

LEK. PAULA MIKOŁAJSKA-PTAŚ

**ZNACZENIE WYBRANYCH POLIMORFIZMÓW GENÓW
UKŁADU METALOPROTEINAZ
I ICH INHIBITORÓW TKANKOWYCH W PORODZIE
PRZEDWCZESNYM**

ROZPRAWA NA STOPIEŃ NAUKOWY DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

PROMOTOR: DR HAB. N. MED. HUBERT WOLSKI



**KOLEGIUM NAUK MEDYCZNYCH
UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

POZNAŃ 2021

Serdecznie dziękuję

*Mojemu Promotorowi Panu Dr. hab. n. med. Hubertowi Wolskiemu za opiekę oraz
nieustanną mobilizację do pracy*

*Pani Prof. dr hab. n. med. Agnieszce Seremak-Mrozikiewicz za nieocenioną
pomoc i wszelkie uwagi udzielone podczas powstawania niniejszej rozprawy doktorskiej*

*Panu Prof. dr. hab. n. med. Krzysztofowi Drewsowi za życzliwość, wsparcie oraz
przekazaną wiedzę*

*Pani Dr n. med. Grażynie Kurzawińskiej za okazaną pomoc na każdym etapie
prowadzenia badań naukowych*

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

1 WSTĘP	6
1.1 Poród przedwczesny jako istotny problem medyczny	6
1.2 Definicja i objawy kliniczne porodu przedwczesnego	7
1.3 Epidemiologia porodu przedwczesnego	8
1.4 Etiopatogeneza porodu przedwczesnego	9
1.5 Genetyczne uwarunkowania porodu przedwczesnego	13
1.6 Metaloproteinazy	15
1.7 Funkcje metaloproteinaz w organizmie	19
1.8 Udział metaloproteinaz w etiologii porodu przedwczesnego	21
1.9 Wybrane polimorfizmy genów metaloproteinaz	23
1.10 Tkankowe inhibitory metaloproteinaz	25
1.11 Hipoteza badawcza	28
2 CEL PRACY	29
3 MATERIAŁ I METODYKA	30
3.1 Materiał	30
3.2 Metodyka	31
3.2.1 Izolacja DNA	32
3.2.2 Reakcja łańcuchowa polimerazy/polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych	33
3.3 Obliczenia statystyczne	39
4 WYNIKI	40
4.1 Charakterystyka danych klinicznych pacjentek i ich noworodków	40
4.2 Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów u kobiet z porodem przedwczesnym oraz w grupie kontrolnej	46
4.3 Analiza nierównowagi sprzężeń i częstości występowania haplotypów analizowanych wariantów genów <i>MMP9</i> oraz <i>TIMP2</i>	57
4.4 Związek częstości współwystępowania genotypów badanych wariantów genetycznych z porodem przedwczesnym	59
4.5 Asocjacja danych klinicznych matek i ich noworodków z badanymi wariantami polimorficznymi	60
5 DYSKUSJA	64
5.1 Częstość występowania na świecie analizowanych w pracy wariantów genetycznych	64
5.2 Związek metaloproteinaz i ich inhibitorów tkankowych z porodem przedwczesnym	68
5.3 Badania asocjacyjne genów kandydujących w etiologii porodu przedwczesnego	74

5.4	Polimorfizmy genów metaloproteinaz w etiologii porodu przedwczesnego.	81
5.5	Implikacje kliniczne badań w zakresie etiologii porodu przedwczesnego....	86
5.6	Ograniczenia przeprowadzonych badań.....	87
5.7	Podsumowanie.....	88
6	WNIOSKI.....	90
7	BIBLIOGRAFIA.....	91
8	STRESZCZENIE W J.POLSKIM.....	105
9	STRESZCZENIE W J.ANGIELSKIM.....	109
10	SPIS TABEL, RYCIN.....	113

