*) [34]. Stan rzucawkowy natomiast rozpoznaje się przy braku lub tylko minimalnych przerwach między kolejnymi napadami drgawek.

W przebiegu rzucawki dochodzi do wystąpienia toniczno-klonicznych drgawek, którym towarzyszy utrata przytomności. Najczęściej rzucawka pojawia się w trakcie ciąży, niemniej jednak może dojść do niej również w czasie porodu lub nawet w okresie połogowym. Przyczyną wystąpienia rzucawki jest prawdopodobnie skurcz mózgowych naczyń krwionośnych. Dochodzi do niedokrwienia mózgu i obrzęku, obserwuje się wylewy śródmózgowe i encefalopatie metaboliczne. W badaniach laboratoryjnych wykazano, że białkomocz towarzyszy w około 34% wystąpieniu rzucawki oraz w około 15% epizodów zespołu HEELP [11]. Następstwa rzucawki są niebezpieczne zarówno dla płodu jak i matki. Jako powikłania występują rozlane wykrzepianie wewnątrznaczyniowe (DIC – *disseminated intravascular coagulation*), obrzęk płuc, zespół ostrej niewydolności oddechowej (ARDS – *acute respiratory distress syndrome*), a także zespół HEELP. Zespół HEELP cechuje się rozpadem czerwonych krwinek, podniesionym poziomem bilirubiny i/lub obniżonym stężeniem haptoglobiny, zwiększeniem aktywności enzymów wątrobowych oraz małopłytkowością [35]. Stan ten jest powikłaniem około 7-8% ciężkich przypadków stanu przedrzucawkowego [36].

Opisano również przypadki odwracalnej ślepoty w przebiegu ciężkiego stanu przedrzucawkowego oraz rzucawki. Zdolność widzenia zazwyczaj powracała w ciągu trzech dni od opanowania sytuacji. Do innych objawów i powikłań wzrokowych towarzyszących stanowi przedrzucawkowemu i rzucawce należy retinopatia, wysiękowe odwarstwienie siatkówki oka [36]. Rzucawka może powodować także obumarcie wewnątrzmaciczne oraz przedwczesne oddzielenie łożyska [37, 38, 39].

1.5. Czynniki ryzyka stanu przedrzucawkowego

W grupie kobiet ciężarnych, które nigdy nie rodziły częstość występowania stanu przedrzucawkowego sięga nawet 7-8% [40]. Liczne analizy przypadków rozwoju stanu przedrzucawkowego umożliwiły jednak identyfikację czynników, które zwiększają ryzyko rozwoju tego schorzenia.

Poprzednia ciąża powikłana stanem przedrzucawkowym, ciąża wielopłodowa, zapłodnienie *in vitro*, rodzinne występowanie stanu przedrzucawkowego, rasa czarna, ciąża u pierwiastki, przewlekłe nadciśnienie tętnicze, przewlekłe choroby nerek, trombofilia

wrodzona i nabyta, cukrzyca i inne schorzenia autoimmunologiczne to najczęściej wymieniane niemodyfikowalne wskaźniki ryzyka występowania schorzenia. Niebezpieczeństwo rozwoju stanu przedrzucawkowego wzrasta aż siedmiokrotnie w związku z przebiegiem tego schorzenia w poprzedniej ciąży [41]. Znacznie częściej stan przedrzucawkowy jest wykrywany u pacjentek z historią tej choroby w pierwszej linii pokrewieństwa [42]. Może to wskazywać na znaczenie czynników genetycznych w etiologii schorzenia. Kolejne analizy dowodzą, że ciąża trojacza niesie ze sobą większe ryzyko pojawienia się stanu przedrzucawkowego w porównaniu z ciążą bliźniaczą i pojedynczą, co może wynikać ze zwiększonej w tym przypadku masy łożyska [43]. Stan przedrzucawkowy częściej stwierdza się u pierworódek, a wyjaśnienie tego zjawiska opiera się na udziale czynników immunologicznych w patogenezie schorzenia. Wnioski takie wysunięto na podstawie pomiaru wskaźników świadczących o poziomie przystosowania układu immunologicznego oraz porównaniu tych parametrów u pierworódek i wieloródek [44]. Stwierdzono również, że częstość występowania stanu przedrzucawkowego w populacji pierwiastek rasy czarnej jest dwa razy większa w porównaniu z pierwiastkami rasy białej [45]. Do czynników modyfikowalnych rozwoju PE należą: otyłość, zaawansowany wiek matki, okres ≥ 10 lat od poprzedniej ciąży, nieprawidłowa dieta [46]. Niekorzystny wpływ zbyt wysokiej masy ciała kobiety w okresie poprzedzającym ciążę jest znany od dawna. Bianco i wsp. dowiedli czterokrotnie większego niebezpieczeństwa wystąpienia stanu przedrzucawkowego u pacjentek z wartością wskaźnika masy ciała (BMI – *body mass index*) powyżej 35 kg/m^2 w porównaniu z ciężarnymi, których BMI kształtowało się na poziomie $19\text{--}27 \text{ kg/m}^2$ [47]. Ryzyko występowania stanu przedrzucawkowego wzrasta wraz z wiekiem matki, co częściowo może wynikać z większego odsetka kobiet chorujących na nadciśnienie przewlekłe w tej grupie wiekowej.

Ochronny wpływ zaadaptowanego układu immunologicznego i wynikająca z niego zmniejszona częstość stanu przedrzucawkowego u wieloródek zanika wraz z wydłużeniem odstępu od poprzedniej ciąży. Gdy mija okres dziesięciu lat ryzyko rozwoju schorzenia kształtuje się na takim samym poziomie jak u pierwiastek [41].

Zarówno w przebiegu ciąży jak i w okresie poprzedzającym zajście w ciążę niezwykle istotne jest stosowanie odpowiedniej diety. Ważna jest odpowiednia podaż antyoksydantów, kwasu foliowego, a także wapnia i witaminy D. Większość dobrze zaprojektowanych badań potwierdziło ochronną rolę podaży kwasu foliowego względem ryzyka rozwoju stanu przedrzucawkowego. W badaniu Wen i wsp. podaż kwasu foliowego już w dawce 1 mg/dobę w drugim trymestrze ciąży wiązała się z obniżeniem stężeniem

homocysteiny w osoczu oraz zmniejszeniem ryzyka stanu przedrzucawkowego. Suplementacja kwasu foliowego w dobowej dawce 4-5 mg powinna być rozważona u kobiet z grupy zwiększonego ryzyka rozwoju stanu przedrzucawkowego. Uzupełnianie diety ciężarnej w wapń na poziomie 2 g/dobę wydaje się działaniem korzystnym, a niedobór tego składnika jest czynnikiem ryzyka rozwoju przedstawianego schorzenia [48].

1.6. Leczenie stanu przedrzucawkowego

Włączenie postępowania farmakologicznego u kobiety ciężarnej każdorazowo powinno być poprzedzone rozważeniem korzyści w stosunku do ryzyka wynikającego z zastosowanego leczenia. W przypadku pojawienia się nadciśnienia ciążowego lub stanu przedrzucawkowego powyżej 37-38 tygodniu ciąży, szczególnie ciężkiej postaci tego powikłania można rozważyć decyzję indukcji porodu. Takie samo postępowanie może być rozważone przy jednoczesnym wystąpieniu stanu przedrzucawkowego w co najmniej w 34 tygodniu oraz podejrzenia przedwczesnego oddzielenia łożyska, obserwacji masy płodu poniżej piątego percentyla i objawów zagrożenia życia płodu, czy przedwczesnego pęknięcia błon płodowych współistniejącego z nieprawidłowościami w zapisie kardiotokograficznym [7].

Postępowanie w pozostałych przypadkach wystąpienia stanu przedrzucawkowego jest szczególnie trudne ze względu na niejednorodny i zindywidualizowany charakter schorzenia. Podejmując decyzję o leczeniu farmakologicznym należy wziąć pod uwagę czynniki środowiskowe, genetyczne, a także obecność chorób przewlekłych u matki. Według zaleceń Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego z 2011 roku leczenie hipotensyjne u kobiet z nadciśnieniem ciążowym należy rozpocząć przy wartościach ciśnienia co najmniej 140/90 mmHg [49]. W ciężkich przypadkach stanu przedrzucawkowego pojawiających się ≤ 34 tygodnia ciąży do właściwego postępowania farmakologicznego należy zaliczyć podawanie kortykosteroidów w celu przedporodowej stymulacji dojrzewania płuc płodu [7]. U pacjentek z łagodną postacią przewlekłego nadciśnienia tętniczego przed ciążą bez powikłań narządowych niekiedy możliwe jest odstawienie leków w I trymestrze trwania ciąży. Wynika to z fizjologicznego spadku ciśnienia w tym okresie [8].

Należy zwrócić także uwagę na działania niefarmakologiczne. Polegają one na zastosowaniu częstego odpoczynku w pozycji leżącej na lewym boku, co pomaga poprawić krążenie łożyskowe. Zastosowanie znajduje również włączenie diety małosolnej, jak również włączenie odpowiedniej podaży wapnia, jego stężenie zewnątrzkomórkowe jest bowiem zmniejszone w przebiegu stanu przedrzucawkowego [50]. Dieta ciężarnej powinna również

zawierać właściwe ilości magnezu i cynku [51]. Znaczenie ma również unikanie palenia papierosów oraz spożywania alkoholu [52].

Lekiem pierwszego rzutu w terapii umiarkowanego nadciśnienia ciążowego jest metyldopa, co jest wynikiem nie tylko badań naukowych ale również wieloletnią obecnością tej substancji w praktyce klinicznej. Niestety nie jest on wystarczająco skuteczny w ciężkich postaciach nadciśnienia ciążowego oraz stanu przedzucawkowego. Mechanizm działania metyldopy jest dwukierunkowy. Wykazuje ona aktywność ośrodkową zajmując miejsca adrenaliny i noradrenaliny w układzie nerwowym oraz stymuluje presynaptyczne, hamujące receptory α_2 [10, 49]. Istnieją jednak doniesienia o przypadkach wystąpienia małopłowa u płodu, co jest łączone z podawaniem metyldopy w ciągu pierwszych piętnastu tygodni ciąży [50]. Innymi lekami dopuszczonymi do stosowania u ciężarnych są labetalol, metoprolol, nitrendypina i werapamil. Labetalol wybiórczo blokuje receptory α -adrenergicznych i nieselektywnie receptory β -adrenergiczne [9]. Profil bezpieczeństwa stosowania labetalolu w ciąży jest wysoki, niemniej jednak istnieją doniesienia o jego związku z ograniczeniem wewnątrzmacicznego rozwoju płodu [9, 53, 54]. Znaczenie labetalolu w leczeniu nadciśnienia ciążowego i stanu przedzucawkowego jest z pewnością większe w innych krajach europejskich.

Z grupy blokerów kanału wapniowego najlepiej przebadana została nifedypina i nitrendypina. Długodziałające postacie tych leków leku są zalecane przez większość światowych organizacji zajmujących się problematyką podwyższonego ciśnienia w ciąży. Leki z tej grupy hamują napływ wolnych jonów wapnia do wnętrza komórki w mięśniach gładkich naczyń wykazując wysoką skuteczność zarówno w łagodnej jak i ciężkiej postaci nadciśnienia ciążowego i stanu przedzucawkowego [55]. Badania dowodzą wysokiej użyteczności blokerów kanału wapniowego w zwalczaniu nagłego ciężkiego wzrostu ciśnienia tętniczego u ciężarnej. Leki te stosowane doustnie obniżają ciśnienie szybciej niż dożylnie podany labetalol [56]. Stosując leki z tej grupy pamiętać należy o synergistycznej interakcji z jonami magnezu oraz o możliwości opóźnienia porodu [55, 57].

W wytycznych Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego z 2011 roku możemy znaleźć dopuszczenie do stosowania metoprololu od II trymestru ciąży. Niemniej jednak jego stosowanie może wywołać bradykardię, istnieje też ryzyko ograniczenia wewnątrzmacicznego wzrastania płodu [49].

W nagłych sytuacjach znacznego wzrostu ciśnienia tętniczego krwi u kobiet z ciężką postacią stanu przedzucawkowego jak już wspomniano zaleca się doustne podanie blokerów kanału wapniowego lub dożylnie labetalolu. Dopuszczone jest także krótkotrwałe parenteralne

zastosowanie hydralazyny, jednak ilość kontrolowanych badań z jej użyciem jest niewystarczająca. Wskazuje się natomiast na wiele działań niepożądanych wynikających z zastosowania tego leku: trombocytopenii, hipotonii, bradykardii, przedwczesnego oddzielenia łożyska, a nawet objawów przypominających toczkę zarówno u matki jak i dziecka [58, 59]. W pilnych przypadkach przy braku skuteczności powyższych możliwe jest podanie dożylnie nitroprusydku sodu, mając jednak na uwadze ryzyko zatrucia płodu cyjankami przy dłuższym stosowaniu [55].

Diuretyki uważane są za leki przeciwwskazane w ciąży. Ze względu na wywoływanie zaburzeń elektrolitowych oraz zmniejszanie objętości krwi leki moczopędne nie powinny być stosowane zwłaszcza w przebiegu stanu przedrzucawkowego [49]. Niepokojące są również doniesienia z dziedziny psychiatrii wskazujące na zwiększone ryzyko rozwoju schizofrenii u dzieci poddanych wpływowi diuretyków w III trymestrze życia płodowego [60]. Bezwzględnie przeciwwskazane w przebiegu całej ciąży są inhibitory konwertazy angiotensyny (ACE – *angiotensin-converting enzyme*) oraz blokery receptora typu 1 dla angiotensyny II. Ich stosowanie wiąże się z ryzykiem embriopatii oraz fetopatii, zwłaszcza w obrębie układu nerwowego i sercowo-naczyniowego [61]. W działaniach niepożądanych wynikających z podawania tych leków wymienia się również uszkodzenie nerek i hipotrofię płodu [57].

Obecnie w prewencji rzucawki i leczeniu ciężkiej postaci stanu rzucawkowego lekiem z wyboru jest siarczan magnezu. Jego stosowanie w ciężkiej postaci stanu przedrzucawkowego zmniejsza ryzyko wystąpienia rzucawki o ponad połowę [62]. Badania wykazały większą skuteczność działania siarczanu magnezu w porównaniu z fenytoiną i diazepamem w omawianym schorzeniu przy zachowaniu względnego profilu bezpieczeństwa dla płodu [63, 64].

Trwają poszukiwania nowych, bardziej specyficznych leków, które poprawiłyby efekty i bezpieczeństwo leczenia stanu przedrzucawkowego. Badania te opierają się głównie na dotychczas poznanych elementach etiologii schorzenia. Celem są substancje wpływające na szlaki przemiany L-argininy, tlenku azotu, endoteliny 1, a także związki wykazujące działanie przeciwzapalne [65]. Punktem uchwytu dla powyższych poszukiwań są procesy patogenetyczne stanu przedrzucawkowego, jak zaburzenia równowagi pomiędzy czynnikami angiogennymi i antyangiogennymi, aktywacja odpowiedzi immunologicznej u matki, zmniejszenie syntezy i działania wazodilatacyjnego tlenku azotu, zwiększenie syntezy i działania wazokonstrykcyjnego endoteliny 1 oraz reaktywnych form tlenu [66].

1.7. Udział czynników genetycznych w etiologii stanu przedrzucawkowego

W chwili obecnej stan przedrzucawkowy jest zaliczany do grupy chorób uwarunkowanych wieloczynnikowo. Są to schorzenia związane z możliwym wpływem czynników genetycznych oraz środowiskowych [45, 67]. W etiologii stanu przedrzucawkowego największy prawdopodobnie jest wpływ genów matki, niemniej jednak znaczenie mają także geny płodowe pochodzące od ojca [68]. Liczne badania epidemiologiczne wskazują również na rodzinne i rasowe skłonności do występowania stanu przedrzucawkowego. Ryzyko rozwoju tego schorzenia wzrasta w związku z jego wystąpieniem u matki bądź siostry, jest także wyższe u kobiet rasy czarnej w porównaniu z rasą białą.

Od kilku lat wskazuje się na istotną rolę polimorfizmów genów biorących udział w procesach prowadzących do wystąpienia nieprawidłowości w patomechanizmie stanu przedrzucawkowego. Wśród polimorfizmów genetycznych kaskady krzepnięcia i fibrynolizy wpływających na rozwój stanu przedrzucawkowego wskazywany jest możliwy udział mutacji Leiden (*1691G>A*) genu V czynnika krzepnięcia. Jest to mutacja punktowa polegająca na zmianie pojedynczego nukleotydu w eksonie 10 genu kodującego czynnik V krzepnięcia, co pociąga za sobą zamianę aminokwasu w łańcuchu białkowym V czynnika krzepnięcia. Powstały w ten sposób V czynnik jest oporny na działanie aktywowanego białka C przez co procesy krzepnięcia ulegają nasileniu. Częstość występowania tego polimorfizmu jest największa w populacjach rasy białej Europy oraz Stanów Zjednoczonych (około 4-5%). Mutacja Leiden jest główną przyczyną trombofilii wrodzonej w rasie kaukaskiej. Badania dowiodły, że może to być również istotny czynnik ryzyka rozwoju stanu przedrzucawkowego, małej masy urodzeniowej dziecka, poronień nawracających oraz zgonów wewnątrzmacicznych. Jest to prawdopodobnie związane ze zwiększonym procesem wykrzepiania w drobnych naczyniach tworzącego się łożyska [69].

Na podstawie licznych badań wskazuje się także wpływ polimorfizmu *20210G>A* genu protrombiny na rozwój stanu przedrzucawkowego. Wiele analiz potwierdza, że jest to czynnik ryzyka powstania tego schorzenia [70, 71]. Obecność mutacji *20210G>A* protrombiny zwiększa ryzyko rozwoju zespołu HELLP oraz ryzyko wystąpienia ograniczenia wewnątrzmacicznego wzrastania płodu [72].

Polimorfizm *4G/5G* inhibitora aktywacji plazminogenu typu 1 (PAI-1) zlokalizowany jest w promotorze genu i wpływa na stężenie białka w osoczu. Obecność allela *4G* wykazującego wyższą aktywność transkrypcyjną i korelującego ze zwiększonym poziomem PAI-1 częściej obserwowana jest u kobiet ze stanem przedrzucawkowym w porównaniu ze

zdrowymi ciężarnymi. Wskazuje to na znaczenie procesu fibrylizacji i możliwej regulacji poprzez obecność polimorficznych wariantów genu PAI-1 w etiologii stanu przedrzucawkowego [73, 74].

Wiele analiz potwierdza wpływ polimorfizmów genetycznych układu renina-angiotensyna na powstawanie oraz przebieg stanu przedrzucawkowego. Polimorfizm typu *insercja/delecja (I/D)* w intronie 16 genu konwertazy angiotensyny I jest związany ze zmianami w aktywności enzymu (allel *D* z wyższą aktywnością enzymu) i może wpływać na ryzyko rozwoju stanu przedrzucawkowego. Wyniki badań są jednak rozbieżne. Kim i wsp. analizowali populację kobiet koreańskich i nie znaleźli znacznych różnic pomiędzy częstością występowania tego polimorfizmu u pacjentek ze stanem przedrzucawkowym w porównaniu do zdrowych ciężarnych [75]. Z kolei Atalay i wsp. zaobserwowali różnicę istotną statystycznie pomiędzy badanymi grupami ciężarnych pokazując związek genotypu *DD* z podwyższonym ryzykiem rozwoju stanu przedrzucawkowego [76].

Podobnie niejednoznaczne są wyniki dotyczące polimorfizmu *235M>T* oraz *174T>M* genu kodującego angiotensynogen. Polimorfizm *235M>T* okazał się czynnikiem predysponującym do wystąpienia stanu przedrzucawkowego w populacji chińskiej. Wykazano również związek tego polimorfizmu ze stężeniem czynników angiogennych o udokumentowanej roli w etiologii stanu przedrzucawkowego: sFlt1, VEGF oraz PlGF [77]. Ponadto, Radkov i wsp. również potwierdzili większą częstość występowania zmutowanego genotypu *235TT* u kobiet ze stanem przedrzucawkowym, a także podwyższoną aktywność reninową osocza [78]. Jednak badanie populacji koreańskiej nie udowodniło znaczenia polimorfizmów genu angiotensynogenu w etiologii stanu przedrzucawkowego [79].

W niektórych badaniach analizowany był także polimorfizm *1166A>C* genu kodującego receptor typu 1 angiotensyny II. W badaniu Procopciuca i wsp. wykazano znaczne zwiększenie częstości występowania zmutowanych wariantów tego polimorfizmu u kobiet ze stanem przedrzucawkowym. Potwierdzono wpływ zarówno genotypu matki, jak i dziecka na etiologię schorzenia [80].

Wielu autorów wskazuje na znaczenie polimorfizmów genu kodującego endotelialną syntazę tlenku azotu (eNOS – *endothelial nitric oxide synthase*). W przebiegu ciąży ze stanem przedrzucawkowym poziom tego wazodilatatora jest bowiem obniżony. Może mieć to związek z uwarunkowanymi genetycznie zaburzeniami aktywności i funkcji eNOS. Badaniami objęto kilka polimorfizmów genu *eNOS*, m.in. polimorfizm *894G>T*, *786T>C* oraz *4b/a*. Wykazano udział polimorfizmów *786T>C* i *4b/a* w etiopatogenezie stanu przedrzucawkowego w populacji europejskiej oraz wskazano na związek tych wariantów

genetycznych z aktywnością eNOS i funkcją śródbłonna [81]. U kobiet japońskich zaobserwowano większą częstość zmutowanego allela 894T genu eNOS w grupie z ciężką postacią stanu przedrzucawkowego w porównaniu do grupy kontrolnej [82]. W populacji z okolic Bangladeszu autorzy nie znaleźli jednak takiej zależności [83].

Polimorfizmy genów kodujących niektóre czynniki zaangażowane w procesy zapalne w organizmie również mogą mieć wpływ na powstawanie i przebieg stanu przedrzucawkowego. W badaniu populacji fińskiej wykazano, że polimorfizm 49A>G antygeny 4 cytotoksycznego limfocyta T (CTLA4 – *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) może stanowić czynnik ryzyka rozwoju stanu przedrzucawkowego oraz przedwczesnego oddzielenia łożyska [84]. Analizowany był także polimorfizm 819T>C w regionie promotorowym genu interleukiny 10 (IL-10 – *interleukin 10*). W populacji hinduskiej zaobserwowano znacznie większą częstość występowania stanu przedrzucawkowego w grupie kobiet z genotypem 819CC względem zdrowych ciężarnych [85]. Istnieją również doniesienia o znaczeniu polimorfizmów 1082G>A oraz 592A>C interleukiny 10, jednak wyniki kolejnych analiz są sprzeczne [86, 87].

Pod uwagę brane są również warianty genetyczne genu kodującego czynnik martwicy nowotworów (TNF- α – *tumor necrosis factor*). Podwyższony poziom tego czynnika został niejednokrotnie zaobserwowany w populacji ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym. Naderi i wsp. dowiedli większej częstości występowania polimorfizmu 238G>A TNF- α warunkującego podwyższoną produkcję tego czynnika w grupie kobiet z stanem przedrzucawkowym względem zdrowych pacjentek [88].

Ze względu na niekorzystny wpływ zaburzeń lipidowych na funkcję śródbłonna podejmowane jest znaczenie funkcjonalnych polimorfizmów lipazy lipoproteinowej w patogenezie stanu przedrzucawkowego. Podwyższone ryzyko rozwoju stanu przedrzucawkowego jest związane z występowaniem polimorfizmu 291N>S tego genu. Obecność zmutowanego allela 291S, a także niektórych wariantów polimorfizmów 447S>X oraz 9D>N lipazy lipoproteinowej korelują z podniesionym poziomem triglicerydów w osoczu. Analizując występowanie haplotypów stwierdzono również, że w rasie kaukaskiej nosicielstwo wariantu 9D/291S/447S jest związane z istotnie większym ryzykiem rozwoju stanu przedrzucawkowego w porównaniu do nosicielstwa najczęściej obserwowanego haplotypu 9D/291N/447S u kobiet tej rasy [89].

Znaczenie VEGF w etiologii stanu przedrzucawkowego zostało udokumentowane w wielu analizach. Badaniom poddane zostały polimorfizmy 936C>T, 634G>C, 2578C>A oraz 1154G>A genu kodującego ten czynnik. Większość prac dowodzi korelacji między

obecnością zmutowanych alleli *936T* oraz *634C* a rozwojem stanu przedrzucawkowego, natomiast znaczenie polimorfizmów *2578C>A* i *1154G>A* nie zostało jednoznacznie udowodnione [90].

Istotny jest również wpływ ojcowskich czynników genetycznych na rozwój stanu przedrzucawkowego. Prawidłowy przebieg ciąży jest uwarunkowany właściwą ekspresją antygenów HLA na komórkach trofoblastu. Część tych molekuł jest pochodzenia ojcowskiego. Przy pewnych uwarunkowaniach genetycznych ojca nieodpowiednia budowa tych antygenów może aktywować odpowiedź immunologiczną matki i być przyczyną nawracających poronień oraz innych powikłań w przebiegu ciąży, jak stanu przedrzucawkowego [91].

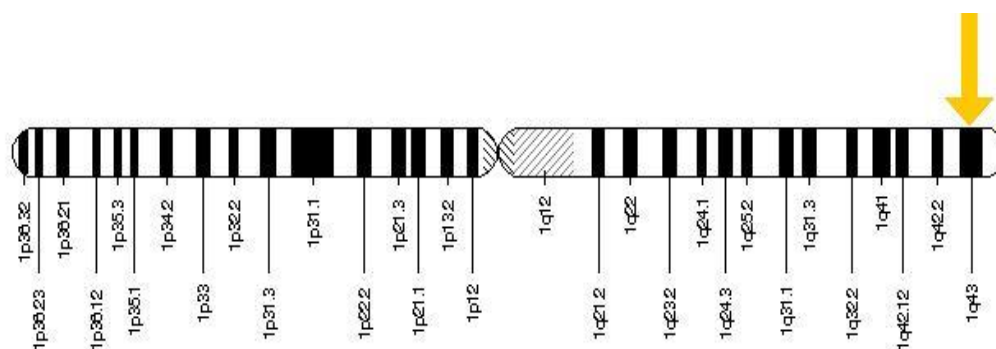
Polimorfizm *677C>T* genu *MTHFR* jest również związany z występowaniem hiperhomocysteinemii, podwyższonym ryzykiem chorób układu sercowo-naczyniowego, w tym nadciśnienia tętniczego. U kobiet ciężarnych nosicielek tego polimorfizmu częściej obserwuje się stan przedrzucawkowy, zgony wewnątrzmaciczne, przedwczesne porody, poronienia nawracające oraz ograniczenie wzrastania płodu. *MTHFR* jest kluczowym enzymem w przemianach folianów co warunkuje jego wpływ na syntezę DNA, ekspresję genów i różnicowanie się komórek.

Wśród polimorfizmów wpływających na metabolizm folianów istotne są także polimorfizmy *2756A>G* syntazy metioniny i *66A>G* reduktazy syntazy metioniny, których może wpływać na aktywność enzymów i może być przyczyną hiperhomocysteinemii, uszkodzenia śródbłonnków, aktywacji trombocytów. Podwyższony poziom homocysteiny koreluje z kolei z rozwojem powikłań w przebiegu ciąży w tym także stanu przedrzucawkowego. Według niektórych autorów odpowiednia suplementacja ciężarnych kompensuje niedobory enzymów uczestniczących w przemianach folianów [92, 93].

Na podstawie dotychczasowych danych można stwierdzić, że podłoże stanu przedrzucawkowego przynajmniej w pewnym stopniu jest uwarunkowane obecnością niektórych wariantów genetycznych. Liczne analizy dotyczące tego problemu nie są jednak spójne dlatego wymagane są dalsze badania w celu określenia liczby i znaczenia wariantów genetycznych w rozwoju tego powikłania.

1.8. Syntaza metioniny i reduktaza syntazy metioniny

Gen kodujący enzym syntazę metioniny jest zlokalizowany na chromosomie 1, *locus* 1q43, natomiast gen reduktazy syntazy metioniny znajduje się na długim ramieniu 5 chromosomu (*locus* 15.32). Syntaza metioniny (MTR – *methionine synthase*) i reduktaza syntazy metioniny (MTRR – *methionine synthase reductase*) to enzymy biorące czynny udział w przemianie homocysteiny w organizmie człowieka (Rycina 2, 3).



Rycina 2. Lokalizacja genu MTR na chromosomie 1 (1q43) [94].

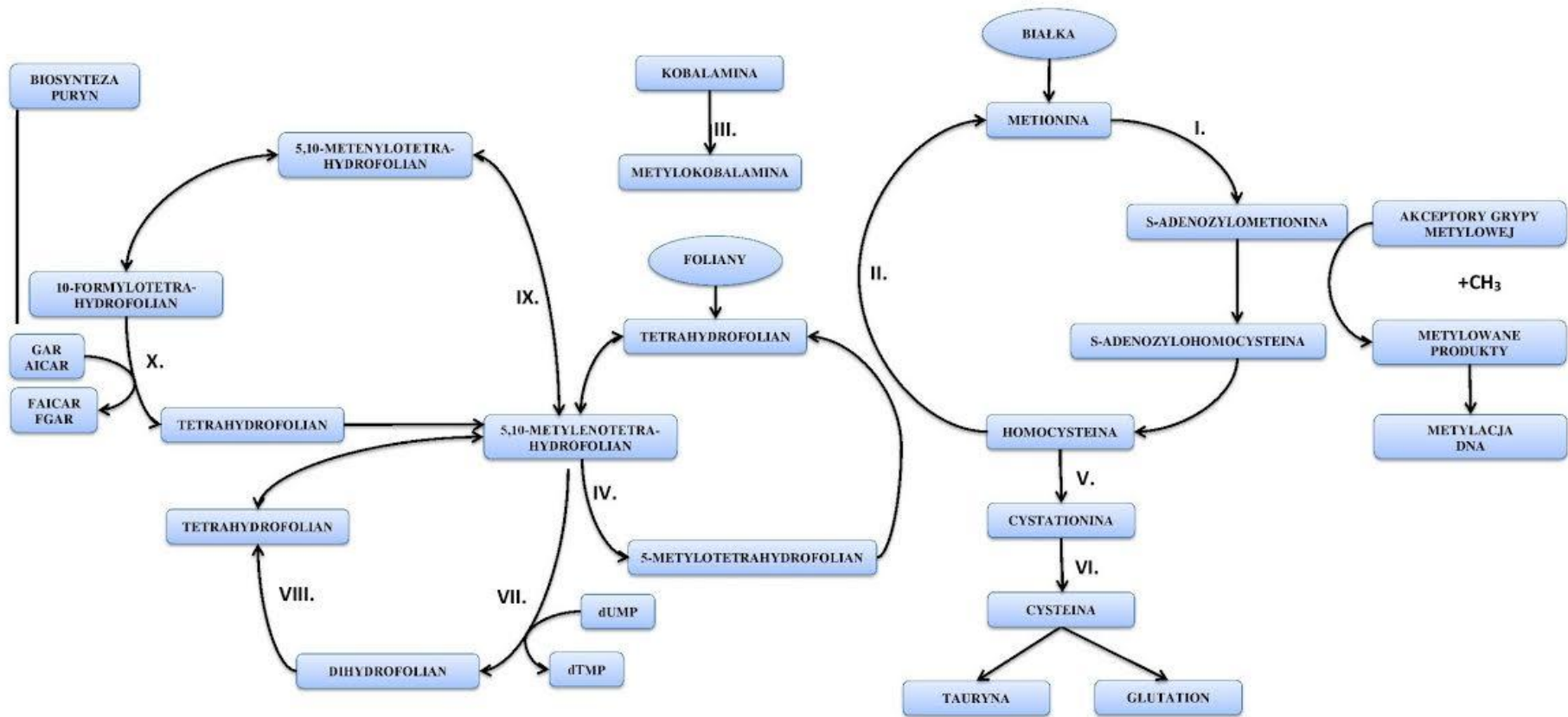


Rycina 3. Lokalizacja genu MTRR na chromosomie 5 (5q15.32) [94].

Homocysteina jest siarkowym aminokwasem niebiałkowym, który powstaje jako efekt fizjologicznych przemian egzogenego aminokwasu metioniny. Bogate źródła metioniny w diecie to jaja, mięso, ryby i nasiona sezamu. W ustroju człowieka grupa metylowa metioniny ulega aktywacji poprzez przekształcenie do S-adenozylometioniny (SAM – *S-adenosylmethionine*) w reakcji katalizowanej przez adenozylotransferazę metioninową (MAT – *methionine adenosyl transferase*) [95]. S-adenozylometionina jako dawca grupy metylowej jest kluczowym związkiem w przebiegu wielu procesów metabolicznych w tym również wyciszaniu genów, proliferacji i rozpoznawaniu komórek poprzez reakcje metylacji DNA, białek i fosfolipidów. Demetylacja S-adenozylometioniny zachodząca przy udziale

metylotransferaz prowadzi do powstania S-adenozylhomocysteiny (SAH – *S-adenosylhomocysteine*). Jako efekt hydrolizy tego związku otrzymujemy właściwą homocysteinę. Główne przemiany homocysteiny to metylacja i transsulfuracja. Transsulfuracja w warunkach prawidłowych zajmuje około połowę całości przemian i polega na nieodwracalnym połączeniu z seryną i utworzeniu cystationiny. Przebieg tego procesu możliwy jest w nerkach, wątrobie, jelicie cienkim oraz trzustce. Niezbędna do tej reakcji jest β -syntaza cystationiny (CBS – *cystathionine β -synthase*) jako enzym oraz fosforan pirydoksalu czyli aktywna postać witaminy B6. W dalszym etapie cystationina rozpada się z utworzeniem cysteiny i α -ketomaślanu. S-adenozylometionina reguluje reakcję transsulfuracji poprzez działanie aktywacyjne na syntazę cystationiny. Drugim istotnym szlakiem przemian homocysteiny, który przebiega we wszystkich tkankach organizmu człowieka oraz przeważa w stanach niedoboru metioniny jest remetylacja. Zachodzi ona przy udziale syntazy metioniny jako enzymu oraz pochodnej witaminy B12 (metylokobalaminy) jako koenzymu. Źródłem grupy metylowej dla metylokobalaminy jest S-adenozylometionina, a proces jej powstania zachodzi dzięki reduktazie syntazy metioniny. Ważnym elementem z punktu intensywności i możliwości przebiegu procesu remetylacji homocysteiny jest dostępność donora grupy metylowej, czyli metylenotetrahydrofolianu, a także czynników umożliwiających jego powstanie: enzymu reduktazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFR – *methylenetetrahydrofolate reductase*) oraz kwasu foliowego jako substratu. Silny choć pośredni wpływ na powyższy proces metylacji wykazuje zwłaszcza reduktaza metylenotetrahydrofolianowa. Istotne jest oddziaływanie S-adenozylometioniny jako allosterycznego inhibitora reduktazy metylenotetrahydrofolianowej [96, 97]. Wpływ tych związków jest obustronny bowiem Hill i wsp. wykazali, że obniżenie aktywności MTHFR skutkuje zmniejszeniem produkcji S-adenozylometioniny. Prawidłowy przebieg cyklu metioninowego, który obejmuje powstawanie homocysteiny oraz jej metabolizm przy udziale syntazy metioniny wraz z powstawaniem metylenotetrahydrofolianu warunkuje właściwą metylację DNA i białek. Skutkuje to znaczącym wpływem substratów i enzymów tego cyklu na regulację ekspresji genów i różnicowanie się komórek. Są to procesy oddziałujące na przebieg ciąży, powstawanie nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych oraz występowanie zespołu Downa [98, 92]. Remetylacja homocysteiny jest również powiązana z cyklem purynowym oraz tymidylanowym. Związkiem scalającym obie przemiany jest 5,10-metylenotetrahydrofolian podlegający redukcji przy udziale MTHFR, a którego grupy jednowęglowe są włączane w syntezę puryn i pirymidyn. Poprzez ten proces elementy cyklu metioninowego wpływają na syntezę DNA oraz prawidłowy podział komórek na etapie

rozwoju zarodka [92]. Inne drogi metabolizmu homocysteiny stanowią tylko niewielki odsetek jej przemian i obejmują desulfurację, utlenianie, metylację przy udziale betainy oraz remetylację przy udziale enzymu metylotransferazy betainowo-homocysteinowej [95, 99]. W przypadku znacznego nagromadzenia homocysteiny w organizmie uruchomiony zostaje alternatywny szlak jej przemian, który prowadzi do powstania tiolaktonu homocysteiny oraz w dalszym etapie kwasu homocysteinowego o silnie aterogennych właściwościach [100] (Rycina 4).

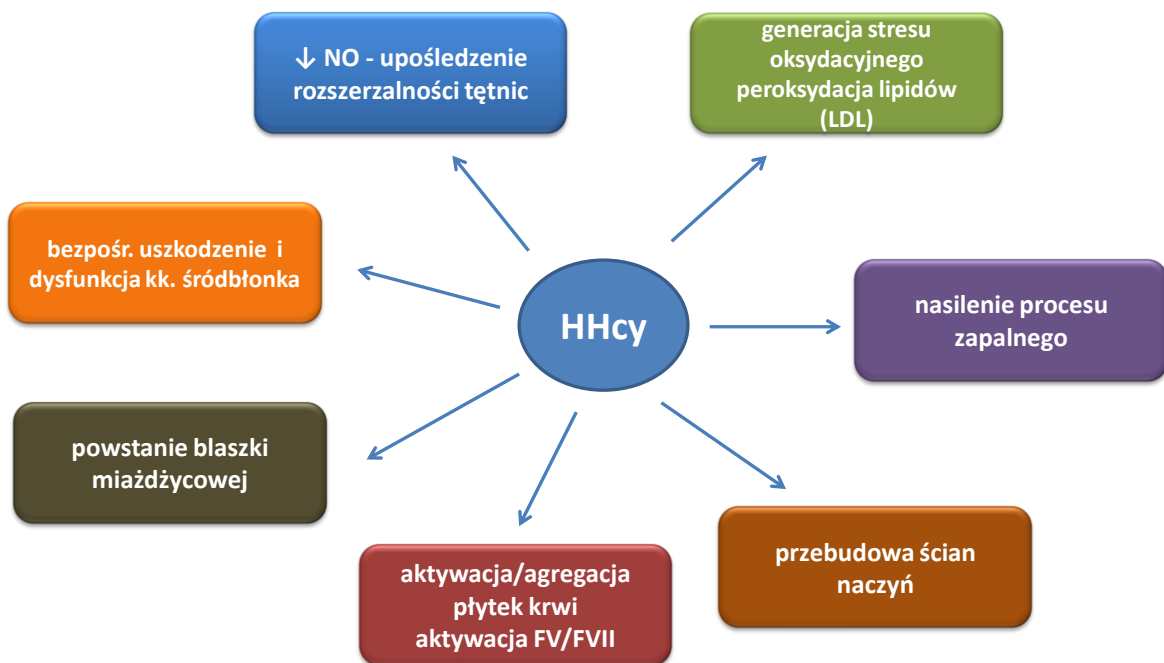


Rycina 4. Przemiany homocysteiny (I – adenozylotransferaza metioninowa, II – syntaza metioniny, III – reduktaza syntazy metioniny, IV – reduktaza metylenotetrahydrofolianowa, V – β -syntaza cystationiny, VI – γ -cystationaza, VII – syntaza tymidylanowa, VIII – reduktaza dihydrofolianowa, IX – dehydrogenaza metylenotetrahydrofolanowa, X – transformylaza GAR [opracowanie własne].