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ADAM	adamalizyny (ang. <i>A disintegrin-like and metalloproteinase</i>)
ADAMTS	ADAM z motywami trombospondyny (ang. <i>A Disintegrin-like And Metalloprotease with Thrombospondin motifs</i>)
ADH1C	dehydrogenaza alkoholowa 1C (ang. <i>Alcohol dehydrogenase 1C</i>)
AP-1	białkowy aktywator transkrypcji 1 (ang. <i>Activator on protein 1</i>)
C/EBP	czynniki transkrypcyjne C/EBP lub białka wiążące się z sekwencją CCAAT (ang. <i>CCAAT enhancer binding proteins</i>)
COX2	cyklooxygenaza 2 (ang. <i>Cyclooxygenase</i>)
CRH	kortykoliberyna (ang. <i>Corticotropin releasing hormone</i>)
CYP1A	Cytochrom P450 1A (ang. <i>Cytochrome P450 1A</i>)
CYP2D6	Cytochrom P450 2D6 (ang. <i>Cytochrome P450 2D6</i>)
CYP2E1	Cytochrom P450 2E1 (ang. <i>Cytochrome P450 2E1</i>)
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa (ang. <i>Extracellular matrix</i>)
ERK1/2	kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo (ang. <i>Extracellular signaling-regulated kinase</i>)
ETS	czynniki transkrypcyjne Ets (ang. <i>E26 transformation-specific</i>)
GST	glutathion-S-transferaza (ang. <i>Glutathione S-transferase</i>)
GSTT1	glutathion-S-transferaza T1 (ang. <i>Glutathione S-transferase theta 1</i>)
IL	interleukina (ang. <i>Interleukin</i>)
IL1RN	antagonista receptora interleukiny 1 (ang. <i>Interleukin 1 receptor antagonist</i>)
JNK	kinaza c-Jun (ang. <i>c-Jun. N-terminal kinase</i>)
LPS	lipopolisacharyd (ang. <i>Lipopolysacharid</i>)
MCP-3	białko chemotaktyczne monocytów (ang. <i>Monocyte chemotactic protein 3</i>)
MMPs	metaloпротеinazy macierzowe (ang. <i>Matrix metalloproteinases</i>)
NAT2	N-acetylotransferaza 2 (ang. <i>N-acetyltransferase 2</i>)
NF kappaB	jądrowy czynnik kappa- wzmacniacz z aktywowanych limfocytów B (ang. <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
OPRM1	receptor opioidowy typu mu 1 (ang. <i>Opioid receptor mu 1</i>)
PEA3	aktywator wzmacniający ekspresję genów wirusa polio (ang. <i>Polymavirus enhancer A-binding protein-3 site</i>)
PF-4	czynniki płytkowy (ang. <i>Platelet factor 4</i>)
PGE	prostaglandyna E2 (ang. <i>Prostaglandin E2</i>)
PGR	receptor progestronu (ang. <i>Progesterone receptor</i>)
PPROM	przedwczesne pęknięcie błon płodowych (ang. <i>preterm premature rupture of membranes</i>)
PTD	poród przedwczesny (ang. <i>preterm delivery</i>)
SAF	czynniki aktywujący surowiczy amyloid A (ang. <i>serum amyloid A-activating factor</i>)
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SP-A	białko surfaktantu A (ang. <i>Surfactant protein A</i>)
Sp-1	czynniki transkrypcyjne 1 (ang. <i>Specificity protein 1</i>)
SPTD	samoistny poród przedwczesny (ang. <i>Spontaneous preterm delivery</i>)
sTNFR1	rozpuszczalny receptor dla TNF typu 1 (ang. <i>Soluble TNF Receptor 1</i>)
sTNFR2	rozpuszczalny receptor dla TNF typu 2 (ang. <i>Soluble TNF Receptor 2</i>)

TIMPs	tkankowe inhibitory metaloproteinaz (ang. <i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>)
TLR	receptor Toll-like (ang. <i>Toll-like receptor</i>)
TNF-α	czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. <i>Tumor necrosis factor alpha</i>)
TGF-β1	transformujący czynnik wzrostu beta 1 (ang. <i>Transforming growth factor β1</i>)