Hiperhomocysteina jest stanem podwyższonego stężenia homocysteiny w osoczu. Łagodną postacią hiperhomocysteinemii określa się stężenie 16-30 $\mu\text{mol/L}$ ale toksyczne działanie tego aminokwasu jest obserwowane już od wartości 10 $\mu\text{mol/L}$. Forma umiarkowana hiperhomocysteinemii określa się jako wartości 31-100 $\mu\text{mol/L}$, natomiast w postaci ciężkiej stężenie homocysteiny wzrasta powyżej 100 $\mu\text{mol/L}$ [101, 102, 103]. Wystąpienie hiperhomocysteinemii może mieć różne przyczyny. Istotne znaczenie mają czynniki genetyczne, żywieniowe, choroby przewlekłe oraz leki. Najczęstsze genetycznie uwarunkowane braki lub niedobory enzymów biorących udział w metabolizmie homocysteiny dotyczą β -syntazy cystationiny oraz reduktazy metylenotetrahydrofolianowej. Obserwuje się także defekty genetyczne syntazy metioniny. W ciężkich przypadkach ujawnia się opóźnienie umysłowe, hipotonia mięśniowa, nadciśnienie płucne, zespół hemolityczno-mocznicowy oraz zaburzenia w aktywności układu krwiotwórczego [104]. W wielu przypadkach genetycznych niedoborów enzymów przemian homocysteiny możliwa staje się kompensacja odpowiednim żywieniem lub leczeniem polegającym na podawaniu folianów, witaminy B6 i B12. Dość częstą przyczyną hiperhomocysteinemii jest właśnie nieprawidłowa dieta uboga w koenzymy przemian homocysteiny oraz foliany. Hiperhomocysteinemia może mieć związek z przebiegiem niektórych schorzeń a zwłaszcza niewydolności nerek i wątroby, cukrzycy, niedoczynności tarczycy a nawet łuszczycy. Leki powodujące wzrost poziomu homocysteiny w osoczu są w większości substancjami oddziaływującymi na enzymy cyklu metioninowego, metabolizm i wchłanianie folianów oraz witamin B6 i B12. Należą do nich metotreksat, metformina, fenytoina, karbamazepina, L-dopa i cholestyramina [95]. Opisano związek hiperhomocysteinemii z występowaniem wielu chorób co jest efektem jej wielokierunkowego negatywnego działania. Hiperhomocysteinemia wpływa toksycznie na wszystkie elementy ściany naczynia krwionośnego a zwłaszcza na śródbłonek. Za działanie to bezpośrednio odpowiadają tiolakton homocysteiny oraz kwas homocysteinowy. Obserwowany jest również efekt prozakrzepowy, prozapalny, aterogenny, mitogenny, neurotoksyczny oraz generujący stres oksydacyjny. Na drodze tak licznych mechanizmów działania hiperhomocysteinemia jest znanym czynnikiem ryzyka rozwoju schorzeń układu sercowo-naczyniowego, choroby Alzheimera i Parkinsona, depresji, schizofrenii, nowotworów, a także upośledzenia rozwoju płodu i powikłań ciąży [95, 101].

Badania dowodzą, że zbyt duże stężenie homocysteiny zaburza proces zapłodnienia, implantacji, embriogenezy oraz tworzenia naczyń krwionośnych łożyska, który to czynnik wraz z uszkodzeniem śródbłonna oraz generowaniem stresu oksydacyjnego ma kluczowe znaczenie w etiologii stanu przedrzucawkowego. Istotnie analizy potwierdzają korelację

między wzrostem poziomu homocysteiny a występowaniem tego schorzenia [95, 100]. Udowodniono również związek między hiperhomocysteinemią a zwiększonym ryzykiem przedwczesnego oddzielenia łożyska, wewnątrzmacicznego obumarcia płodu, poronieniami nawracającymi, a także rozszczepu kręgosłupa, warg i podniebienia oraz wystąpienia zespołu Downa u dziecka [92]. Możliwy udział hiperhomocysteinemii w patomechanizmie stanu przedrzucawkowego przedstawiono na Rycinie 5.



Rycina 5. Udział hiperhomocysteinemii w etiologii stanu przedrzucawkowego [na podstawie 23].

Fizjologicznie stężenie homocysteiny u pacjentek obniża się w przebiegu ciąży. Oprócz spadku w I trymestrze charakterystyczne jest osiągnięcie minimalnego poziomu tego białka w II trymestrze. Stężenie homocysteiny w warunkach prawidłowych wraca do wartości wyjściowych pod koniec trwania ciąży. Pomimo powyższych ustaleń nadal nie ma wytycznych jakimi badaniami oraz w jakim okresie należy objąć pacjentki, by wykorzystać te wyniki w celu zwiększenia wykrywalności i zmniejszenia śmiertelności stanu przedrzucawkowego. Niektórzy autorzy wskazują na możliwość analizy mutacji w genach enzymów uczestniczących w metabolizmie homocysteiny jako wskaźników oceny nasilenia

zaburzeń. Należy wziąć więc pod uwagę również polimorfizmy genów syntazy metioniny i reduktazy syntazy metioniny [100, 105].

1.9. Polimorfizm 2756A>G genu *MTR* oraz 66A>G genu *MTRR*

Polimorfizm 2756A>G genu syntazy metioniny polega na zamianie nukleotydu adeniny na guaninę w pozycji 2756 eksonu 26 tego genu, co skutkuje zamianą kwasu asparaginowego na glicynę w pozycji 919 łańcucha białkowego enzymu. Badania wykazały, że jego obecność jest związana z występowaniem hiperhomocysteinemii oraz zwiększonym ryzykiem upośledzenia rozwoju płodu. Polimorfizm 66A>G genu reduktazy syntazy metioniny polega na zamianie nukleotydu adeniny na guaninę w pozycji 66 eksonu 2 genu kodującego enzym MTRR, powoduje zamianę izoleucyny na metioninę w pozycji 22 łańcucha białkowego i również koreluje z podwyższonym poziomem homocysteiny w osoczu. Ponadto, zwiększa ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych, wad cewy nerwowej oraz zespołu Downa u dziecka [92].

Polimorfizmy 2756A>G genu syntazy metioniny i 66A>G genu reduktazy syntazy metioniny mają wpływ na przemiany folianów oraz przenoszenie grup jednowęglowych w organizmie człowieka. Oddziałują one bowiem na S-adenozylometioninę będącą dawcą jednostek metylowych. W ten sposób aktywność MTR i MTRR warunkowana przez obecność określonych wariantów genetycznych wpływa na ekspresję genów i różnicowanie się komórek, oraz wystąpienie hiperhomocysteinemii. Są to kluczowe procesy dla właściwego rozwoju łożyska oraz prawidłowego przebiegu ciąży, a ich zaburzenia mogą promować rozwój stanu przedrzucawkowego [106]. Polimorfizm 66A>G genu reduktazy syntazy metioniny jest związany ze zmniejszeniem aktywności tego enzymu oraz zwiększonym ryzykiem poronień nawracających [107, 108]. Badania potwierdziły związek polimorfizmu 2756A>G genu syntazy metioniny z obniżeniem stężenia S-adenozylometioniny [97]. Furness i wsp. zwrócili uwagę na polimorfizm 2756A>G genu syntazy metioniny jako wskaźnika predysponującego do niewydolności krążenia maciczno-łożyskowego. Nie powiązali jednak tego faktu z wpływem na poziom SAM lecz bezpośrednio z oddziaływaniem na aktywność enzymu MTR oraz poziom homocysteiny [109].

Występowanie polimorfizmów 2756A>G genu syntazy metioniny oraz 66A>G genu reduktazy syntazy metioniny jest związane ze zmniejszeniem aktywności kodowanych enzymów co przy pewnych uwarunkowaniach dietetycznych skutkuje podniesieniem

poziomu homocysteiny we krwi. Hiperhomocysteinemia z kolei jest czynnikiem uszkodzającym śródbłonek i wpływającym niekorzystnie na proces tworzenia krążenia łożyskowego. W efekcie może to być przyczyna następczego niedokrwienia łożyska i utraty równowagi hemostatycznej. Hiperhomocysteinemia bezpośrednio wpływa również na wzrost aktywności czynników krzepnięcia V, VII, czynnika von Willebranda oraz na wzrost agregacji, adhezji i aktywacji płytek krwi [110].

2. CEL PRACY

Celem pracy była próba oceny znaczenia badanych polimorfizmów genów syntazy metioniny (*MTR*) i reduktazy syntazy metioniny (*MTRR*) oraz ekspresji w łożysku powyższych genów w etiologii stanu przedrzucawkowego.

Cel ten realizowano poprzez:

1. Analizę częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmów *2756A>G* genu syntazy metioniny (*MTR*) oraz *66A>G* genu reduktazy syntazy metioniny (*MTRR*) w grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym oraz zdrowych kobiet ciężarnych.
2. Analizę korelacji pomiędzy badanymi polimorfizmami *2756A>G* genu *MTR* oraz *66A>G* genu *MTRR* a parametrami klinicznymi i biochemicznymi u kobiet ze stanem przedrzucawkowym i w grupie kontrolnej.
3. Analizę ekspresji mRNA genu syntazy metioniny (*MTR*) oraz genu reduktazy syntazy metioniny (*MTRR*) w łożysku kobiet ze stanem przedrzucawkowym.
4. Określenie zależności pomiędzy badanymi polimorfizmami genów *MTR* i *MTRR* a poziomem ich ekspresji w łożysku u kobiet ze stanem przedrzucawkowym.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

Analizie poddano grupę 218 kobiet ciężarnych należących do rasy kaukaskiej. Pacjentki zostały podzielone na grupę badaną, którą stanowiły kobiety ze stanem przedzucawkowym (98 pacjentek) oraz grupę kontrolną obejmującą zdrowe kobiety (120 pacjentek). Pacjentki do badań kwalifikowano w Klinice Perinatologii i Chorób Kobiety Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w okresie od czerwca 2013 do września 2014 roku. Wszystkie ciężarne poinformowano o celu i zakresie badań oraz otrzymano ich pisemną zgodę na udział w badaniu. Na przeprowadzenie analiz uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu nr 497/13 z dnia 13 czerwca 2013 roku.

3.1.1 Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej

Grupę badaną stanowiło 98 kobiet ciężarnych rasy kaukaskiej z rejonu Wielkopolski, u których potwierdzono stan przedzucawkowy w przebiegu ciąży. W tej grupie średni wiek kobiet wynosił $30,0 \pm 5,5$ lat, średni tydzień zakończenia ciąży $33,7 \pm 3,9$ t.c. Charakterystykę pacjentek przedstawiono w tabeli 1.

Stan przedzucawkowy rozpoznawano na podstawie kryteriów opracowanych przez Amerykańskie Towarzystwo Ginekologów i Położników w 2013 roku, przyjmując wartość ciśnienia tętniczego $\geq 140/90$ mmHg po 20 tygodniu ciąży oraz obecność białka w moczu w ilości co najmniej 300 mg na dobę (30 mg/dL w przypadkowej próbce moczu). Pomiar ciśnienia tętniczego krwi u każdej pacjentki przeprowadzany był za pomocą sfigmomanometru. Pomiar ten potwierzano co najmniej dwukrotnie w pozycji siedzącej lub półleżącej na lewym boku z zachowaniem sześciogodzinnego odstępu czasowego.

U wszystkich pacjentek w obydwu grupach badanych ze stanem przedzucawkowym oraz w grupie kontrolnej analizowano wartości ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego, wiek pacjentki, tydzień zakończenia ciąży, wzrost, masę ciała przed ciążą, masę ciała pod koniec III trymestru ciąży, liczbę przebytych ciąż. W obydwu grupach analizowane były również parametry laboratoryjne, jak wartości hemoglobiny, hematokrytu, liczbę płytek krwi, obecność białka w moczu. Analizie poddano także dane dotyczące noworodka (masa urodzeniowa, wartości pH żyły i tętnicy pępowinowej, masę łożyska).

Dodatkowo w grupie ze stanem przedrzucawkowym analizowano wartość mocznika, kwasu moczowego, białka całkowitego oraz stosowaną u ciężarnej dawkę metylodopa.

Kryteriami wykluczającymi z badań były: przewlekłe nadciśnienie tętnicze, choroby układu sercowo-naczyniowego i powikłania zakrzepowe, choroby nerek, cukrzyca, otyłość oraz ciąża wielopłodowa. Wszystkie pacjentki kwalifikowane do badań były w ciąży pojedynczej, należały do rasy kaukaskiej narodowości polskiej. Ze względu na pobieranie fragmentów łożyska do badania ekspresji genów, celem wykluczenia zmian zapalnych, z badań wyłączono również pacjentki z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych, zakażeniem wewnątrzrodniowym, jak również kobiety palące papierosy.

Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 120 zdrowych kobiet ciężarnych rasy kaukaskiej z rejonu Wielkopolski. Średni wiek kobiet w tej grupie wynosił $28,7 \pm 4,7$ lat, średni tydzień ukończenia ciąży $39,1 \pm 1,3$ t.c. (Tabela 1). Do grupy kontrolnej zakwalifikowano pacjentki z prawidłowym ciśnieniem tętniczym ($<140/90$ mmHg, bez białkomoczu) nieobciążone chorobami przewlekłymi z prawidłowym przebiegiem ciąży pojedynczej, rasy kaukaskiej, narodowości polskiej.

Tabela 1. Charakterystyka analizowanych pacjentek.

<i>Analizowana zmienna</i>	<i>Grupa badana (PE) n=98</i>	<i>Grupa kontrolna n=120</i>
<i>Wiek (lata) średnia\pmSD zakres 95% P.U.</i>	$30,0 \pm 5,5$ 18,0 – 45,0 29,0 – 31,1	$28,7 \pm 4,7$ 18,0 – 42,0 27,9 – 29,6
<i>Tydzień ukończenia ciąży (t.c.) średnia\pmSD zakres 95% P.U.</i>	$33,7 \pm 3,9$ 19,0 – 40,0 33,0 – 34,5	$39,1 \pm 1,3$ 37,0 – 42,0 38,9 – 39,3
<i>Ciśnienie skurczowe (mmHg) średnia\pmSD zakres 95% P.U.</i>	$171,9 \pm 21,3$ 120,0 – 220,0 167,7 – 176,2	$108,5 \pm 11,6$ 90,0 – 130,0 106,4 – 110,6
<i>Ciśnienie rozkurczowe (mmHg) średnia\pmSD zakres 95% P.U.</i>	$106,0 \pm 14,1$ 70,0 – 160,0 103,1 – 108,8	$67,6 \pm 9,1$ 50,0 – 80,0 66,0 – 69,3

3.2 Metody

Przeprowadzone w pracy analizy wykonywano w Pracowni Farmakogenetyki Doświadczalnej przy Katedrze i Zakładzie Farmacji Klinicznej i Biofarmacji Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz w Zakładzie Farmakologii i Fitochemii Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu.

Od wszystkich zakwalifikowanych kobiet pobrano krew żyłą do analizy polimorfizmów genetycznych, którą zabezpieczono w temperaturze -20°C . Od każdej z pacjentek ze stanem przedrzucawkowym oraz z grupy kontrolnej natychmiast po urodzeniu płodu pobierano fragment z centralnej części łożyska po stronie matczynej celem uzyskania tkanki zawierającej kosmki oraz doczesną. Tak pobrane fragmenty tkankowe umieszczano w ciekłym azocie i transportowano do laboratorium, gdzie materiał zabezpieczano w temperaturze -80°C do momentu wykonania badań.

3.2.1 Izolacja DNA z krwi obwodowej

DNA do przeprowadzenia badań genetycznych wyizolowano z krwi obwodowej pacjentek. W tym celu pobrano około 5 ml krwi ze zgięcia łokciowego pacjentki, a następnie umieszczono ją w probówce zawierającej kwas wersenowy (EDTA, ang. *ethylene diamine tetraacetic acid*). Pobrany materiał przechowywano w temperaturze -20°C . Z tak przygotowanych próbek dokonywano izolacji DNA za pomocą zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA). Pierwszy etap obejmował liżę komórek krwi (do próbki z 20 μl enzymu proteolitycznego – proteinyzy K dodano 200 μl krwi z EDTA a następnie 200 μl buforu litycznego i poddano wytrząsaniu oraz inkubacji w temperaturze 56°C przez 20 minut). W celu usprawnienia wiązania DNA do membrany kolumny dodano 96% etanol w ilości 200 μl , a następnie wytrząsano. W kolejnym etapie zawartość próbki została przeniesiona na kolumnę QIAamp Mini Spin i poddana wirowaniu przy obrotach 8000 rpm przez 1 minutę. Resztkowe zanieczyszczenia zostały usunięte poprzez wypłukanie za pomocą buforów przemywających (AW1 i AW2). Przemywanie za pomocą buforu AW1 następowało poprzez wirowanie przez 1 minutę przy prędkości 8000 rpm, natomiast w przypadku buforu AW2 przez 3 minuty i 12 000 rpm. Końcowy etap izolacji DNA polegał na wmywaniu czystego DNA. W tym celu kolumnka została umieszczona w probówce eppendorf i nałożono na nią 200 μl buforu do elucji. Po 5-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej

przeprowadzono wirowanie przez 1 minutę przy prędkości 8000 rpm. Uzyskany przesącz był czystym DNA gotowym do dalszych analiz.

3.2.2 Izolacja RNA z łożyska

RNA niezbędne do określenia poziomu ekspresji genów wyizolowane zostało z tkanki łożyska. W tym celu niewielki jego fragment homogenizowano w próbówce z 1 ml odczynnika TriPure Isolation Reagent (Roche, USA). Następnie dodano 200 μ l chloroformu, wytrząsano i wirowano przez 15 minut w temperaturze 4 °C przy prędkości 12 000 rpm. W kolejnym etapie izolacji uzyskany górny supernatant zawierający RNA zebrano i po przeniesieniu do czystej próbówki poddano wytrącaniu izopropanolem z zachowaniem stosunku objętościowego 1:1. Po dokładnym wymieszaniu próbówki z zawartością przeniesiono na 30 minut do temperatury -80°C. Po rozmrożeniu próbówki wirowano w warunkach 4°C, 12 000 rpm przez 10 minut. Następnie usunięto nasącz, a uzyskany osad zawierający RNA przemyto 75% etanolem przygotowanym z użyciem wody dejonizowanej i autoklawowanej w obecności dietylopirowęgla (DEPC, ang. *diethylpyrocarbonate*) mieszano i pozostawiono na kilka minut na lodzie. Następnie ponownie poddano wirowaniu przez okres 5 minut w temperaturze 4°C przy prędkości 7500 rpm. Po usunięciu etanolu osad RNA pozostawiono do wysuszenia, a następnie rozpuszczono w wodzie depcowanej. Próby przechowywano w temperaturze -80°C.

3.2.3 Analiza ilościowa i jakościowa uzyskanych preparatów DNA i RNA

Wyizolowane preparaty DNA i RNA poddano ocenie za pomocą spektrofotometru (Eppendorf, Niemcy). Urządzenie zostało skalibrowane przy użyciu 100 μ l sterylnej wody dejonizowanej. Stężenia DNA w próbkach określano na podstawie pomiaru absorpcji przy długości fali $\lambda=260$ nm określanej jako gęstość optyczna (OD - *optical density*). Absorpcję próbek odczytywano przy następujących długościach fali:

1. 260 nm - maksimum absorpcji dla DNA
2. 280 nm – maksimum absorpcji dla białek
3. 320 nm – absorpcja drobin komórkowych czyli tzw. „tła”

W analizach wykorzystano wartości OD 260 oraz OD 280 po odjęciu od nich wartości OD 320. Uwzględniono, że dla stężenia dwuniciowego DNA 50 μ g/ml oraz stężenia RNA 40 μ g/ml, OD 260 przyjmuje wartość 1 więc do obliczeń wykorzystano następujące wzory:

Stężenie DNA [$\mu\text{g/ml}$] = OD 260 x 50 x rozcieńczenie próbki

Stężenie RNA [$\mu\text{g/ml}$] = OD 260 x 40 x rozcieńczenie próbki

Wyznaczono również wartości współczynników A260/A280. Wielkości te mieściły się w granicach normy: 1,8 – 2,0, co świadczyło o odpowiedniej czystości prób.

Ponadto jakość DNA oceniono na podstawie rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym. W tym celu do 0,5 μg preparatu DNA dodano 10 μl wody oraz 3 μl buforu obciążającego po czym naniesiono próby na żel i przeprowadzono rozdzielanie. Efekt możliwy był do zaobserwowania w świetle UV – DNA widoczny był w postaci pojedynczego prążka.

3.2.4. Oznaczanie polimorfizmów 2756A>G genu *MTR* oraz 66A>G genu *MTRR*

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR – *polymerase chain reaction*) jest techniką *in vitro* polegającą na amplifikacji wybranych odcinków DNA poprzez wielokrotne powtarzanie cyklu (denaturacja, wiązanie starterów i elongacja), co pozwala na uzyskanie dużej liczby kopii badanego fragmentu DNA. Reakcję PCR umożliwiają startery (oligonukleotydy), które łączą się z komplementarnym miejscem w nici DNA. W wyniku reakcji powstaje produkt (fragment DNA) o określonej długości, identyfikowany następnie przez rozdzielanie elektroforetyczne i obserwowany po wybarwieniu w świetle ultrafioletowym.

W niniejszej pracy wykorzystano technikę PCR do amplifikacji fragmentów genu syntazy metioniny właściwego dla miejsca występowania polimorfizmu 2756A>G (rs1805087) oraz genu reduktazy syntazy metioniny odpowiedniego do analizowania polimorfizmu 66A>G (rs1801394). Reakcje PCR przeprowadzono w termocyklerze PTC-200 (MJ Research, USA). Do uzyskania fragmentu genu *MTR*, w którym analizowano polimorfizm 2756A>G zastosowano startery przedstawione w pracy Naushad i wsp. [111], natomiast dla polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* z pracy Wilsona i wsp. [112] (Tabela 2).

Tabela 2. Sekwencje starterów zastosowanych w pracy.

<i>Polimorfizm</i>	<i>Sekwencje starterów Forward (F) [5 → 3] Reverse (R) [5 → 3]</i>
2756A>G <i>MTR</i>	F. TGT TCC CAG CTG TTA GAT GAA AAT C R. GAT CCA AAG CCT TTT ACA CTC CTC
66A>G <i>MTRR</i>	F. CAA AGG CCA TCG CAG AAG A <u>C</u> A T R. CCC AAC CAA AAT TCT TCA AAG CA

Skład mieszaniny reakcyjnej PCR ustalony doświadczalnie przedstawiał się następująco: 2 μ l matrycy - genomowego DNA, 2,5 μ l buforu do PCR (stężonego 10 x), 2,5 μ l $MgCl_2$ (25 mM), 2 μ l dNTPs (2,5 mM), 0,4 μ l starterów F i R (25 pmol/ μ l), 0,2 μ l polimerazy (5U/ μ l) oraz sterylną wodę do objętości końcowej 25 μ l mieszaniny reakcyjnej (w nawiasach podano stężenia wyjściowe składników reakcji). Warunki umożliwiające właściwą amplifikację reakcji PCR ustalano w gradiencie temperaturowym.

Obejmowały one:

1. Denaturację wstępną - 95°C, 4 minuty
2. Denaturację właściwą - 95°C, 0,5 minuty
3. Hybrydyzację starterów - 50-68°C, 0,5 minuty
4. Elongację - 72°C, 1 minuta

Powtórzenie punktów 2 - 4, 30 razy

5. Syntezę końcową - 72°C, 10 minut

Optymalna temperatura hybrydyzacji starterów wynosiła dla obu badanych polimorfizmów 61°C. W wyniku przeprowadzonych reakcji PCR do analizy polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* uzyskano produkt o wielkości 211 par zasad, natomiast dla polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* długość produktu PCR wynosiła 142 pary zasad.

Wizualizacja produktu reakcji PCR możliwa była dzięki przeprowadzeniu elektroforezy w 2% żelu agarozowym oraz wybarwieniu za pomocą bromku etydyny i zastosowaniu światła UV.

Identyfikacja genotypów badanych polimorfizmów następowała poprzez zastosowanie metody polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP – *restriction fragment length polymorphism*). Enzymy restrykcyjne charakteryzują się wysoką specyficznością, potrafią „rozpoznawać” docelowe sekwencje DNA i „przecinać” podwójną nić helisy w ściśle określonych miejscach. W celu analizy polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* uzyskany produkt PCR o wielkości 211 pz poddawano hydrolizie restrykcyjnej enzymem *BsuRI* (Fermentas, Litwa). Metoda identyfikacji wariantów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* polegała na przeprowadzeniu reakcji PCR ze starterem o zmienionej sekwencji (zmieniony nukleotyd podkreślono w tabeli 2). Produkt o wielkości 142 pz poddano działaniu enzymu restrykcyjnego *NdeI* (Fermentas, Litwa). Skład mieszanin reakcyjnych do reakcji hydrolizy restrykcyjnych przedstawia tabela 3. Mieszaniny reakcyjne inkubowane były w temperaturze 37°C przez 16 godzin. Po zakończeniu reakcji enzymy restrykcyjne inaktywowano 20 minut w temperaturze 65°C.

Tabela 3. Skład mieszaniny reakcyjnej do hydrolizy produktów PCR enzymami *Bsu*RI oraz *Nde*I.

<i>Składnik mieszaniny reakcyjnej</i>	<i>2756A>G MTR</i>	<i>66A>G MTRR</i>
Produkt PCR	19 µl	19 µl
Bufor (10x)	2,5 µl	2,5 µl
H₂O	2,5 µl	2,5 µl
Enzym restrykcyjny	1 µl	1 µl
Objętość końcowa	25 µl	25 µl

Produkty reakcji RFLP uwidoczono poprzez rozdział elektroforetyczny w 3% żelu agarozowym w świetle UV, po wybarwieniu w bromku etydyny. W przypadku polimorfizmu 2765A>G miejsce restrykcyjne enzymu *Bsu*RI odpowiadało genotypowi zmutowanemu 2756GG, dla którego uzyskiwano dwa prążki 131 i 80 pz. Genotyp 2756AA nie był hydrolizowany przez endonukleazę, a dla heterozygoty 2756AG otrzymywano fragmenty wielkości 211, 131 oraz 80 pz. Dla polimorfizmu 66A>G uzyskiwano następujące fragmenty dla poszczególnych genotypów: homozygota 66AA 121, 21 pz, heterozygota 66AG 142, 121, 21 pz oraz homozygota zmutowana 66GG 142 pz.

3.2.5. Oznaczanie poziomu ekspresji mRNA genów *MTR* i *MTRR* w tkance łożyskowej

3.2.5.1. Odwrotna transkrypcja

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano za pomocą komercyjnego zestawu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) oraz przy użyciu termocyklera PTC 200 (MJ, Research, USA). Analiza wykonywana była pod komorą laminarną na lodzie. W pierwszym etapie 2 µg RNA dodawano 1 µl oligo(dt)₁₈ (stężenie wyjściowe 50 µM) i uzupełniano wodą wolną od RNaz do objętości 12 µl. Zawartość próbki mieszano i wirowano przez okres 30 sekund a następnie umieszczano w temperaturze 65°C na 5 minut w celu denaturacji RNA. W kolejnym etapie przenoszono do lodu na okres 1 minuty, po czym

dodawano następujące składniki reakcji: 4 µl 10 x stężonego buforu, 2 µl mieszaniny deoksyrybonukleotydów (dNTP) o stężeniu wyjściowym 10 mM, 1 µl DTT o stężeniu wyjściowym 0,1 M, 0,5 µl inhibitora rybonukleaz Rnase OUT o stężeniu wyjściowym 40 U/µl i 0,5 µl odwrotnej transkryptazy SuperScript III RT o stężeniu wyjściowym 200 U/µl. Po wymieszaniu probówkę wirowano i umieszczano w temperaturze 50°C na okres 35 minut w celu syntezy cDNA. Po zakończeniu reakcji probówki z cDNA poddawano inkubacji w temperaturze 4°C. Otrzymane preparaty cDNA wykorzystywano jako matrycę do reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym.

3.2.5.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

W celu określenia zmian w poziomie ekspresji genów MTR i MTRR przeprowadzono reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (rt-PCR - real time PCR). Reakcję rt-PCR przeprowadzono w systemie płytkowym z użyciem cDNA uzyskanego w reakcji odwrotnej transkrypcji, specyficznych par starterów zaprojektowanych przy pomocy programu OLIGO 4 (Tabela 4) oraz zestawu LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Diagnostic). W analizie wykorzystano aparat LightCycler® 480 do wykonania reakcji łańcuchowej polimerazy, barwnik fluorescencyjny SYBR Green do pomiaru ekspresji oraz oprogramowanie LightCycler® 480 Basic Software w celu analizy otrzymanych wyników. Poziom badanych transkryptów standaryzowano względem genu referencyjnego dehydrogenazy gliceroaldehydofosforanowej (GAPDH - *glyceraldehydephosphate dehydrogenase*).

Tabela 4. Sekwencje starterów użytych do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

<i>Gen</i>	<i>Sekwencje starterów Forward (F) [5→3] Reverse (R) [5→3]</i>	<i>Długość produktu PCR [pz]</i>
<i>GAPDH</i>	F. GAA GGT GAA GGT CGG AGT C R. GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	226
<i>MTR</i>	F. GGA TGA TGG CAT GCT AGA TG R. CAC CAT AGC AGC TCC ATA CT	238
<i>MTRR</i>	F. GTG AGC AAG CTG TGG TAC AT R. GTG TAT TCT GAA TCA CCG AGA	238

Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę w celu amplifikacji transkryptu genów GAPDH, MTR i MTRR.

<i>Składnik reakcji</i>	<i>GAPDH</i>	<i>MTR</i>	<i>MTRR</i>
woda wolna od RNaz	3,5 µl	3,5 µl	3,5 µl
starter F (Forward)	0,25 µl (stężenie końcowe 0,5 µM)	0,25 µl (stężenie końcowe 0,5 µM)	0,25 µl (stężenie końcowe 0,5 µM)
starter R (Reverse)	0,25 µl (stężenie końcowe 0,5 µM)	0,25 µl (stężenie końcowe 0,5 µM)	0,25 µl (stężenie końcowe 0,5 µM)
LightCycler® 480 SYBR Green I Master 10 x stężony	5 µl	5 µl	5 µl
cDNA	1 µl	1 µl	1 µl

Etapy i warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla poszczególnych genów przedstawiały się następująco:

Gen GAPDH (liczba cykli wynosiła 35):

1. Denaturacja wstępna – 95°C, czas 300 sekund
2. Denaturacja – 95°C, czas 20 sekund
3. Hybrydyzacja starterów – 56°C, czas 15 sekund
4. Synteza nici komplementarnej – 72°C, czas 15 sekund

Gen MTR (liczba cykli wynosiła 40):

1. Denaturacja wstępna – 95°C, czas 300 sekund
2. Denaturacja – 95°C, czas 20 sekund
3. Hybrydyzacja starterów – 58°C, czas 10 sekund
4. Synteza nici komplementarnej – 72°C, czas 15 sekund

Gen MTRR (liczba cykli wynosiła 40):

1. Denaturacja wstępna – 95°C, czas 300 sekund
2. Denaturacja – 95°C, czas 20 sekund
3. Hybrydyzacja starterów – 63°C, czas 10 sekund
4. Synteza nici komplementarnej – 72°C, czas 15 sekund

Sporządzono krzywą wzorcową na podstawie rozcieńczeń cDNA uzyskanego po odwrotnej transkrypcji mRNA i na jej podstawie wyznaczano ilość transkryptu z zachowaniem standaryzacji wobec genu referencyjnego GAPDH. Wyniki przedstawiono w postaci wykresów jako wartość względną w odniesieniu do grupy kontrolnej.

3.2.6. Analiza statystyczna

Statystyczna analiza wyników otrzymanych w prezentowanej pracy została przeprowadzona za pomocą programu statystycznego SPSS 17.0 PL dla Windows. Dane pacjentek zarówno kliniczne jak i uzyskane w badaniach genetycznych (częstość występowania poszczególnych genotypów oraz średnie wartości poziomu ekspresji badanych genów) zamieszczono w bazie danych.

Analizę danych klinicznych pacjentek rozpoczęto od obliczenia średniej arytmetycznej wraz z odchyleniem standardowym (\pm SD, ang. *standard deviation*) oraz zakresu wartości obserwowanych obliczając wartości maksymalne i minimalne wraz z przedziałem ufności (95% P.U.) stosując jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA, ang. *analysis of variance*).

W uzyskanych wynikach analiz genetycznych porównano częstości występowania genotypów i alleli pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną (test chi kwadrat), obliczano współczynnik ryzyka (W.R.) przy uwzględnieniu odpowiednich przedziałów ufności (95% P.U.). Analizowano także wzajemne korelacje pomiędzy badanymi polimorfizmami za pomocą testu chi-kwadrat.

Dla uzyskanych genotypów porównywano wartości obserwowane z oczekiwanymi, które obliczano na podstawie częstości występowania alleli danego polimorfizmu zgodnie z prawem Hardy-Weinberga, przedstawianego za pomocą równania, w którym częstość występowania allela dominującego oznaczono przez p , a recesywnego przez q :

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

Zgodność z prawem Hardy-Weinberga w badanych grupach określano testem chi kwadrat.

We wszystkich analizach jako istotnie statystyczną przyjęto wartość $p < 0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Analiza parametrów klinicznych i biochemicznych badanych grup kobiet

Tabela 6 przedstawia porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną. Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA wykazała istotną statystycznie różnicę w wartościach ciśnienia skurczowego i rozkurczowego pomiędzy grupami ($p < 0,0001$). Zaobserwowano ponadto istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną w odniesieniu do wzrostu ($p = 0,006$), masy przed ciążą ($p = 0,001$) oraz masy w trakcie ciąży kobiet ciężarnych ($p < 0,0001$). Grupa badana i grupa kontrolna różniły się w sposób istotny statystycznie w poziomie hemoglobiny ($p < 0,0001$). Istotna statystycznie różnica dotyczyła również tygodnia ukończenia ciąży ($p < 0,0001$) oraz masy urodzeniowej noworodka ($p < 0,0001$). W stosunku do wieku ciężarnych, liczby przebytych ciąż oraz płytek krwi i hematokrytu nie wykazano różnic istotnych pod względem statystycznym.

W grupie badanej oznaczono dodatkowo parametry biochemiczne w surowicy krwi: mocznik, kwas moczowy, białko całkowite oraz stosowaną przez ciężarną dawkę leku metyldopa. W obydwu grupach badanej i kontrolnej analizowano poziom białka w moczu, jak również odnotowywano masę łożyska, pH żyłne i tętnicze (Tabela 6).

Tabela 6. Porównanie wartości parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy grupą kontrolną (GK, n=120) a grupą badaną (GB, n=98).

<i>Analizowana zmienna</i>	<i>Grupa</i>	<i>Średnia±SD</i>	<i>SEM</i>	<i>95% P.U.</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>p</i>
<i>Ciśnienie skurczowe (mmHg)</i>	GK	108,50 ± 11,588	1,06	106,41 - 110,59	90,00	140,00	<0,0001
	GB	171,89 ± 21,27	2,15	167,62 - 176,15	120,00	220,00	
	Ogółem	137,00 ± 35,70	2,42	132,22 - 141,76	90,00	220,00	
<i>Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)</i>	GK	67,63 ± 9,12	0,83	65,98 - 69,27	50,00	90,00	<0,0001
	GB	105,92 ± 14,13	1,43	103,09 - 108,75	70,00	160,00	
	Ogółem	84,84 ± 22,35	1,51	81,86 - 87,82	50,00	160,00	
<i>Wiek (lata)</i>	GK	28,74 ± 4,75	0,43	27,88 - 29,60	18,00	42,00	=0,062
	GB	30,04 ± 5,47	0,55	28,94 - 31,14	18,00	45,00	
	Ogółem	29,32 ± 5,11	0,35	28,64 - 30,00	18,00	45,00	
<i>Wzrost (cm)</i>	GK	167,38 ± 4,98	0,45	166,48 - 168,28	150,00	180,00	=0,006
	GB	165,15 ± 6,66	0,68	163,79 - 166,50	140,00	180,00	
	Ogółem	166,39 ± 5,88	0,40	165,60 - 167,18	140,00	180,00	
<i>Masa przed ciążą (kg)</i>	GK	60,33 ± 9,38	0,86	58,64 - 62,02	40,00	97,00	=0,001
	GB	66,83 ± 17,51	1,86	63,14 - 70,52	42,00	150,00	
	Ogółem	63,10 ± 13,80	0,95	61,22 - 64,98	40,00	150,00	
<i>Masa po koniec III trymestru ciąży (kg)</i>	GK	75,34 ± 10,52	0,96	73,44 - 77,24	52,00	106,00	<0,0001
	GB	81,95 ± 16,71	1,71	78,57 - 85,34	50,00	157,00	
	Ogółem	78,28 ± 13,99	0,95	76,40 - 80,16	50,00	157,00	
<i>Liczba przeżytych ciąż</i>	GK	1,55 ± 0,79	0,07	1,41 - 1,69	1,00	6,00	=0,601
	GB	1,61 ± 0,97	0,10	1,42 - 1,81	1,00	6,00	
	Ogółem	1,58 ± 0,87	0,06	1,46 - 1,69	1,00	6,00	
<i>Tydzień zakończenia ciąży (t. c.)</i>	GK	39,09 ± 1,25	0,11	38,87 - 39,32	37,00	42,00	<0,0001
	GB	33,73 ± 3,88	0,39	32,95 - 34,51	19,00	40,00	
	Ogółem	36,70 ± 3,83	0,26	36,18 - 37,21	19,00	42,00	
<i>Masa urodzeniowa noworodka (g)</i>	GK	3454,42 ± 403,12	36,80	3381,56 - 3527,29	2560,00	4640,00	<0,0001
	GB	1913,51 ± 827,53	87,23	1740,19 - 2086,83	620,00	3940,00	
	Ogółem	2794,03 ± 984,08	67,91	2660,16 - 2927,91	620,00	4640,00	
<i>Hemoglobina (mmol/L)</i>	GK	6,72 ± 0,79	0,07	6,58 - 6,86	4,50	8,80	<0,0001
	GB	7,87 ± 2,09	0,21	7,44 - 8,29	0,90	15,30	
	Ogółem	7,23 ± 1,62	0,11	7,02 - 7,45	0,90	15,30	
<i>Hematokryt</i>	GK	0,36 ± 3,26	0,30	0,04 - 1,22	0,22	36,00	

<i>(L/L)</i>	GB	0,35 ± 0,04	0,01	0,34 - 0,36	0,20	0,45	=0,400
	Ogółem	0,40 ± 2,42	0,16	0,18 - 0,83	0,20	36,00	
<i>Płytki krwi (g/L)</i>	GK	209,37 ± 58,72	5,36	198,75 - 219,98	9,10	381,00	=0,258
	GB	199,58 ± 68,24	6,93	185,83 - 213,34	47,00	398,00	
	Ogółem	204,99 ± 63,19	4,29	196,54 - 213,45	9,10	398,00	
<i>Mocznik (mg/dL)</i>	GK	-	-	-	-	-	-
	GB	30,51 ± 14,23	1,48	27,58 - 33,44	12,57	92,52	
	Ogółem	-	-	-	-	-	
<i>Kwas moczowy (mg/dL)</i>	GK	-	-	-	-	-	-
	GB	6,63 ± 1,32	0,14	6,36 - 6,90	3,57	10,48	
	Ogółem	-	-	-	-	-	
<i>Białko całkowite (g/dL)</i>	GK	-	-	-	-	-	-
	GB	5,68 ± 0,76	0,08	5,52 - 5,83	2,90	8,76	
	Ogółem	-	-	-	-	-	
<i>Białkomocz (mg/dL)</i>	GK	10,21 ± 12,34	11,03	10,53 - 18,24	0	25,00	<0,0001
	GB	302,04 ± 191,60	19,35	263,63 - 340,45	75,00	500,00	
	Ogółem	152,24 ± 102,42	14,23	134,46 - 180,24	0	500,00	
<i>Masa łożyska (g)</i>	GK	629,16 ± 111,98	57,67	564,24 - 722,86	420,00	800,00	=0,004
	GB	445,38 ± 190,40	19,85	405,95 - 484,81	150,00	700,00	
	Ogółem	556,44 ± 156,82	36,43	486,24 - 602,22	150,00	800,00	
<i>pH żyłne</i>	GK	7,32 ± 0,07	0,006	7,27 - 7,34	7,11	7,35	=0,384
	GB	7,27 ± 0,10	0,01	7,25 - 7,29	6,69	7,40	
	Ogółem	7,30 ± 0,08	0,008	7,26 - 7,30	6,69	7,40	
<i>pH tętnicze</i>	GK	7,27 ± 0,07	0,006	7,23 - 7,29	7,07	7,44	=0,654
	GB	7,25 ± 0,09	0,01	7,23 - 7,27	6,80	7,42	
	Ogółem	7,25 ± 0,08	0,008	7,23 - 7,28	6,80	7,44	
<i>Dawka metyldopy (mg)</i>	GK	-	-	-	-	-	-
	GB	1535,71 ± 592,04	59,81	1417,02 - 1654,41	250,00	3000,00	
	Ogółem	-	-	-	-	-	

Ponadto dokonano podziału grupy badanej pod względem stopnia ciężkości PE wyodrębniając pacjentki z umiarkowaną (52 ciężarne) oraz ciężką (46 ciężarnych) postacią choroby. Porównanie parametrów klinicznych i biochemicznych tych grup przedstawiono w tabeli 7. Grupa z umiarkowanym oraz ciężkim przebiegiem PE różniły się istotnie statystycznie pod względem wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego, tygodnia zakończenia ciąży, masy urodzeniowej noworodka, poziomu hemoglobiny oraz masy łożyska ($p < 0,0001$). Analizowane grupy nie wykazały różnic na poziomie istotności statystycznej w odniesieniu do liczby przebytych ciąży ($p = 0,091$) oraz niektórych parametrów hematologicznych: hematokrytu ($p = 0,703$), płytek krwi ($p = 0,472$). Nie odnotowano również

istotności statystycznej pod względem poziomu mocznika, kwasu moczowego oraz białka całkowitego, pH żylnego i tętniczego oraz dawki zażywanej metyldopy.

Tabela 7. Porównanie wartości parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy grupą kontrolną (GK, n=120) a grupą z umiarkowaną postacią PE (umiarkowana PE, n=52) oraz grupą z ciężką postacią PE (ciężka PE, n=46).

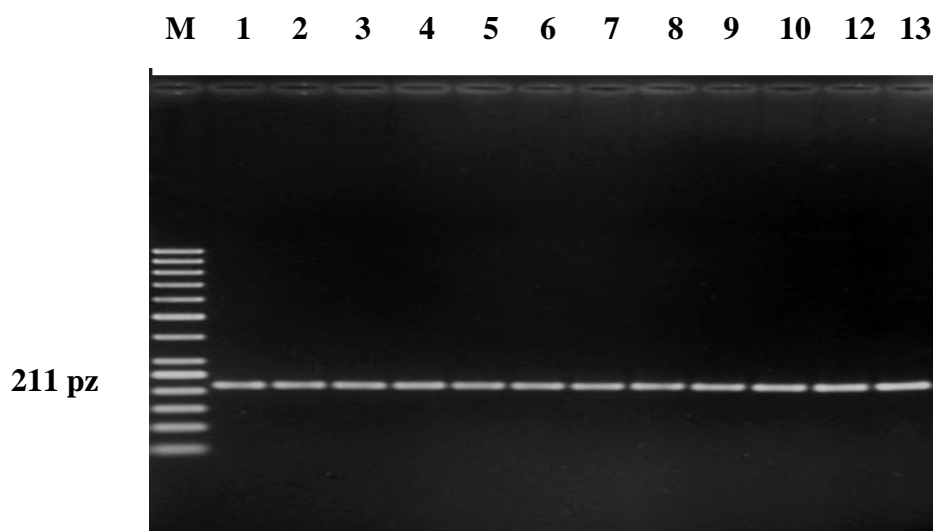
<i>Analizowana zmienna</i>	<i>Grupa</i>	<i>Średnia±SD</i>	<i>SEM</i>	<i>95% P.U.</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>p</i>
<i>Ciśnienie skurczowe (mmHg)</i>	GK	108,50 ± 11,59	1,06	106,41 - 110,59	90,00	140,00	<0,0001
	Umiarkowana PE	167,02 ± 21,44	2,97	161,05 - 172,99	120,00	220,00	
	Ciężka PE	177,39 ± 19,88	2,93	171,49 - 183,30	140,00	220,00	
<i>Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)</i>	GK	67,63 ± 9,12	0,83	65,98 - 69,27	50,00	90,00	<0,0001
	Umiarkowana PE	103,37 ± 14,20	1,97	99,41 - 107,32	70,00	140,00	
	Ciężka PE	108,80 ± 13,63	2,01	104,76 - 112,85	90,00	160,00	
<i>Wiek (lata)</i>	GK	28,74 ± 4,75	0,43	27,88 - 29,60	18,00	42,00	=0,019
	Umiarkowana PE	31,08 ± 5,68	0,80	29,48 - 32,68	18,00	43,00	
	Ciężka PE	28,89 ± 5,03	0,74	27,40 - 30,38	21,00	45,00	
<i>Wzrost (cm)</i>	GK	167,38 ± 4,98	0,45	166,48 - 168,28	150,00	180,00	=0,016
	Umiarkowana PE	165,55 ± 7,45	1,04	163,45 - 167,64	140,00	180,00	
	Ciężka PE	164,68 ± 5,66	0,85	162,96 - 166,40	155,00	175,00	
<i>Masa przed ciążą (kg)</i>	GK	60,33 ± 9,38	0,86	58,64 - 62,03	40,00	97,00	=0,001
	Umiarkowana PE	68,85 ± 20,38	2,94	62,94 - 74,77	42,00	150,00	
	Ciężka PE	64,46 ± 13,25	2,07	60,28 - 68,64	45,00	100,00	
<i>Masa po koniec III trymestru ciąży (kg)</i>	GK	75,34 ± 10,52	0,96	73,44 - 77,24	52,00	106,00	=0,002
	Umiarkowana PE	82,48 ± 19,31	2,70	77,05 - 87,91	50,00	157,00	
	Ciężka PE	81,36 ± 13,38	1,99	77,34 - 85,38	55,00	115,00	
<i>Liczba przeżytych ciąż</i>	GK	1,55 ± 0,79	0,07	1,41 - 1,69	1,00	6,00	=0,091
	Umiarkowana PE	1,78 ± 1,14	0,16	1,47 - 2,11	1,00	6,00	
	Ciężka PE	1,41 ± 0,69	0,10	1,21 - 1,62	1,00	4,00	
<i>Tydzień zakończenia ciąży (t. c.)</i>	GK	39,09 ± 1,25	0,11	38,87 - 39,32	37,00	42,00	<0,0001
	Umiarkowana PE	35,29 ± 3,15	0,44	34,41 - 36,18	27,00	40,00	
	Ciężka PE	32,00 ± 3,90	0,58	30,84 - 33,16	19,00	40,00	
<i>Masa urodzeniowa noworodka (g)</i>	GK	3454,43 ± 403,12	36,80	3381,56 - 3527,29	2560,00	4640,00	<0,0001
	Umiarkowana PE	1811,18 ± 796,02	118,66	1572,03 - 2050,33	620,00	3800,00	
	Ciężka PE	2015,84 ± 854,45	127,37	1759,14 - 2272,55	760,00	3940,00	
<i>Hemoglobina (mmol/L)</i>	GK	6,72 ± 0,79	0,07	6,58 - 6,86	4,50	8,80	<0,0001
	Umiarkowana PE	7,88 ± 1,69	0,24	7,40 - 8,35	5,29	12,50	

	Ciężka PE	7,86 ± 2,49	0,37	7,12 - 8,59	0,90	15,30	
Hematokryt (L/L)	GK	0,36 ± 3,26	0,30	0,04 - 1,22	0,22	36,00	=0,703
	Umiarkowana PE	0,35 ± 0,04	0,01	0,34 - 0,36	0,28	0,44	
	Ciężka PE	0,35 ± 0,05	0,01	0,33 - 0,36	0,20	0,45	
Płytki krwi (g/L)	GK	209,37 ± 58,72	5,36	198,75 - 219,98	9,10	381,00	=0,472
	Umiarkowana PE	196,69 ± 73,27	10,26	176,09 - 217,30	47,00	398,00	
	Ciężka PE	202,79 ± 62,84	9,27	184,12 - 221,45	69,00	339,00	
Mocznik (mg/dL)	GK	-	-	-	-	-	=0,970
	Umiarkowana PE	30,46 ± 15,11	2,18	26,07 - 34,85	12,57	92,52	
	Ciężka PE	30,57 ± 13,39	2,00	26,55 - 34,60	14,20	81,60	
Kwas moczowy (mg/dL)	GK	-	-	-	-	-	=0,072
	Umiarkowana PE	6,39 ± 1,39	0,20	5,99 - 6,79	3,57	10,48	
	Ciężka PE	6,88 ± 1,21	0,18	6,52 - 7,25	4,42	9,43	
Białko całkowite (g/dL)	GK	-	-	-	-	-	=0,384
	Umiarkowana PE	5,74 ± 0,86	0,12	5,50 - 5,99	2,90	8,76	
	Ciężka PE	5,61 ± 0,63	0,09	5,42 - 5,80	4,24	7,50	
Białkomocz (mg/dL)	GK	10,21 ± 12,34	11,03	10,53 - 18,24	0	25,00	<0,0001
	Umiarkowana PE	126,92 ± 56,63	7,85	111,16 - 142,69	75,00	300,00	
	Ciężka PE	500,00 ± 0,00	0,00	500,00 - 500,00	500,00	500,00	
Masa łożyska (g)	GK	629,16 ± 111,98	57,67	564,24 - 722,86	420,00	800,00	<0,0001
	Umiarkowana PE	521,70 ± 212,72	31,03	459,25 - 584,16	150,00	700,00	
	Ciężka PE	365,67 ± 122,28	18,23	328,93 - 402,40	160,00	750,00	
pH żyłne	GK	7,32 ± 0,07	0,006	7,27 - 7,34	7,11	7,35	=0,374
	Umiarkowana PE	7,27 ± 0,11	0,01	7,24 - 7,31	6,69	7,37	
	Ciężka PE	7,26 ± 0,08	0,01	7,23 - 7,28	7,03	7,40	
pH tętnicze	GK	7,27 ± 0,07	0,006	7,23 - 7,29	7,07	7,44	=0,622
	Umiarkowana PE	7,25 ± 0,10	0,015	7,22 - 7,28	6,80	7,42	
	Ciężka PE	7,25 ± 0,07	0,01	7,22 - 7,27	6,98	7,34	
Dawka metyldopy (mg)	GK	-	-	-	-	-	=0,161
	Umiarkowana PE	1456,73 ± 559,50	77,59	1300,96 - 1612,50	250,00	3000,00	
	Ciężka PE	1625,00 ± 620,82	91,54	1440,64 - 1809,36	500,00	3000,00	

4.2. Analiza badanych polimorfizmów genów *MTR* oraz *MTRR*

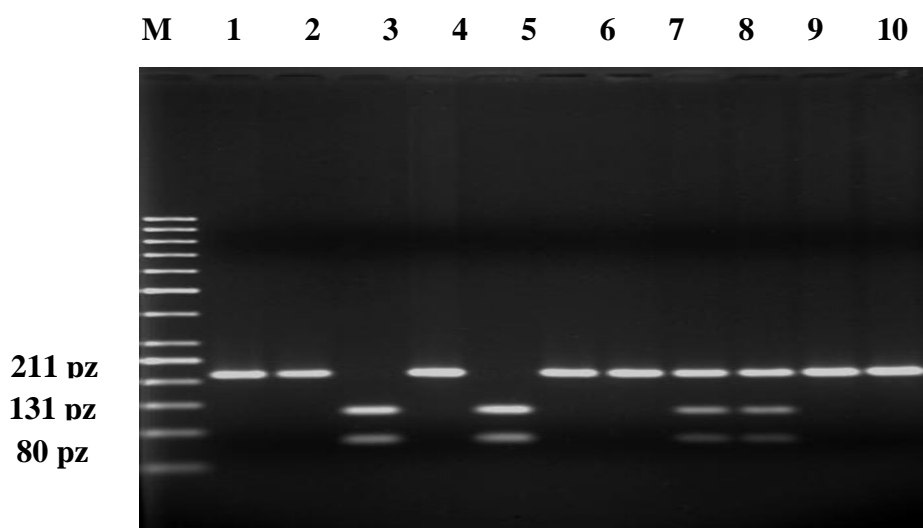
4.2.1. Analiza polimorfizmu 2756A>G genu *MTR*

Analizując polimorfizm 2756A>G genu *MTR* dokonano amplifikacji właściwego fragmentu genu *MTR*. Elektroforeza w 2% żelu agarozowym potwierdziła obecność produktu o wielkości 211 pz (Rycina 5).



Rycina 5. Rozdział elektroforetyczny produktu amplifikacji genu *MTR* w 2% żelu agarozowym. Tor M – marker wielkości, tory 1-13 – produkty reakcji PCR.

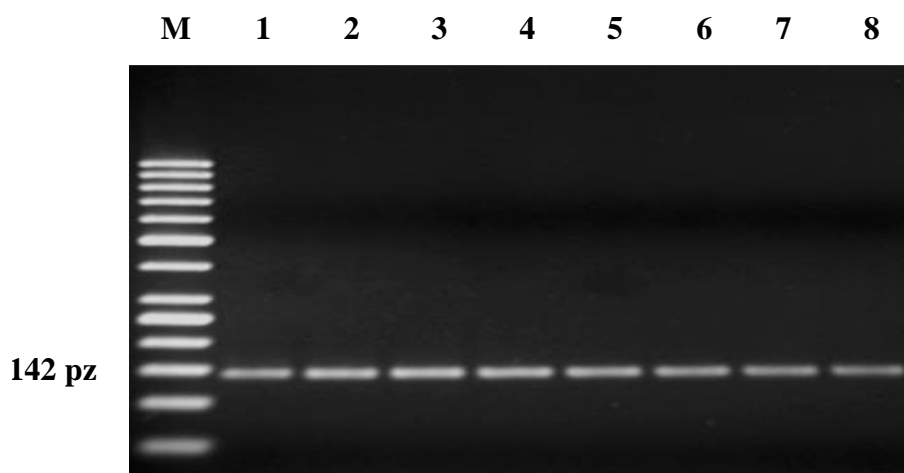
Rycina 6 przedstawia wynik analizy restrykcyjnej polimorfizmu 2756A>G genu *MTR*. Trawienie przeprowadzono za pomocą enzymu restrykcyjnego *Bsu*RI (Fermentas, Litwa). Elektroforeza w 2,75% żelu agarozowym umożliwiła wizualizację analizy restrykcyjnej. Użyty enzym *Bsu*RI nastawiony był na cięcie miejsca zmutowanego. Obecność jednego prążka o wielkości 211 pz oznaczał homozygotę dominującą 2756AA. Dwa prążki o wielkościach 131 pz i 80 pz utożsamiano z homozygotą recesywną 2756GG. Z kolei trzy prążki o wielkościach: 211 pz, 131 pz oraz 80 pz oznaczały heterozygotę 2756AG (Rycina 6).



Rycina 6. Rozdział elektroforetyczny produktu trawienia genu *MTR* w 2,75% żelu agarozowym. Trawienie przy pomocy enzymu *Bsu*RI (Fermentas, Litwa). Tory 1, 2, 4, 6, 7, 10, 11 – homozygoty dominujące 2756AA, tory 3, 5 – homozygoty recesywne 2756GG, tory 8, 9 – heterozygoty 2756AG, tor M – marker wielkości (100 pz).

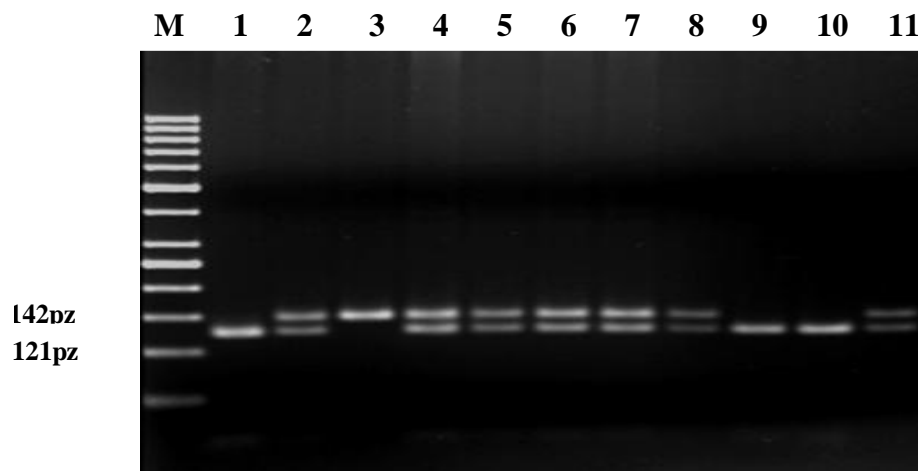
4.2.2. Analiza polimorfizmu 66A>G genu *MTRR*

W wyniku amplifikacji odpowiedniego fragmentu genu *MTRR* otrzymano produkt o wielkości 142 pz (Rycina 7).



Rycina 7. Rozdział elektroforetyczny produktu amplifikacji genu *MTRR* w 2% żelu agarozowym. Tor M – marker wielkości, tory 1-8 – produkty reakcji PCR.

Analiza restrykcyjna dla polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* przeprowadzona została przy pomocy enzymu *NdeI* (Fermentas, Litwa) nastawionego na hydrolizę miejsca prawidłowego. Obecność dwóch prążków o wielkości 121 pz i 21 pz świadczyła o obecności homozygoty dominującej 66AA. Trzy prążki o wielkości 142 pz, 121 pz oraz 21 pz oznaczały heterozygotę 66AG. Homozygotę recesywną 66GG stwierdzano w przypadku obecności jednego prążka o wielkości 142 pz (Rycina 8).



Rycina 8. Rozdział elektroforetyczny produktu trawienia genu *MTRR* w 2,75% żelu agarozowym. Trawienie przy pomocy enzymu *NdeI* (Fermentas, Litwa). Tory 1, 9, 10 – homozygoty dominujące 66AA, tory 2, 4-8, 11 – heterozygoty 66AG, tor 3 – homozygota recesywna 66GG, tor M-marker wielkości.

4.3. Rozkład częstości występowanie poszczególnych genotypów i alleli dla polimorfizmu 2756A>G genu *MTR*

Tabela 8 przedstawia częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR*. Analiza nie wykazała znaczących różnic w częstości występowania genotypu homozygotycznego recesywnego 2756GG *MTR* oraz heterozygotycznego 2756AG *MTR* w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej (5,10% vs. 3,33% oraz 32,70% vs. 30,82%, *ns*). Ponadto, częstość homozygot 2756AA była porównywalna w obydwu badanych grupach kobiet (62,20 vs. 65,85%, *ns*).

Tabela 8. Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

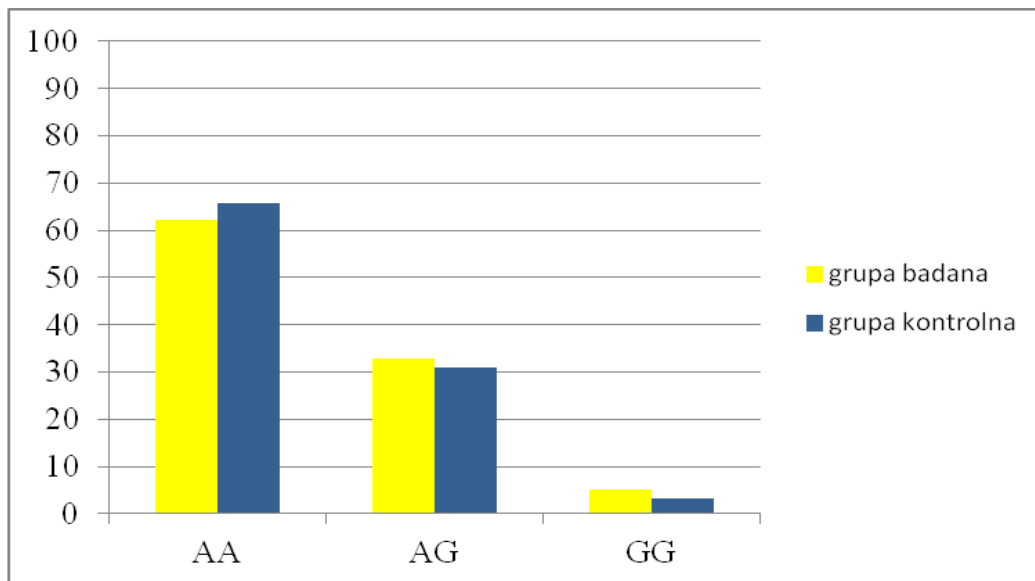
Genotypy 2756A>G MTR	Grupa badana (PE) n=98		Grupa kontrolna n=120	
	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana %	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana %
AA	61 (62,20)	61,73	79 (65,85)	66,01
AG	32 (32,70)	33,68	37 (30,82)	30,47
GG	5 (5,10)	4,59	4 (3,33)	3,52
Suma	98 (100,00)	100,00	120 (100,00)	100,00

Tabela 9 przedstawia częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie badanej i kontrolnej. Również w tej analizie zaobserwowano porównywalną częstość występowania allela A (78,57 vs. 81,25%, *ns*) zmutowanego allela 2756G w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej (21,43% vs. 18,75%, *ns*).

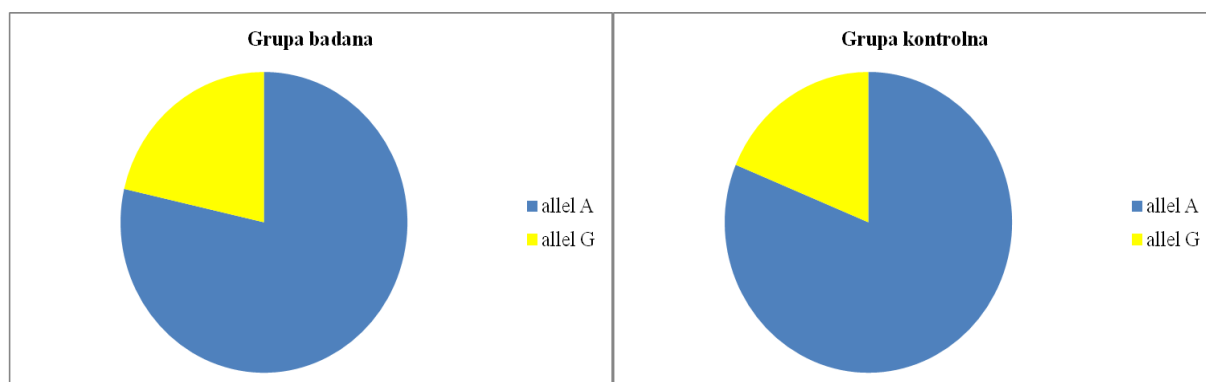
Tabela 9. Częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

Allele 2756A>G MTR	Grupa badana (PE) wartość obserwowana n (%)	Grupa kontrolna wartość obserwowana n (%)
A	154 (78,57)	195 (81,25)
G	42 (21,43)	45 (18,75)
Suma	196 (100,00)	240 (100,00)

Dla lepszego zobrazowania rozkładu częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* wyniki dodatkowo przedstawiono na rycinach 9 i 10.



Rycina 9. Porównanie częstości występowania genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie badanej oraz grupie kontrolnej.



Rycina 10. Porównanie częstości występowania alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

W analizie polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości występowania genotypów oraz alleli pomiędzy grupą badaną kobiet ze stanem przedzucawkowym i kontrolną zdrowych kobiet ciężarnych. Analiza współczynnika ryzyka w odniesieniu do genotypów i alleli nie wykazała znaczenia polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* jako czynnika zwiększającego ryzyko występowania PE (Tabela 10 i 11).

Tabela 10. Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (p) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną.

Genotypy 2756A>G MTR	W.R.	p	95% P.U.
AA	0,856	0,341	0,473 – 1,551
AG	1,087	0,443	0,588 – 2,006
GG	1,559	0,375	0,325 – 8,072

Tabela 11. Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (p) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną.

Allele 2756A>G MTR	W.R.	p	95% P.U.
A	1,111	0,389	0,655 – 1,898
G	0,900	0,389	0,527 – 1,526

Dokonano porównania częstości występowania genotypów oraz alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* pomiędzy grupą pacjentek z umiarkowaną postacią PE oraz grupą kontrolną (Tabela 12 i 13), a także pomiędzy grupą z ciężką postacią PE oraz grupą kontrolną (Tabela 16 i 17) nie wykazując różnic istotnych statystycznie w tym zakresie. Analiza współczynnika ryzyka w odniesieniu do genotypów i alleli odpowiednio w grupach z umiarkowaną oraz ciężką PE nie pokazały znaczenia polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* jako czynnika ryzyka wystąpienia omawianego powikłania (Tabele 14, 15, 18 i 19).

Umiarkowana postać PE

Tabela 12. Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie z umiarkowaną postacią PE oraz w grupie kontrolnej.

Genotypy 2756A>G MTR	Grupa z umiarkowaną postacią PE (umiarkowana PE) n=52		Grupa kontrolna n=120	
	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana %	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana %
AA	31 (59,6)	59,17	79 (65,85)	66,01
AG	18 (34,6)	35,50	37 (30,82)	30,47
GG	3 (5,8)	5,33	4 (3,33)	3,52
Suma	52 (100,00)	100,00	120 (100,00)	100,00

Tabela 13. Częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie z umiarkowaną postacią PE oraz w grupie kontrolnej.

Allele 2756A>G MTR	Grupa z umiarkowaną postacią PE (umiarkowana PE) wartość obserwowana n (%)	Grupa kontrolna Wartość obserwowana n (%)
A	80 (76,92)	195 (81,25)
G	24 (23,08)	45 (18,75)
Suma	104 (100,00)	240 (100,00)

Tabela 14. Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (*p*) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* pomiędzy grupą z umiarkowaną postacią PE a grupą kontrolną.

Genotypy 2756A>G MTR	W.R.	<i>p</i>	95% P.U.
AA	0,766	0,271	0,373 – 1,592
AG	1,187	0,375	0,556 – 2,488
GG	1,775	0,357	0,249 – 10,882

Tabela 15. Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (*p*) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* pomiędzy grupą z umiarkowaną postacią PE a grupą kontrolną.

<i>Allele</i> 2756A>G <i>MTR</i>	<i>W.R.</i>	<i>p</i>	<i>95% P.U.</i>
<i>A</i>	0,769	0,218	0,426 – 1,414
<i>G</i>	1,300	0,218	0,707 – 2,345

Ciężka postać PE

Tabela 16. Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.

<i>Genotypy</i> 2756A>G <i>MTR</i>	<i>Grupa z ciężką postacią PE</i> (ciężka PE) <i>n=46</i>		<i>Grupa kontrolna</i> <i>n=120</i>	
	<i>Wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>Wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>%</i>	<i>Wartość</i> <i>obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>Wartość</i> <i>oczekiwana</i> <i>%</i>
AA	30 (65,3)	64,69	79 (65,85)	66,01
AG	14 (30,4)	31,48	37 (30,82)	30,47
GG	2 (4,3)	3,83	4 (3,33)	3,52
Suma	46 (100,00)	100,00	120 (100,00)	100,00

Tabela 17. Częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.

<i>Allele</i> 2756A>G <i>MTR</i>	<i>Grupa z ciężką postacią PE</i> (ciężka PE) <i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>Grupa kontrolna</i> <i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>
<i>A</i>	74 (80,43)	195 (81,25)
<i>G</i>	18 (19,57)	45 (18,75)
Suma	92 (100,00)	240 (100,00)

Tabela 18. Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (p) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* pomiędzy grupą z ciężką postacią PE a grupą kontrolną.

Genotypy 2756A>G MTR	W.R.	p	95% P.U.
AA	0,598	0,082	0,298 – 1,206
AG	0,981	0,559	0,431 – 2,161
GG	1,318	0,531	0,115 – 9,556

Tabela 19. Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (p) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* pomiędzy grupą z ciężką postacią PE a grupą kontrolną.

Allele 2756A>G MTR	W.R.	p	95% P.U.
A	0,949	0,489	0,501 – 1,858
G	1,054	0,489	0,538 – 1,999

4.4. Rozkład częstości występowanie poszczególnych genotypów i alleli dla polimorfizmu 66A>G genu *MTRR*

W pracy dokonano również analizy częstości występowania genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie badanej ze stanem przedrzucawkowym oraz kontrolnej. Odnotowano większą częstość występowania homozygot 66AA *MTRR* w grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych (27,50 vs. 10,20%, $p=0,001$) oraz porównywalną częstość genotypu heterozygotycznego 66AG *MTRR* (46,90 vs. 46,70%, *ns*). Ciekawą obserwacją było odnotowanie w grupie badanej z PE istotnie większej częstości występowania genotypu homozygotycznego zmutowanego 66GG genu *MTRR* w porównaniu z grupą kontrolną (42,90% vs. 25,80%, $p=0,006$) (Tabela 20).

Tabela 20. Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

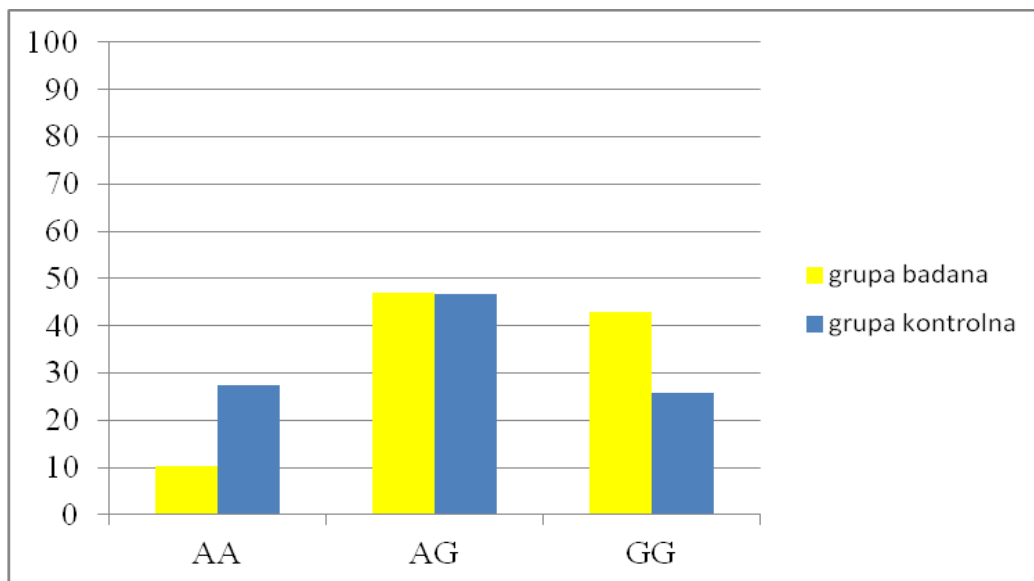
Genotypy 66A>G MTRR	Grupa badana (PE) n=98		Grupa kontrolna n=120	
	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana %	Wartość obserwowana n (%)	Wartość Oczekiwana %
AA	10 (10,20)	11,33	33 (27,50)	25,84
AG	46 (46,90)	44,67	56 (46,70)	49,98
GG	42 (42,90)	44,00	31 (25,80)	24,18
Suma	98 (100,00)	100,00	120 (100,00)	100,00

W tabeli 21 przedstawiono częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie badanej i kontrolnej. W grupie badanej zaobserwowano znacznie większą częstość występowania zmutowanego allela 66G w porównaniu z grupą kontrolną (66,33% vs. 49,17%).

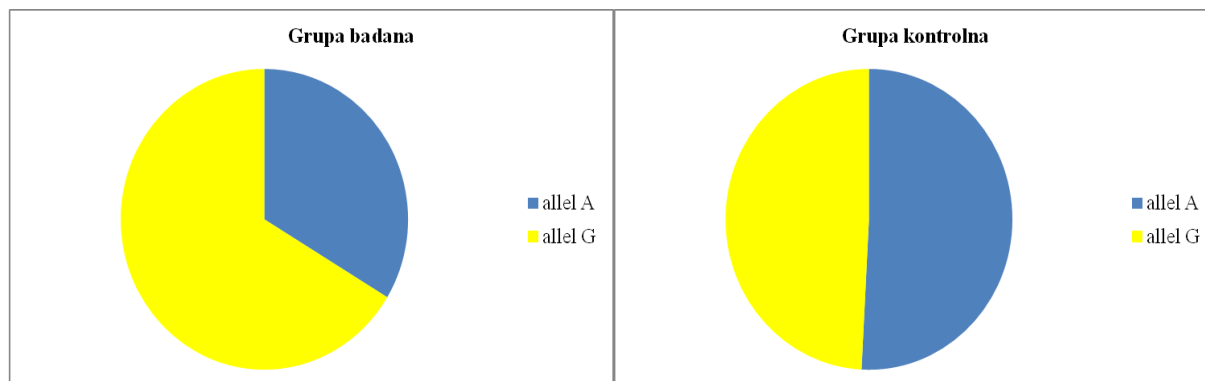
Tabela 21. Częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

Allele 66A>G MTRR	Grupa badana (PE) wartość obserwowana n (%)	Grupa kontrolna wartość obserwowana n (%)
A	66 (33,67)	122 (50,83)
G	130 (66,33)	118 (49,17)
Suma	196 (100,00)	240 (100,00)

Ryciny 11 oraz 12 przedstawiają porównanie częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie badanej i kontrolnej.



Rycina 11. Porównanie częstości występowania genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie badanej oraz grupie kontrolnej.



Rycina 12. Porównanie częstości występowania alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

Analiza polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* wykazała istnienie istotnych statystycznie różnic w częstości występowania genotypów i alleli pomiędzy grupą badaną i kontrolną. Badanie współczynnika ryzyka wskazuje na znaczenie genotypu 66GG oraz allela 66G genu *MTRR* jako czynników ryzyka wystąpienia PE (Tabela 22 i 23).

Tabela 22. Porównanie wartości współczynników ryzyka (W.R.), istotności (p) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR*.

Genotypy 66A>G MTRR	W.R.	p	95% P.U.
AA	0,299	0,001	0,124 – 0,673
AG	1,011	0,538	0,572 – 1,787
GG	2,153	0,006	1,169 – 3,976

Tabela 23. Porównanie wartości współczynników ryzyka (W.R.), istotności (p) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR*.

Allele 66A>G MTRR	W.R.	p	95% P.U.
A	0,491	0,0002	0,326 – 0,738
G	2,036	0,0002	1,354 – 3,067

Ponadto, dokonano porównania częstości występowania genotypów oraz alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* pomiędzy grupą pacjentek z umiarkowaną postacią PE oraz grupą kontrolną (Tabela 24 i 25), a także pomiędzy grupą z ciężką postacią PE oraz grupą kontrolną (Tabela 28 i 29). W obu analizowanych grupach ujawniły się istotne statystycznie różnice w częstości występowania genotypu 66AA oraz alleli w porównaniu do grupy kontrolnej. Obecność genotypu 66GG i allela 66G znacznie częściej stwierdzano u pacjentek z umiarkowaną a także z ciężką postacią PE niż w grupie zdrowych ciężarnych (wartości p dla umiarkowanych postaci PE odpowiednio 0,007 i 0,001, wartości p dla ciężkich postaci PE odpowiednio 0,069 i 0,006). Analiza współczynnika ryzyka w odniesieniu do genotypów i alleli zarówno w grupach z umiarkowaną oraz ciężką PE ujawniły potencjalne znaczenie polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* jako czynnika ryzyka wystąpienia PE (Tabele 26, 27, 30 i 31).

Umiarkowana postać PE

Tabela 24. Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie z umiarkowaną postacią PE oraz w grupie kontrolnej.

<i>Genotypy 66A>G MTRR</i>	<i>Grupa z umiarkowaną postacią PE (umiarkowana PE) n=52</i>		<i>Grupa kontrolna n=120</i>	
	<i>Wartość obserwowana n (%)</i>	<i>Wartość oczekiwana %</i>	<i>Wartość obserwowana n (%)</i>	<i>Wartość oczekiwana %</i>
<i>AA</i>	6 (11,50)	10,69	79 (65,85)	66,01
<i>AG</i>	22 (42,30)	44,01	37 (30,82)	30,47
<i>GG</i>	24 (46,20)	45,30	4 (3,33)	3,52
<i>Suma</i>	52 (100,00)	100,00	120 (100,00)	100,00

Tabela 25. Częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie z umiarkowaną postacią PE oraz w grupie kontrolnej.

<i>Allele 66A>G MTRR</i>	<i>Grupa z umiarkowaną postacią PE (umiarkowana PE) wartość obserwowana n (%)</i>	<i>Grupa kontrolna wartość obserwowana n (%)</i>
<i>A</i>	34 (32,69)	195 (81,25)
<i>G</i>	70 (67,31)	45 (18,75)
<i>Suma</i>	104 (100,00)	240 (100,00)

Tabela 26. Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (*p*) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* pomiędzy grupą z umiarkowaną postacią PE a grupą kontrolną.

<i>Genotypy 66A>G MTRR</i>	<i>W.R.</i>	<i>p</i>	<i>95% P.U.</i>
<i>AA</i>	0,344	0,015	0,110 – 0,918
<i>AG</i>	0,838	0,359	0,410 – 1,698
<i>GG</i>	2,461	0,007	1,172 – 5,129

Tabela 27. Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (*p*) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* pomiędzy grupą z umiarkowaną postacią PE a grupą kontrolną.

<i>Allele 66A>G MTRR</i>	<i>W.R.</i>	<i>p</i>	<i>95% P.U.</i>
<i>A</i>	0,469	0,001	0,281 – 0,779
<i>G</i>	2,128	0,001	1,283 – 3,563

Ciężka postać PE

Tabela 28. Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.

<i>Genotypy 66A>G MTRR</i>	<i>Grupa z ciężką postacią PE (ciężka PE) n=46</i>		<i>Grupa kontrolna n=120</i>	
	<i>Wartość obserwowana n (%)</i>	<i>Wartość oczekiwana %</i>	<i>Wartość obserwowana n (%)</i>	<i>Wartość oczekiwana %</i>
<i>AA</i>	4 (8,70)	12,10	79 (65,85)	66,01
<i>AG</i>	24 (52,20)	45,37	37 (30,82)	30,47
<i>GG</i>	18 (39,10)	42,53	4 (3,33)	3,52
<i>Suma</i>	46 (100,00)	100,00	120 (100,00)	100,00

Tabela 29. Częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.

<i>Allel 66A>G MTRR</i>	<i>Grupa z ciężką postacią PE (ciężka PE) wartość obserwowana n (%)</i>	<i>Grupa kontrolna wartość obserwowana n (%)</i>
<i>A</i>	32 (34,78)	195 (81,25)
<i>G</i>	60 (65,22)	45 (18,75)
<i>Suma</i>	92 (100,00)	240 (100,00)

Tabela 30. Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (p) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* pomiędzy grupą z ciężką postacią PE a grupą kontrolną.

<i>Genotypy 66A>G MTRR</i>	<i>W.R.</i>	<i>p</i>	<i>95% P.U.</i>
<i>AA</i>	0,251	0,006	0,061 – 0,779
<i>AG</i>	1,247	0,322	0,597 – 2,609
<i>GG</i>	1,845	0,069	0,836 – 4,005

Tabela 31. Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (p) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* pomiędzy grupą z ciężką postacią PE a grupą kontrolną.

<i>Allele 66A>G MTRR</i>	<i>W.R.</i>	<i>p</i>	<i>95% P.U.</i>
<i>A</i>	0,516	0,006	0,302 – 0,872
<i>G</i>	1,938	0,006	1,147 – 3,306

4.5. Porównanie parametrów klinicznych i biochemicznych oraz ich związek z genotypami badanego polimorfizmu 2756A>G genu MTR

Tabele 32 i 33 przedstawiają korelacje wartości wybranych parametrów klinicznych i laboratoryjnych z poszczególnymi genotypami polimorfizmu 2756A>G genu MTR odpowiednio dla grupy badanej i grupy kontrolnej. Przeprowadzona analiza wariancji ANOVA nie wykazała obecności żadnej istotności statystycznej w tym zakresie zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej. W grupie badanej analiza parametrów laboratoryjnych pozwoliła zaobserwować jednak nieznacznie wyższy poziom hemoglobiny oraz białka całkowitego i białkomoczu u ciężarnych z genotypem prawidłowym w porównaniu z genotypami 2756AG oraz 2756GG badanego polimorfizmu. Obecność genotypu zmutowanego w tej grupie korelowała natomiast z nieco obniżonym poziomem płytek krwi oraz wyższym poziomem mocznika. Wśród danych klinicznych grupy badanej zaobserwowano wyższą wartość parametrów: czasu trwania i liczby przebytych ciąż natomiast niższą masę urodzeniową noworodka u nosicielek genotypu 2756GG MTR.

Tabela 32. Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 2756A>G genu MTR w grupie badanej.