1. WSTĘP

1.1. Poród przedwczesny jako istotny problem medyczny

Poród przedwczesny (PTD - *preterm delivery*) jest jednym z najistotniejszych wyzwań medycyny XXI wieku. Pomimo postępu wiedzy oraz modyfikacji postępowania klinicznego na przestrzeni lat, problem ten nadal dotyczy dużej grupy społecznej. Wcześnieactwo jest przyczyną 70% zgonów noworodków, a metody leczenia tego powikłania są bardzo kosztowne. Badania wskazują, że wysokość kosztów hospitalizacji noworodka kształtuje się proporcjonalnie odwrotnie do urodzeniowej masy ciała. W Stanach Zjednoczonych koszty związane z porodem przedwczesnym wynoszą rocznie aż 26 bilionów dolarów. Ta wysoka suma wynika z konieczności prowadzenia długotrwałej specjalistycznej opieki medycznej nad wcześniakami. Koszty te obejmują także pomoc socjalną, rehabilitację oraz rentę w późniejszych latach życia. Zredukowanie liczby porodów przedwczesnych istotnie wpłynęłoby na poprawę zdrowia społeczeństwa, stąd zapobieganie wystąpieniu tego powikłania staje się priorytetem dla sektora zdrowia publicznego [Behrman i wsp., 2007]. Największą grupę wśród wcześniaków stanowią noworodki urodzone po 32 tc. Dzieci urodzone przed 28 tc. stanowią mniej liczną grupę, jednak wymagają długotrwałej terapii i zastosowania kosztownych metod leczniczych, zarówno w pierwszych tygodniach życia, jak również wczesnego i późnego dzieciństwa, a nawet w wieku dorosłym. Noworodki urodzone przedwcześnie obciążone są większą śmiertelnością oraz zachorowalnością w porównaniu z dziećmi urodzonymi o czasie, a zachorowalność jest odwrotnie proporcjonalna do wieku ciążowego oraz urodzeniowej masy ciała. Powikłania wynikające z niedojrzałości mogą dotyczyć każdego narządu. Wczesne powikłania obejmują choroby układu oddechowego jak zespół zaburzeń oddychania, przewlekła choroba płucna, bezdech, również martwicze zapalenie jelit, retinopatia, krwotoki dokomorowe, trwałe ubytki neurologiczne, zaburzenia termoregulacji i metabolizmu. W pierwszych latach życia dominują późne następstwa wcześniactwa m.in. mózgowe porażenie dziecięce, opóźnienie umysłowe, zaburzenia rozwojowe, neuromotoryczne i poznawcze. Problemy zdrowotne dzieci urodzonych przedwcześnie nie ograniczają się tylko do okresu noworodkowego. Wcześnieactwo ma swoje poważne konsekwencje w późniejszych etapach życia. U wcześniaków udowodniono częstsze występowanie chorób układu krążenia oraz chorób metabolicznych: cukrzycy typu 1 oraz cukrzycy

typu 2. Wieloczynnikowa etiologia porodu przedwczesnego oraz nie w pełni poznane mechanizmy rozpoczęcia porodu powodują, że nadal powikłanie to stanowi jeden z najważniejszych problemów w medycynie perinatalnej [Saigal i wsp., 2008, Li i wsp., 2014, Barfield i wsp., 2018].

1.2. Definicja i objawy kliniczne porodu przedwczesnego

Poród przedwczesny definiowany jest jako poród odbywający się między skończonym 22 a 36+6 tc. lub przed 259 dniami trwania ciąży. Termin porodu wyznaczany jest zgodnie z regułą Naegelego, według której od pierwszego dnia ostatniej miesiączki odejmuje się trzy miesiące i dodaje 7 dni. Metoda ta, ma jednak zastosowanie tylko w przypadku regularnie miesiączkujących kobiet, co 28 dni.

W literaturze istnieje kilka klasyfikacji porodu przedwczesnego. Jednym z ich jest podział według czasu trwania ciąży. Podział ten ma duże znaczenie praktyczne oraz kliniczne, gdyż im wcześniej dochodzi do narodzin dziecka, tym większe jest ryzyko zgonu oraz powikłań okresu noworodkowego. Poród przedwczesny podzielić można na [Kalinka i wsp., 2012, Howson i wsp., 2012]:

- poród skrajnie przedwczesny (*extremely preterm*) <28 tc., co stanowi ok 7% porodów przedwczesnych
- poród bardzo przedwczesny (*very preterm*) 28-31+6 tc. występujący z częstością ok.18%
- umiarkowanie przedwczesny >32-36+6 tc. (*moderately preterm*), występujący z częstością ok. 75%, z czego tzw. późne wcześniaki, czyli dzieci urodzone między 34 a 36 tc. stanowią nawet aż 70% wszystkich noworodków urodzonych przed 37 tc.