<i>Analizowana zmienna</i>	<i>Genotyp 2756A>G MTR</i>	<i>Średnia±SD</i>	<i>SEM</i>	<i>95% P.U.</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>p</i>
<i>Ciśnienie skurczowe (mmHg)</i>	AA	173,20 ± 21,49	2,75	167,69 - 178,70	140,00	220,00	=0,086
	AG	166,88 ± 20,70	3,66	159,41 - 174,34	120,00	210,00	
	GG	188,00 ± 13,04	5,83	171,81 - 204,19	170,00	200,00	
	Ogółem	171,89 ± 21,27	2,15	167,62 - 176,15	120,00	220,00	
<i>Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)</i>	AA	107,70 ± 13,31	1,70	104,30 - 111,11	90,00	160,00	=0,219
	AG	102,34 ± 15,61	2,76	96,72 - 107,97	70,00	140,00	
	GG	107,00 ± 12,04	5,39	92,05 - 121,95	95,00	120,00	
	Ogółem	105,92 ± 14,13	1,43	103,09 - 108,75	70,00	160,00	
<i>Wiek (lata)</i>	AA	29,57 ± 5,09	0,65	28,27 - 30,88	18,00	40,00	=0,380
	AG	30,52 ± 6,32	1,13	28,20 - 32,83	21,00	45,00	
	GG	32,80 ± 3,768	1,69	28,12 - 37,48	29,00	39,00	
	Ogółem	30,04 ± 5,47	0,55	28,94 - 31,14	18,00	45,00	
<i>Wzrost (cm)</i>	AA	165,49 ± 5,60	0,73	164,03 - 166,95	150,00	176,00	=0,423
	AG	165,10 ± 8,53	1,53	161,97 - 168,22	140,00	180,00	

	GG	161,40 ± 4,88	2,18	155,34 - 167,46	155,00	168,00	
	Ogółem	165,15 ± 6,66	0,68	163,79 - 166,50	140,00	180,00	
Masa przed ciążą (kg)	AA	66,90 ± 16,01	2,18	62,54 - 71,28	45,00	128,00	=0,996
	AG	66,80 ± 20,55	3,75	59,13 - 74,47	42,00	150,00	
	GG	66,20 ± 16,90	7,56	45,21 - 87,19	49,00	90,00	
	Ogółem	66,83 ± 17,51	1,86	63,14 - 70,52	42,00	150,00	
Masa po koniec III trymestru ciąży (kg)	AA	81,24 ± 14,99	1,93	77,37 - 85,11	50,00	139,00	=0,804
	AG	83,58 ± 19,87	3,57	76,29 - 90,87	55,00	157,00	
	GG	80,40 ± 18,23	8,15	57,77 - 103,03	64,00	110,00	
	Ogółem	81,95 ± 16,72	1,71	78,57 - 85,34	50,00	157,00	
Liczba przebytych ciąży	AA	1,57 ± 0,97	0,12	1,32 - 1,82	1,00	6,00	=0,177
	AG	1,56 ± 0,80	0,14	1,27 - 1,85	1,00	4,00	
	GG	2,40 ± 1,67	0,75	0,32 - 4,48	1,00	5,00	
	Ogółem	1,61 ± 0,97	0,10	1,42 - 1,81	1,00	6,00	
Tydzień zakończenia ciąży (t. c.)	AA	33,54 ± 4,23	0,54	32,46 - 34,62	19,00	40,00	=0,522
	AG	33,81 ± 3,31	0,59	32,59 - 35,02	27,00	40,00	
	GG	35,60 ± 2,41	1,08	32,61 - 38,59	33,00	38,00	
	Ogółem	33,73 ± 3,88	0,39	32,95 - 34,51	19,00	40,00	
Masa urodzeniowa noworodka (g)	AA	1931,16±845,98	113,05	1704,61 - 2157,71	620,00	3940,00	=0,647
	AG	1937,79±752,18	139,68	1651,68 - 2223,91	705,00	3750,00	
	GG	1575,00±1133,14	506,75	168,02 - 2981,98	630,00	3470,00	
	Ogółem	1913,51 ± 827,53	87,23	1740,19 - 2086,83	620,00	3940,00	
Hemoglobina (mmol/L)	AA	8,18 ± 2,22	0,28	7,61 - 8,75	4,70	15,30	=0,131
	AG	7,5 ± 1,88	0,34	6,56 - 7,94	0,90	12,90	
	GG	7,89 ± 0,43	0,19	7,36 - 8,41	7,30	8,40	
	Ogółem	7,87 ± 2,09	0,21	7,44 - 8,29	0,90	15,30	
Hematokryt (L/L)	AA	0,35 ± 0,05	0,01	0,34 - 0,37	0,20	0,45	=0,264
	AG	0,34 ± 0,034	0,01	0,33 - 0,35	0,26	0,39	
	GG	0,36 ± 0,02	0,01	0,34 - 0,38	0,35	0,39	
	Ogółem	0,35 ± 0,04	0,00	0,34 - 0,36	0,20	0,45	
Płytki krwi (g/L)	AA	201,25 ± 72,50	9,28	182,69 - 219,82	69,00	398,00	=0,577
	AG	201,35 ± 60,19	10,81	179,28 - 223,43	47,00	309,00	
	GG	168,20 ± 66,71	29,83	85,37 - 251,03	91,00	237,00	
	Ogółem	199,58 ± 68,24	6,93	185,83 - 213,34	47,00	398,00	

Mocznik (mg/dL)	AA	30,72 ± 12,38	1,63	27,46 - 33,97	12,57	68,26	=0,529
	AG	29,07 ± 17,46	3,19	22,56 - 35,59	14,20	92,52	
	GG	36,79 ± 14,04	6,28	19,35 - 54,23	26,40	58,57	
	Ogółem	30,51 ± 14,23	1,48	27,58 - 33,44	12,57	92,52	
Kwas moczowy (mg/dL)	AA	6,66 ± 1,35	0,18	6,30 - 7,01	3,57	10,48	=0,927
	AG	6,61 ± 1,28	0,23	6,13 - 7,09	4,42	9,43	
	GG	6,42 ± 1,55	0,70	4,49 - 8,35	4,83	8,73	
	Ogółem	6,63 ± 1,32	0,14	6,36 - 6,90	3,57	10,48	
Białko całkowite (g/dL)	AA	5,76 ± 0,75	0,10	5,56 - 5,96	4,28	8,76	=0,064
	AG	5,65 ± 0,64	0,12	5,41 - 5,89	4,24	7,29	
	GG	4,94 ± 1,17	0,52	3,49 - 6,39	2,90	5,80	
	Ogółem	5,68 ± 0,76	0,08	5,52 - 5,83	2,90	8,76	
Białkomocz (mg/dL)	AA	312,30 ± 192,12	24,60	263,09 - 361,50	75,00	500,00	=0,790
	AG	286,72 ± 193,13	34,14	217,09 - 356,35	75,00	500,00	
	GG	275,00 ± 207,67	92,87	17,15 - 532,85	75,00	500,00	
	Ogółem	302,04 ± 191,60	19,35	263,63 - 340,45	75,00	500,00	
Masa łożyska (g)	AA	432,72 ± 212,92	28,20	376,22 - 489,22	150,00	1300,00	=0,711
	AG	468,33 ± 143,58	26,21	414,72 - 521,95	200,00	1010,00	
	GG	452,00 ± 185,26	82,85	221,97 - 682,03	290,00	750,00	
	Ogółem	445,38 ± 190,40	19,85	405,95 - 484,81	150,00	1300,00	
pH żyłne	AA	7,26 ± 0,11	0,01	7,23 - 7,29	6,69	7,40	=0,385
	AG	7,29 ± 0,05	0,01	7,27 - 7,31	7,13	7,37	
	GG	7,26 ± 0,11	0,05	7,13 - 7,39	7,08	7,34	
	Ogółem	7,27 ± 0,10	0,01	7,25 - 7,29	6,69	7,40	
pH tętnicze	AA	7,24 ± 0,10	0,01	7,21 - 7,26	6,80	7,35	=0,102
	AG	7,28 ± 0,06	0,01	7,26 - 7,30	7,08	7,42	
	GG	7,23 ± 0,10	0,04	7,11 - 7,35	7,07	7,31	
	Ogółem	7,25 ± 0,09	0,01	7,23 - 7,27	6,80	7,42	
Dawka metyldopy (mg)	AA	1602,46±641,25	82,10	1438,23-1766,69	250,00	3000,00	=0,194
	AG	1382,81±487,69	86,21	1206,98-1558,64	500,00	2000,00	
	GG	1700,00±447,21	200,00	1144,71-2255,29	1000,00	2000,00	
	Ogółem	1535,71±592,04	59,81	1417,01-1654,41	250,00	3000,00	

Tabela 33. Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie kontrolnej.

<i>Analizowana zmienna</i>	<i>Genotyp 2756A>G MTR</i>	<i>Średnia±SD</i>	<i>SEM</i>	<i>95% P.U.</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>p</i>
<i>Ciśnienie skurczowe (mmHg)</i>	AA	108,80 ± 11,41	1,28	106,24 - 111,35	90,00	140,00	=0,807
	AG	108,24 ± 12,09	1,99	104,21 - 112,27	90,00	130,00	
	GG	105,00 ± 12,91	6,45	84,46 - 125,54	90,00	120,00	
	Ogółem	108,50 ± 11,59	1,06	106,41 - 110,59	90,00	140,00	
<i>Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)</i>	AA	66,77 ± 8,99	1,01	64,76 - 68,79	50,00	90,00	=0,225
	AG	69,73 ± 8,89	1,46	66,76 - 72,69	60,00	90,00	
	GG	65,00 ± 12,91	6,45	44,46 - 85,54	50,00	80,00	
	Ogółem	67,63 ± 9,12	0,83	65,98 - 69,27	50,00	90,00	
<i>Wiek (lata)</i>	AA	29,29 ± 4,51	0,51	28,28 - 30,30	18,00	42,00	=0,140
	AG	27,46 ± 5,15	0,85	25,74 - 29,18	19,00	37,00	
	GG	29,75 ± 4,11	2,06	23,21 - 36,29	25,00	35,00	
	Ogółem	28,74 ± 4,75	0,43	27,88 - 29,60	18,00	42,00	
<i>Wzrost (cm)</i>	AA	167,80 ± 5,14	0,58	166,65 - 168,95	150,00	180,00	=0,313
	AG	166,35 ± 4,60	0,76	164,82 - 167,89	159,00	178,00	
	GG	168,50 ± 4,73	2,36	160,98 - 176,02	165,00	175,00	
	Ogółem	167,38 ± 4,98	0,45	166,48 - 168,28	150,00	180,00	
<i>Masa przed ciążą (kg)</i>	AA	60,43 ± 8,99	1,01	58,42 - 62,44	40,00	90,00	=0,979
	AG	60,08 ± 10,56	1,74	56,56 - 63,60	47,00	97,00	
	GG	60,75 ± 6,90	3,45	49,77 - 71,73	55,00	70,00	
	Ogółem	60,33 ± 9,38	0,86	58,64 - 62,03	40,00	97,00	
<i>Masa po koniec III trymestru ciąży (kg)</i>	AA	75,61 ± 10,11	1,13	73,34 - 77,87	52,00	106,00	=0,794
	AG	75,14 ± 11,51	1,89	71,30 - 78,97	54,00	105,00	
	GG	72,00 ± 11,34	5,67	53,95 - 90,05	57,00	83,00	
	Ogółem	75,34 ± 10,52	0,96	73,44 - 77,24	52,00	106,00	
<i>Liczba przebytych ciąż</i>	AA	1,57 ± 0,80	0,09	1,39 - 1,75	1,00	6,00	=0,367
	AG	1,57 ± 0,80	0,13	1,30 - 1,83	1,00	4,00	
	GG	1,00 ± 0,00	0,00	1,00 - 1,00	1,00	1,00	
	Ogółem	1,55 ± 0,79	0,07	1,41 - 1,69	1,00	6,00	
<i>Tydzień zakończenia ciąży (t. c.)</i>	AA	39,18 ± 1,31	0,15	38,88 - 39,47	37,00	42,00	=0,031
	AG	39,08 ± 1,06	0,17	38,73 - 39,44	37,00	41,00	
	GG	37,50 ± 0,58	0,29	36,58 - 38,42	37,00	38,00	

	Ogółem	39,09 ± 1,25	0,11	38,87 - 39,32	37,00	42,00	
Masa urodzeniowa noworodka (g)	AA	3474,44±436,24	49,08	3376,73-3572,16	2770,00	4640,00	=0,599
	AG	3430,00±340,54	55,98	3316,46-3543,54	2560,00	4210,00	
	GG	3285,00±224,57	112,29	2927,65-3642,35	2960,00	3440,00	
	Ogółem	3454,43±403,12	36,80	3381,56-3527,29	2560,00	4640,00	
Hemoglobina (mmol/L)	AA	6,76 ± 0,78	0,09	6,59 - 6,93	4,92	8,80	=0,008
	AG	6,77 ± 0,70	0,12	6,53 - 7,00	5,30	8,04	
	GG	5,52 ± 1,10	0,55	3,78 - 7,27	4,50	6,67	
	Ogółem	6,72 ± 0,79	0,07	6,58 - 6,86	4,50	8,80	
Hematokryt (L/L)	AA	0,79 ± 4,01	0,45	0,11 - 1,69	0,23	36,00	=0,755
	AG	0,32 ± 0,03	0,01	0,31 - 0,33	0,26	0,40	
	GG	0,26 ± 0,04	0,02	0,19 - 0,33	0,22	0,30	
	Ogółem	0,63 ± 3,26	0,30	0,04 - 1,22	0,22	36,00	
Płytki krwi (g/L)	AA	210,95 ± 62,99	7,09	196,84 - 225,06	9,10	381,00	=0,818
	AG	207,78 ± 50,22	8,26	191,04 - 224,53	114,00	362,00	
	GG	192,65 ± 53,60	26,80	107,36 - 277,94	129,00	244,20	
	Ogółem	209,37 ± 58,72	5,36	198,75 - 219,98	9,10	381,00	

Ponadto, dokonano porównania wartości parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy genotypami polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie z umiarkowaną postacią PE (Tabela 34) oraz w grupie z ciężką postacią PE (Tabela 35). W grupie z umiarkowaną postacią PE u nosicielek genotypu 2756GG stwierdzono obniżony poziom białka całkowitego o znaczeniu istotnym statystycznie ($p=0,022$). Analiza pozostałych parametrów klinicznych i biochemicznych tej grupy nie wykazała różnic na poziomie istotności statystycznej. W grupie z ciężką postacią PE genotyp 2756GG związany był z obniżonym pH żylnym oraz tętnicznym o wartości istotnej statystycznie (odpowiednio $p=0,049$ i $p=0,014$).

Tabela 34. Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie z umiarkowaną postacią PE.

<i>Analizowana zmienna</i>	<i>Genotyp 2756A>G MTR</i>	<i>Średnia±SD</i>	<i>SEM</i>	<i>95% P.U.</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>p</i>
<i>Ciśnienie skurczowe (mmHg)</i>	AA	169,19 ± 20,82	3,74	161,56 - 176,83	140,00	220,00	=0,159
	AG	160,56 ± 22,09	5,21	149,57 - 171,54	120,00	210,00	
	GG	183,33 ± 15,28	8,82	145,39 - 221,28	170,00	200,00	
	Ogółem	167,02 ± 21,45	2,97	161,05 - 172,99	120,00	220,00	
<i>Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)</i>	AA	105,97 ± 11,29	2,03	101,83 - 110,11	90,00	120,00	=0,215
	AG	98,61 ± 17,97	4,24	89,67 - 107,55	70,00	140,00	
	GG	105,00 ± 13,23	7,64	72,14 - 137,86	95,00	120,00	
	Ogółem	103,37 ± 14,20	1,97	99,41 - 107,32	70,00	140,00	
<i>Wiek (lata)</i>	AA	29,90 ± 5,6	1,01	27,84 - 31,97	18,00	39,00	=0,185
	AG	32,82 ± 5,62	1,36	29,94 - 35,71	24,00	43,00	
	GG	33,33 ± 5,13	2,96	20,59 - 46,08	29,00	39,00	
	Ogółem	31,08 ± 5,68	0,80	29,48 - 32,68	18,00	43,00	
<i>Wzrost (cm)</i>	AA	166,42 ± 6,14	1,10	164,17 - 168,67	150,00	176,00	=0,592
	AG	164,24 ± 9,86	2,39	159,17 - 169,30	140,00	180,00	
	GG	164,00 ± 4,00	2,31	154,06 - 173,94	160,00	168,00	
	Ogółem	165,55 ± 7,45	1,04	163,45 - 167,64	140,00	180,00	
<i>Masa przed ciążą (kg)</i>	AA	68,76 ± 17,55	3,26	62,08 - 75,43	50,00	128,00	=0,997
	AG	69,13 ± 26,05	6,51	55,24 - 83,01	42,00	150,00	
	GG	68,33 ± 18,93	10,93	21,31 - 115,36	55,00	90,00	
	Ogółem	68,85 ± 20,38	2,94	62,94 - 74,77	42,00	150,00	
<i>Masa po koniec III trymestru ciąży (kg)</i>	AA	81,11 ± 15,89	2,85	75,28 - 86,94	50,00	139,00	=0,826
	AG	84,65 ± 24,90	6,04	71,84 - 97,45	55,00	157,00	
	GG	84,33 ± 22,28	12,86	28,99 - 139,68	70,00	110,00	
	Ogółem	82,48 ± 19,31	2,70	77,065 - 87,91	50,00	157,00	
<i>Liczba przebytych ciąż</i>	AA	1,68 ± 1,17	0,21	1,25 - 2,11	1,00	6,00	=0,051
	AG	1,72 ± 0,89	0,21	1,28 - 2,17	1,00	4,00	
	GG	3,33 ± 1,53	0,88	0,46 - 7,13	2,00	5,00	
	Ogółem	1,79 ± 1,14	0,16	1,47 - 2,11	1,00	6,00	
<i>Tydzień zakończenia ciąży (t. c.)</i>	AA	35,55 ± 3,30	0,59	34,34 - 36,76	27,00	40,00	=0,633
	AG	34,71 ± 3,02	0,73	33,16 - 36,26	28,00	40,00	
	GG	36,00 ± 2,65	1,53	29,43 - 42,57	33,00	38,00	

	Ogółem	35,29 ± 3,15	0,44	34,41 - 36,18	27,00	40,00	
Masa urodzeniowa noworodka (g)	AA	1873,65 ± 873,82	171,37	1520,71 - 2226,60	620,00	3800,00	=0,387
	AG	1824,56 ± 684,43	171,11	1459,86 - 2189,27	705,00	3320,00	
	GG	1198,33 ± 516,78	298,36	85,41 - 2482,08	630,00	1640,00	
	Ogółem	1811,18 ± 796,02	118,66	1572,03 - 2050,33	620,00	3800,00	
Hemoglobina (mmol/L)	AA	8,15 ± 1,93	0,35	7,45 - 8,86	5,29	12,50	=0,324
	AG	7,38 ± 1,22	0,30	6,76 - 8,01	6,00	11,00	
	GG	7,80 ± 0,56	0,32	6,42 - 9,18	7,30	8,40	
	Ogółem	7,88 ± 1,69	0,24	7,40 - 8,35	5,29	12,50	
Hematokryt (L/L)	AA	0,36 ± 0,04	0,01	0,34 - 0,37	0,28	0,44	=0,438
	AG	0,34 ± 0,03	0,01	0,32 - 0,36	0,28	0,39	
	GG	0,36 ± 0,01	0,01	0,33 - 0,39	0,35	0,37	
	Ogółem	0,35 ± 0,04	0,01	0,34 - 0,36	0,28	0,44	
Płytki krwi (g/L)	AA	197,07 ± 76,77	13,79	168,91 - 225,23	82,00	398,00	=0,759
	AG	201,30 ± 69,75	16,92	165,44 - 237,16	47,00	309,00	
	GG	166,67 ± 73,15	42,23	15,04 - 348,37	91,00	237,00	
	Ogółem	196,69 ± 73,27	10,26	176,09 - 217,30	47,00	398,00	
Mocznik (mg/dL)	AA	31,02 ± 13,87	2,57	25,75 - 36,30	12,57	68,26	=0,896
	AG	29,06 ± 18,47	4,62	19,22 - 38,90	15,20	92,52	
	GG	32,46 ± 9,51	5,49	8,84 - 56,08	26,40	43,42	
	Ogółem	30,46 ± 15,11	2,18	26,07 - 34,85	12,57	92,52	
Kwas moczowy (mg/dL)	AA	6,45 ± 1,53	0,28	5,86 - 7,03	3,57	10,48	=0,935
	AG	6,29 ± 1,05	0,26	5,73 - 6,84	4,82	8,17	
	GG	6,42 ± 2,05	1,18	1,33 - 11,51	4,83	8,73	
	Ogółem	6,39 ± 1,39	0,20	5,99 - 6,79	3,57	10,48	
Białko całkowite (g/dL)	AA	5,91 ± 0,85	0,16	5,58 - 6,23	4,28	8,76	=0,022
	AG	5,68 ± 0,58	0,14	5,37 - 5,99	4,88	7,29	
	GG	4,52 ± 1,42	0,82	0,99 - 8,04	2,90	5,55	
	Ogółem	5,74 ± 0,86	0,12	5,50 - 5,99	2,90	8,76	
Białkomocznik (mg/dL)	AA	130,65 ± 66,99	12,03	106,07 - 155,22	75,00	300,00	=0,847
	AG	120,83 ± 37,62	8,87	102,12 - 139,54	75,00	150,00	
	GG	125,00 ± 43,30	25,00	17,43 - 232,57	75,00	150,00	
	Ogółem	126,92 ± 56,63	7,85	111,16 - 142,69	75,00	300,00	
Masa łożyska (g)	AA	525,00 ± 246,60	46,60	429,38 - 620,62	150,00	1300,00	=0,890
	AG	526,88 ± 142,25	35,56	451,07 - 602,68	390,00	1010,00	

	GG	463,33 ± 250,07	144,38	157,87 - 1084,53	290,00	750,00	
	Ogółem	521,70±212,72	31,03	459,25 - 584,16	150,00	1300,00	
<i>pH żyłne</i>	AA	7,27 ± 0,13	0,02	7,22 - 7,32	6,69	7,37	=0,702
	AG	7,28 ± 0,06	0,02	7,25 - 7,31	7,13	7,37	
	GG	7,32 ± 0,02	0,01	7,29 - 7,36	7,31	7,34	
	Ogółem	7,28 ± 0,11	0,02	7,24 - 7,31	6,69	7,37	
<i>pH tętnicze</i>	AA	7,24 ± 0,12	0,02	7,19 - 7,28	6,80	7,35	=0,448
	AG	7,27 ± 0,07	0,02	7,23 - 7,31	7,08	7,42	
	GG	7,29 ± 0,02	0,01	7,24 - 7,34	7,27	7,31	
	Ogółem	7,25 ± 0,10	0,01	7,22 - 7,28	6,80	7,42	
<i>Dawka metyldopy (mg)</i>	AA	1467,74±587,16	105,46	1252,37 - 1683,11	250,00	3000,00	=0,748
	AG	1402,78±529,56	124,82	1139,43-1666,12	500,00	2000,00	
	GG	1666,67±577,35	333,33	232,45 - 3100,88	1000,00	2000,00	
	Ogółem	1456,73±559,50	77,59	1300,96 - 1612,50	250,00	3000,00	

Tabela 35. Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie z ciężką postacią PE.

<i>Analizowana zmienna</i>	<i>Genotyp 2756A>G MTR</i>	<i>Średnia±SD</i>	<i>SEM</i>	<i>95% P.U.</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>p</i>
<i>Ciepłota skurczowe (mmHg)</i>	AA	177,33 ± 21,72	3,97	169,22 - 185,45	140,00	220,00	=0,422
	AG	175,00 ± 16,05	4,29	165,73 - 184,27	150,00	200,00	
	GG	195,00 ± 7,07	5,00	131,47 - 258,53	190,00	200,00	
	Ogółem	177,39 ± 19,88	2,93	171,49 - 183,30	140,00	220,00	
<i>Ciepłota rozkurczowe (mmHg)</i>	AA	109,50 ± 15,11	2,76	103,86 - 115,14	90,00	160,00	=0,865
	AG	107,14 ± 10,69	2,86	100,97 - 113,32	90,00	120,00	
	GG	110,00 ± 14,14	10,00	17,06 - 237,06	100,00	120,00	
	Ogółem	108,80 ± 13,63	2,01	104,76 - 112,85	90,00	160,00	
<i>Wiek (lata)</i>	AA	29,23 ± 4,55	0,83	27,54 - 30,93	21,00	40,00	=0,443
	AG	27,71 ± 6,16	1,65	24,16 - 31,27	21,00	45,00	
	GG	32,00 ± 1,41	1,00	19,29 - 44,71	31,00	33,00	
	Ogółem	28,89 ± 5,03	0,74	27,40 - 30,38	21,00	45,00	
<i>Wzrost (cm)</i>	AA	164,46 ± 4,85	0,92	162,58 - 166,34	156,00	175,00	=0,122
	AG	166,14 ± 6,78	1,81	162,23 - 170,06	157,00	175,00	
	GG	157,50 ± 3,54	2,50	125,73 - 189,27	155,00	160,00	
	Ogółem	164,68 ± 5,66	0,85	162,96 - 166,40	155,00	175,00	

Masa przed ciążą (kg)	AA	64,76 ± 14,05	2,81	58,96 - 70,56	45,00	100,00	=0,979
	AG	64,14 ± 12,02	3,21	57,20 - 71,08	50,00	93,00	
	GG	63,00 ± 19,80	14,00	114,89 - 240,89	49,00	77,00	
	Ogółem	64,46 ± 13,25	2,07	60,28 - 68,64	45,00	100,00	
Masa po koniec III trymestru ciąży (kg)	AA	81,38 ± 14,23	2,64	75,97 - 86,79	55,00	115,00	=0,752
	AG	82,29 ± 12,03	3,21	75,34 - 89,23	62,00	105,00	
	GG	74,500 ± 14,85	10,50	58,92 - 207,92	64,00	85,00	
	Ogółem	81,36 ± 13,38	1,99	77,34 - 85,38	55,00	115,00	
Liczba przebytych ciąż	AA	1,47 ± 0,73	0,13	1,19 - 1,74	1,00	4,00	=0,616
	AG	1,36 ± 0,63	0,17	0,99 - 1,72	1,00	3,00	
	GG	1,00 ± 0,00	0,00	1,00 - 1,00	1,00	1,00	
	Ogółem	1,41 ± 0,69	0,10	1,21 - 1,62	1,00	4,00	
Tydzień zakończenia ciąży (t. c.)	AA	31,47 ± 4,12	0,75	29,93 - 33,00	19,00	40,00	=0,339
	AG	32,71 ± 3,43	0,92	30,73 - 34,69	27,00	39,00	
	GG	35,00 ± 2,83	2,00	9,59 - 60,41	33,00	37,00	
	Ogółem	32,00 ± 3,90	0,58	30,84 - 33,16	19,00	40,00	
Masa urodzeniowa noworodka (g)	AA	1981,00 ± 832,79	152,05	1670,03 - 2291,97	760,00	3940,00	=0,927
	AG	2077,15 ± 834,53	231,46	1572,85 - 2581,46	780,00	3750,00	
	GG	2140,00 ± 1880,90	1330,00	14759,25 - 19039,25	810,00	3470,00	
	Ogółem	2015,84 ± 854,45	127,37	1759,14 - 2272,55	760,00	3940,00	
Hemoglobina (mmol/L)	AA	8,21 ± 2,52	0,46	7,26 - 9,15	4,70	15,30	=0,387
	AG	7,09 ± 2,50	0,67	5,64 - 8,53	0,90	12,90	
	GG	8,02 ± 0,22	0,16	6,05 - 9,98	7,86	8,17	
	Ogółem	7,86 ± 2,49	0,37	7,12 - 8,59	0,90	15,30	
Hematokryt (L/L)	AA	0,35 ± 0,05	0,01	0,33 - 0,37	0,20	0,45	=0,516
	AG	0,34 ± 0,04	0,01	0,32 - 0,36	0,26	0,39	
	GG	0,38 ± 0,02	0,02	0,18 - 0,57	0,36	0,39	
	Ogółem	0,35 ± 0,05	0,01	0,33 - 0,36	0,20	0,45	
Płytki krwi (g/L)	AA	205,58 ± 68,85	12,57	179,87 - 231,29	69,00	339,00	=0,752
	AG	201,42 ± 48,70	13,01	173,30 - 229,54	81,00	259,90	
	GG	170,50 ± 84,15	59,50	585,52 - 926,52	111,00	230,00	
	Ogółem	202,79 ± 62,84	9,27	184,12 - 221,45	69,00	339,00	
Mocznik (mg/dL)	AA	30,41 ± 10,93	2,03	26,25 - 34,57	14,70	46,40	=0,380
	AG	29,09 ± 16,92	4,52	19,32 - 38,86	14,20	81,60	
	GG	43,29 ± 21,62	15,29	15,09 - 23,75	28,00	58,57	

	Ogółem	30,57 ± 13,39	2,00	26,55 - 34,60	14,20	81,60	
Kwas moczowy (mg/dL)	AA	6,87 ± 1,12	0,21	6,44 - 7,30	4,60	9,00	=0,836
	AG	6,98 ± 1,45	0,39	6,14 - 7,81	4,42	9,43	
	GG	6,43 ± 1,13	0,80	3,74 - 16,60	5,63	7,23	
	Ogółem	6,88 ± 1,21	0,18	6,52 - 7,25	4,42	9,43	
Białko całkowite (g/dL)	AA	5,60 ± 0,62	0,12	5,36 - 5,84	4,29	7,50	=0,993
	AG	5,62 ± 0,72	0,19	5,21 - 6,03	4,24	6,68	
	GG	5,57 ± 0,33	0,23	2,65 - 8,49	5,34	5,80	
	Ogółem	5,61 ± 0,63	0,09	5,42 - 5,80	4,24	7,50	
Białkomocz (mg/dL)	AA	500,00 ± 0,00	0,00	500,00 - 500,00	500,00	500,00	-
	AG	500,00 ± 0,00	0,00	500,00 - 500,00	500,00	500,00	
	GG	500,00 ± 0,00	0,00	500,00 - 500,00	500,00	500,00	
	Ogółem	500,00 ± 0,00	0,00	500,00 - 500,00	500,00	500,00	
Masa łożyska (g)	AA	343,62 ± 123,67	22,97	296,58 - 390,66	160,00	750,00	=0,254
	AG	401,43 ± 116,61	31,17	334,10 - 468,76	200,00	600,00	
	GG	435,00 ± 106,07	75,00	517,97 - 1387,97	360,00	510,00	
	Ogółem	365,67 ± 122,28	18,23	328,93 - 402,40	160,00	750,00	
pH żyłne	AA	7,25 ± 0,09	0,02	7,21 - 7,28	7,03	7,40	=0,049
	AG	7,30 ± 0,05	0,01	7,27 - 7,32	7,24	7,36	
	GG	7,17 ± 0,12	0,09	6,09 - 8,25	7,08	7,25	
	Ogółem	7,26 ± 0,08	0,01	7,23 - 7,28	7,03	7,40	
pH tętnicze	AA	7,23 ± 0,08	0,01	7,21 - 7,26	6,98	7,34	=0,014
	AG	7,28 ± 0,03	0,01	7,26 - 7,30	7,23	7,34	
	GG	7,15 ± 0,11	0,08	6,19 - 8,10	7,07	7,22	
	Ogółem	7,24 ± 0,07	0,01	7,22 - 7,27	6,98	7,34	
Dawka metyldopy (mg)	AA	1741,67 ± 674,29	123,11	1489,88 - 1993,45	500,00	3000,00	=0,154
	AG	1357,14 ± 446,29	119,28	1099,46 - 1614,82	750,00	2000,00	
	GG	1750,00 ± 353,55	250,00	1426,55 - 4926,55	1500,00	2000,00	
	Ogółem	1625,00 ± 620,82	91,53	1440,64 - 1809,36	500,00	3000,00	

4.6. Porównanie parametrów klinicznych i biochemicznych oraz ich związek z genotypami badanego polimorfizmu 66A>G genu *MTRR*

W tabeli 36 i 37 przedstawiono porównanie wartości niektórych parametrów klinicznych i laboratoryjnych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* odpowiednio w grupie badanej oraz kontrolnej. W grupie badanej nosicielki genotypu prawidłowego odznaczały się nieznacznie wyższymi wartościami ciśnienia skurczowego oraz niższymi wartościami ciśnienia rozkurczowego. W analizie grupy badanej stwierdzono wyższy poziom płytek krwi a także niższy poziom mocznika u ciężarnych o genotypie 66AA *MTRR* w porównaniu z pozostałymi genotypami. Różnice te nie okazały się być istotne statystycznie. Ponadto genotyp zmutowany 66GG *MTRR* korelował z wyższymi dawkami zażywanej metyldopy oraz niższą masą urodzeniową noworodka i wyższą masą łożyska w grupie badanej. Jednak również w tym zakresie nie wykazano istotności statystycznej. W grupie kontrolnej analiza wariancji ANOVA również nie wykazała zależności na poziomie istotności statystycznej.

Tabela 36. Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie badanej.

<i>Analizowana zmienna</i>	<i>Genotyp 66A>G MTRR</i>	<i>Średnia±SD</i>	<i>SEM</i>	<i>95% P.U.</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>p</i>
<i>Ciśnienie skurczowe (mmHg)</i>	AA	176,00±30,98387	9,80	153,84 - 198,16	120,00	220,00	=0,703
	AG	172,61 ± 19,49	2,87	166,82 - 178,40	140,00	220,00	
	GG	170,12 ± 20,85	3,22	163,62 - 176,62	140,00	220,00	
	Ogółem	171,89 ± 21,27	2,15	167,62 - 176,15	120,00	220,00	
<i>Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)</i>	AA	100,00 ± 10,54	3,33	92,46 - 107,54	90,00	120,00	=0,373
	AG	106,30 ± 13,39	1,97	102,33 - 110,28	70,00	140,00	
	GG	106,90 ± 15,54	2,40	102,06 - 111,75	90,00	160,00	
	Ogółem	105,92 ± 14,13	1,43	103,09 - 108,75	70,00	160,00	
<i>Wiek (lata)</i>	AA	30,00 ± 6,67	2,11	25,23 - 34,77	23,00	43,00	=0,455
	AG	29,35 ± 5,36	0,79	27,76 - 30,94	18,00	42,00	
	GG	30,83 ± 5,31	0,83	29,15 - 32,51	21,00	45,00	
	Ogółem	30,04 ± 5,47	0,55	28,94 - 31,14	18,00	45,00	
<i>Wzrost (cm)</i>	AA	163,70 ± 7,01	2,22	158,69 - 168,71	150,00	173,00	=0,466
	AG	164,61 ± 7,21	1,09	162,42 - 166,81	140,00	176,00	
	GG	166,07 ± 5,98	0,93	164,19 - 167,96	149,00	180,00	

	Ogółem	165,15 ± 6,66	0,68	163,79 - 166,50	140,00	180,00	
Masa przed ciążą (kg)	AA	68,25 ± 13,14	4,65	57,26 - 79,24	55,00	93,00	=0,898
	AG	65,95 ± 19,40	2,96	59,98 - 71,92	45,00	150,00	
	GG	67,53 ± 16,34	2,65	62,15 - 72,90	42,00	128,00	
	Ogółem	66,83 ± 17,51	1,86	63,14 - 70,52	42,00	150,00	
Masa po koniec III trymestru ciąży (kg)	AA	82,60 ± 17,80	5,63	69,87 - 95,33	50,00	105,00	=0,934
	AG	81,28 ± 17,79	2,65	75,93 - 86,62	55,00	157,00	
	GG	82,54 ± 15,60	2,44	77,61 - 87,46	56,00	139,00	
	Ogółem	81,95 ± 16,72	1,71	78,57 - 85,34	50,00	157,00	
Liczba przebytych ciąż	AA	2,00 ± 0,94	0,30	1,33 - 2,67	1,00	4,00	=0,166
	AG	1,43 ± 0,89	0,13	1,17 - 1,70	1,00	6,00	
	GG	1,71 ± 1,04	0,16	1,39 - 2,04	1,00	5,00	
	Ogółem	1,61 ± 0,97	0,10	1,42 - 1,81	1,00	6,00	
Tydzień zakończenia ciąży (t. c.)	AA	33,60 ± 3,06	0,97	31,41- 35,79	29,00	39,00	=0,623
	AG	33,36 ± 4,58	0,68	31,98 - 34,73	19,00	40,00	
	GG	34,17 ± 3,22	0,50	33,16 - 35,17	27,00	39,00	
	Ogółem	33,73 ± 3,88	0,39	32,95 - 34,51	19,00	40,00	
Masa urodzeniowa noworodka (g)	AA	1873,33±1017,04	339,01	1091,57-2655,10	630,00	3620,00	=0,171
	AG	2079,95 ± 810,37	123,58	1830,56-2329,35	670,00	3940,00	
	GG	1734,68 ± 782,75	126,98	1477,40-1991,97	620,00	3470,00	
	Ogółem	1913,51 ± 827,53	87,23	1740,19-2086,83	620,00	3940,00	
Hemoglobina (mmol/L)	AA	7,74 ± 0,94	0,30	7,07 - 8,41	6,31	9,20	=0,910
	AG	7,80 ± 1,75	0,26	7,27 - 8,32	5,29	13,60	
	GG	7,97 ± 2,60	0,40	7,16 - 8,78	0,90	15,30	
	Ogółem	7,87 ± 2,09	0,21	7,44 - 8,29	0,90	15,30	
Hematokryt (L/L)	AA	0,37 ± 0,05	0,01	0,33 - 0,40	0,29	0,45	=0,384
	AG	0,35 ± 0,03	0,01	0,34 - 0,36	0,26	0,42	
	GG	0,35 ± 0,05	0,01	0,33 - 0,36	0,20	0,44	
	Ogółem	0,35 ± 0,04	0,00	0,34 - 0,36	0,20	0,45	
Płytki krwi (g/L)	AA	237,19 ± 72,39	22,89	185,41 - 288,97	170,00	398,00	=0,112
	AG	188,23 ± 56,37	8,40	171,29 - 205,17	81,00	292,00	
	GG	202,79 ± 76,46	11,80	178,97 - 226,62	47,00	352,00	
	Ogółem	199,58 ± 68,24	6,93	185,83 - 213,34	47,00	398,00	
Mocznik (mg/dL)	AA	26,29 ± 9,82	3,10	19,26 - 33,31	12,57	42,78	=0,319
	AG	29,29 ± 11,49	1,75	25,76 - 32,83	14,30	68,26	

	GG	32,88 ± 17,35	2,74	27,33 - 38,43	14,20	92,52	
	Ogółem	30,51 ± 14,23	1,48	27,58 - 33,44	12,57	92,52	
Kwas moczowy (mg/dL)	AA	6,99 ± 1,84	0,58	5,67 - 8,30	3,57	9,43	=0,017
	AG	6,21 ± 1,18	0,18	5,85 - 6,57	4,42	9,00	
	GG	6,99 ± 1,22	0,19	6,60 - 7,38	4,41	10,48	
	Ogółem	6,63 ± 1,32	0,14	6,36 - 6,90	3,57	10,48	
Białko całkowite (g/dL)	AA	5,84 ± 0,49	0,16	5,46 - 6,22	4,88	6,53	=0,636
	AG	5,61 ± 0,80	0,12	5,36 - 5,85	4,28	8,76	
	GG	5,72 ± 0,77	0,12	5,47 - 5,96	2,90	7,29	
	Ogółem	5,68 ± 0,76	0,08	5,52 - 5,83	2,90	8,76	
Białkomocz (mg/dL)	AA	297,50 ± 182,75	57,79	166,77 - 428,23	75,00	500,00	=0,586
	AG	322,83 ± 192,49	28,38	265,66 - 379,99	75,00	500,00	
	GG	280,36 ± 194,63	30,03	219,71 - 341,01	75,00	500,00	
	Ogółem	302,04 ± 191,60	19,35	263,63 - 340,45	75,00	500,00	
Masa łożyska (g)	AA	407,00 ± 179,07	56,63	278,90 - 535,10	200,00	840,00	=0,740
	AG	441,90 ± 170,24	26,27	388,85 - 494,96	200,00	900,00	
	GG	458,63 ± 214,83	33,97	389,92 - 527,33	150,00	1300,00	
	Ogółem	445,38 ± 190,40	19,85	405,95 - 484,81	150,00	1300,00	
pH żyłne	AA	7,25 ± 0,06	0,02	7,20 - 7,29	7,09	7,31	=0,779
	AG	7,27 ± 0,11	0,02	7,23 - 7,30	6,69	7,37	
	GG	7,27 ± 0,09	0,01	7,24 - 7,30	7,03	7,40	
	Ogółem	7,27 ± 0,10	0,01	7,25 - 7,29	6,69	7,40	
pH tętnicze	AA	7,26 ± 0,04	0,01	7,23 - 7,29	7,20	7,32	=0,889
	AG	7,25 ± 0,09	0,01	7,22 - 7,28	6,80	7,34	
	GG	7,25 ± 0,09	0,01	7,22 - 7,28	6,98	7,42	
	Ogółem	7,25 ± 0,09	0,01	7,23 - 7,27	6,80	7,42	
Dawka metyldopy (mg)	AA	1375,00±580,35	183,52	959,84 - 1790,16	750,00	2000,00	=0,551
	AG	1516,30±546,20	80,53	1354,10 - 1678,51	500,00	3000,00	
	GG	1595,24±646,17	99,71	1393,88 - 1796,60	250,00	3000,00	
	Ogółem	1535,71±592,04	59,81	1417,02 - 1654,41	250,00	3000,00	

Tabela 37. Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie kontrolnej.

Analizowana zmienna	Genotyp 66A>G MTRR	Średnia±SD	SEM	95% P.U.	Min	Max	p
----------------------------	------------------------------	-------------------	------------	-----------------	------------	------------	----------

Ciśnienie skurczowe (mmHg)	AA	111,82 ± 10,81	1,88	107,98 - 115,65	90,00	140,00	=0,115
	AG	107,95 ± 11,35	1,52	104,91 - 110,99	90,00	130,00	
	GG	105,97 ± 12,34	2,22	101,44 - 110,50	90,00	140,00	
	Ogółem	108,50 ± 11,59	1,06	106,41 - 110,59	90,00	140,00	
Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)	AA	69,55 ± 8,69	1,51	66,46 - 72,63	50,00	90,00	=0,330
	AG	67,23 ± 9,90	1,32	64,58 - 69,88	50,00	90,00	
	GG	66,29 ± 7,95	1,43	63,37 - 69,21	60,00	85,00	
	Ogółem	67,63 ± 9,12	0,83	65,98 - 69,27	50,00	90,00	
Wiek (lata)	AA	29,18 ± 5,31	0,92	27,30 - 31,07	19,00	42,00	=0,456
	AG	28,16 ± 3,99	0,53	27,09 - 29,23	18,00	37,00	
	GG	29,32 ± 5,38	0,97	27,35 - 31,30	20,00	41,00	
	Ogółem	28,74 ± 4,75	0,43	27,88 - 29,60	18,00	42,00	
Wzrost (cm)	AA	167,85 ± 4,94	0,86	166,10 - 169,60	160,00	180,00	=0,373
	AG	166,70 ± 4,62	0,62	165,46 - 167,93	159,00	177,00	
	GG	168,10 ± 5,61	1,01	166,04 - 170,16	150,00	178,00	
	Ogółem	167,38 ± 4,98	0,45	166,48 - 168,28	150,00	180,00	
Masa przed ciążą (kg)	AA	62,42 ± 10,33	1,80	58,76 - 66,09	52,00	97,00	=0,279
	AG	59,13 ± 8,41	1,12	56,87 - 61,38	40,00	82,00	
	GG	60,29 ± 9,89	1,78	56,66 - 63,92	46,00	92,00	
	Ogółem	60,33 ± 9,38	0,86	58,64 - 62,03	40,00	97,00	
Masa po koniec III trymestru ciąży (kg)	AA	77,88 ± 10,67	1,86	74,10 - 81,66	60,00	106,00	=0,215
	AG	73,82 ± 10,70	1,43	70,96 - 76,69	52,00	97,00	
	GG	75,39 ± 9,83	1,77	71,78 - 78,99	55,00	104,00	
	Ogółem	75,34 ± 10,52	0,96	73,44 - 77,24	52,00	106,00	
Liczba przebytych ciąż	AA	1,61 ± 0,93	0,16	1,28 - 1,94	1,00	4,00	=0,805
	AG	1,50 ± 0,54	0,07	1,36 - 1,64	1,00	3,00	
	GG	1,58 ± 0,99	0,18	1,22 - 1,94	1,00	6,00	
	Ogółem	1,55 ± 0,79	0,07	1,41 - 1,69	1,00	6,00	
Tydzień zakończenia ciąży (t. c.)	AA	39,18 ± 1,31	0,23	38,72 - 39,65	37,00	41,00	=0,788
	AG	39,11 ± 1,22	0,16	38,78 - 39,43	37,00	41,00	
	GG	38,97 ± 1,28	0,23	38,50 - 39,44	37,00	42,00	
	Ogółem	39,09 ± 1,25	0,11	38,87 - 39,32	37,00	42,00	
Masa urodzeniowa noworodka (g)	AA	3559,70 ± 435,74	75,85	3405,19 - 3714,20	2790,00	4500,00	=0,213
	AG	3413,59 ± 352,11	47,05	3319,29 - 3507,89	2770,00	4410,00	
	GG	3416,13 ± 444,94	79,91	3252,92 - 3579,33	2560,00	4640,00	

	Ogółem	3454,43 ± 403,12	36,80	3381,56-3527,29	2560,00	4640,00	
Hemoglobina (mmol/L)	AA	6,82 ± 0,68	0,12	6,58 - 7,07	4,99	7,98	=0,688
	AG	6,69 ± 0,71	0,10	6,50 - 6,88	5,21	8,80	
	GG	6,67 ± 1,01	0,18	6,30 - 7,04	4,50	8,15	
	Ogółem	6,72 ± 0,79	0,07	6,58 - 6,86	4,50	8,80	
Hematokryt (L/L)	AA	1,44 ± 6,21	1,08	0,76 - 3,64	0,23	36,00	=0,248
	AG	0,32 ± 0,03	0,00	0,31 - 0,33	0,25	0,42	
	GG	0,32 ± 0,05	0,01	0,30 - 0,34	,22	0,40	
	Ogółem	0,63 ± 3,26	0,30	0,04 - 1,22	0,22	36,00	
Płytki krwi (g/L)	AA	207,22 ± 55,02	9,58	187,70 - 226,73	114,00	381,00	=0,927
	AG	208,75 ± 65,96	8,81	191,08 - 226,41	9,10	362,00	
	GG	212,77 ± 49,54	8,90	194,60 - 230,94	129,00	368,00	
	Ogółem	209,37 ± 58,72	5,36	198,75 - 219,98	9,10	381,00	

Dokonano także porównania parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie z umiarkowaną postacią oraz w grupie z ciężką postacią PE (Tabela 38 i 39).

Nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie w parametrach klinicznych i biochemicznych pomiędzy genotypami polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie z umiarkowaną postacią PE. W analizie ciężkiej postaci choroby genotyp 66AA badanego genu związany był z większym wskaźnikiem liczby przeżytych ciąż. Różnica ta okazała się być istotna statystycznie ($p=0,002$) (Tabela 38 i 39).

Tabela 38. Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie z umiarkowaną postacią PE.

<i>Analizowana zmienna</i>	<i>Genotyp 66A>G MTRR</i>	<i>Średnia±SD</i>	<i>SEM</i>	<i>95% P.U.</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>p</i>
<i>Ciśnienie skurczowe (mmHg)</i>	AA	166,67 ± 34,45	14,06	130,52 - 202,82	120,00	210,00	=0,923
	AG	168,41 ± 20,32	4,33	159,40 - 177,42	140,00	220,00	
	GG	165,83 ± 19,54	3,99	157,58 - 174,09	140,00	200,00	
	Ogółem	167,02 ± 21,45	2,97	161,05 - 172,99	120,00	220,00	
<i>Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)</i>	AA	95,00 ± 8,37	3,42	86,22 - 103,78	90,00	110,00	=0,295
	AG	105,23 ± 15,85	3,38	98,20 - 112,25	70,00	140,00	
	GG	103,75 ± 13,45	2,75	98,07 - 109,43	90,00	130,00	
	Ogółem	103,37 ± 14,20	1,97	99,41 - 107,32	70,00	140,00	
<i>Wiek (lata)</i>	AA	29,50 ± 7,40	3,02	21,74 - 37,26	23,00	43,00	=0,673
	AG	30,82 ± 6,29	1,34	28,03 - 33,61	18,00	42,00	
	GG	31,74 ± 4,69	0,98	29,71 - 33,77	24,00	39,00	
	Ogółem	31,08 ± 5,68	0,80	29,48 - 32,68	18,00	43,00	
<i>Wzrost (cm)</i>	AA	161,83 ± 7,76	3,17	153,69 - 169,97	150,00	171,00	=0,433
	AG	165,86 ± 8,14	1,74	162,25 - 169,47	140,00	176,00	
	GG	166,22 ± 6,70	1,40	163,32 - 169,12	149,00	180,00	
	Ogółem	165,55 ± 7,45	1,04	163,45 - 167,64	140,00	180,00	
<i>Masa przed ciążą (kg)</i>	AA	65,00 ± 10,10	5,05	48,93 - 81,07	55,00	76,00	=0,876
	AG	68,14 ± 23,79	5,07	57,59 - 78,69	46,00	150,00	
	GG	70,27 ± 18,54	3,95	62,05 - 78,49	42,00	128,00	
	Ogółem	68,85 ± 20,38	2,94	62,94 - 74,77	42,00	150,00	
<i>Masa po koniec III trymestru ciąży (kg)</i>	AA	76,83 ± 18,35	7,49	57,58 - 96,09	50,00	105,00	=0,646
	AG	81,57 ± 21,85	4,66	71,88 - 91,26	55,00	157,00	
	GG	84,83 ± 17,31	3,61	77,34 - 92,31	56,00	139,00	
	Ogółem	82,48 ± 19,30	2,70	77,05 - 87,91	50,00	157,00	
<i>Liczba przeżytych ciąż</i>	AA	1,67 ± 0,52	0,21	1,12 - 2,21	1,00	2,00	=0,470
	AG	1,59 ± 1,18	0,25	1,07 - 2,11	1,00	6,00	
	GG	2,00 ± 1,22	0,25	1,49 - 2,51	1,00	5,00	
	Ogółem	1,79 ± 1,14	0,16	1,47 - 2,11	1,00	6,00	
<i>Tydzień zakończenia ciąży (t. c.)</i>	AA	35,50 ± 2,07	0,85	33,32 - 37,68	33,00	39,00	=0,907
	AG	35,48 ± 3,67	0,80	33,81 - 37,15	27,00	40,00	
	GG	35,08 ± 2,98	0,61	33,83 - 36,34	28,00	39,00	

	Ogółem	35,29 ± 3,15	0,44	34,41 - 36,18	27,00	40,00	
Masa urodzeniowa noworodka (g)	AA	1765,00 ± 1074,28	438,57	637,62 - 2892,38	630,00	3620,00	=0,233
	AG	2041,84 ± 744,51	170,80	1683,00-2400,68	670,00	3800,00	
	GG	1605,90 ± 735,08	164,37	1261,87-1949,93	620,00	3320,00	
	Ogółem	1811,18 ± 796,02	118,66	1572,03-2050,33	620,00	3800,00	
Hemoglobina (mmol/L)	AA	7,47 ± 1,01	0,41	6,41 - 8,53	6,31	9,20	=0,761
	AG	7,82 ± 1,65	0,36	7,07 - 8,57	5,29	12,30	
	GG	8,03 ± 1,87	0,38	7,24 - 8,82	6,00	12,50	
	Ogółem	7,88 ± 1,69	0,24	7,40 - 8,35	5,29	12,50	
Hematokryt (L/L)	AA	0,35 ± 0,05	0,01	0,30 - 0,40	0,29	0,43	=0,985
	AG	0,35 ± 0,03	0,01	0,34 - 0,37	0,28	0,42	
	GG	0,35 ± 0,04	0,01	0,33 - 0,37	0,28	0,44	
	Ogółem	0,35 ± 0,04	0,01	0,34 - 0,36	0,28	0,44	
Płytki krwi (g/L)	AA	252,83 ± 88,64	36,19	159,81 - 345,86	170,00	398,00	=0,106
	AG	181,19 ± 58,41	12,75	154,60 - 207,78	88,00	274,00	
	GG	196,22 ± 77,16	15,75	163,64 - 228,80	47,00	352,00	
	Ogółem	196,69 ± 73,27	10,26	176,09 - 217,30	47,00	398,00	
Mocznik (mg/dL)	AA	23,96 ± 9,85	4,02	13,62 - 34,29	12,57	36,20	=0,501
	AG	30,44 ± 13,27	2,97	24,23 - 36,65	14,30	68,26	
	GG	32,25 ± 17,69	3,77	24,41 - 40,09	15,20	92,52	
	Ogółem	30,46 ± 15,11	2,18	26,07 - 34,85	12,57	92,52	
Kwas moczowy (mg/dL)	AA	6,57 ± 1,97	0,80	4,51 - 8,64	3,57	8,73	=0,082
	AG	5,87 ± 1,00	0,22	5,40 - 6,34	4,50	7,95	
	GG	6,81 ± 1,43	0,30	6,18 - 7,45	4,41	10,48	
	Ogółem	6,39 ± 1,39	0,20	5,99 - 6,79	3,57	10,48	
Białko całkowite (g/dL)	AA	5,80 ± 0,60	0,25	5,17 - 6,43	4,88	6,53	=0,985
	AG	5,74 ± 0,91	0,20	5,31 - 6,16	4,28	8,76	
	GG	5,74 ± 0,90	0,19	5,34 - 6,13	2,90	7,29	
	Ogółem	5,74 ± 0,86	0,12	5,50 - 5,99	2,90	8,76	
Białkomoc (mg/dL)	AA	162,50 ± 73,74	30,10	85,12 - 239,88	75,00	300,00	=0,187
	AG	129,55 ± 66,21	14,11	100,19 - 158,90	75,00	300,00	
	GG	115,63 ± 38,17	7,79	99,51 - 131,74	75,00	150,00	
	Ogółem	126,92 ± 56,63	7,85	111,16 - 142,69	75,00	300,00	
Masa łożyska (g)	AA	498,33 ± 175,20	71,53	314,47 - 682,20	350,00	840,00	=0,960
	AG	523,16 ± 171,21	39,28	440,64 - 605,68	250,00	900,00	

	GG	526,82 ± 257,87	54,98	412,48 - 641,15	150,00	1300,00	
	Ogółem	521,70 ± 212,72	31,03	459,25 - 584,16	150,00	1300,00	
<i>pH żyłne</i>	AA	7,27 ± 0,04	0,02	7,23 - 7,31	7,21	7,31	=0,669
	AG	7,26 ± 0,15	0,03	7,19 - 7,33	6,69	7,37	
	GG	7,29 ± 0,07	0,01	7,26 - 7,32	7,13	7,37	
	Ogółem	7,28 ± 0,11	0,02	7,24 - 7,30	6,69	7,37	
<i>pH tętnicze</i>	AA	7,27 ± 0,04	0,02	7,23 - 7,31	7,22	7,32	=0,505
	AG	7,23 ± 0,13	0,03	7,17 - 7,30	6,80	7,32	
	GG	7,27 ± 0,08	0,02	7,23 - 7,30	7,08	7,42	
	Ogółem	7,25 ± 0,10	0,01	7,22 - 7,28	6,80	7,42	
<i>Dawka metyldopy (mg)</i>	AA	1333,33 ± 584,52	238,63	719,91 - 1946,75	750,00	2000,00	=0,764
	AG	1431,82 ± 482,93	102,96	1217,70-1645,94	750,00	2000,00	
	GG	1510,42 ± 631,94	128,99	1243,57-1777,26	250,00	3000,00	
	Ogółem	1456,73 ± 559,50	77,59	1300,96-1612,50	250,00	3000,00	

Tabela 39. Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie z ciężką postacią PE.

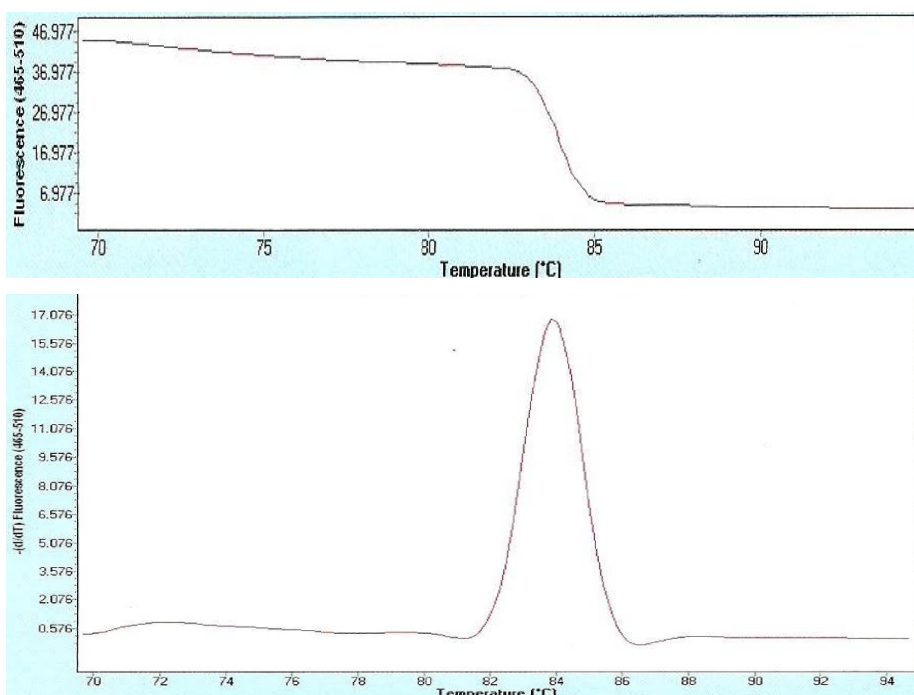
<i>Analizowana zmienna</i>	<i>Genotyp 66A>G MTRR</i>	<i>Średnia±SD</i>	<i>SEM</i>	<i>95% P.U.</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>p</i>
<i>Ciśnienie skurczowe (mmHg)</i>	AA	190,00 ± 21,60	10,80	155,63 - 224,37	170,00	220,00	=0,422
	AG	176,46 ± 18,27	3,72	168,75 - 184,17	140,00	200,00	
	GG	175,83 ± 21,71	5,12	165,04 - 186,63	140,00	220,00	
	Ogółem	177,39 ± 19,88	2,93	171,49 - 183,30	140,00	220,00	
<i>Ciśnienie rozkurczowe (mmHg)</i>	AA	107,50 ± 9,57	4,79	92,27 - 122,73	100,00	120,00	=0,664
	AG	107,29 ± 10,93	2,23	102,68 - 111,91	90,00	140,00	
	GG	111,11 ± 17,45	4,11	102,43 - 119,79	90,00	160,00	
	Ogółem	108,80 ± 13,63	2,01	104,76 - 112,85	90,00	160,00	
<i>Wiek (lata)</i>	AA	30,75 ± 6,40	3,20	20,57 - 40,93	24,00	39,00	=0,430
	AG	28,00 ± 4,01	0,82	26,31 - 29,69	21,00	36,00	
	GG	29,67 ± 5,94	1,40	26,71 - 32,62	21,00	45,00	
	Ogółem	28,89 ± 5,03	0,74	27,40 - 30,38	21,00	45,00	
<i>Wzrost (cm)</i>	AA	166,50 ± 5,45	2,72	157,83 - 175,17	160,00	173,00	=0,305
	AG	163,36 ± 6,07	1,29	160,67 - 166,05	155,00	175,00	
	GG	165,89 ± 5,09	1,20	163,36 - 168,42	157,00	175,00	
	Ogółem	164,68 ± 5,66	0,85	162,95 - 166,40	155,00	175,00	

Masa przed ciążą (kg)	AA	71,50 ± 16,52	8,26	45,21 - 97,79	55,00	93,00	=0,547
	AG	63,67 ± 13,62	2,97	57,47 - 69,87	45,00	93,00	
	GG	63,75 ± 12,30	3,08	57,19 - 70,31	49,00	100,00	
	Ogółem	64,46 ± 13,25	2,07	60,28 - 68,64	45,00	100,00	
Masa po koniec III trymestru ciąży (kg)	AA	91,25 ± 14,93	7,47	67,49 - 115,01	70,00	105,00	=0,291
	AG	81,00 ± 13,31	2,78	75,24 - 86,76	55,00	108,00	
	GG	79,61 ± 12,98	3,06	73,16 - 86,06	62,00	115,00	
	Ogółem	81,36 ± 13,38	1,99	77,34 - 85,38	55,00	115,00	
Liczba przebytych ciąż	AA	2,50 ± 1,29	0,65	0,45 - 4,55	1,00	4,00	=0,002
	AG	1,29 ± 0,46	0,09	1,10 - 1,49	1,00	2,00	
	GG	1,33 ± 0,59	0,14	1,04 - 1,63	1,00	3,00	
	Ogółem	1,41 ± 0,69	0,10	1,21 - 1,62	1,00	4,00	
Tydzień zakończenia ciąży (t. c.)	AA	30,75 ± 1,71	0,85	28,03 - 33,47	29,00	33,00	=0,404
	AG	31,50 ± 4,55	0,93	29,58 - 33,42	19,00	40,00	
	GG	32,94 ± 3,19	0,75	31,36 - 34,53	27,00	39,00	
	Ogółem	32,00 ± 3,90	0,58	30,84 - 33,16	19,00	40,00	
Masa urodzeniowa noworodka (g)	AA	2090,00 ± 1070,84	618,25	570,12 - 4750,12	1180,00	3270,00	=0,685
	AG	2110,13 ± 873,64	178,33	1741,22-2479,03	810,00	3940,00	
	GG	1877,78 ± 829,71	195,56	1465,17-2290,38	760,00	3470,00	
	Ogółem	2015,84 ± 854,45	127,37	1759,14-2272,55	760,00	3940,00	
Hemoglobina (mmol/L)	AA	8,16 ± 0,75	0,37	6,96 - 9,35	7,42	8,97	=0,959
	AG	7,78 ± 1,87	0,38	6,98 - 8,57	5,30	13,60	
	GG	7,90 ± 3,39	0,80	6,21 - 9,58	0,90	15,30	
	Ogółem	7,86 ± 2,49	0,37	7,12 - 8,59	0,90	15,30	
Hematokryt (L/L)	AA	0,39 ± 0,05	0,02	0,32 - 0,46	0,35	0,45	=0,224
	AG	0,35 ± 0,04	0,01	0,33 - 0,36	0,26	0,40	
	GG	0,3 ± 0,06	0,01	0,31 - 0,37	0,20	0,43	
	Ogółem	0,35 ± 0,05	0,01	0,33 - 0,36	0,20	0,45	
Płytki krwi (g/L)	AA	213,73 ± 37,43	18,72	154,16 - 273,29	176,00	259,90	=0,648
	AG	194,39 ± 55,03	11,23	171,15 - 217,63	81,00	292,00	
	GG	211,56 ± 76,82	18,11	173,36 - 249,76	69,00	339,00	
	Ogółem	202,79 ± 62,84	9,27	184,12 - 221,45	69,00	339,00	
Mocznik (mg/dL)	AA	29,79 ± 10,01	5,00	13,86 - 45,71	18,42	42,78	=0,452
	AG	28,30 ± 9,87	2,06	24,03 - 32,57	16,87	45,69	
	GG	33,65 ± 17,41	4,10	25,00 - 42,31	14,20	81,60	

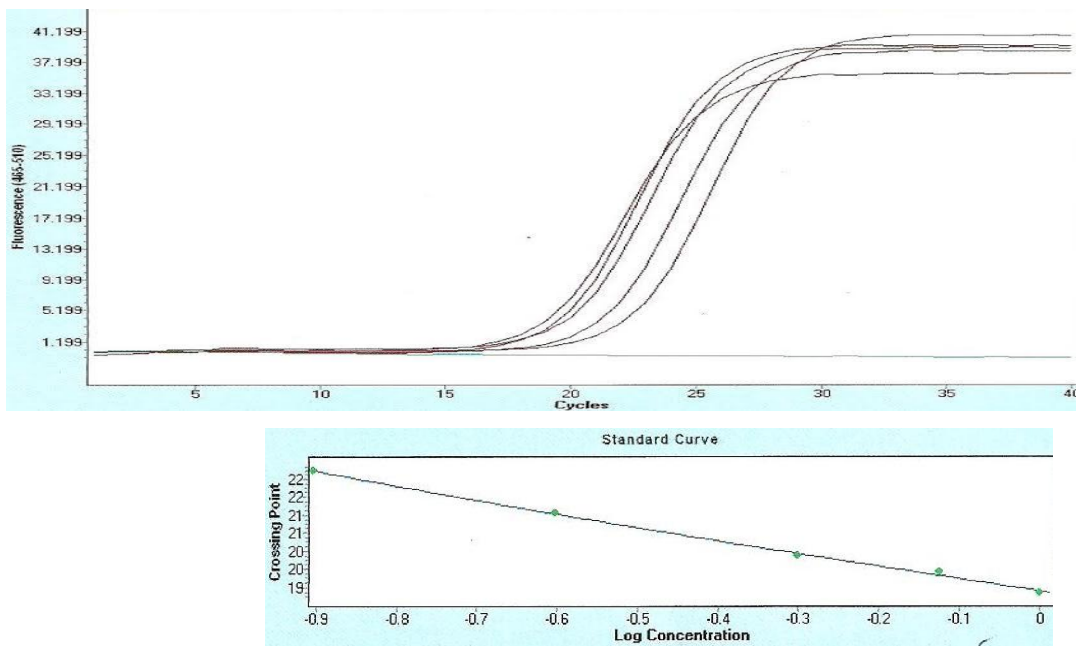
	Ogółem	30,57 ± 13,39	2,00	26,55 - 34,60	14,20	81,60	
Kwas moczowy (mg/dL)	AA	7,61 ± 1,68	0,84	4,94 - 10,28	5,54	9,43	=0,083
	AG	6,51 ± 1,26	0,26	5,96 - 7,05	4,42	9,00	
	GG	7,20 ± 0,90	0,21	6,76 - 7,65	6,03	9,00	
	Ogółem	6,88 ± 1,21	0,18	6,52 - 7,25	4,42	9,43	
Białko całkowite (g/dL)	AA	5,92 ± 0,22	0,13	5,38 - 6,47	5,73	6,16	=0,398
	AG	5,49 ± 0,68	0,14	5,20 - 5,79	4,29	7,50	
	GG	5,70 ± 0,60	0,14	5,40 - 6,00	4,24	6,68	
	Ogółem	5,61 ± 0,63	0,09	5,42 - 5,80	4,24	7,50	
Białkomocz (mg/dL)	AA	500,00 ± 0,00	0,00	500,00 - 500,00	500,00	500,00	-
	AG	500,00 ± 0,00	0,00	500,00 - 500,00	500,00	500,00	
	GG	500,00 ± 0,00	0,00	500,00 - 500,00	500,00	500,00	
	Ogółem	500,00 ± 0,00	0,00	500,00-500,0000	500,00	500,00	
Masa łożyska (g)	AA	270,00 ± 57,74	28,87	178,13 - 361,87	200,00	340,00	=0,266
	AG	374,78 ± 140,06	29,20	314,21 - 435,35	200,00	750,00	
	GG	375,28 ± 101,79	23,99	324,66 - 425,89	160,00	550,00	
	Ogółem	365,67 ± 122,28	18,23	328,93 - 402,40	160,00	750,00	
pH żyłne	AA	7,21 ± 0,08	0,04	7,08 - 7,34	7,09	7,26	=0,307
	AG	7,27 ± 0,06	0,01	7,25 - 7,30	7,13	7,36	
	GG	7,25 ± 0,11	0,03	7,19 - 7,30	7,03	7,40	
	Ogółem	7,26 ± 0,08	0,01	7,23 - 7,28	7,03	7,40	
pH tętnicze	AA	7,25 ± 0,044	0,025	7,14 - 7,36	7,20	7,28	=0,288
	AG	7,26 ± 0,04	0,01	7,24 - 7,28	7,19	7,34	
	GG	7,22 ± 0,10	0,02	7,17 - 7,27	6,98	7,34	
	Ogółem	7,23 ± 0,073	0,01	7,22 - 7,27	6,98	7,34	
Dawka metyldopy (mg)	AA	1437,50 ± 657,49	328,74	391,28 - 2483,71	750,00	2000,00	=0,697
	AG	1593,75 ± 598,06	122,08	1341,21-1846,29	500,00	3000,00	
	GG	1708,33 ± 665,59	156,88	1377,34-2039,32	500,00	3000,00	
	Ogółem	1625,00 ± 620,82	91,53	1440,64-1809,36	500,00	3000,00	

4.7. Analiza poziomu ekspresji mRNA *MTR* i *MTRR* w tkance łożyskowej

W celu określenia poziomu ekspresji badanych genów przeprowadzono reakcje PCR w czasie rzeczywistym. Sporządzono krzywe wzorcowe rozcieńczeń cDNA uzyskanych po reakcji odwrotnej transkrypcji mRNA na podstawie których wyznaczano ilość transkryptu. Wyniki standaryzowano wobec genu referencyjnego *GAPDH* o stałym poziomie ekspresji. Dla genu referencyjnego sporządzono krzywą topnienia cDNA. Wyznaczono temperaturę topnienia (T_m - *melting temperature*) produktu amplifikacji tego genu. Na krzywej topnienia zaobserwowano pojedynczy pik co potwierdzało specyficzność amplifikowanego produktu. Rycina 13 i rycina 14 przedstawiają wyznaczenie temperatury topnienia, przebieg reakcji amplifikacji oraz krzywą wzorcową dla genu referencyjnego *GAPDH*.

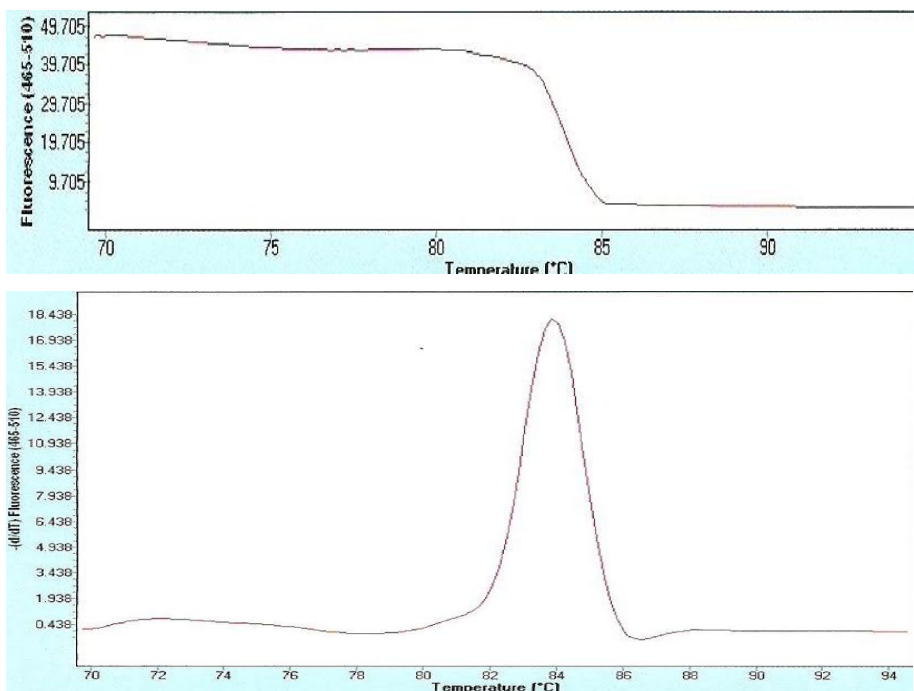


Rycina 13. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu amplifikacji genu *GAPDH*. Temperatura topnienia wynosiła 83,90°C.

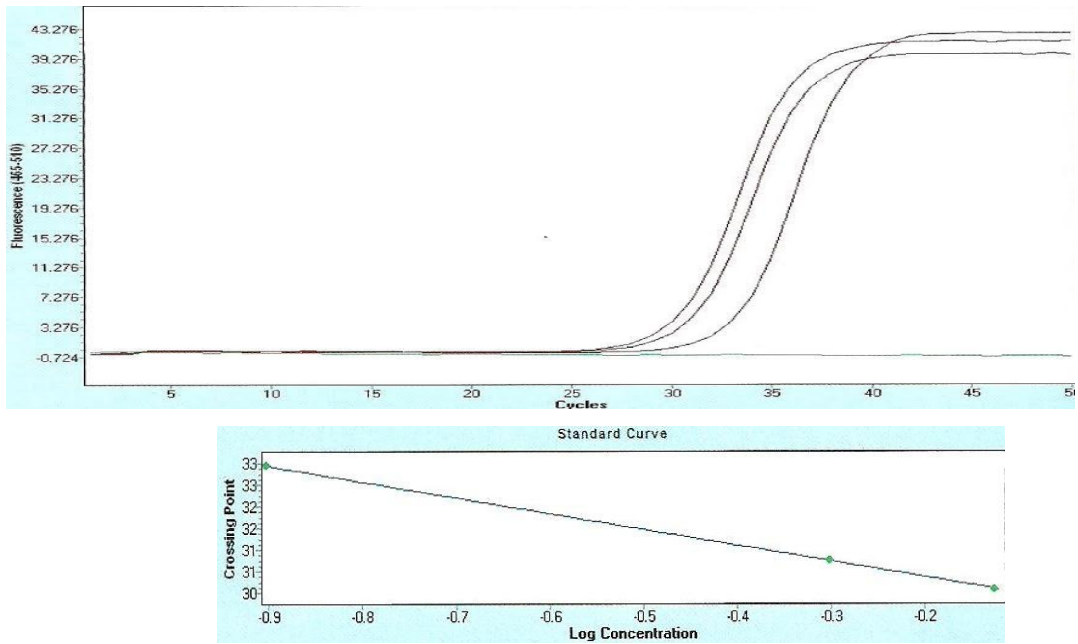


Rycina 14. Przebieg reakcji rt-PCR dla genu *GAPDH*. Krzywa wzorcowa dla genu *GAPDH*.

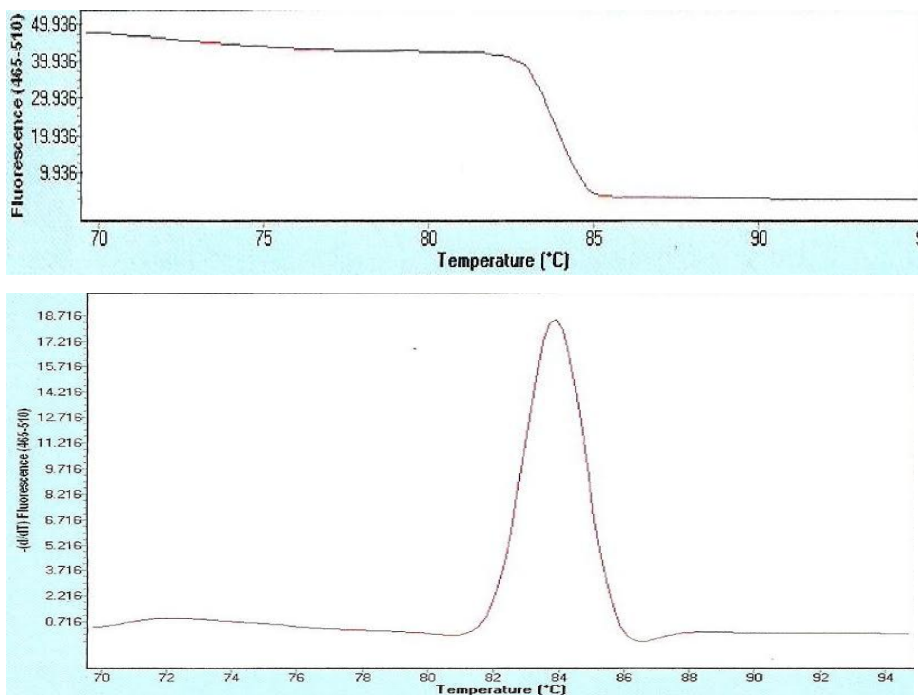
W analogiczny sposób przeprowadzono analizę poziomu ekspresji dla badanych genów *MTR* oraz *MTRR*. Rycina 15 oraz rycina 16 przedstawiają wyznaczanie temperatury topnienia, przebieg reakcji amplifikacji oraz krzywą wzorcową dla genu *MTR*. Rycina 17 i rycina 18 prezentują natomiast wyznaczanie temperatury topnienia, przebieg reakcji amplifikacji oraz krzywą wzorcową dla genu *MTRR*.



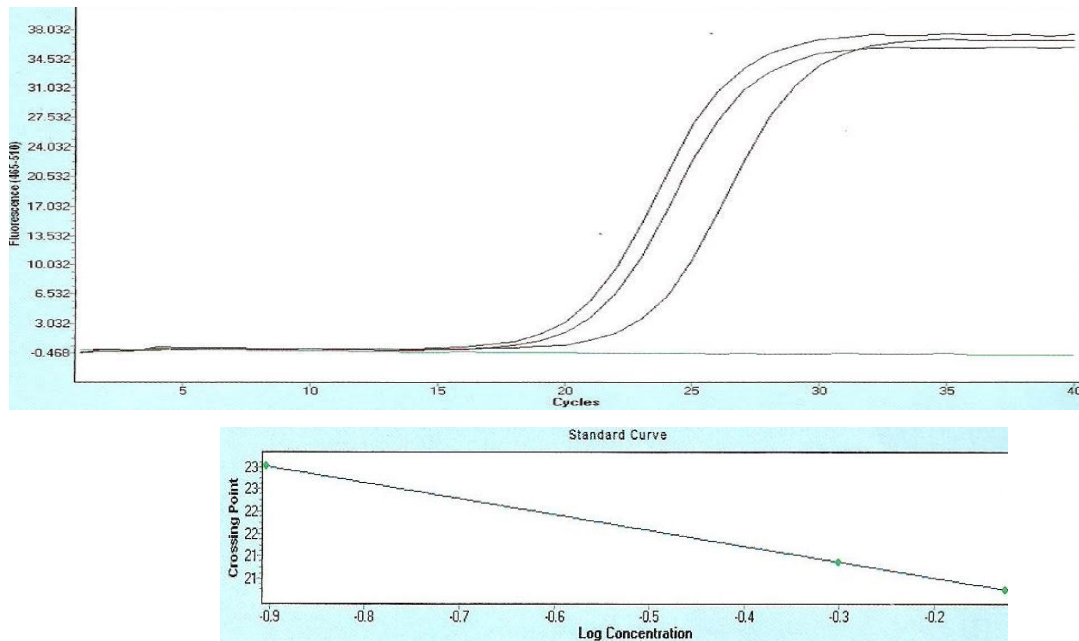
Rycina 15. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu amplifikacji genu *MTR*. Temperatura topnienia wynosiła 83,86°C.



Rycina 16. Przebieg reakcji rt-PCR dla genu *MTR*. Krzywa wzorcowa dla genu *MTR*.



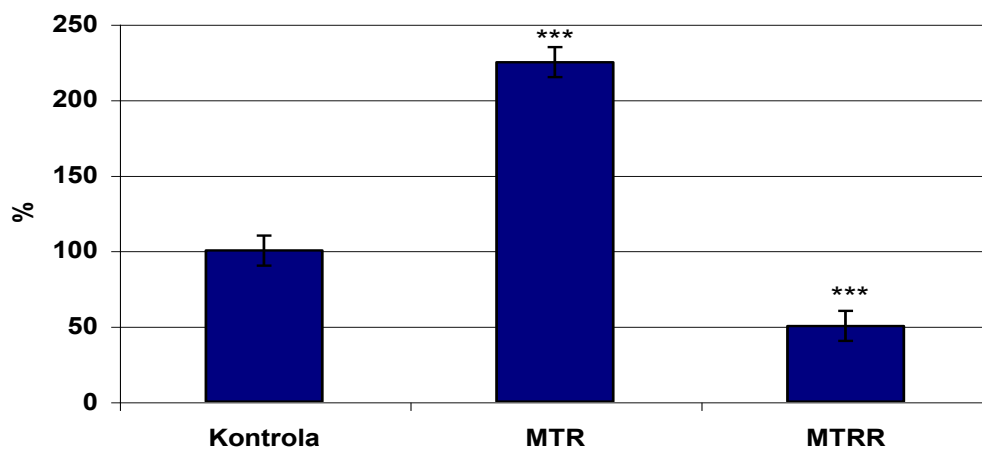
Rycina 17. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu amplifikacji genu *MTRR*. Temperatura topnienia wynosiła 83,89°C.



Rycina 18. Przebieg reakcji rt-PCR dla genu *MTRR*. Krzywa wzorcowa dla genu *MTRR*.

W celu uwidocznienia zmian poziomu łożyskowej ekspresji genów *MTR* oraz *MTRR* uzyskane wyniki przedstawiono w postaci wykresów z zachowaniem standaryzacji wobec genu referencyjnego *GAPDH*. Wyniki zaprezentowano jako wartość względną w odniesieniu do grupy kontrolnej (dla ilości transkryptu w próbach kontrolnych przyjęto wartość 1 (Rycina 19)).

W oparciu o uzyskane dane z analizy poziomu mRNA badanych genów zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji genu *MTR* u kobiet ze stanem przedrzucawkowym w porównaniu do zdrowych kobiet ciężarnych. Wzrost ekspresji tego genu kształtował się na poziomie 125% ($p < 0,0001$). Ponadto wykazano istotną statystycznie redukcję ekspresji genu *MTRR* u pacjentek ze stanem przedrzucawkowym w porównaniu do zdrowych kobiet ciężarnych o około 50% ($p < 0,0001$) (Rycina 19). Wyniki pokazują o obniżenie poziomu transkryptu analizowanego genu *MTRR* w tkance łożyskowej, co może wiązać się z obniżeniem aktywności reduktazy syntazy metioniny.