Poród przedwczesny podzielić również można na trzy podgrupy, w zależności od przyczyny jego wystąpienia:

- idiopatyczny poród przedwczesny z samoistnie rozpoczynającą się czynnością skurczową, dotyczy 50% porodów przed terminem
- przedwczesne odpłynięcie płynu owodniowego (PPROM - *preterm premature rupture of membrane*) stanowi 30% porodów przedwczesnych
- jatrogeny poród przedwczesny dotyczy ciąż zakończonych przedwcześnie ze względu na stan zdrowia matki lub płodu, co stanowi 20% wszystkich porodów przed 37 tc.

Ważnym aspektem pozostaje odróżnienie zagrażającego porodu przedwczesnego od już rozpoczętego porodu przed 37 tc. Zagrażający poród przedwczesny można zdefiniować jako bardzo wczesną fazę porodu przedwczesnego. Tak samo charakteryzuje się wystąpieniem czynności skurczowej, która w przeciwieństwie do porodu przedwczesnego w toku, nie powoduje skracania i rozwierania szyjki macicy. Klinicznymi kryteriami rozpoczętego porodu przedwczesnego są: obecność skurczów macicy - minimum 4 skurcze na 20 minut, skrócenie szyjki macicy o 80% lub rozwarcie szyjki macicy przynajmniej na 2 cm. Krótka szyjka macicy definiowana jest jako szyjka długości <25 mm, jednak większość ciężarnych z długością szyjki macicy w tym przedziale, nie urodzi przedwcześnie. Niektórzy badacze są zdania, by punktem odcięcia była wartość długości szyjki <15 mm, gdyż taka długość szyjki wiąże się z 50% ryzykiem wystąpienia porodu przedwczesnego [Kalinka i wsp., 2012, Goldenberg i wsp., 2008].

1.3. Epidemiologia porodu przedwczesnego

Mimo ciągłego rozwoju medycyny matczyno-łożyskowej, poród przedwczesny jest jednym z największych problemów współczesnej nauki. Oszacowano, że rocznie na świat przychodzi przedwcześnie, aż 15 mln noworodków, co stanowi 11,1% wszystkich żywych porodów. Nadal dominuje tendencja wzrostowa tego powikłania. Dodatkowo, komplikacje zdrowotne wynikające z wystąpienia porodu przedwczesnego stanowią najczęstszą bezpośrednią przyczynę śmierci w okresie noworodkowym oraz zaraz za zapaleniem płuc, są drugą przyczyną zgonów dzieci do 5 roku życia [Blencowe i wsp., 2013].

Beck i wsp. opublikowali w 2010 r. analizę epidemiologiczną dotyczącą porodu przedwczesnego. Według nich w 2005 r. występowanie tego powikłania w 92 krajach oszacowano na 9,6% [Beck i wsp., 2010]. Kolejne doniesienia z 2010 roku szacowały występowanie porodu przedwczesnego na świecie na poziomie 11%. Dodatkowo Blencowe i wsp. badali terytorialne występowanie porodu przedwczesnego, wykazując dużą rozpiętość od 5% w krajach północnej Europy do aż 18% w krajach Afryki (Malawi) [Blencowe i wsp., 2012, Blencowe i wsp., 2013].

W kolejnym badaniu dotyczącym epidemiologii porodu przedwczesnego w Europie w latach 1996-2008, wykazano że poród przedwczesny obejmuje 5,5-11,1% żywych urodzeń w zależności od kraju. W Irlandii oraz Finlandii zaobserwowano najniższą liczbę porodów przedwczesnych w ciążach pojedynczych. Największy

odsetek porodów przed 37 tc. zarówno w ciążach pojedynczych jak i mnogich wystąpił w Austrii. Według tego raportu, w Polsce, najniższa liczba wszystkich, żywych urodzeń przed 37 tc. wynosiła 6,3% w 2000 r. Wzrosła ona do wartości 6,6% w 2008 r. [Bomba-Opoń i wsp., 2016, Zeitlin i wsp., 2013].