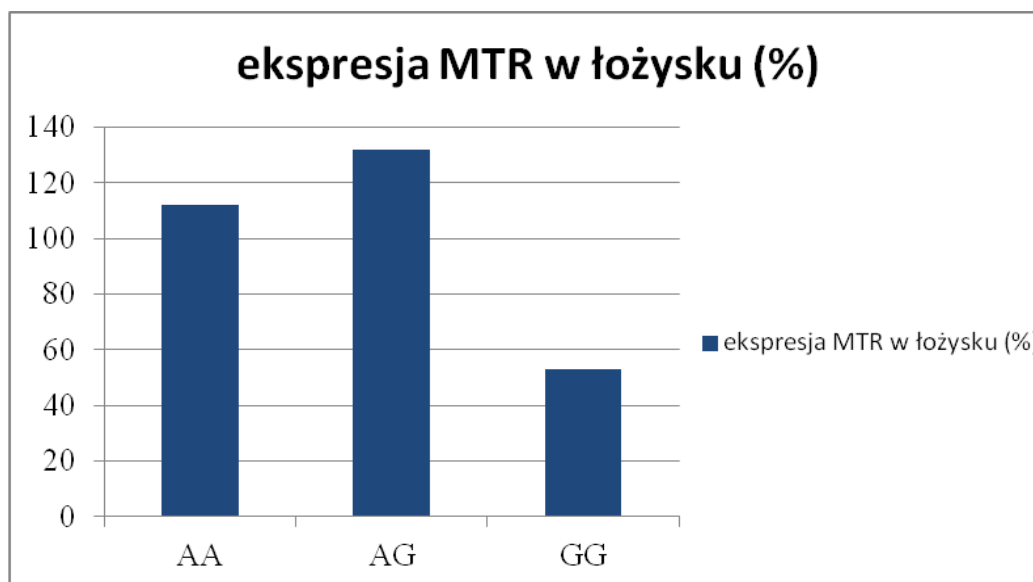
Rycina 19. Analiza zmian poziomu ekspresji genu *MTR* i *MTRR* w łożysku u kobiet ze stanem przedzucawkowym w odniesieniu do grupy kontrolnej z wykorzystaniem reakcji rt-PCR. Przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. *** $p < 0,0001$ (analiza jednoczynnikowa ANOVA).

4.8. Analiza zależności pomiędzy genotypami badanych polimorfizmów genów *MTR* i *MTRR* a ich poziomem ekspresji w łożysku

Analiza zależności pomiędzy genotypami polimorfizmu 2756A>G *MTR* a poziomem ekspresji tego genu w łożysku nie wykazała korelacji istotnych statystycznie ($p=0,25$). Najwyższy poziom ekspresji genu *MTR* zaobserwowano w grupie heterozygot 2756AG (133%), najniższy natomiast dotyczył genotypu zmutowanego 2756GG (53%) (Tabela 40, Rycina 20).

Tabela 40. Porównanie zależności pomiędzy genotypami polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* a jego poziomem ekspresji w łożysku.

<i>Genotyp 2756A>G MTR</i>	<i>Średnia ±SD</i>	<i>SEM</i>	<i>95% P.U.</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>	<i>p</i>
AA	1,12 ± 0,46	0,10	0,52 - 1,98	0,16	2,11	=0,25
AG	1,33 ± 0,67	0,24	0,45 - 2,80	0,12	2,54	
GG	0,53 ± 0,24	0,60	0,24 - 0,87	0,24	0,26	

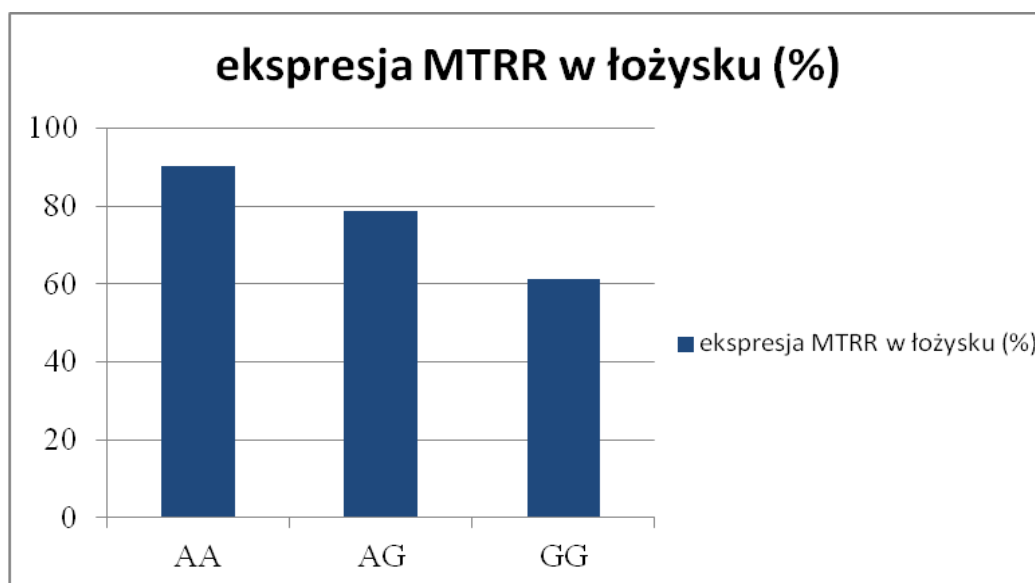


Rycina 20. Zmiany w poziomie ekspresji genu *MTR* w łożysku w zależności od genotypu polimorfizmu 2756A>G tego genu.

W przypadku polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* zaobserwowano obniżenie poziomu ekspresji tego genu w łożysku u heterozygot 66AG (79%) i homozygot zmutowanych 66GG (61%) w porównaniu z poziomem ekspresji u nosicieli genotypu homozygotycznego niezmutowanego 66AA (90%). Obserwowane różnice okazały się być istotne statystycznie ($p=0,049$) (Tabela 41, Rycina 21).

Tabela 41. Porównanie zależności pomiędzy genotypami polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* a jego poziomem ekspresji w łożysku.

Genotyp 66A>G MTRR	Średnia ±SD	SEM	95% P.U.	Min	Max	p
AA	0,90 ± 0,39	0,18	0,41 - 1,39	0,16	2,54	=0,049
AG	0,79 ± 0,54	0,15	0,45 - 1,99	0,12	1,34	
GG	0,61 ± 0,38	0,11	0,40- 0,88	0,16	1,24	



Rycina 21. Zmiany w poziomie ekspresji genu *MTRR* w łożysku w zależności od genotypu polimorfizmu 66A>G tego genu.

5. DYSKUSJA

Prawidłowy proces przemian folianów jest bardzo istotny dla właściwego rozwoju i funkcjonowania organizmu. Cykl ten wpływając na metabolizm aminokwasów, syntezę puryn i pirymidyn oraz metylację DNA warunkuje właściwe funkcjonowanie układu krwiotwórczego, sercowo-naczyniowego i nerwowego. Istnieją liczne doniesienia wskazujące na związek zaburzeń w metabolizmie folianów z rozwojem chorób układu sercowo-naczyniowego, nowotworów, chorób neurodegeneracyjnych i psychiatrycznych. Wiele danych dotyczy również wpływu tych nieprawidłowości na występowanie powikłań w przebiegu ciąży. Niedobór folianów wydaje się dotyczyć szczególnie kobiet ciężarnych ze względu na zwiększone zużycie tych związków w procesy rozwoju łożyska oraz intensywne wzrastanie płodu. Udowodniony jest związek zaburzeń metabolizmu folianów z poronieniami nawracającymi, ograniczeniem wewnątrzmacicznego wzrastania płodu, zgonem wewnątrzmacicznym, przedwczesnym oddzieleniem się łożyska, porodem przedwczesnym a także stanem przedrzucawkowym. Odnotowano również znaczenie tych zaburzeń w powstawaniu niektórych wad wrodzonych płodu w tym także rozszczepu kręgosłupa, przepukliny mózgowo-rdzeniowej i zespołu Downa [92, 113].

Szczególnie istotny jest wpływ wydajności cyklu folianów na przemiany i stężenie homocysteiny w organizmie człowieka. Homocysteina jest aminokwasem potencjalnie cytotoksycznym. Szkodliwe oddziaływanie podwyższonego stężenia homocysteiny ujawnia się poprzez cytotoksyczny wpływ na komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, zmniejszenie rozszerzalności tętnic poprzez ograniczenie syntezy tlenu azotu, działanie aterogenne, generowanie stresu oksydacyjnego, nasilanie procesu zapalnego a także działanie prozakrzepowe [95, 103].

5.1. Związek hiperhomocysteinemii ze stanem przedrzucawkowym

Niekorzystne oddziaływanie homocysteiny jest widoczne już na etapie zapłodnienia oraz we wczesnym etapie ciąży. Zbyt wysokie stężenie tego aminokwasu w płynie pęcherzykowym jajnika może zaburzać interakcję pomiędzy plemnikiem a komórką jajową doprowadzając do niepowodzeń w reprodukcji. Ponadto udowodniono występowanie zaburzeń na etapie implantacji zapłodnionego jaja spowodowane przez hiperhomocysteinemię. Hyperhomocysteinemia obserwowana jest również na wczesnym etapie ciąży powikłanej w drugiej połowie stanem przedrzucawkowym, stąd podwyższony

poziom homocysteiny uznawany jest za jeden z wielu przyczyn powstawania tego schorzenia [114]. Wzrost stężenia homocysteiny w osoczu jest udokumentowanym czynnikiem ryzyka rozwoju miażdżycy naczyń krwionośnych, ponieważ w efekcie prowadzi do uszkodzenia śródbłonna naczyń krwionośnych. Jednocześnie dysfunkcja śródbłonna naczyniowego w obrębie powstającego łożyska jest ważną hipotezą dotyczącą podłoża stanu przedrzucawkowego. Ponadto wysokie stężenie homocysteiny nasila procesy stresu oksydacyjnego, które należą również do kluczowych elementów w patogenezie stanu przedrzucawkowego. Istotne są więc badania dotyczące związku pomiędzy podwyższonym poziomem homocysteiny w osoczu a występowaniem stanu przedrzucawkowego [115]. W przebiegu ciąży zaobserwowano fizjologiczny spadek stężenia homocysteiny. Zależność ta widoczna jest już w I trymestrze ciąży, największy spadek dotyczy jednak II trymestru. Pod koniec ciąży stężenie tego aminokwasu osiąga wartość pierwotną. Przyczyny fizjologicznego obniżenia stężenia homocysteiny w ciąży nie zostały jednoznacznie ustalone. Hipotezy podkreślają możliwe znaczenie zwiększenia objętości łożyska naczyniowego oraz zmniejszenia wiązania homocysteiny przez albuminy w obserwowanej zależności. Badacze wskazują również na aktywację enzymów w nerkach i w wątrobie poprzez zmiany hormonalne, a także wpływu zużycia homocysteiny przez płód jako przyczyny spadku stężenia homocysteiny w ciąży [100, 115].

Większość analiz potwierdza znacznie wyższe stężenia homocysteiny w osoczu pacjentek ze stanem przedrzucawkowym w porównaniu ze zdrowymi ciężarnymi. Obecnie podwyższony poziom homocysteiny wiązany jest z występowaniem jedynie ciężkich postaci stanu przedrzucawkowego, nie zaobserwowano natomiast istotnych różnic w stężeniu tego białka w grupach kobiet z łagodną postacią schorzenia względem zdrowych pacjentek. Obserwacje niniejsze mogą wynikać z ujawniania się cytotoksycznego wpływu niskich dawek homocysteiny na śródbłonek naczyniowy w grupie z łagodną postacią stanu przedrzucawkowego [116]. Już w 1995 roku Dekker i wsp. udowodnili znaczenie wrodzonej hiperhomocysteinemii w powstawaniu ciężkich postaci stanu przedrzucawkowego. Autorzy zastosowali test obciążenia metioniną i potwierdzili, że u 17,7% ciężarnych z ciężką postacią stanu przedrzucawkowego występowała równocześnie hiperhomocysteinemia. Występowanie podwyższonego poziomu tego aminokwasu w populacji ogólnej kształtowało się na poziomie 2% [117]. Khosrowbeygi i wsp. wykazali związek między poziomem homocysteiny w osoczu ciężarnych a nasileniem stanu przedrzucawkowego. Wyższy poziom badanego aminokwasu stwierdzano w ciężkich postaciach schorzenia w porównaniu z postaciami łagodnymi. Ponadto, stężenie homocysteiny korelowało z wartościami ciśnienia skurczowego u kobiet z

stanu przedrzucawkowego [118]. Z kolei Ingec i wsp. wykazali związek pomiędzy podwyższonym poziomem homocysteiny a występowaniem ciężkich postaci stanu przedrzucawkowego i rzucawki. Autorzy nie zaobserwowali natomiast istotnej statystycznie różnicy w stężeniu tego aminokwasu w grupie z łagodną postacią stanu przedrzucawkowego w porównaniu do grupy badanej [115]. Niemniej jednak niektórzy badacze otrzymali odmienne wyniki. D'Anna i wsp. nie zauważyli istotnej statystycznej różnicy w stężeniu homocysteiny pomiędzy grupą pacjentek ze stanem przedrzucawkowym a grupą kontrolną. Analiza ta dotyczyła jednak początku pierwszego trymestru ciąży [119]. W badaniu Middeldorpa i wsp. występowanie hiperhomocysteinemii u ciężarnych było związane ze zmniejszonym ryzykiem wystąpienia stanu przedrzucawkowego. Wynik ten jest jednak sprzeczny w stosunku do większości doniesień i może być efektem zbyt małej grupy kobiet poddanej analizie [120].

Polskie Towarzystwo Badań nad Miażdżycą zaleca wykonywanie testów przesiewowych w kierunku oceny stężenia homocysteiny w osoczu w grupie kobiet z stanem przedrzucawkowym ze względu na potencjalny niedobór witamin z grupy B w tej populacji [114]. Dotychczas przeprowadzone badania nie pozwalają natomiast ustalić jednoznacznie znaczenia analizy poziomu homocysteiny w predykcji stanu przedrzucawkowego. Jak wynika z powyższych doniesień potencjalna rola wykrywania hiperhomocysteinemii w zapobieganiu stanowi przedrzucawkowego jest możliwa. W określaniu stężenia homocysteiny u kobiet ciężarnych i podejmowaniu odpowiednich działań w ramach predykcji i profilaktyki stanu przedrzucawkowego oprócz czynników konstytucjonalnych należy uwzględnić również wpływ czynników środowiskowych. Poziom homocysteiny w organizmie zależy od płci, wieku, wydolności nerek i wątroby, spożywania alkoholu, palenia papierosów, zażywania niektórych leków, poziomu aktywności fizycznej oraz sposobu odżywiania.

Liczne doniesienia wskazują również na znaczenie hiperhomocysteinemii oraz zaburzeń metabolizmu folianów w rozwoju hipotrofii płodu. Termin hipotrofia oznacza patologiczny proces ograniczenia wewnątrzmacicznego wzrastania płodu i względnie często dotyczy cięż powikłanych stanem przedrzucawkowym. Analizy dowiodły znaczenia suplementacji folianami w zmniejszeniu ryzyka rozwoju hipotrofii rozpatrywanej często jako następstwo stanu przedrzucawkowego. Leed i wsp. analizowali pacjentki obciążone ryzykiem rozwoju hipotrofii i udowodnili że właściwa suplementacja folianami w tej grupie powoduje wzrost masy urodzeniowej płodu [121]. Mitchell i wsp. także dowiedli, że odpowiednia podaż folianów ma istotne znaczenie w zmniejszeniu ryzyka tego powikłania [122]. Ponadto, wykazano korelację pomiędzy podwyższonym poziomem homocysteiny a występowaniem

hipotrofii płodu. Uważa się więc, że mechanizm rozwoju hipotrofii płodu jest związany z nieprawidłowościami na etapie metabolizmu homocysteiny [123]. Przytoczone analizy stanowią potwierdzenie znaczenia hiperhomocysteinemii w rozwoju powikłania, jakim jest stan przedrzucawkowy w przebiegu ciąży.

5.2. Polimorfizmy genetyczne o potencjalnym wpływie na stężenie homocysteiny i rozwój stanu przedrzucawkowego

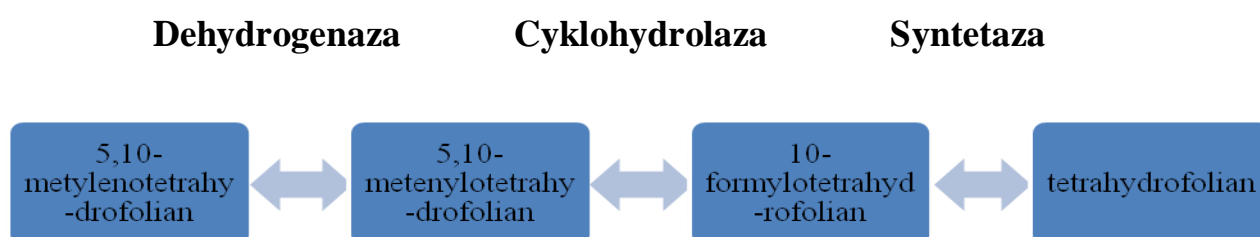
Właściwa predykcja stanu przedrzucawkowego umożliwia przewidywanie ciąży zwiększonego ryzyka i następcze wdrożenie działań profilaktycznych, co w konsekwencji może znacząco zmniejszyć śmiertelność tej choroby. Najnowsze zalecenia opublikowane przez ACOG wskazują również na konieczność prowadzenia intensywnych badań w kierunku określenia znaczenia czynników genetycznych i epigenetycznych w patogenezie stanu przedrzucawkowego. Podejmowany jest temat wpływu wielu polimorfizmów, wśród których na uwagę zasługują mutacje genów kodujących enzymy niezbędne do przemiany homocysteiny w organizmie [1, 7]. Zaliczamy do nich m.in. syntazę metioniny i reduktazę syntazy metioniny. Niedobory lub braki syntazy metioniny i reduktazy syntazy metioniny, związane z obecnością określonych wariantów genetycznych mogą być przyczyną hiperhomocysteinemii. Jednocześnie podwyższony poziom homocysteiny w organizmie określany jako hiperhomocysteinemia jest czynnikiem ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego oraz powikłań ciążowych i zaburzeń rozwojowych płodu. Mając powyższe na uwadze niezbędne wydaje się ustalenie związku między wariantami genetycznymi genów *MTR* i *MTRR* a występowaniem stanu przedrzucawkowego [124, 125].

Syntaza metioniny jest enzymem katalizującym przemianę homocysteiny do metioniny przy udziale metylokobalaminy jako kofaktora reakcji. Metylokobalamina powstaje z kolei w reakcji metylacji kobalaminy (witaminy B12) gdzie enzymem katalizującym jest reduktaza syntazy metioniny, a dawcą grupy metylowej jest S-adenozylometionina. Odpowiednia aktywność enzymów *MTR* i *MTRR* uwarunkowana istnieniem określonych wariantów genetycznych będzie wpływała na wydajność powyższych reakcji i stężenie homocysteiny w organizmie. Dotychczasowe analizy wykazały, że enzymem, który silnie choć pośrednio wpływa na opisany proces przemiany homocysteiny do metioniny jest reduktaza metylenotetrahydrofolianowa (*MTHFR*).

Istnieją doniesienia o znaczeniu polimorfizmu *776C>G* genu kodującego transkobalaminę (*TCN2* - *transcobalamin II*) w powstawaniu hiperhomocysteinemii. *TCN2*

jest β -globuliną odpowiedzialną za transport kobalaminy do komórki, dostarcza więc ważnego czynnika dla prawidłowej aktywności enzymu syntazy metioniny. Wynika stąd istotna ale pośrednia rola tego białka w procesie przekształcania homocysteiny do metioniny [126].

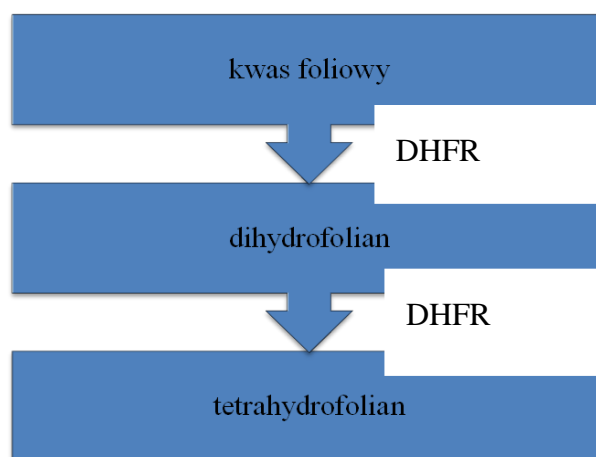
W piśmiennictwie odnaleźć można również badania dotyczące polimorfizmów *1958G>A* oraz *401G>A* genu dehydrogenazy metylenotetrahydrofolianowej (MTHFD 1 - *metylenotetrahydrofolate dehydrogenase 1*) i ich wpływu na poziom homocysteiny oraz rozwój powikłań położniczych. MTHFD1 jest enzymem katalizującym przemianę tetrahydrofolianu do pochodnych będących bezpośrednimi kofaktorami w biosyntezie puryn i pirymidyn. MTHFD1 jest trójfunkcyjnym enzymem zależnym od NADP (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*) obejmującym funkcje: dehydrogenazy 5,10-metylenotetrahydrofolianowej, cyklohydrolazy 5,10-metylotetrahydrofolianowej oraz syntetazy 10-formylo-tetrahydrofolianowej. Powstałe pochodne 10-formylo-tetrahydrofolian oraz 5,10-metylotetrahydrofolian są bezpośrednimi kofaktorami w syntezie puryn i pirymidyn [127] (Rycina 22).



Rycina 22. Reakcje katalizowane przez enzym MTHFD1 [opracowanie własne].

Z przytoczonej aktywności tego enzymu wynika więc jego istotna rola w procesach związanych z intensywnym podziałem komórek w tym również w powstawaniu łożyska oraz wzrastania i rozwoju płodu.

Kolejnym enzymem cyklu folianów o możliwym znaczeniu w rozwoju powikłań u kobiet ciężarnych jest reduktaza dihydrofolianowa (DHFR – *dihydrofolate reductase*). DHFR jako enzym cyklu tymidylanowego katalizuje w obecności NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase*) redukcję kwasu foliowego do jego aktywnej postaci tetrahydrofolianu [128].



Rycina 23. Dwuetapowa redukcja kwasu foliowego do tetrahydrofolanu (DHFR – *reduktaza dihydrofolianowa*) [opracowanie własne].

Nieprawidłowa aktywność DHFR warunkowana istnieniem odpowiednich polimorfizmów genetycznych może powodować zaburzenia syntezy pirymidyn i w następstwie rozwój powikłań położniczych [128].

Ze względu na wpływ aktywności enzymów cyklu folianów na syntezę puryn i pirymidyn oraz w następstwie na prawidłową syntezę DNA analizowane jest więc znaczenie polimorfizmów genów *MTR*, *MTRR*, *TCN2*, *MTHFR*, *DHFR* i *MTHFD1* także w aspekcie powstawania wad rozwojowych płodu.

5.2.1. Polimorfizm 2756A>G genu *MTR*

W niniejszej pracy zbadano czy możliwy jest związek polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* z częstością występowania stanu przedrzucawkowego przy uwzględnieniu poziomu ekspresji genu w łożysku. Niewiele jest dotychczasowych danych dotyczących możliwego znaczenia polimorfizmów 2756A>G *MTR* w etiologii PE. Udokumentowano jednak, że obecność zmutowanego allela 2756G genu *MTR* jest związana ze zmniejszeniem aktywności tego enzymu i występowaniem zwiększonego ryzyka hiperhomocysteinemii [129, 130].

Przegląd piśmiennictwa dotyczącego polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* nie pozwala więc obecnie jednoznacznie stwierdzić jego znaczenia w patogenezie stanu przedrzucawkowego. Rola tego polimorfizmu w powikłaniach ciąży rozwijających się na tle niedokrwienia maciczo-łożyskowego była analizowana w badaniu Furnessa i wsp. Jedną z podstawowych jednostek chorobowych związanych z niewydolnością krążenia maciczo-łożyskowego jest stan przedrzucawkowy. Autorzy analizując genotypy płodów i matek w obu przypadkach zauważyli związek między obecnością polimorfizmów 2756A>G a

występowaniem niedokrwienia maciczo-łożyskowego. W przypadku genotypów kobiet zależność ta dotyczyła tylko pacjentek pozbawionych suplementacji wysokimi dawkami witamin z grupy B. Badanie to potwierdza więc istotne znaczenie odpowiedniej podaży kwasu foliowego oraz witamin B6 i B12 dla prawidłowego przebiegu ciąży. Ponadto genotyp 2756GG płodu był związany z istotnie podwyższonym poziomem homocysteiny w osoczu matki [131].

Also-Rallo i wsp. poddając badaniu 43 kobiety z PE oraz 122 zdrowe pacjentki nie zauważyli istotnej różnicy w częstości występowania polimorfizmu 2756A>G *MTR* pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną. Stężenie całkowitej homocysteiny w osoczu ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym było jednak znacznie wyższe niż w grupie pacjentek zdrowych [132]. Również Pérez-Sepúlveda i wsp. analizowali różnice w częstości występowania polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* pomiędzy grupą z PE a grupą kontrolną. Pod tym względem nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy (50% grupa kontrolna vs. 37,5% grupa badana). Być może w tym przypadku przyczyną uzyskania takich wyników była mała liczba pacjentek poddanych analizie (16 kobiet z PE, 32 zdrowe kobiety ciężarne) [97].

Zaskakujące są wyniki uzyskane przez Barbossa i wsp. W analizie ciężarnych będących nosicielkami genotypu prawidłowego 2756AA *MTR* stwierdzono wyższy poziom homocysteiny oraz niższe stężenie kobalaminy w osoczu w porównaniu z pacjentkami o genotypach 2756AG oraz 2756GG. Z powyższej analizy wynika więc możliwy ochronny wpływ polimorfizmu 2756A>G *MTR* względem ryzyka rozwoju hiperhomocysteinemii u ciężarnych [133]. Wcześniejsze analizy na grupie zdrowych przedstawicieli populacji kanadyjskiej również wykazały paradoksalny związek polimorfizmu 2756A>G z występowaniem obniżonego stężenia homocysteiny w osoczu. Również Klerk i wsp. badali zależność pomiędzy polimorfizmem 2756A>G genu *MTR* a stężeniem homocysteiny w osoczu nie odnotowując jednak związku. Analiza ta wykazała natomiast obniżenie stężenia kobalaminy o 30% w osoczu dorosłych, związane z obecnością genotypu 2756GG w porównaniu z genotypami 2756AG i 2756AA [134].

Istotne są również analizy dotyczące związku pomiędzy polimorfizmem 2756A>G genu *MTR* a rozwojem hipotrofii płodu określanej inaczej jako ograniczenie wzrastania wewnątrzmacicznego (IUGR – *intrauterine growth restriction*). Mogą one wskazywać na właściwy kierunek poszukiwań mających na celu dokładniejsze poznanie etiologii i znaczenia czynników genetycznych również w rozwoju powikłań pokrewnych i następczych: stanu przedrzucawkowego, przedwczesnego porodu i zwiększonego ryzyka oderwania się łożyska. Zarówno w przypadku stanu przedrzucawkowego jaki i hipotrofii za istotny element

patogenezy uważa się nieprawidłowości w obrębie łożyska skutkujące niedokrwieniem i niedostatecznym transportem tlenu i substancji odżywczych do płodu. Engel i wsp. analizowali zależności pomiędzy polimorfizmem 2756A>G genu *MTR* a częstością występowania niskiej masy ciała w stosunku do wieku ciążowego (SGA – *small for gestational age*). Autorzy uwzględnili również różnice w podaży folianów i ich znaczenie w rozwoju powikłania. SGA może być spowodowane hipotrofią płodu, przy czym istotny jest wpływ nieprawidłowości w obrębie łożyska i zaburzeń przepływu w tętnicach macicznych oraz stanu przedzręczawkowego na powstawanie tego powikłania. Badaniu zostały poddane pacjentki rasy białej oraz czarnej. Nie wykazano jednak istotnych statystycznie różnic w częstości występowania genotypu 2756A>G genu *MTR* pomiędzy grupą badaną i kontrolną zarówno w populacji białej jak i czarnej [135]. Wspomniane wcześniej badanie Furnessa i wsp. oprócz wykazania korelacji pomiędzy polimorfizmem 2756A>G *MTR* a zwiększeniem ryzyka niedokrwienia maciczno-łożyskowego oraz wzrostem poziomu homocysteiny, nie dowiodło jednak związku tego polimorfizmu ze zmniejszoną masą urodzeniową płodu [131]. Ze względu na zbyt małą liczbę badań obecnie nie można jednak jednoznacznie potwierdzić braku zależności pomiędzy wariantami polimorficznymi 2756A>G genu *MTR* a występowaniem IUGR, zwłaszcza w kontekście wykazania związku tego polimorfizmu z niewydolnością maciczno-łożyskową.

Polimorfizm 2756A>G genu *MTR* może być czynnikiem ryzyka wystąpienia niektórych wad rozwojowych płodu. Pod tym względem analizom poddawany jest wpływ tego polimorfizmu na częstość występowania zespołu Downa oraz rozszczepu kręgosłupa. Coppede i wsp. dowiedli większego ryzyka rozwoju zespołu Downa w przypadku współwystępowania u matki polimorfizmów 677C>T *MTHFR* oraz 2756A>G *MTR* [136]. W populacji chińskiej obecność allele 2756G *MTR* nie była związana z istotnie większym ryzykiem zespołu Downa u płodu. Autorzy analizowali również wpływ współistnienia polimorfizmów kilku genów na rozwój tej wady i potwierdzili możliwe znaczenie wariantów 677CC *MTHFR* / 2756AG + 2756GG *MTR* jako czynników ryzyka w tym zakresie [137]. Mostowska i wsp. badali związek matczynego polimorfizmu 2756A>G *MTR* z częstością występowania rozszczepu podniebienia u płodu w populacji polskiej. Analiza wykazała ponad 2-krotnie większe ryzyko rozwoju tej wady u nosicielek zmutowanego allele 2756G *MTR*. Wynik ten może potwierdzać istotne znaczenie odpowiedniej aktywności enzymu *MTR* w procesie embriogenezy [138]. Odmienne wyniki w tym zakresie otrzymali Brandalize i wsp. Autorzy analizowali populację południowobrazylijską (grupa badana: 114 dzieci z rozszczepem podniebienia i 110 matek tych dzieci, grupa kontrolna: 100 zdrowych dzieci i

ich matki). Nie wykazali związku pomiędzy genotypem 2756GG *MTR* zarówno matki jak i dziecka, a częstością występowania rozszczepu podniebienia [139].

Częstość występowania polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* podlega zróżnicowaniu etnicznemu. W populacji kaukaskiej obecność zmutowanego allele obserwuje się w 17% przypadków. Podobną częstość zaobserwowano w populacji indyjskiej. Wartość niniejsza w populacji portugalskiej kształtuje się na poziomie 16,7%. Znacznie rzadziej obecność allele 2756G *MTR* dotyczy grupy chińskiej (7,95%) [140, 141, 142, 143] (Tabela 42).

Tabela 42. Zestawienie częstości występowania genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* wśród populacji na świecie.

Populacja [źródło]	Grupa badana (n)	Genotyp polimorfizmu 2756A>G <i>MTR</i>		
		AA	AG	GG
Populacja portugalska [Guerreiro i wsp., 2008]	200	98,00%		2,00%
Populacja chińska [Cai i wsp., 2010]	220	85,45%	13,18%	1,36%
Populacja kaukaska [Skibola i wsp., 2002]	114	65,80%	34,20%	0,00%
Populacja indyjska [Rai i wsp., 2011]	294	67,00%	32,00%	1,00%

5.2.2. Polimorfizm 66A>G genu *MTRR*

Celem niniejszej pracy była również analiza związku polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* z częstością występowania stanu przedrzucawkowego przy uwzględnieniu poziomu ekspresji genu w łożysku. Uważa się że występowanie polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* wiąże się z obniżeniem aktywności kodowanego enzymu co może podwyższać stężenie homocysteiny w osoczu. Wpływ powyższego polimorfizmu genetycznego na częstość występowania stanu przedrzucawkowego wydaje się więc być wysoce prawdopodobny [129, 130].

Niemniej jednak dane dotyczące związku polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* z częstością występowania stanu przedrzucawkowego nie są wystarczające i wymagają dalszych analiz. Wang i wsp. badali potencjalne zastosowanie polimorfizmu 66A>G *MTRR* w predykcji PE. Wyniki tego badania nie potwierdziły jednak takiej możliwości [144]. Niemniej

jednak odnaleźć można doniesienia dotyczące związku tego polimorfizmu ze stężeniem homocysteiny w osoczu ciężarnych. Wykazano, że u kobiet będących nosicielkami zmutowanego allela 66G przy równocześnie niskim stężeniu witaminy B12 w osoczu poziom homocysteiny jest podwyższony [133]. Interesujące są wyniki uzyskane przez Vaughna i wsp. Autorzy analizowali współwystępowanie polimorfizmów 677C>T *MTHFR* oraz 66A>G *MTRR*. W osoczu nosierek genotypu 677TT *MTHFR* stwierdzano wyższe stężenia homocysteiny w przypadku gdy obecny był u nich jednocześnie polimorfizm 66A>G *MTRR* [145].

W związku z możliwym oddziaływaniem polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* na stężenie homocysteiny w osoczu ciężarnych należy zwrócić uwagę na jego potencjalne znaczenie również w kontekście rozwoju innych powikłań na tle niedomogi krążenia maciczno-łożyskowego w tym hipotrofii płodu. Analizy tego zagadnienia można odnaleźć we wspomnianej już wcześniej pracy Furnessa i wsp. dotyczącej wpływu polimorfizmów genów cyklu folianów na niedomogę krążenia maciczno-łożyskowego i następcze powikłania. Autorzy nie zauważyli istotnego związku pomiędzy wariantami genetycznymi polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* a ryzykiem hipotrofii płodu [131]. Podobnie w pracy Engela i wsp. obejmującej analizy populacji kaukaskiej i afroamerykańskiej nie wykazano możliwości zastosowania polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* jako czynnika predysponującego do rozwoju IUGR [135].

Wiele analiz dotyczy również związku polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* matki z występowaniem zespołu Downa u płodu. W populacji rasy kaukaskiej udowodniono znaczenie tego polimorfizmu jako czynnika ryzyka tej wady. Oprócz wpływu wariantów polimorficznych genu *MTRR*, ujawnia się tutaj dodatkowo wpływ czynników geograficznych i środowiskowych na ostateczne ryzyko wystąpienia tej nieprawidłowości [146]. Liao i wsp. analizowali znaczenie polimorfizmu 66A>G *MTRR* jako niezależnego czynnika ryzyka wystąpienia zespołu Downa. Wśród zdrowych, młodych kobiet ciężarnych populacji chińskiej nosicielki genotypu 66GG *MTRR* obarczone były 3,16 - krotnie większym ryzykiem rozwoju tej wady u płodu [137]. Pozzi i wsp. poddając analizie 74 przypadki matek których dzieci obarczone są zespołem Downa zauważyli w tej grupie istotnie statystycznie większą częstość występowania zmutowanego allela 66G *MTRR* w porównaniu z grupą kontrolną obejmującą matki zdrowych dzieci. Obserwacje te dotyczyły populacji włoskiej [147]. Odmienne wyniki otrzymali Chango i wsp. poddając analizie populację francuską obejmującą 119 przypadków grupy kontrolnej oraz 119 przypadków grupy badanej. Autorzy nie odnotowali znaczenia

polimorfizmu *66A>G MTRR* matki jako niezależnego czynnika ryzyka zespołu Downa u płodu. Ponadto zbadano znaczenie współistnienia polimorfizmów genów zaangażowanych w metabolizm folianów oraz homocysteiny (*677C>T MTHFR*, *1298A>C MTHFR*, *2756A>G MTR*, *66A>G MTRR*) i również nie zauważono korelacji w tym zakresie [148].

Istnieją badania świadczące o zwiększonym ryzyku wystąpienia wad cewy nerwowej u pacjentek nosicielek zmutowanego allela polimorfizmu *66A>G MTRR* [149]. Zależność ta może być efektem zwiększonego poziomu homocysteiny u ciężarnych z tym wariantem polimorficznym. Wyniki badań nie są jednak w pełni jednoznaczne i wykazują zróżnicowanie w zależności od badanych populacji i regionów geograficznych. Polimorfizm *66A>G* genu *MTRR* jest związany z większą częstością występowania wad cewy nerwowej w populacji kanadyjskiej. Również w grupie kobiet z Sycylii potwierdzono znaczenie genotypu *66GG MTRR / 677CC MTHFR* jako czynnika ryzyka tej wady. Istnieją analizy które nie potwierdzają jednak związku polimorfizmu *66A>G MTRR* z występowaniem wad cewy nerwowej u płodu. Rozbieżności w powyższych danych pomiędzy populacjami mogą być uwarunkowane różnicami w czynnikach żywieniowych i środowiskowych w zależności od zamieszkiwanego terenu, które w dość znacznym stopniu mogą wpływać na przebieg cyklu folianów i związane z nim procesy kluczowe dla szybko dzielących się komórek na wczesnym etapie rozwoju zarodka [150, 151].

Przegląd piśmiennictwa potwierdza istnienie etnicznych różnic w częstości występowania polimorfizmu *66A>G* genu *MTRR*. W badaniu Rai i wsp. częstość występowania zmutowanego allela *66G MTRR* w populacji indyjskiej była wysoka i wynosiła 67%. Wartości te w populacjach australijskiej, chińskiej i południowobrazylijskiej wynosiły odpowiednio: 36%, 26% oraz 49% (Tabela 43) [142, 152, 140, 153].

Tabela 43. Zestawienie częstości występowania genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* wśród populacji na świecie.

<i>Kraj/populacja</i> <i>[źródło]</i>	<i>Grupa badana (n)</i>	<i>Genotyp polimorfizmu</i> <i>66A>G MTRR</i>		
		<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>
<i>Populacja indiańska</i> <i>[Rai i wsp., 2011]</i>	294	1,70%	62,60%	35,70%
<i>Populacja australijska</i> <i>[Szvetko i wsp., 2007]</i>	124	38,00%	52,00%	10,00%
<i>Populacja chińska</i> <i>[Cai i wsp., 2010]</i>	220	53,64%	40,45%	5,91%
<i>Populacja południowobrazylijska</i> <i>[Brandalize i wsp., 2010]</i>	197	21,30%	56,30%	22,40%

5.2.3. Inne polimorfizmy o potencjalnym znaczeniu w rozwoju stanu przedrzucawkowego

5.2.3.1. Polimorfizmy genu *MTHFR*

W literaturze większość badań dotyczących wpływu polimorfizmów genów cyklu metioninowego na częstość występowania stanu przedrzucawkowego dotyczy genu *MTHFR*. Istotny i często poddawany analizie jest polimorfizm 677C>T genu *MTHFR* będący przyczyną znacznie obniżonej aktywności enzymu MTHFR. Udokumentowano związek tego polimorfizmu z zaburzeniami metabolizmu folianów w czasie ciąży i w następstwie występowaniem hiperhomocysteinemii oraz powikłań postrzeganych jako konsekwencje podwyższonego poziomu tego aminokwasu w tym stanie przedrzucawkowego.

Wiele analiz potwierdziło większą częstość występowania zmutowanych wariantów polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* u kobiet z PE. Badania te dotyczyły populacji różnych ras w tym rasy kaukaskiej i wschodnioazjatyckiej [92, 154]. Chedraui i wsp. analizowali zależności pomiędzy polimorfizmami 677C>T oraz 1298A>C genu *MTHFR* a występowaniem stanu przedrzucawkowego w grupie pacjentek, które wcześniej nie rodziły. Częstość występowania genotypu 1298CC *MTHFR* w grupie kobiet z PE była znacznie większa niż w grupie kontrolnej (15,3% vs. 0,7%, $p < 0,05$). Ponadto u nosicielek tego polimorfizmu potwierdzono większe stężenie homocysteiny w osoczu. Nie uzyskano jednak analogicznych wyników odnośnie polimorfizmu 677C>T genu *MTHFR* w zakresie tej analizy

[155]. Klai i wsp. badali związek polimorfizmu $677C>T$ oraz $1298A>C$ genu *MTHFR* z powikłaniami położniczymi rozwijającymi się na tle nieprawidłowości naczyniowych. Uwzględniono również poziom homocysteiny w osoczu pacjentek, natomiast analizowanymi nieprawidłowościami były: stan przedrzucawkowy, poronienia nawracające, ograniczenie wewnątrzmacicznego wzrastania płodu oraz oderwanie się łożyska. Nosicielki polimorfizmu $1298A>C$ genu *MTHFR* obarczone były istotnie statystycznie większym poziomem homocysteiny oraz większym ryzykiem wystąpienia powikłań położniczych na tle niedomogi naczyniowej w obrębie łożyska. Nie stwierdzono natomiast takich zależności w odniesieniu do polimorfizmu $677C>T$ genu *MTHFR* [156].