Powyższe dane wskazują, iż porody przedwczesne dotyczą nie tylko krajów rozwijających się, jak subsaharyjska Afryka, czy południowa Azja, gdzie rodzi się ponad 60% wcześniaków, ale także tych wysoko rozwiniętych. Stany Zjednoczone są krajem, który od lat charakteryzuje się wysokimi wskaźnikami porodów przedwczesnych [Bomba-Opoń i wsp., 2016, Blencowe i wsp., 2012, Purisch i wsp., 2017]. Raport z 2018 r. podaje, iż liczba porodów przedwczesnych w Stanach Zjednoczonych uległa znacznemu wzrostowi w porównaniu do 2017 r. i wynosi 10,02% [Martin i wsp., 2019].

W Polsce, według najnowszych danych Głównego Urzędu Statystycznego w 2018 r. urodziło się ogółem 389 455 dzieci, z czego 388 178 dotyczyło żywych urodzeń. Tak jak i we wcześniejszych latach, najliczniejszą grupą wśród dzieci urodzonych przedwcześnie były te, urodzone między 32-36 tc., stanowiąc aż 24 078 urodzeń. Między 28 a 31 tc. urodziło się 2 751 dzieci. Te grupy dzieci wciąż stanowią duże wyzwanie dla współczesnej neonatologii [GUS, 2019].

1.4. Etiopatogeneza porodu przedwczesnego

Pierwsze badania nad etiopatogenezą porodu przedwczesnego pojawiły się już ponad pół wieku temu. Literatura podaje, że już w 1946 r. Dunbar zauważył związek wystąpienia powikłań ciążowych z napięciem emocjonalnym kobiety [Dunbar, 1946]. Dalsze badania potwierdziły, iż stres, szczególnie w pierwszych miesiącach ciąży, może negatywnie wpływać na przebieg ciąży, prowadząc do jej przedwczesnego zakończenia. Do silnych czynników stresujących zaliczano choroby, śmierć w rodzinie, nadmierne obciążenie pracą zawodową lub domową, niekorzystne warunki socjalne, jak również wystąpienie porodu przedwczesnego w poprzedniej ciąży i związany z tym niepokój o dalszy przebieg obecnej ciąży. Obecnie wiadomo, iż stres w okresie ciąży wiąże się z aktywacją maczyno-płodowej osi podwzgórze-przysadka-nadnercza. Mechanizm ten zaobserwowany został zarówno w ciążach fizjologicznych, które kończyły się porodem w terminie, ale również w przypadku porodów przedwczesnych. McLean i wsp. nazwali ten proces „łożyskowym zegarem” (*placental clock*). Czynnikiem wyzwalającym jest wzrost poziomu kortykoliberyny (CRH - *corticotropin releasing hormone*) w

odpowiedzi na długotrwały stres. W konsekwencji dochodzi do wzrostu stężeń kortyzolu, estriolu, co razem z innymi hormonami, jak oksytocyna i prostaglandyny, inicjuje wystąpienie czynności skurczowej macicy [Czajka, 2006, Goodwin i wsp., 1999; McLean i wsp., 1995]. Hobel i wsp. dokonali seryjnych pomiarów stężeń CRH. Wykazali, iż poziom CRH u kobiet rodzących przedwcześnie jest znacząco wyższy niż u kobiet rodzących w terminie oraz następuje u nich szybszy przyrost poziomu CRH w okresie trwania ciąży. Pomiary te, mogą więc przyczynić się do rozpoznania kobiet, u których poród nastąpi przedwcześnie [Hobel i wsp., 1999].

Według współczesnych badaczy, poród przedwczesny określany jest mianem zespołu cech klinicznych i jest wynikiem aktywacji wielu patologicznych mechanizmów. Pogląd ten ma istotne znaczenie w rozumieniu całego procesu: w prowadzeniu diagnostyki, wdrażaniu leczenia i zapobieganiu porodowi przedwczesnemu. Roberto Romero, jeden z najwybitniejszych współczesnych naukowców badających zagadnienie porodu przedwczesnego wskazuje, iż odpowiedzialne za inicjację porodu przedwczesnego są: infekcja wewnątrzmaciczna, niewydolność szyjki macicy, zaburzenia ukrwienia łożyska, nadmierne rozciąganie włókien mięśniowych macicy, nieprawidłowa reakcja na allogeniczny przeszczep, reakcje alergiczne, zaburzenia hormonalne [Romero i wsp., 2006 a, Romero i wsp., 2006 b, Romero i wsp., 2010 a, Romero i wsp., 2010 b].

Najlepiej poznaną przyczyną porodu przedwczesnego jest infekcja wewnątrzowodniowa. Do zakażenia dochodzi najczęściej drogą wstępującą z pochwy, co wykazano izolując z płynu owodniowego takie same mikroorganizmy, jak te bytujące w drogach rodnych kobiet ciężarnych. Zakażenie dolnego odcinka dróg rodnych jest mocnym czynnikiem inicjującym poród przedwczesny, dlatego tak ważne jest badanie biocenozy pochwy w trakcie trwania ciąży. W dalszej kolejności do zakażenia wewnątrzowodniowego może dochodzić drogą zstępującą przez jajowody z jamy otrzewnej, drogą krwiopochodną, czy też przezłożyskową. Najnowsze badania pokazują jednak, iż do infekcji wewnątrzowodniowej może dochodzić także w przypadku braku wykrywalnych mikroorganizmów, co określa się mianem „sterylnego zakażenia” [Romero i wsp., 2014].

W warunkach prawidłowych jama owodni pozostaje sterylna. W prowadzonych badaniach, u kobiet z samoistnym porodem przedwczesnym z zachowanymi błonami do inwazji bakteryjnej dochodziło w 22%, u pacjentek z PPRM w 32,4%, a w przypadku niewydolności szyjki macicy w ponad połowie przypadków, co stanowiło 51%

badanych. Z płynu owodniowego u pacjentek z porodem przedwczesnym najczęściej izolowano takie gatunki bakterii jak: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* oraz *Fusobacterium species*. Bakterie oraz ich produkty rozpoznawane są przez receptory Toll-like (TLR - *Toll like receptors*), co stymuluje syntezę prostaglandyn oraz cytokin prozapalnych takich jak interleukiny (*interleukins*) - IL-8, IL-1, czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- α - *tumor necrosis factor alpha*) [Goncalves i wsp., 2002, Romero i wsp., 2006 b, Romero i wsp., 2014]. Cytokiny IL-1 oraz IL-6 bezpośrednio stymulują również komórki nadnerczy do wydzielania kortyzolu, co aktywuje maczyno-płodową oś podwzgórze-przysadka-nadnercza prowadząc w efekcie do porodu [Gravett i wsp., 1997]. Zaobserwowano także, że wysokie stężenia IL-6 w płynie owodniowym mogą być uznawane za swoisty marker toczącego się zakażenia wewnątrz jamy owodni [Romero i wsp., 2014].

Z reakcją zapalną wiąże się również przedwczesne dojrzewanie szyjki macicy oraz przedwczesne pęknięcie błon płodowych, jako że cytokiny, aktywują metaloproteinazy (MMPs – *matrix metalloproteinases*) enzymy degradujące tkankę łączną, które odpowiadają za niestabilność błon płodowych oraz szyjki macicy. Oprócz metaloproteinaz podobną rolę spełniają tripsyna, elastaza oraz trombina aktywująca MMP9 [Czajka, 2006].