Aggarwal i wsp. uzyskali jednak wyniki sprzeczne z większością doniesień. Badając ciężarne należące do populacji północnoindyjskiej wykazali ochronny wpływ polimorfizmu $677C>T$ *MTHFR* względem ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego [157]. W piśmiennictwie odnaleźć można jeszcze jedną pracę wykazującą taką zależność. Jest to analiza Canto i wsp. którzy po raz pierwszy uzyskali wynik świadczący o ochronnym wpływie polimorfizmu $677C>T$ *MTHFR* względem ryzyka rozwoju stanu przedrzucawkowego. Było to badanie przeprowadzone na populacji meksykańskiej, w grupie pacjentek zdrowych częstość występowania genotypu $677TT$ była istotnie statystycznie wyższa niż w grupie powikłanej PE [158]. Przyczyny uzyskania tak odmiennych danych są trudne do ustalenia, niemniej jednak nie można wykluczyć znaczenia uwarunkowań dietetycznych i środowiskowych. Wysoka podaż folianów może bowiem w pewnym stopniu kompensować niedomogę enzymatyczną związaną z obecnością określonych polimorfizmów.

Znaczna ilość prac dotyczy wpływu wariantów genetycznych enzymów cyklu folianów na ryzyko występowania hipotrofii płodu. Kupfermanc i wsp. przeprowadzili analizę związku polimorfizmu $677C>T$ *MTHFR* z obecnością zaburzeń na tle zakrzepicy w krążeniu maciczno-łożyskowym: stanu przedrzucawkowego, hipotrofii płodu, przedwczesnego oddzielenia się łożyska oraz wewnątrzmacicznego obumarcia płodu. Większe ryzyko hipotrofii dotyczyło pacjentek będących nosicielkami zmutowanego allele [159]. Doniesienia nie są jednoznaczne bowiem Gebhardt i wsp. poddając badaniom problem hipotrofii płodu nie zauważyli istotnej statystycznie różnicy w częstości występowania polimorfizmu $677C>T$ genu *MTHFR* pomiędzy pacjentkami należącymi do grupy badanej oraz grupy kontrolnej. Wykazano natomiast znaczenie polimorfizmu $1298A>C$ genu *MTHFR* w tym zakresie. Obecność allele $1298C$ stwierdzano częściej w grupie powikłanej hipotrofią niż w grupie kontrolnej (34% vs. 21%, $p=0,019$) [160].

Polimorfizmy $677C>T$ oraz $1298A>C$ genu *MTHFR* są również często badane pod względem ryzyka poronień nawracających o nieznaną etiologię. Mtiraoui i wsp. wykazali znaczenie zarówno polimorfizmu $677C>T$ jak i $1298A>C$ jako czynników predysponujących do wystąpienia poronień nawracających. Badanie to dotyczyło populacji tunezyjskiej. W grupie badanej częstości występowania genotypu $677TT$ oraz $1298CC$ kształtowały się odpowiednio na poziomie 30,00% i 13,5%. W grupie kontrolnej wartości te wynosiły kolejno: 7,0% i 4,0% [161]. Nair i wsp. wykazali pozytywną korelację pomiędzy polimorfizmem $677C>T$ genu *MTHFR* a ryzykiem idiopatycznych poronień nawracających w populacji północnoindyjskiej. W przypadku homozygot zmutowanych ryzyko to wzrastało 6,3-krotnie, natomiast u pacjentek będących heterozygotami prawie 2-krotnie [162]. Niemniej jednak analiza piśmiennictwa dostarcza również odmiennych wyników w tym zakresie. Metaanaliza przeprowadzona przez Rena i wsp. obejmująca przegląd badań na różnych populacjach w większości nie wykazała znaczenia polimorfizmu $677C>T$ genu *MTHFR* jako czynnika ryzyka wystąpienia poronień nawracających o nieznaną etiologię [163].

5.2.3.2. Polimorfizm genu *TCN2*

Możliwy jest związek polimorfizmu $776C>G$ genu *TCN2* z występowaniem hiperhomocysteinemii. Zmiana w obrębie łańcucha białkowego związana z obecnością tego polimorfizmu zaburza zdolność wiązania białka z kobalaminą oraz wiązanie holotranskobalaminy do receptora komórkowego [126]. Wpływ polimorfizmu $776C>T$ *TCN2* na ryzyko rozwoju hiperhomocysteinemii został potwierdzony w populacji hiszpańskiej [164]. Z drugiej jednak strony analiza Sunder-Plassmann i wsp. nie potwierdziła takiej zależności [165]. Oddziaływanie tego polimorfizmu na stężenie homocysteiny oraz rozwój stanu przedrzucawkowego wymaga więc dalszych badań.

Badany był ponadto związek polimorfizmu $776C>G$ genu *TCN2* z występowaniem wad rozwojowych płodu. W tym aspekcie analizom poddawany był wpływ na powstawanie wad cewy nerwowej [166]. Martinelli i wsp. potwierdzili z kolei możliwy związek polimorfizmu $776C>T$ *TCN2* z powstawaniem rozszczepu wargi oraz rozszczepu wargi i podniebienia (CL/P – *cleft lip with or without cleft palate*) [167]. Rozważany był również wpływ wariantów polimorficznych genu *TCN2* na występowanie poronień samoistnych. Potencjalny związek w tym zakresie został potwierdzony w badaniu Zetterberga i wsp. [168].

5.2.3.3. Polimorfizmy genu *DHFR*

Reduktaza dihydrofolianowa jest kluczowym enzymem w cyklu syntezy pirymidyn. Jednocześnie prawidłowa synteza DNA uzależniona od właściwego przebiegu cyklu syntezy pirymidyn i puryn ma kluczowe znaczenie w podziałach komórkowych na wczesnym etapie ciąży. Nieprawidłowości w tym okresie mogą być przyczyną wad rozwojowych płodu a także zaburzeń w powstawaniu łożyska. Możliwe jest więc znaczenie aktywności enzymu DHFR warunkowanej istnieniem odpowiednich polimorfizmów genetycznych w patogenezie stanu przedrzucawkowego, choć dotychczas nie przeprowadzono badań pokazujących taką zależność. Opisano natomiast warianty polimorficzne *238C>T* oraz *458A>T* genu *DHFR*, które wpływając na aktywność enzymu mogą mieć znaczenie w powstawaniu wad cewy nerwowej i rozszczepu kręgosłupa [92]. Martinelli i wsp. w analizie populacji włoskiej jako pierwsi udokumentowali możliwe znaczenie polimorfizmów genu DHFR w powstawaniu rozszczepu wargi oraz rozszczepu wargi i podniebienia (CL/P – *cleft lip with or without cleft palate*) [169]. Dość dobrze z kolei zbadana jest rola polimorfizmów genu DHFR w rozwoju niektórych powikłań hematologicznych i neurologicznych a także oporności na leczenie metotreksatem i pirymetaminą [170].

5.2.3.4. Polimorfizm genu *MTHFD1*

Nie odnaleziono prac dotyczących związku wariantów polimorficznych genu *MTHFD1* z częstością występowania stanu przedrzucawkowego. Przegląd piśmiennictwa dotyczącego polimorfizmów genu *MTHFD1* dostarcza jednak danych o możliwym ich wpływie na ryzyko niektórych powikłań w przebiegu ciąży w tym również uznawanych za następstwo PE. Analizom poddawane były w tym zakresie polimorfizmy *1958G>A* oraz *401G>A MTHFD1*.

Badanie Furnessa i wsp. dotyczące wpływu polimorfizmów genów cyklu folianów na ryzyko niedokrwienia maciczo-łożyskowego i następce jego konsekwencje dostarczyło również danych odnośnie genu *MTHFD1*. Potwierdzone zostało przypuszczenie o związku polimorfizmu *1958G>A MTHFD1* z rozwojem hipotrofii płodu. Pacjentki będące nosicielkami zmutowanego genotypu *1958AA* obarczone były istotnym statystycznie wzrostem ryzyka rozwoju hipotrofii płodu względem grupy kontrolnej [131].

Parle-McDermott i wsp. po raz pierwszy zbadali związek polimorfizmu *1958G>A* z ryzykiem utraty ciąży w drugim trymestrze ciąży o niewyjaśnionym podłożu. Grupę badaną stanowiło 126 pacjentek z przynajmniej jednym przypadkiem poronienia lub wewnątrzmacicznej śmierci płodu pomiędzy 13 a 26 tygodniem trwania ciąży. Grupa

kontrolna obejmowała 625 przypadków kobiet z prawidłowym przebiegiem ciąży. Pacjentki będące homozygotami *1958AA MTHFD1* narażone były na 1,64 razy większe ryzyko rozwoju badanego powikłania w porównaniu z nosicielkami genotypów *1958AG* oraz *1958GG* (OR 1.64, $p=0.03$) [171].

Przeprowadzona została również analiza dotycząca znaczenia polimorfizmów *1958G>A* i *401G>A* genu *MTHFD1* w powstawaniu wad cewy nerwowej w populacji irlandzkiej. Wykazano większą częstość występowania allela *1958AA* w grupie dzieci z wadami cewy nerwowej oraz ich matek w porównaniu z grupą kontrolną. Różnice te były istotne statystycznie. Ponadto stwierdzono pozytywną korelację pomiędzy występowaniem polimorfizmu *401G>A* genu *MTHFD1* a ryzykiem rozwoju analizowanej wady, nie były to jednak różnice istotne statystycznie [127].

Ponadto możliwy jest związek matczyneho polimorfizmu *1958G>A* genu *MTHFD1* ze zwiększonym ryzykiem urodzenia dziecka z zespołem Downa. Scala i wsp. analizowali w tym zakresie populację włoską dowodząc pozytywnej korelacji genotypu *MTHFD1 1958AA/RFC1 80GG* matki z występowaniem zespołu Downa u dziecka [172]. Odmienne wyniki otrzymali jednak Neagos i wsp. poddając analizie populację rumuńską. W grupie kobiet, których potomstwo cierpi na zespół Downa częstość występowania alleli *1958GG*, *1958GA* i *1958AA* genu *MTHFD1* wynosiła odpowiednio 23,07%, 65,38% i 11,53%. W grupie kontrolnej wartości te kształtowały się kolejno na poziomie: 32,60%, 54,24% oraz 13,04% [173].

5.3. Poziom ekspresji mRNA genu *MTR* oraz *MTRR* w łożysku

5.3.1. Ekspresja mRNA genu *MTR*

Obecne doniesienia dotyczące ekspresji mRNA dla genów enzymów szlaku przemian folianów są nieliczne i niejednoznaczne. Solanky i wsp. poddali analizie ekspresję mRNA genu *MTR* oraz *MTHFR* w łożysku w celu wyznaczenia kluczowych enzymów zaangażowanych w łożyskowy metabolizm homocysteiny i metioniny w przebiegu ciąży. Poziomy ekspresji tych genów w łożysku były porównywalne względem ekspresji wątrobowej i kształtowały się na podobnym poziomie, zarówno w pierwszym, drugim, jak i w trzecim trymestrze ciąży. Autorzy wskazali jednak, że proces remetylacji, którego przebieg jest uwarunkowany odpowiednio wysoką aktywnością enzymów *MTR* i *MTHFR* oraz dostępnością folianów stanowi główny szlak przemiany homocysteiny w łożysku [174].

W przypadku stanu przedrzucawkowego obniżony poziom ekspresji genu *MTR* w łożysku wydaje się być czynnikiem zwiększającym ryzyko niedostatecznej przemiany

homocysteiny do metioniny. Ujawniająca się wówczas hiperhomocysteinemia może być związana ze zwiększeniem ryzyka stanu przedrzucawkowego.

W niniejszej pracy zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji genu *MTR* w łożysku kobiet ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym w porównaniu ze zdrowymi pacjentkami. Podwyższony poziom ekspresji mRNA genu *MTR* w łożysku kobiet ze stanem przedrzucawkowym może być rezultatem potencjalnego mechanizmu kompensacyjnego metabolizmu metionina-homocysteina w patofizjologii tego powikłania. Podobne wyniki uzyskali w swoich badaniach również inni autorzy. W pracy Pérez-Sepúlveda i wsp. również stwierdzono statystycznie istotnie wyższą ekspresję genu *MTR* oraz *MTHFR* w łożyskach pochodzących od kobiet ze stanem przedrzucawkowym. Dodatkowo w czasie kiedy ekspresja mRNA dla enzymu *MTR* oraz *MTHFR* była znacząco podwyższona w łożyskach kobiet z PE, poziom obwodowy białek tych enzymów w surowicy nie wykazywał różnic pomiędzy grupą badaną i kontrolną zdrowych ciężarnych. Wyjaśnieniem tego może być udział różnorodnych mechanizmów, poprzez które następuje regulacja procesu translacji. Autorzy wskazali tutaj na współuczestnictwo na proces translacji interferencyjnego RNA (siRNA) oraz mikro-RNA (miRNA). Interferencyjne RNA oraz mikro-RNA stanowią dodatkowy mechanizm regulujący przebieg procesu translacji i ostateczną aktywność enzymów szlaku folianów, w tym enzymu *MTHFR* oraz *MTR*. Ponadto stężenia mRNA i białek enzymatycznych mogą wykazywać także różnice czasowe podczas ich syntezy w zależności od przebiegu procesu transkrypcji i translacji. Uzupełnieniem tych analiz okazał się również pomiar stężeń SAM oraz SAH i porównanie ich pomiędzy grupą z PE a grupą zdrowych ciężarnych. Obydwa związki SAM i SAH są bowiem produktami pośrednimi w cyklu metioninowym. Aktywność enzymów tego cyklu w tym również *MTR* mogą wykazywać korelację z poziomem zarówno SAM jak i SAH [97]. Autorzy sugerują, że może to być wynikiem działania mechanizmu wyrównawczego, który ujawnia się w szlaku metabolicznym homocysteina-metionina u kobiet z PE. W tej samej analizie poziom ekspresji genu *MTHFR* w łożysku pacjentek ze stanem przedrzucawkowym również był znacznie wyższy niż w grupie kontrolnej [97].

Inne wyniki przedstawili w swojej pracy Shin i wsp. Autorzy wykazali znaczną ekspresję genu *MTR* w obrębie syncytiotrofoblastu. Nie obserwowali jednak istotnej różnicy ekspresji *MTR* pomiędzy grupą zdrowych ciężarnych a grupą pacjentek z PE. Autorzy analizowali ponadto poziom ekspresji genu *MTHFR* w łożysku i jego związek ze stanem przedrzucawkowym. Istotną ekspresję tego genu wykazano w obrębie trofoblastu, jednak również nie odnotowano związku poziomu ekspresji z częstością występowania PE [175].

Innym ciekawym aspektem badań jest analiza polimorfizmów badanych genów enzymów szlaku folianów w powiązaniu z ekspresją mRNA w łożysku kobiet ze stanem przedrzucawkowym. Korelacja tych danych umożliwi potwierdzenie wpływu analizowanych polimorfizmów na poziom ekspresji mRNA, jak również w dalszej kolejności na stężenie białka enzymatycznego w surowicy.

W prezentowanej pracy przeprowadzona po raz pierwszy w populacji kobiet polskich analiza nie pokazała zależności pomiędzy genotypami polimorfizmu 2756A>G *MTR* a poziomem ekspresji tego genu w łożysku. Przegląd literatury również nie dostarcza wystarczającej ilości danych dotyczących zależności pomiędzy polimorfizmami genetycznymi, poziomem ekspresji genu *MTR* w łożysku a predykcją stanu przedrzucawkowego.

Badania dotyczące polimorfizmu 2756A>G *MTR* oraz łożyskowej ekspresji genu *MTR* u kobiet ze stanem przedrzucawkowym zaprezentowano w tabeli 44.

Tabela 44. Znaczenie polimorfizmu 2756A>G i łożyskowej ekspresji genu *MTR* w rozwoju stanu przedrzucawkowego i powikłań pokrewnych.

<i>Związek polimorfizmu / poziomu łożyskowej ekspresji ze stanem przedrzucawkowym lub powikłaniem pokrewnym</i>	<i>Populacja poddana analizie</i>	<i>Autor</i>
Brak bezpośredniej zależności pomiędzy polimorfizmem a występowaniem PE	48 ciężarnych, populacja amerykańska	Pérez-Sepúlveda i wsp., 2013 [97]
Brak bezpośredniej zależności pomiędzy polimorfizmem a występowaniem PE	165 ciężarnych, populacja hiszpańska	Also-Rallo i wsp., 2005 [132]
Wzrost ryzyka niewydolności krążenia maciczno-łożyskowego związane z występowaniem polimorfizmu	143 ciężarne, populacja australijska	Furness i wsp., 2008 [131]
Brak zależności pomiędzy polimorfizmem a występowaniem IUGR	180 ciężarnych, populacja amerykańska (87 ciężarnych rasy białej, 53 ciężarne rasy białej)	Engel i wsp., 2006 [135]
Brak zależności pomiędzy polimorfizmem a występowaniem IUGR, możliwy związek wariantów polimorficznych płodu z występowaniem IUGR	149 ciężarnych, populacja australijska	Furness i wsp., 2008 [131]
Zmniejszenie ryzyka hiperhomocysteinemii związane z występowaniem polimorfizmu	272 ciężarne, populacja brazylijska	Barbosa i wsp., 2008 [133]
Zmniejszenie ryzyka hiperhomocysteinemii związane z występowaniem polimorfizmu	181 zdrowych dorosłych, populacja kanadyjska	Miriuka i wsp., 2005 [176]
Brak zależności pomiędzy polimorfizmem a występowaniem hiperhomocysteinemii	540 zdrowych dorosłych, populacja holenderska	Klerk i wsp., 2003 [134]
Wzrost ekspresji genu w łożysku kobiet z PE	48 ciężarnych, populacja chilijska	Pérez-Sepúlveda i wsp., 2013 [97]

5.3.2. Ekspresja mRNA genu *MTRR*

W związku z niejednoznacznymi danymi dotyczącymi wpływu polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* na poziom homocysteiny oraz rozwój powikłań u ciężarnych i wad rozwojowych u płodów, interesujące wydaje się zbadanie poziomu łożyskowej ekspresji tego genu. Ekspresja mRNA dla genu *MTRR* może być analizowana w kontekście obecności poszczególnych wariantów polimorficznych oraz występowania wspomnianych nieprawidłowości w tym również stanu przedrzucawkowego. Ostateczne ustalenie wpływu polimorfizmu 66A>G *MTRR* oraz poziomu ekspresji tego genu na aktywność kodowanego enzymu wymaga jednak również określenia stężenia białka w surowicy.

W literaturze nie odnaleziono prac badających związek poziomu ekspresji genu *MTRR* w łożysku z powikłaniami położniczymi u kobiet ciężarnych. Padmanabhan i wsp. analizowali jednak mutację *MTRR*^{+gt} genu *MTRR* u myszy i wykazali jej związek ze zmniejszeniem łożyskowej ekspresji genu, mogącej w dalszej kolejności prowadzić do rozwoju wad wrodzonych nawet w przypadku prawidłowej podaży folianów [177].

W niniejszej pracy wykazano statystycznie istotną redukcję łożyskowej ekspresji genu *MTRR* w grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym. Ta obserwacja sugeruje możliwe zastosowanie w przyszłości badania poziomu ekspresji mRNA genów kodujących foliany w łożysku jako czynnika wskazującego na zaburzenia metabolizmu homocysteiny i jednocześnie jednego z czynników predysponujących do wystąpienia stanu przedrzucawkowego.

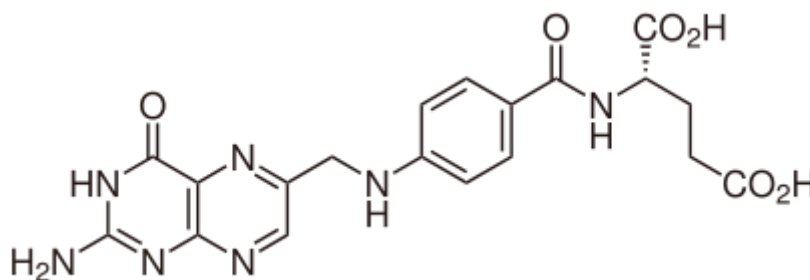
W czasie analizy polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* odnotowano obniżenie ekspresji tego genu w łożysku u nosicielek genotypu heterozygotycznego oraz homozygotycznego zmutowanego w porównaniu z nosicielkami genotypu homozygotycznego niezmutowanego ($p=0,049$). Ponieważ jest to jedna z pierwszych tego typu analiz badających korelację polimorfizmów enzymów cyklu przemian folianów z ich ekspresją mRNA w łożysku i możliwym udziałem tych mechanizmów w patogenezie stanu przedrzucawkowego, Stąd istnieje ścisła potrzeba przeprowadzenia dalszych badań i potwierdzenia powyższych obserwacji. W tabeli 45 zaprezentowano badania dotyczące polimorfizmu 66A>G i ekspresji genu *MTRR* w rozwoju stanu przedrzucawkowego.

Tabela 45. Znaczenie polimorfizmu 66A>G i ekspresji genu *MTRR* w rozwoju stanu przedrzucawkowego i powikłań pokrewnych.

<i>Związek polimorfizmu / poziomu łożyskowej ekspresji ze stanem przedrzucawkowym lub powikłaniem pokrewnym</i>	<i>Populacja poddana analizie</i>	<i>Autor</i>
Zwiększenie ryzyka hiperhomocysteinemii związane z współwystępowaniem polimorfizmu i niskiego stężenia kobalaminy w osoczu	275 ciężarnych, populacja brazylijska	Barbosa i wsp.; 2008 [133]
Zwiększenie ryzyka hiperhomocysteinemii związane z współwystępowaniem polimorfizmu z genotypem 677TT MTHFR	362 zdrowe nieciążarne, populacja amerykańska	Vaughn i wsp.; 2004 [145]
Brak zależności pomiędzy polimorfizmem a występowaniem IUGR	149 ciężarnych, populacja australijska	Furness i wsp.; 2008 [131]
Brak zależności pomiędzy polimorfizmem a występowaniem IUGR	180 ciężarnych, populacja amerykańska (87 ciężarnych rasy białej, 53 ciążarne rasy białej)	Engel i wsp.; 2006 [135]
Poziom ekspresji genu w łożysku kobiet z PE	brak danych	brak danych

5.4. Polimorfizmy genów *MTR* i *MTRR* w predykcji i profilaktyce stanu przedrzucawkowego

Niska podaż folianów w ciąży przy pewnych uwarunkowaniach genetycznych może prowadzić do podwyższenia poziomu homocysteiny i w następstwie komplikacji w przebiegu ciąży w tym również rozwoju stanu przedrzucawkowego. Foliań to nazwa szeregu związków należących do witamin z grupy B, które wykazują zróżnicowanie pod względem utlenienia, rodzaju reszt jednowęglowych oraz ilości reszt kwasu glutaminowego. Powszechnie stosowanym folianem w suplementacji ciężarnych jest obecnie kwas foliowy będący związkiem o wysokim stopniu utlenienia (Rycina 24). Kwas foliowy nie jest jednak formą folianów aktywną metabolicznie. Jego włączenie w procesy biologiczne wymaga szeregu przekształceń zależnych od aktywności licznych enzymów. Kwas foliowy ulega przemianom kolejno do: dihydrofolianu, tetrahydrofolianu, 5,10-metylenotetrahydrofolianu oraz 5-metylotetrahydrofolianu. 5-metylotetrahydrofolian jest najbardziej zredukowaną formą folianów, która podlega włączeniu w procesy biologiczne komórek [178, 128].



Rycina 24. Wzór strukturalny kwasu foliowego ($C_{19}H_{19}O_6N_7$, m.cz. 441,4) [na podstawie 128].

W aspekcie tak licznych przemian cennym związkiem może okazać się metafolina (sól wapniowa kwasu L-5-MTHF). Jest to stabilna sól będąca zredukowaną formą folianów, która w organizmie podlega szybkiej hydrolizie do 5-metylotetrahydrofolianu. Metafolina w organizmie podlega więc bezpośredniemu włączeniu w cykl folianów omijając procesy przemian jakim wcześniej podlega kwas foliowy. W badaniach potwierdzono bezpieczeństwo stosowania metafoliny oraz jej skuteczność w obniżaniu poziomu [178].

Prawidłowe przemiany folianów w organizmie zależą od odpowiedniej aktywności wielu enzymów i dostępności koenzymów. Procesy te wpływając na syntezę puryn i pirymidyn, metylację DNA oraz przemiany homocysteiny i metioniny mają kluczowe

znaczenie dla właściwego przebiegu ciąży i rozwoju płodu już na wczesnym jego etapie. Syntaza metioniny i reduktaza syntazy metioniny są enzymami uczestniczącymi w metabolizmie folianów. Obecność polimorfizmów $2756A>G$ *MTR* oraz $66A>G$ *MTRR* jest związana ze spadkiem aktywności kodowanych enzymów. Rozpatrywane jest znaczenie aktywności tych enzymów uwarunkowane istnieniem polimorfizmów genetycznych w powstawaniu powikłań w przebiegu ciąży i wad rozwojowych płodu. Podejmowana jest próba wykorzystania niniejszych analiz w predykcji i profilaktyce tych schorzeń. W badaniu Barbossa i wsp. u nosicielek genotypu $66AA$ *MTRR* niski poziom kobalaminy w surowicy był związany z podwyższonym poziomem homocysteiny całkowitej. Ponadto wzrost poziomu tego aminokwasu zaobserwowano u kobiet z niskim osoczym stężeniem folianów, przy czym wynik ten nie zależał od obecności wariantów polimorficznych genów *MTR* oraz *MTRR*. W analizie niniejszych zależności genetyczno-odżywczych można więc zauważyć największe znaczenie czynnika podaży folianów w kształtowaniu poziomu homocysteiny i w następstwie ryzyka następczych powikłań [133].

Suplementacja folianami kobiet w okresie przedkoncepcyjnym oraz ciężarnych jest obecnie jednym z najważniejszych zaleceń dla tych grup pacjentek. Wydaje się ona być szczególnie ważna również w przypadku obecności polimorfizmów $2756A>G$ *MTR* oraz $66A>G$ *MTRR* z uwagi na związane z tym obniżenie aktywności kodowanych enzymów. Suplementacja folianami może być czynnikiem wyrównującym niedomogę enzymatyczną u tych pacjentek [131]. Istotna w tym zakresie może okazać się również suplementacja metafoliną, która może być cenną alternatywą dla kwasu foliowego [178].

Dotychczas najwięcej jest danych odnośnie znaczenia polimorfizmów $677C>T$ oraz $1298A>C$ genu *MTHFR* zarówno w kontekście powstawania wad rozwojowych płodu jak i powikłań w przebiegu ciąży. Ponadto częstość występowania polimorfizmu $677C>T$ genu *MTHFR* w populacji rasy białej jest dość znaczna (genotypy $677TT$ i $677CT$ stanowią około 50%). Rozważyć należy aspekt odpowiedniej suplementacji folianami kobiet w czasie ciąży jak również w okresie jej planowania, mający na celu nie tylko zapobieganie powstawaniu wad rozwojowych lecz również minimalizowaniu ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego i niebezpiecznych jego następstw [92]. Pomocne mogą się więc okazać badania przesiewowe polimorfizmów genetycznych pozwalające na identyfikację kobiet o zwiększonym ryzyku rozwoju PE. Odpowiednio wyższa suplementacja folianami tej grupy mogłaby stanowić czynnik ochronny względem wystąpienia stanu przedrzucawkowego i jego poważnych konsekwencji.

6. WNIOSKI

1. Uzyskane wyniki dotyczące polimorfizmu $66A>G$ genu *MTRR* sugerują predyspozycję do wystąpienia stanu przedrzucawkowego u kobiet ciężarnych będących nosicielkami zmutowanego genotypu $66GG$ oraz zmutowanego allela $66G$.
2. Analiza poszczególnych genotypów oraz alleli polimorfizmu $2756A>G$ genu *MTR* nie wskazała bezpośredniego wpływu tego wariantu genetycznego na rozwój stanu przedrzucawkowego.
3. W badanej grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym z populacji polskiej polimorfizmy $2756A>G$ genu *MTR* oraz $66A>G$ genu *MTRR* nie wykazują korelacji z analizowanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi.
4. Przeprowadzone obserwacje sugerują wpływ wariantów zawierających co najmniej jeden zmutowany allel polimorfizmu $66A>G$ genu *MTRR* na obniżenie poziomu jego ekspresji mRNA w łożysku u ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym.
5. Zwiększona ekspresja mRNA genu *MTR* w połączeniu ze zmniejszoną ekspresją mRNA genu *MTRR* może sugerować istotną rolę zaburzeń szlaku metabolizmu folianów w kompartmentcie łożyskowym w etologii stanu przedrzucawkowego.

7. PIŚMIENNICTWO

1. ACOG 2013 Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists. Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2013, 122, 1122-1131.
2. Osungbade KO, Ige OK. Public health perspectives of preeclampsia in developing countries: implication for health system strengthening. *J Pregnancy.* 2011, 481095.
3. Chesley LC History and epidemiology of preeclampsia-eclampsia. *Clin Obstet Gynecol.* 1984, 27, 801-820.
4. Purkerson ML, Vekerdy L. A history of eclampsia, toxemia and the kidney in pregnancy. *Am J Nephrol.* 1999, 19, 313-319.
5. Saczko Z, Saczko J, Kulbacka J, Chwiłkowska A, Żurawski K. Nadciśnienie tętnicze u kobiet w ciąży - etiopatogeneza. *Nadciśnienie Tętnicze.* 2009, 13, 199-205.
6. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Hypertension.* 2001, 38, 718-722.
7. ESC Guidelines on the management of cardiovascular diseases during pregnancy The Task Force on the Management of Cardiovascular Diseases during Pregnancy of the European Society of Cardiology (ESC) *European Heart Journal.* 2011, 32, 3147-3197.
8. Niromanesh S, Laghai S, Mosavi-Jarrahi A. Supplementary calcium in prevention of pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet.* 2001, 74, 17-21.
9. Magee LA, Abalos E, von Dadelszen P, Sibai B, Easterling T, Walkinshaw S. How to manage hypertension in pregnancy effectively. *J Clin Pharmacol.* 2011, 72, 394-401.
10. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T. ESH guidelines *Eur Heart J.* 2011, 32, 1769-1818.
11. Rath W, Fischer T. The diagnosis and treatment of hypertensive disorders of pregnancy: new findings for antenatal and inpatient care. *Dtsch Arztebl Int.* 2009, 106, 733-738.
12. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta. *J Clin Pathol.* 2008, 61, 12, 1296-12302.
13. Nagy J, Dvorak M, Dvorak F. VEGF-A(164/165) and PlGF roles in angiogenesis and arteriogenesis. *Trends Cardiovac Med.* 2003, 13, 69-175.
14. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM, Sukhatme VP, Karumanchi SA Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.* 2004, 12, 350, 672-683.
15. Bielecki DA, Klonowska-Dziatkiewicz E, Jarocki S, Urban J. Growth factors in pregnancy complications with preeclampsia. *Ginekol Pol.* 2002, 73, 422-429.
16. Ahmed A, Dunk C, Ahmad S, Khaliq A. Regulation of placental vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PlGF) and soluble Flt-1 by oxygen - a review. *Placenta.* 2000, 21, 16-24.
17. Laresgoiti-Servitje E, Gómez-López N, Olson DM. An immunological insight into the origins of pre-eclampsia. *Hum Reprod Update.* 2010, 16, 510-524.
18. Yie SM, Li LH, Li YM, Librach C. HLA-G protein concentrations in maternal serum and placental tissue are decreased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2004, 191, 525-529.

19. Cowans NJ, Stamatopoulou A, Khalil A, Spencer K. PP13 as a marker of pre-eclampsia: A two platform comparison study. *Placenta*. 2011, 32, 37-41.
20. Chavarría ME, Lara-González L, González-Gleason A, Sojo I, Reyes A. Maternal plasma cellular fibronectin concentrations in normal and preeclamptic pregnancies: a longitudinal study for early prediction of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2002, 187, 595-601.
21. Page NM, Woods RJ, Gardiner SM, Lomthaisong K, Gladwell RT, Butlin DJ, Manyonda IT, Lowry PJ. Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature*. 2000, 405, 797-800.
22. Wang J, Trudinger BJ, Duarte N, Wilcken DE, Wang XL. Elevated circulating homocysteine levels in placental vascular disease and associated pre-eclampsia. *BJOG*. 2000, 107, 935-938.
23. Tamura T, Picciano MF Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr*. 2006, 83, 993-1016.
24. Pérez-Sepúlveda A, España-Perrot PP, Fernández XB, Ahumada V, Bustos V, Arraztoa JA, Dobierzewska A, Figueroa-Diesel H, Rice GE, Illanes SE. Levels of key enzymes of methionine-homocysteine metabolism in preeclampsia. *Biomed Res Int*. 2013, 2013, 731962.
25. Cooper J.C., Sharkey A.M., Charnock-Jones D.S. VEGF mRNA levels in placentae from pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1996, 103, 1191-1196.
26. Semczuk-Sikora A, Krzyzanowski A, Kwiatek M, Semczuk M. Maternal serum concentration of placental growth factor (PIGF) and endothelial growth factor (VEGF) in pregnancies complicated by preeclampsia. *Ginekol Pol*. 2007, 78, 873-876.
27. Krekora M, Zych K, Biesiada L, Pietrzak Z, Faflik U, Krasomski G. Przydatność wybranych markerów biochemicznych w przewidywaniu wystąpienia preeklampsji u ciężarnych. *Perinat Neonat Ginek*. 2011, 4, 4, 197-201.
28. Głuchowska M, Kowalska-Koprek U, Karowicz-Bilińska A. Evaluation of the usefulness of endoglin level as a predictor of preeclampsia in pregnant women with hypertension. *Ginekol Pol*. 2013, 84, 835-840.
29. Roberts JM, Bodnar LM, Lain KY, Hubel CA, Markovic N, Ness RB, Powers RW. Uric acid is as important as proteinuria in identifying fetal risk in women with gestational hypertension. *Hypertension*. 2005, 46, 1263-1269.
30. Martin AM, Bindra R, Curcio P, Cicero S, Nicolaides KH. Screening for pre-eclampsia and fetal growth restriction by uterine artery Doppler at 11-14 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2001, 18, 583-586.
31. Stupak A, Kwaśniewska A. Najnowsze osiągnięcia w diagnostyce stanu przedrzucawkowego w ciąży. *Zdr Publ*. 2012, 122, 316-321.
32. Poon L, Karagiannis G, Leal A. Hypertensive disorders in pregnancy: screening by uterine artery Doppler imaging and blood pressure at 11-13 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2009, 34, 497-502.
33. Poon L, Kametas N, Maiz N. First-trimester prediction of hypertensive disorders in pregnancy. *Hypertension*. 2009, 53, 812-818.
34. Nankali A, Malek-Khosravi SH, Zangeneh M, Rezaei M, Hemati Z, Kohzadi M. Maternal complications associated with severe preeclampsia. *J Obstet Gynaecol India*. 2013, 63, 112-115.
35. Swende TZ, Abwa T. Reversible blindness in fulminating preeclampsia. *Ann Afr Med*. 2009, 8, 189-191.
36. Sibai BM. Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet Gynecol*. 2004, 103, 981-991.

37. Redman CW, Sargent IL. Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response - a review. *Placenta*. 2003, 24, 21-27.
38. Schwartz RB, Feske SK, Polak JF. Preeclampsia/eclampsia: Clinical and neuroradiographic correlates adinsights into the pathogenesis of hypertensive encephalo-pathy. *Radiology*. 2000, 217, 371-376.
39. Leszczyńska-Gorzela B, Poniedziałek-Czajkowska E. Rzucałka w ciąży - aktualny problem kliniczny. *Perinat Neonat Ginek*. 2009, 2, 2, 94-101.
40. Zeng F, Chen D. A report of fourteen cases with hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count syndrome. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2002, 37, 526-528.
41. Hauth JC, Ewell MG, Levine RJ, Esterlitz JR, Sibai B, Curet LB, Catalano PM, Morris CD. Pregnancy outcomes in healthy nulliparas who developed hypertension. Calcium for Preeclampsia Prevention Study Group. *Obstet Gynecol*. 2000, 95, 24-28.
42. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*. 2005, 12, 330, 565.
43. Carr DB, Epplein M, Johnson CO, Easterling TR, Critchlow CW. A sister's risk: family history as a predictor of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2005, 193, 965-972.
44. Ciantar E, Walker JJ. Pre-eclampsia, severe pre-eclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes and low platelets syndrome: what is new? *Womens Health (Lond Engl)*. 2011, 7, 555-569.
45. Tanaka M, Jaamaa G, Kaiser M. Racial disparity in hypertensive disorders of pregnancy in New York State: a 10-year longitudinal population-based study. *Am J Public Health*. 2007, 97, 163-170.
46. Luo ZC, An N, Xu HR, Larante A, Audibert F, Fraser WD. The effects and mechanisms of primiparity on the risk of pre-eclampsia: a systematic review. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2007, 21, 1, 36-45.
47. Bianco AT, Smilen SW, Davis Y, Lopez S, Lapinski R, Lockwood CJ. Pregnancy outcome and weight gain recommendations for the morbidly obese woman. *Obstet Gynecol*. 1998, 91, 97-102.
48. Wen SW, Chen XK, Rodger M, White RR, Yang Q, Smith GN, Sigal RJ, Perkins SL, Walker MC. Folic acid supplementation in early second trimester and the risk of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2008, 198, 45-47.
49. Widecka K, Grodzicki T, Narkiewicz K, Tykarski A, Dziwura J. Zasady postępowania w nadciśnieniu tętniczym - 2011 rok Wytyczne Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego. 2011.
50. Kawecka-Jaszcz K, Lubaszewski W. Nadciśnienie tętnicze w ciąży. *Przew Lek*. 2003, 6, 1, 120-124.
51. Jain S, Sharma P, Kulshreshtha S, Mohan G, Singh S. The role of calcium, magnesium, and zinc in pre-eclampsia. *Biol Trace Elem Res*. 2010, 133, 162-170.
52. Moutquin JM, Garner PR, Burrows RF, Rey E, Helewa ME, Lange IR, Rabkin SW. Report of the Canadian Hypertension Society Consensus Conference: 2. Nonpharmacologic management and prevention of hypertensive disorders in pregnancy. *CMAJ*. 1997, 1, 157, 907-919.
53. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2000, 183, 1-22.
54. Giannubilo SR, Bezzeccheri V, Cecchi S, Landi B, Battistoni GI, Vitali P, Cecchi L, Tranquilli AL. Nifedipine versus labetalol in the treatment of hypertensive disorders of pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*. 2012, 286, 637-642.
55. Moser M, Brown CM, Rose CH, Garovic VD. Hypertension in pregnancy: is it time for a new approach to treatment? *J Hypertens*. 2012, 30, 1092-1100.

56. Shekhar S, Sharma C, Thakur S, Verma S. Oral nifedipine or intravenous labetalol for hypertensive emergency in pregnancy: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol.* 2013, 122, 1057-1063.
57. Lindheimer MD, Taler SJ, Cunningham FG. Hypertension in pregnancy. *J Am Soc Hypertens.* 2008, 2, 484-494.
58. Yemini M, Shoham Z, Dgani R, Lancet M, Mogilner BM, Nissim F, Bar-Khayim Y. Lupus-like syndrome in a mother and newborn following administration of hydralazine; a case report. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1989, 30, 193-197.
59. Magee LA, Cham C, Waterman EJ, Ohlsson A, von Dadelszen P. Hydralazine for treatment of severe hypertension in pregnancy: meta-analysis. *BMJ.* 2003, 25, 327, 955-960.
60. Sørensen HJ¹, Mortensen EL, Reinisch JM, Mednick SA. Do hypertension and diuretic treatment in pregnancy increase the risk of schizophrenia in offspring? *Am J Psychiatry.* 2003, 160, 464-468.
61. Cooper WO, Hernandez-Diaz S, Arbogast PG, Dudley JA, Dyer S, Gideon PS, Hall K, Ray WA. Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. *N Engl J Med.* 2006, 8; 354, 2443-2451.
62. Duley L, Gülmezoglu AM, Henderson-Smart DJ, Chou D. Magnesium sulphate and other anticonvulsants for women with pre-eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010, 10, CD000025.
63. Duley L, Henderson-Smart DJ, Chou D. Magnesium sulphate versus phenytoin for eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010, CD000128.
64. Duley L, Henderson-Smart D. Magnesium sulphate versus diazepam for eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003, CD000127.
65. Mate A, Vázquez CM, Leiva A, Sobrevía L. New therapeutic approaches to treating hypertension in pregnancy. *Drug Discov Today.* 2012, 17, 1307-1315.
66. George EM, Granger JP. Mechanisms and potential therapies for preeclampsia. *Curr Hypertens Rep.* 2011, 13, 269-275.
67. Broughton Pipkin F. Risk factors for preeclampsia. *N Engl J Med.* 2001, 344, 925-926.
68. Cooper D, Brennecke S, Wilton A. Genetics of pre-eclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 1993, 12, 1-23.
69. Nurk E, Tell GS, Refsum H, Ueland PM, Vollset SE. Factor V Leiden, pregnancy complications and adverse outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *QJM.* 2006, 99, 289-298.
70. Silver RM, Zhao Y, Spong CY, Sibai B, Wendel G Jr, Wenstrom K, Samuels P, Caritis SN, Sorokin Y, Miodovnik M, O'Sullivan MJ, Conway D, Wapner RJ. Prothrombin gene G20210A mutation and obstetric complications. *Obstet Gynecol.* 2010, 115, 14-20.
71. Buurma AJ, Turner RJ, Driessen JH, Mooyaart AL, Schoones JW, Bruijn JA, Bloemenkamp KW, Dekkers OM, Baelde HJ. Genetic variants in pre-eclampsia: a meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2013, 19, 289-303.
72. Hayashi M. Aetiology of pre-eclampsia and thrombophilic genetic mutations. *Clin Sci.* 2003, 105, 269-271.
73. Wiwanitkit V. Correlation between plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and pre-eclampsia: an appraisal. *Arch Gynecol Obstet.* 2006, 273, 322-324.
74. Morgan JA, Bombell S, McGuire W. Association of plasminogen activator inhibitor-type 1 (-675 4G/5G) polymorphism with pre-eclampsia: systematic review. *PLoS One.* 2013, 8, e56907.