W niewydolności szyjki macicy obserwuje się zbyt wczesne jej dojrzewanie, co prowadzi do bezbolesnego rozwierania szyjki, niejednokrotnie przy zachowaniu jej długości. Objawy niewydolności szyjki macicy opisali po raz pierwszy Cole, Culpepper i Rowland w 1658 r. [Culpepper i wsp., 1658]. Etiopatogeneza niewydolności szyjkowej jest bardzo złożona. Czynnikiem ryzyka są jatrogenne uszkodzenia szyjki macicy, ekspozycja na dietylostilbestrol w życiu płodowym, obniżenie działania progesteronu, choroby przewlekłe przebiegające z nieprawidłowościami budowy tkanki łącznej oraz czynniki genetyczne, jak polimorfizmy genów kolagenu [Romero i wsp., 2006 a].

Ciąże wielopłodowe, wielowodzie, jak również makrosomia płodu poprzez nadmierne rozciąganie włókien mięśniowych macicy zwiększają ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego. Na skutek rozciągania macicy, zwiększa się także jej kurczliwość, poprzez indukcję syntezy białek takich jak koneksyna-43, koneksyna-26, syntaza cyklicznego nadtlenu prostaglandynowego 2, prostaglandyny E2 (PGE - *Prostaglandin-E2*) oraz receptorów oksytocyny. Rozciąganie dolnego odcinka macicy powoduje wzrost produkcji IL-8 oraz kolagenaz, co wiąże się równolegle z

przedwczesnym dojrzewaniem szyjki macicy [Loudon i wsp., 2004, Behrman i wsp., 2007].

Zaburzenia samego procesu placentacji powodują z kolei nieprawidłowe ukrwienie łożyska. Zaburzenia te, mogą dotyczyć nieprawidłowej transformacji tętnic spiralnych, zakrzepicy lub wystąpienia zmian miażdżycowych. W konsekwencji powstają zmiany niedokrwienne co skutkuje wystąpieniem patologii położniczych, jak stan przedrzucawkowy. Pomimo braku szczegółowej wiedzy na temat tego procesu, postuluje się w nim udział układu renina-angiotensyna-aldosteron [Poisner i wsp., 1998].

Prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego matki jest niezbędnym elementem w fizjologicznej, donoszonej ciąży. Naukowcy zauważyli, iż płód może być postrzegany jako allograft. Zaburzenia w rozpoznawaniu i adaptacji antygenów płodu mogą prowadzić do porodu przedwczesnego. Romero i wsp. zaobserwowali wzrost poziomu receptorów dla IL-2 u kobiet z porodem przedwczesnym przy jednoczesnym braku infekcji. Wzrost stężeń receptorów IL-2 zauważono także u kobiet po przeszczepieniu nerek na wczesnym etapie odrzucenia przeszczepu [Romero i wsp., 2006 b].

Dotychczas, mechanizmy prowadzące do wystąpienia porodu przedwczesnego nie zostały dokładnie poznane, a ocena ryzyka wystąpienia tego powikłania jest niezwykle trudna. Bardzo często u jednej pacjentki współlistnieje kilka czynników zwiększających ryzyko wystąpienia porodu przed 37 tc. [Drews i wsp., 2016]. Niezwykle istotne jest określenie grup kobiet narażonych na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego. Poniżej przedstawiono wykaz czynników ryzyka porodu przedwczesnego według Leszczyńska-Gorzelak i wsp., spośród których najistotniejszymi czynnikami pozostają: wystąpienie porodu przedwczesnego w poprzednich ciążach (31-50%), niski status socjoekonomiczny (15-35%), ciąża wielopłodowa i jej powikłania (12-28%) oraz przedwczesne pęknięcie pęcherza płodowego (6-40%) (Tab. 1) [Leszczyńska-Gorzelak i wsp., 2006].

Tabela 1. Czynniki ryzyka porodu przedwczesnego [wg Leszczyńskiej-Gorzelak i wsp., 2006]