75. Kim YJ, Park MH, Park HS, Lee KS, Ha EH, Pang MG. Associations of polymorphisms of the angiotensinogen M235 polymorphism and angiotensin-converting-enzyme intron 16 insertion/deletion polymorphism with preeclampsia in Korean women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004, 116, 48-53.
76. Atalay MA, Ozerkan K, Karkucak M, Yakut T, Atik Y, Develioglu OH. Polymorphisms in angiotensin-converting enzyme and glutathione s-transferase genes in Turkish population and risk for preeclampsia. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2012, 39, 466-469.
77. Song C, Xie S, Wang J, Lian J, Diao B, Tang Y. Association of angiotensinogen gene polymorphisms and angiogenic factors with preeclampsia in Chinese women. *Gynecol Obstet Invest.* 2013, 76, 64-68.
78. Radkov OV, Kalinkin MN, Zavarin VV. Genophenotypic analysis of angiotensinogen gene M235T polymorphism and preeclampsia. *Bull Exp Biol Med.* 2013, 154, 354-356.
79. Choi H, Kang JY, Yoon HS, Han SS, Whang CS, Moon IG, Shin HH, Park JB Association of Angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms with preeclampsia. *J Korean Med Sci.* 2004, 19, 253-257.
80. Procopciuc LM, Caracostea G, Zaharie G, Puscas M, Iordache G, Popa M, Colcear D, Olteanu I, Stamatian F. Maternal/newborn genotype contribution of the renin-angiotensin system (Met235Thr, Thr174Met, I/D-ACE, A2350G-ACE, A1166C-AT2R1, C3123A- AT2R2, 83A/G-REN) to the risk of pre-eclampsia: a Romanian study *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2011, 12, 539-548.
81. Dai B, Liu T, Zhang B, Zhang X, Wang Z. The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: a meta-analysis. *Gene.* 2013, 519, 187-193.
82. Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with severe preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 2000, 7, 238-241.
83. Yoshimura T, Chowdhury F, Yoshimura M, Okamura H. Genetic and environmental contributions to severe preeclampsia: lack of association with the endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp variant in a developing country. *Gynecol Obstet Invest.* 2003, 56, 10-13.
84. Jääskeläinen E, Toivonen S, Keski-Nisula L, Paattiniemi EL, Helisalml S, Punnonen K, Heinonen S. CTLA-4 polymorphism 49A-G is associated with placental abruption and preeclampsia in Finnish women. *Clin Chem Lab Med.* 2008, 46, 169-173.
85. Sowmya S, Ramaiah A, Sunitha T, Nallari P, Jyothy A, Venkateshwari A. Role of IL-10 -819(T/C) promoter polymorphism in preeclampsia. *Inflammation.* 2014, 37, 1022-1027.
86. Sowmya S, Sri Manjari K, Ramaiah A, Sunitha T, Nallari P, Jyothy A, Venkateshwari A. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms in women with early onset preeclampsia. *Clin Exp Immunol.* 2014, 178, 334-341.
87. Sowmya S, Ramaiah A, Sunitha T, Nallari P, Jyothy A, Venkateshwari A Evaluation of Interleukin-10 (G-1082A) promoter polymorphism in preeclampsia. *J Reprod Infertil.* 2013, 14, 62-66.
88. Naderi M, Yaghootkar H, Tara F, Tavakkol Afshari J, Farid Hosseini R, Ghayour Mobarhan M, Shapouri Moghadam A, Mirteimouri M, Tara SM. Tumor necrosis factor-alpha polymorphism at position -238 in preeclampsia. *Iran Red Crescent Med J.* 2014, 16, e11195.
89. Zhang C, Austin MA, Edwards KL, Farin FM, Li N, Hsu L, Srinouanprachanh SL, Williams MA Functional variants of the lipoprotein lipase gene and the risk of preeclampsia among non-Hispanic Caucasian women. *Clin Genet.* 2006, 69, 33-39.

90. Cheng D, Hao Y, Zhou W, Ma Y. Vascular endothelial growth factor +936C/T, -634G/C, -2578C/A, and -1154G/A polymorphisms with risk of preeclampsia: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013, 8, e78173.
91. Mosaferi E, Majidi J, Mohammadian M, Babaloo Z, Monfaredan A, Baradaran B. HLA-G Expression Pattern: Reliable Assessment for Pregnancy Outcome Prediction. *Adv Pharm Bull*. 2013, 3, 443-446.
92. Seremak-Mrozikiewicz A. Znaczenie metabolizmu folianów w rozwoju powikłań u kobiet ciężarnych. *Ginekol Pol*. 2013, 84, 377-384.
93. Murphy RP, Donoghue C, Nallen RJ, D'Mello M, Regan C, Whitehead AS, Fitzgerald DJ. Prospective evaluation of the risk conferred by factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in pregnancy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000, 20, 266-270.
94. Leclerc D, Wilson A, Dumas R, Gafuik C, Song D, Watkins D, Heng HH, Rommens JM, Scherer SW, Rosenblatt DS, Gravel RA Cloning and mapping of a cDNA for methionine synthase reductase, a flavoprotein defective in patients with homocystinuria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998, 95, 3059-3064.
95. Gąsiorowska D, Korzeniowska K, Jabłecka A. Homocysteina. *Farm Współcz*. 2008, 1, 169-175.
96. Laskowska-Klita T. Homocysteina i hiperhomocysteinemia. *Pol Merk Lek*. 2001, 57, 135-137.
97. Pérez-Sepúlveda A, España-Perrot P, Fernández X, Ahumada V, Bustos V, Arraztoa JA, Dobierzewska A, Figueroa-Diesel H, Rice GE, Illanes SE. Levels of Key Enzymes of Methionine-Homocysteine Metabolism in Preeclampsia. *Biomed Res Int*. 2013, 2013, 731-962.
98. Hill LD, York TP, Kusanovic JP. Epistasis between COMT and MTHFR in maternal-fetal dyads increases risk for preeclampsia. *PLoS ONE* 2011, 6, 1, e16681.
99. Wielkoszyński T, Zawadzki M, Zalejska-Fiolka J. Hiperhomocysteinemia jako czynnik ryzyka chorób układu nerwowego. *Czynniki Ryzyka*. 2007, 4, 45-51.
100. Niemiec T, Kajdy A. Zaburzenia metabolizmu homocysteiny w stanie przedzruciawkowym. *Ginekol Pol*. 2008, 79, 775-779.
101. Wichlińska-Lubińska M, Lubiński J. Znaczenie homocysteiny w patogenezie udaru niedokrwienego mózgu. *Udar Mózgu*. 2009, 11, 2, 80-84.
102. Wichlińska-Lipka M, Nyka WM. Rola homocysteiny w patogenezie chorób układu nerwowego. *Via Medica* 2008, 2, 223-228.
103. Kołodziejczyk J, Malinowska J, Olas B. Prozakrzepowe działanie podwyższonego stężenia homocysteiny i jej metabolitów w osoczu krwi. *Farm Przegl Nauk*. 2011, 2, 73, 39-45.
104. Koch H. Zaburzenia przemiany homocysteiny. *Clin. Pediatr*. 2001, 8, 11-14.
105. National High Blood Pressure Education Program Working Group report on High blood Pressure in Pregnancy 2000. NIH Publication No. 00-3029.
106. McKay JA, Groom A, Potter C, Coneyworth LJ, Ford D, Mathers JC, Relton CL. Genetic and Non-Genetic Influences during Pregnancy on Infant Global and Site Specific DNA Methylation: Role for Folate Gene Variants and Vitamin B12. *Plos One* 2012, 7, e33290.
107. Kim JH, Jeon YJ, Lee BE, Kang H, Shin JE, Choi DH. Association of methionine synthase and thymidylate synthase genetic polymorphisms with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2013, 99, 1674-1680.
108. Rah H, Choi YS, Jeon YJ, Choi Y, Cha SH, Choi DH. Solute Carrier Family 19, member 1 (SLC19A1) polymorphisms (-43T[C, 80G[A, and 696C[T), and haplotypes

- in idiopathic recurrent spontaneous abortion in a Korean population. *Reprod Sci* 2012, 19, 513-519.
109. Furness DLF, Fenech MF, Khong YT, Romero R, Dekker GA. One-carbon metabolism enzyme polymorphisms and uteroplacental insufficiency. *Am J Obstet Gynecol.* 2008, 199, 276-284.
 110. Cao Y, Zhang Z, Zheng Y, Yuan W, Wang J, Liang H, Chen J, Du J, Shen Y. The association of idiopathic recurrent early pregnancy loss with polymorphisms in folic acid metabolism-related genes. *Genes Nutr.* 2014, 9, 402-408.
 111. Naushad SM, Pavani A, Rupasree Y, Sriputna D, Gottumukkala SR, Digumarti RR, Kutala VK. Modulatory effect of plasma folate and polymorphisms in one-carbon metabolism on catecholamine methyltransferase (COMT) H108L associated oxidative DNA damage and breast cancer risk. *Indian J Biochem Biophys.* 2011, 48, 283-289.
 112. Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Yang H, Gravel RA, Rozen R. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. *Mol Genet Metab.* 1999, 67, 317-323.
 113. Fekete K, Berti C, Cetin I, Hermoso M, Koletzko BV, Decsi T. Perinatal folate supply: relevance in health outcome parameters. *Matern Child Nutr.* 2010, 6, 23-38.
 114. Kraczkowska S, Suchocka Z, Pachecka J. Podwyższone stężenie homocysteiny we krwi jako wskaźnik zagrożenia życia. *Biul Wyzd Farm AMW.* 2005, 3, 19-24.
 115. Ingec M, Borekci B, Kadanali S. Elevated plasma homocysteine concentrations in severe preeclampsia and eclampsia. *Tohoku J Exp Med.* 2005, 206, 225-231.
 116. Hasanzadeh M, Ayatollahi H, Farzadnia M, Ayati S, Khoob MK. Elevated plasma total homocysteine in preeclampsia. *Saudi Med J.* 2008, 29, 875-878.
 117. Dekker GA, de Vries JI, Doelitzsch PM, Huijgens PC, von Blomberg BM, Jakobs C, van Geijn HP. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1995, 173, 1042-1048.
 118. Khosrowbeygi A, Ahmadvand H. Circulating levels of homocysteine in preeclamptic women. *Bangladesh Med Res Counc Bull.* 2011, 37, 106-109.
 119. D'Anna R, Baviera G, Corrado F, Ientile R, Granese D, Stella NC. Plasma homocysteine in early and late pregnancies complicated with preeclampsia and isolated intrauterine growth restriction. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004, 83, 155-158.
 120. Middeldorp S, van de Poel MH, Bank I, Hamulyák K, Libourel EJ, Koopman MM, Prins MH, van der Meer J, Büller HR. Unselected women with elevated levels of factor VIII:C or homocysteine are not at increased risk for obstetric complications. *Thromb Haemost.* 2004, 92, 787-790.
 121. Leeda M, Riyazi N, de Vries JI, Jakobs C, van Geijn HP, Dekker GA. Effects of folic acid and vitamin B6 supplementation on women with hyperhomocysteinemia and a history of preeclampsia or fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 1998, 179, 135-139.
 122. Mitchell EA, Robinson E, Clark PM, Becroft DM, Glavish N, Pattison NS, Pryor JE, Thompson JM, Wild CJ. Maternal nutritional risk factors for small for gestational age babies in a developed country: a case-control study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004, 89, 431-435.
 123. Steegers-Theunissen RP, Van Iersel CA, Peer PG, Nelen WL, Steegers EA. Hyperhomocysteinemia, pregnancy complications, and the timing of investigation. *Obstet Gynecol.* 2004, 104, 336-343.
 124. Oleszczuk J, Leszczyńska-Gorzela B, Sawulicka-Oleszczuk H, Marciniak B, Poniedziałek-Czajkowska E, Pietras G, Kamiński K, Szymula D, Kimber-Trojnar Ż. Management of pregnancy complicated by hypertension. *Perinatol Neonatol.* 2006, 42, 32-39.

125. Kajdy A, Niemiec T. Homocysteine metabolism disorders as a potential predictor of preeclampsia. *Ginekol Pol.* 2008, 79, 775-779.
126. Bożentowicz M, Bobilewicz D. Holotranskobalamina - aktywna witamina B₁₂. *Abbott Voice.* 2006, 14, 3-7.
127. Brody LC, Conley M, Cox C, Kirke PN, McKeever MP, Mills JL, Molloy AM, O'Leary VB, Parle-McDermott A, Scott JM, Swanson DA. A polymorphism, R653Q, in the trifunctional enzyme methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase/formyltetrahydrofolate synthetase is a maternal genetic risk factor for neural tube defects: report of the Birth Defects Research Group. *Am J Hum Genet.* 2002, 71, 1207-1215.
128. Czeczot H. Kwas foliowy w fizjologii i patologii. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2008; 62, 405-419.
129. Yu K, Zhang J, Zhang J, Dou C, Gu S, Xie Y, Mao Y, Ji C. Methionine synthase A2756G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis *Eur J Hum Genet.* 2010, 18, 370-378.
130. Nagele P, Zeugswetter B, Eberle C, Hüpfel M, Mittlböck M, Födinger M. A common gene variant in methionine synthase reductase is not associated with peak homocysteine concentrations after nitrous oxide anesthesia *Pharmacogenet Genomics.* 2009, 19, 325-329.
131. Furness DL, Fenech MF, Khong YT, Romero R, Dekker GA. One-carbon metabolism enzyme polymorphisms and uteroplacental insufficiency. *Am J Obstet Gynecol.* 2008, 199, 276, 1-8.
132. Also-Rallo E, Lopez-Quesada E, Urreiziti R, Vilaseca MA, Laila JM, Balcells S, Grinberg D. Polymorphisms of genes involved in homocysteine metabolism in preeclampsia and in uncomplicated pregnancies. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005, 120, 45-52.
133. Barbosa PR, Stabler SP, Machado AL, Braga RC, Hirata RD, Hirata MH, Sampaio-Neto LF, Allen RH, Guerra-Shinohara EM. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphisms as determinants for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women. *Eur J Clin Nutr.* 2008, 62, 1010-1021.
134. Klerk M, Lievers KJ, Kluijtmans LA, Blom HJ, den Heijer M, Schouten EG, Kok FJ, Verhoef P. The 2756A>G variant in the gene encoding methionine synthase: its relation with plasma homocysteine levels and risk of coronary heart disease in a Dutch case-control study. *Thromb Res.* 2003, 110, 87-91.
135. Engel SM, Olshan AF, Siega-Riz AM, Savitz DA, Chanock SJ. Polymorphisms in folate metabolizing genes and risk for spontaneous preterm and small-for-gestational age birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2006, 195, 1231, 1-11.
136. Coppedè F, Migheli F, Bargagna S, Siciliano G, Antonucci I, Stuppia L, Palka G, Migliore L. Association of maternal polymorphisms in folate metabolizing genes with chromosome damage and risk of Down syndrome offspring. *Neurosci Lett.* 2009, 449, 15-19.
137. Liao YP, Bao MS, Liu CQ, Liu H, Zhang D. Folate gene polymorphism and the risk of Down syndrome pregnancies in young Chinese women. *Yi Chuan.* 2010, 32, 461-466.
138. Mostowska A, Hozyasz KK, Jagodzinski PP. Maternal MTR genotype contributes to the risk of non-syndromic cleft lip and palate in the Polish population. *Clin Genet.* 2006, 69, 512-517.
139. Brandalize AP, Bandinelli E, Borba JB, Félix TM, Roisenberg I, Schüler-Faccini L. Polymorphisms in genes MTHFR, MTR and MTRR are not risk factors for cleft lip/palate in South Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2007, 40, 787-791.

140. Cai D, Ning L, Pan C, Liu X, Bu R, Chen X, Wang K, Cheng Y, Wu B. Association of polymorphisms in folate metabolic genes and prostate cancer risk: a case-control study in a Chinese population. *J Genet*. 2010, 89, 263-267.
141. Guerreiro CS, Carmona B, Gonçalves S, Carolino E, Fidalgo P, Brito M, Leitão CN, Cravo M. Risk of colorectal cancer associated with the C677T polymorphism in 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase in Portuguese patients depends on the intake of methyl-donor nutrients. *Am J Clin Nutr*. 2008, 88, 1413-1418.
142. Rai PS, Murali TS, Vasudevan TG, Prasada SK, Bhagavath AK, Pai P, Gopinath PM, Satyamoorthy K. Genetic variation in genes involved in folate and drug metabolism in a south Indian population Indian. *J Hum Genet*. 2011, 17, 1, 48-53.
143. Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, Shane B, Roberts AC, Law GR, Rollinson S, Roman E, Cartwright RA, Morgan GJ. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002, 99, 3786-3791.
144. Wang S, Shen R, Shi X, Jiang T, Liu X, Shi Y, Chen S, Zhang W. The role of homocysteine metabolism related enzymes gene polymorphisms on pregnancy-induced hypertension. *Chinese J Birth Health Heredit*. 2006, 04, 3-8.
145. Vaughn JD, Bailey LB, Shelnett KP, Dunwoody KM, Maneval DR, Davis SR, Quinlivan EP, Gregory JF, Theriaque DW, Kauwell GP. Methionine synthase reductase 66A->G polymorphism is associated with increased plasma homocysteine concentration when combined with the homozygous methylenetetrahydrofolate reductase 677C->T variant. *J Nutr*. 2004, 134, 2985-2990.
146. Coppedè F, Bosco P, Lorenzoni V, Denaro M, Anello G, Antonucci I, Barone C, Stuppia L, Romano C, Migliore L. The MTRR 66A>G polymorphism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome in Caucasian women: a case-control study and a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2014, 41, 5571-5583.
147. Pozzi E, Vergani P, Dalprà L, Combi R, Silvestri D, Crosti F, Dell'Orto M, Valsecchi MG. Maternal polymorphisms for methyltetrahydrofolate reductase and methionine synthetase reductase and risk of children with Down syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 2009, 200, 636.e1-6.
148. Chango A, Fillon-Emery N, Mircher C, Bléhaut H, Lambert D, Herbeth B, James SJ, Réthoré MO, Nicolas JP. No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers. *Br J Nutr*. 2005, 94, 166-169.
149. Ouyang S, Li Y, Liu Z, Chang H, Wu J. Association between MTR A2756G and MTRR A66G polymorphisms and maternal risk for neural tube defects: a meta-analysis. *Gene*. 2013, 515, 308-312.
150. Guéant JL, Guéant-Rodriguez RM, Anello G, Bosco P, Brunaud L, Romano C, Ferri R, Romano A, Candito M, Namour B. Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? *Clin Chem Lab Med*. 2003, 41, 1473-1477.
151. Rady PL, Szucs S, Grady J, Hudnall SD, Kellner LH, Nitowsky H, Tyring SK, Matalon RK. Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) in ethnic populations in Texas; a report of a novel MTHFR polymorphic site, G1793A. *Am J Med Genet*. 2002, 107, 162-168.
152. Szvetko AL, Fowdar J, Nelson J, Colson N, Tajouri L, Csurhes PA, Pender MP, Griffiths LR. No association between MTHFR A1298C and MTRR A66G polymorphisms, and MS in an Australian cohort. *J Neurol Sci*. 2007, 252, 49-52.

153. Brandalize AP, Bandinelli E, Dos Santos PA, Schüler-Faccini L. Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism as risk factors for Down syndrome offspring in Southern Brazil. *Dis Markers*. 2010, 29, 95-101.
154. Wang XM, Wu HY, Qiu XJ. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene C677T polymorphism and risk of preeclampsia: an updated meta-analysis based on 51 studies. *Arch Med Res*. 2013; 44, 159-168.
155. Chedraui P, Salazar-Pousada D, Villao A, Escobar GS, Ramirez C, Hidalgo L, Pérez-López FR, Genazzani A, Simoncini T. Polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (C677T and A1298C) in nulliparous women complicated with preeclampsia. *Gynecol Endocrinol*. 2014, 30, 392-396.
156. Klai S, Fekih-Mrissa N, El Housaini S, Kaabechi N, Nsiri B, Rachdi R, Gritli N. Association of MTHFR A1298C polymorphism (but not of MTHFR C677T) with elevated homocysteine levels and placental vasculopathies. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2011, 22, 374-378.
157. Aggarwal S, Dimri N, Tandon I, Agarwal S. Preeclampsia in North Indian women: the contribution of genetic polymorphisms. *J Obstet Gynaecol Res*. 2011, 37, 1335-1341.
158. Canto P, Canto-Cetina T, Juárez-Velázquez R, Rosas-Vargas H, Rangel-Villalobos H, Canizales-Quinteros S, Velázquez-Wong AC, Villarreal-Molina MT, Fernández G, Coral-Vázquez R. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and glutathione S-transferase P1 A313G are associated with a reduced risk of preeclampsia in Maya-Mestizo women. *Hypertens Res*. 2008, 31, 1015-1019.
159. Kupferminc MJ, Peri H, Zwang E, Yaron Y, Wolman I, Eldor A. High prevalence of the prothrombin gene mutation in women with intrauterine growth retardation, abruptio placentae and second trimester loss. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000, 79, 963-967.
160. Gebhardt GS, Scholtz CL, Hillermann R, Odendaal HJ. Combined heterozygosity for methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) mutations C677T and A1298C is associated with abruptio placentae but not with intrauterine growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001, 97, 174.
161. Mtiraoui N, Zammiti W, Ghazouani L, Braham NJ, Saidi S, Finan RR, Almawi WY, Mahjoub T. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphism and changes in homocysteine concentrations in women with idiopathic recurrent pregnancy losses. *Reproduction*. 2006, 131, 395-401.
162. Nair RR, Khanna A, Singh K. MTHFR C677T polymorphism and recurrent early pregnancy loss risk in north Indian population. *Reprod Sci*. 2012, 19, 210-215.
163. Ren A, Wang J. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and the risk of unexplained recurrent pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril*. 2006, 86, 1716-1722.
164. Garrod MG, Allen LH, Haan MN, Green R, Miller JW. Transcobalamin C776G genotype modifies the association between vitamin B12 and homocysteine in older Hispanics. *Eur J Clin Nutr*. 2010, 64, 503-509.
165. Sunder-Plassmann G, Födinger M. Genetic determinants of the homocysteine level. *Kidney Int Suppl*. 2003, 84, 141-144.
166. Pietrzyk JJ, Bik-Multanowski M. 776C>G polymorphism of the transcobalamin II gene as a risk factor for spina bifida. *Mol Gen Metab*. 2003, 80, 364-370.
167. Martinelli M, Scapoli L, Palmieri A, Pezzetti F, Baciliero U, Padula E. Study of four genes belonging to the folate pathway: transcobalamin 2 is involved in the onset of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat*. 2006, 27, 294-298.
168. Zetterberg H, Regland B, Palmer M, Rymo L, Zafiroopoulos A, Arvanitis DA. The transcobalamin codon 259 polymorphism influences the risk of human spontaneous abortion. *Hum Reprod*. 2002, 17, 3033-3036.

169. Martinelli M, Girardi A, Cura F, Carinci F, Morselli PG, Scapoli L. Evidence of the involvement of the DHFR gene in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Med Genet.* 2014, 57, 1-4.
170. Cario H, Smith DE, Blom H, Blau N, Bode H, Holzmann K, Pannicke U, Hopfner KP, Rump EM, Ayric Z, Kohne E, Debatin KM, Smulders Y, Schwarz K. Dihydrofolate reductase deficiency due to a homozygous DHFR mutation causes megaloblastic anemia and cerebral folate deficiency leading to severe neurologic disease. *Am J Hum Genet.* 2011, 88, 226-231.
171. Parle-McDermott A, Pangilinan F, Mills JL, Signore CC, Molloy AM, Cotter A, Conley M, Cox C, Kirke PN, Scott JM, Brody LC. A polymorphism in the MTHFD1 gene increases a mother's risk of having an unexplained second trimester pregnancy loss. *Mol Hum Reprod.* 2005, 11, 477-480.
172. Scala I, Granese B, Sellitto M, Salomè S, Sammartino A, Pepe A, Mastroiacovo P, Sebastio G, Andria G. Analysis of seven maternal polymorphisms of genes involved in homocysteine/folate metabolism and risk of Down syndrome offspring. *Genet Med.* 2006, 8, 409-416.
173. Neagos D, Cretu R, Tutulan-Cunita A, Stoian V, Bohiltea LC. Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFD) enzyme polymorphism as a maternal risk factor for trisomy 21: a clinical study. *J Med Life.* 2010, 3, 454-457.
174. Solanky N, Requena Jimenez A, D'Souza SW, Sibley CP, Glazier JD. Expression of folate transporters in human placenta and implications for homocysteine metabolism. *Placenta* 2010, 31, 134-143.
175. Shin JA, Kim YJ, Park H, Kim HK, Lee HY. Localization of Folate Metabolic Enzymes, Methionine Synthase and 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase in Human Placenta. *Gynecol Obstet Invest.* 2014, 78, 259-265.
176. Miriuka SG, Langman LJ, Evrovski J, Miner SE, D'Mello N, Delgado DH. Genetic polymorphisms predisposing to hyperhomocysteinemia in cardiac transplant patients. *Transpl Int* 2005, 18, 29-35.
177. Padmanabhan N, Jia D, Geary-Joo C, Wu X, Ferguson-Smith AC, Fung E, Bieda MC, Snyder FF, Gravel RA, Cross JC, Watson ED. Mutation in folate metabolism causes epigenetic instability and transgenerational effects on development. *Cell.* 2013, 155, 81-93.
178. Seremak-Mrozikiewicz A. Metafolina - alternatywa dla suplementacji niedoboru folianów u kobiet ciężarnych. *Ginekol Pol.* 2013, 84, 641-646.

8. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Stan przedrzucawkowy (PE – *preeclampsia*) jest chorobą wieloczynnikową stanowiącą jedną z głównych przyczyn zwiększonej zachorowalności i umieralności matek, płodów i noworodków. Pomimo licznych badań nad mechanizmem powstawania stanu przedrzucawkowego podłoże tej choroby nadal nie zostało w pełni poznane. Kluczowymi elementami w patogenezie PE wydają się być: niewłaściwa adaptacja układu immunologicznego matki, niedokrwienie i niedotlenie łożyska oraz uszkodzenie śródbłonna naczyniowego. Hiperhomocysteinemia obserwowana we wczesnym etapie ciąży powikłanej później PE wskazuje na możliwe znaczenie zaburzeń cyklu przemian folianów w patogenezie choroby. Wyniki analiz sugerują również udział czynników genetycznych w etiologii PE. Sugeruje się znaczenie polimorfizmów genów kodujących enzymy metabolizmu folianów w cyklu metioninowym, niezbędne do przemiany homocysteiny - syntaza metioniny (*MTR - methionine synthase*) i reduktaza syntazy metioniny (*MTRR - methionine synthase reductase*).

Celem pracy była analiza częstości występowania poszczególnych genotypów i alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* oraz 66A>G genu *MTRR* w grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym z uwzględnieniem podziału na postać umiarkowaną i ciężką choroby oraz w grupie zdrowych ciężarnych z regionu Wielkopolski. Porównano poziom łożyskowej ekspresji genów *MTR* i *MTRR* pomiędzy grupą z PE a grupą zdrowych pacjentek. Podjęto próbę określenia znaczenia polimorfizmów 2756A>G *MTR* i 66A>G *MTRR* w etiologii stanu przedrzucawkowego z uwzględnieniem poziomu ekspresji w łożysku.

Analizie została poddana grupa 98 kobiet z PE oraz grupa 120 zdrowych pacjentek ciężarnych. Oznaczanie badanych polimorfizmów przeprowadzono metodą PCR/RFLP. Poziom łożyskowej ekspresji genów *MTR* i *MTRR* został określony za pomocą metody real-time PCR.

W pracy nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR*. W odniesieniu do polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* zaobserwowano istotny statystycznie wzrost częstości występowania genotypu GG oraz allela G w grupie kobiet z PE w porównaniu do grupy kontrolnej. Ponadto wykazano wzrost ekspresji mRNA genu *MTR* oraz spadek ekspresji mRNA genu *MTRR* w łożysku u pacjentek ze stanem przedrzucawkowym w porównaniu do zdrowych ciężarnych.

Uzyskane wyniki dotyczące polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* sugerują predyspozycję do wystąpienia stanu przedrzucawkowego u kobiet ciężarnych będących nosicielkami zmutowanego genotypu 66GG oraz zmutowanego allela 66G. Analiza poszczególnych genotypów oraz alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* nie wskazała bezpośredniego wpływu tego wariantu genetycznego na rozwój stanu przedrzucawkowego. W badanej grupie kobiet ze stanem przedrzucawkowym z populacji polskiej polimorfizmy 2756A>G genu *MTR* oraz 66A>G genu *MTRR* nie wykazują korelacji z analizowanymi parametrami klinicznymi i biochemicznymi. Przeprowadzone obserwacje sugerują wpływ wariantów zawierających co najmniej jeden zmutowany allel polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* na obniżenie poziomu jego ekspresji mRNA w łożysku u ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym. Zwiększona ekspresja mRNA genu *MTR* w połączeniu ze zmniejszoną ekspresją mRNA genu *MTRR* może sugerować istotną rolę zaburzeń szlaku metabolizmu folianów w kompartmentie łożyskowym w etologii stanu przedrzucawkowego.

9. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

The analysis of polymorphisms and expression of methionine synthase (MTR) and methionine synthase reductase (MTRR) genes in pathogenesis of preeclampsia

Preeclampsia (PE) is multifactorial disorder that is a main cause of morbidity and mortality of mothers, fetuses and newborns. Besides many researches the etiology of preeclampsia has not been fully elucidated. An important role in the pathogenesis of preeclampsia plays: disturbances in maternal immune system, the ischemia of placenta and the endothelial dysfunction. Hyperhomocysteinemia observed in early pregnancy complicated later by PE indicates the potential role of disturbances of folate cycle in pathogenesis of the disease. The results of analyses also indicate the contribution of the genetic factors in PE etiology. It is suggested the significance of gene polymorphisms of enzymes involved to methionine cycle, in homocysteine pathway - methionine synthase (MTR) and methionine synthase reductase (MTRR).

The goal of the study was to examine the frequency of genotypes and alleles of 2756A>G polymorphism of *MTR* and 66A>G polymorphism of *MTRR* genes in a group of women with PE (in mild and severe forms of this disorder) and healthy pregnant women. The study also compared the level of placental expression of *MTR* and *MTRR* genes between the group with PE and healthy pregnant women. An attempt was also made to determine the possible significance of 2756A>G *MTR* and 66A>G *MTRR* polymorphisms in the etiology of PE with allowing the expression level in placenta.

The group of 98 women with PE and the group of 120 healthy pregnant women was analysed. Determination of 2756A>G *MTR* and 66A>G *MTRR* polymorphisms was performed using PCR/RFLP method. The placental expression levels of genes was performed using real-time PCR method.

In the analysis any statistically significant differences in frequency of genotypes and alleles of 2756A>G *MTR* polymorphism between PE group and controls has been observed. Higher frequency 66GG genotype and 66G allele of 66A>G *MTR* polymorphism was observed in the group of PE compared to control group (statistically significant). Moreover, higher expression mRNA of *MTR* and lower expression mRNA of *MTRR* genes in placenta was observed in PE group compared to healthy pregnant women.

The obtained results for 66A>G polymorphism of *MTRR* gene suggest the predisposition to preeclampsia in pregnant women carriers of mutated 66GG genotype and

66G mutated allele. Analysis of particular genotypes and alleles of 2756A>G polymorphism of *MTR* gene do not indicate the influence of this genetic variant on preeclampsia etiology. In investigated study group of women with preeclampsia from polish population the 2756A>G *MTR* and 66A>G *MTRR* polymorphisms do not correlate with analysed clinical and biochemical parameters. The performed observation suggested the influence of variants containing at least one mutated allele of 66A>G *MTRR* polymorphism on decreasing level of its mRNA expression in placenta in pregnant women with preeclampsia. Increasing mRNA expression of *MTR* gene in connection with decreasing mRNA expression for *MTRR* gene could suggest the significance role of folate metabolism disturbances in placenta compartment in preeclampsia etiology.

10. WYKAZ TABEL I RYCIN

TABELE

- Tabela 1.** Charakterystyka analizowanych pacjentek.
- Tabela 2.** Sekwencja starterów zastosowanych w pracy.
- Tabela 3.** Skład mieszaniny reakcyjnej do hydrolizy produktów PCR enzymami *BsuRI* oraz *NdeI*.
- Tabela 4.** Sekwencje starterów użytych do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.
- Tabela 5.** Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę w celu amplifikacji transkryptu genów *GAPDH*, *MTR* i *MTRR*.
- Tabela 6.** Porównanie wartości parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy grupą kontrolną (GK, n=120) a grupą badaną (GB, n=98).
- Tabela 7.** Porównanie wartości parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy grupą kontrolną (GK, n=120) a grupą z umiarkowaną postacią PE (umiarkowana PE, n=52) oraz grupą z ciężką postacią PE (ciężka PE, n=46).
- Tabela 8.** Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 9.** Częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 10.** Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (*p*) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną.
- Tabela 11.** Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (*p*) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną.
- Tabela 12.** Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie z umiarkowaną postacią PE oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 13.** Częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie z umiarkowaną postacią PE oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 14.** Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (*p*) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* pomiędzy grupą z umiarkowaną postacią PE a grupą kontrolną.
- Tabela 15.** Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (*p*) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* pomiędzy grupą z umiarkowaną postacią PE a grupą kontrolną.
- Tabela 16.** Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 17.** Częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 18.** Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (*p*) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* pomiędzy grupą z ciężką postacią PE a grupą kontrolną.
- Tabela 19.** Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (*p*) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* pomiędzy grupą z ciężką postacią PE a grupą kontrolną.
- Tabela 20.** Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

- Tabela 21.** Częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 22.** Porównanie wartości współczynników ryzyka (W.R.), istotności (*p*) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR*.
- Tabela 23.** Porównanie wartości współczynników ryzyka (W.R.), istotności (*p*) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR*.
- Tabela 24.** Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie z umiarkowaną postacią PE oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 25.** Częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie z umiarkowaną postacią PE oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 26.** Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (*p*) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* pomiędzy grupą z umiarkowaną postacią PE a grupą kontrolną.
- Tabela 27.** Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (*p*) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* pomiędzy grupą z umiarkowaną postacią PE a grupą kontrolną.
- Tabela 28.** Częstość występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 29.** Częstość występowania poszczególnych alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie z ciężką postacią PE oraz w grupie kontrolnej.
- Tabela 30.** Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (*p*) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* pomiędzy grupą z ciężką postacią PE a grupą kontrolną.
- Tabela 31.** Porównanie wartości współczynnika ryzyka (W.R.), istotności statystycznej (*p*) oraz 95% przedziału ufności (95% P.U.) dla alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* pomiędzy grupą z ciężką postacią PE a grupą kontrolną.
- Tabela 32.** Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie badanej.
- Tabela 33.** Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie kontrolnej.
- Tabela 34.** Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie z umiarkowaną postacią PE.
- Tabela 35.** Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie z ciężką postacią PE.
- Tabela 36.** Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie badanej.
- Tabela 37.** Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie kontrolnej.
- Tabela 38.** Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie z umiarkowaną postacią PE.

- Tabela 39.** Porównanie wartości wybranych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie z ciężką postacią PE.
- Tabela 40.** Porównanie zależności pomiędzy genotypami polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* a jego poziomem ekspresji w łożysku.
- Tabela 41.** Porównanie zależności pomiędzy genotypami polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* a jego poziomem ekspresji w łożysku.
- Tabela 42.** Zestawienie częstości występowania genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* wśród populacji na świecie.
- Tabela 43.** Zestawienie częstości występowania genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* wśród populacji na świecie.
- Tabela 44.** Znaczenie polimorfizmu 2756A>G i łożyskowej ekspresji genu *MTR* w rozwoju stanu przedrzucawkowego i powikłań pokrewnych.
- Tabela 45.** Znaczenie polimorfizmu 66A>G i ekspresji genu *MTRR* w rozwoju stanu przedrzucawkowego i powikłań pokrewnych.

RYCINY

- Rycina 1.** Wieloczynnikowe podłoże stanu przedrzucawkowego.
- Rycina 2.** Lokalizacja genu *MTR* na chromosomie 1 (1q43).
- Rycina 3.** Lokalizacja genu *MTRR* na chromosomie 5 (q15.32).
- Rycina 4.** Przemiany homocysteiny.
- Rycina 5.** Udział hiperhomocysteinemii w etiologii stanu przedrzucawkowego.
- Rycina 6.** Rozdział elektroforetyczny produktu trawienia genu *MTR* w 2% żelu agarozowym.
- Rycina 7.** Rozdział elektroforetyczny produktu trawienia genu *MTR* w 2,75% żelu agarozowym.
- Rycina 8.** Rozdział elektroforetyczny produktu amplifikacji genu *MTRR* w 2% żelu agarozowym.
- Rycina 9.** Rozdział elektroforetyczny produktu trawienia genu *MTRR* w 2,75% żelu agarozowym.
- Rycina 10.** Porównanie częstości występowania genotypów polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie badanej oraz grupie kontrolnej.
- Rycina 11.** Porównanie częstości występowania alleli polimorfizmu 2756A>G genu *MTR* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.
- Rycina 12.** Porównanie częstości występowania genotypów polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie badanej oraz grupie kontrolnej.
- Rycina 13.** Porównanie częstości występowania alleli polimorfizmu 66A>G genu *MTRR* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.
- Rycina 14.** Wyznaczanie temperatury topnienia produktu amplifikacji genu *GAPDH*.
- Rycina 15.** Przebieg reakcji rt-PCR dla genu *GAPDH*. Krzywa wzorcowa dla genu *GAPDH*.
- Rycina 16.** Wyznaczanie temperatury topnienia produktu amplifikacji genu *MTR*.
- Rycina 17.** Przebieg reakcji rt-PCR dla genu *MTR*. Krzywa wzorcowa dla genu *MTR*.
- Rycina 18.** Wyznaczanie temperatury topnienia produktu amplifikacji genu *MTRR*.
- Rycina 19.** Przebieg reakcji rt-PCR dla genu *MTRR*. Krzywa wzorcowa dla genu *MTRR*.
- Rycina 20.** Analiza zmian poziomu ekspresji genu *MTR* i *MTRR* w łożysku u kobiet ze stanem przedrzucawkowym w odniesieniu do grupy kontrolnej z wykorzystaniem reakcji rt-PCR.

- Rycina 21.** Zmiany w poziomie ekspresji genu *MTR* w łożysku w zależności od genotypu polimorfizmu 2756A>G tego genu.
- Rycina 22.** Zmiany w poziomie ekspresji genu *MTRR* w łożysku w zależności od genotypu polimorfizmu 66A>G tego genu.
- Rycina 23.** Reakcje katalizowane przez enzym MTHFD1.
- Rycina 24.** Dwuetapowa redukcja kwasu foliowego do tetrahydrofolanu (DHFR – reduktaza dihydrofolianowa).
- Rycina 25.** Wzór strukturalny kwasu foliowego (C₁₉H₁₉O₆N₇, m.cz. 441,4).