<i>Kategoria</i>	<i>Czynnik</i>
<i>Socjoekonomiczne i epidemiologiczne</i>	niski status socjoekonomiczny, niski poziom wykształcenia, niskie dochody, brak lub niedostateczna opieka przedporodowa, stres i przemęczenie, przemoc psychiczna i fizyczna w rodzinie, rasa czarna, wiek matki <18 r.ż i >40 r.ż, palenie tytoniu, narkomania, alkoholizm
<i>zdrowotne</i>	przedwczesne ukończenie ciąży w wywiadzie, niewydolność szyjki macicy, przedwczesne pęknięcie pęcherza płodowego, ciąża wielopłodowa, stosowanie technik wspomaganego rozrodu, krwawienie z dróg rodnych w II i III trymestrze, mięśniaki macicy (podśluzówkowe lub podłożyskowe), wady macicy (przegroda macicy, macica dwurożna, jednoróżna), przynajmniej jedna strata ciąży w II trymestrze
<i>infekcyjne</i>	zakażenie wewnątrzmaciczne (chorioamnionitis), nieprawidłowa flora bakteryjna pochwy (bacterial vaginosis), bakteriomocz bezobjawowy, ostre odmiedniczkowe zapalenie nerek, zapalenie pochwy/kanału szyjki, zapalenie tkanek przyzębia
<i>płodowe</i>	zgon wewnątrzmaciczny, ograniczenie wzrastania wewnątrzmacicznego, wady wrodzone
<i>łożyskowe</i>	przedwczesne odklejenie łożyska, łożysko przodujące, nieprawidłowy rozwój łożyska, guzy łożyska, zakażenia łożyska
<i>jatrogenne</i>	prenatalna diagnostyka inwazyjna, częste wewnętrzne badanie położnicze

1.5. Genetyczne uwarunkowania porodu przedwczesnego

Coraz częściej zwraca się uwagę na podłoże genetyczne powikłania jakim jest poród przedwczesny. W wielu pracach naukowych badano genetyczne predyspozycje do występowania porodu przedwczesnego jakimi są czynniki osobnicze oraz historia rodzinna. Na osobnicze uwarunkowania genetyczne wskazuje fakt częstszego występowania porodu przedwczesnego u kobiet, które same urodziły się przed ukończonym 37 tc. Według Portera i wsp. ryzyko to jest odwrotnie proporcjonalne do wieku ciążowego, w którym urodziły się matki same rodzące przedwcześnie. Dla kobiet urodzonych przed 30 tc. szansa wystąpienia porodu przedwczesnego była wyższa niż w grupie kontrolnej (OR=2,38). Czynnikiem zmniejszającym ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego był starszy wiek ciężarnej (OR=2,9 dla 17-latek, OR=1,9 dla 25-29-latek) oraz wzrost rodności [Porter i wsp., 1997]. Większe ryzyko występuje również u kobiet, u których w rodzinie występowały porody przedwczesne i u kobiet, których wcześniejsze ciążę zakończyły się przed 37 tc. [Ward i wsp., 2005, Varner i wsp., 2005]. Badania w populacji szwedzkiej wykazały dodatkowo, że kobiety, których siostry urodziły dzieci przed 37 tc., mają nawet 80% większe ryzyko wystąpienia tego

powikłania. W badaniu tym nie potwierdzono jednak występowania zwiększonego ryzyka porodu przedwczesnego dla kobiet, które same urodziły się przedwcześnie. Zwiększonym ryzykiem porodu przedwczesnego cechowały się natomiast kobiety urodzone z zaburzeniami wzrastania [Winkvist i wsp., 1998].

Co ciekawe, przedwczesny poród ojca dziecka nie ma znaczenia dla predykcji porodu przedwczesnego u jego potomstwa. Badania wykazały również, iż zmiana partnera u kobiety mającej w wywiadzie poród przedwczesny, nie powoduje redukcji ryzyka porodu przedwczesnego w kolejnej ciąży. U mężczyzn ryzyko to pozostaje nieistotne w kontekście zmiany partnerki. Sugeruje to, iż genom mężczyzny nie ma znaczenia w predykcji porodu przedwczesnego [Weinberg i wsp., 2009, Basso i wsp., 1999].

W kontekście genetycznych aspektów porodu przedwczesnego ważne są również predyspozycje rasowe. U kobiet rasy czarnej częściej dochodzi do zakończenia ciąży przed 37 tc. w porównaniu do kobiet rasy kaukaskiej. W swojej pracy Adams i wsp. pokazali, że spośród 1023 kobiet rasy białej, u których pierwszy poród odbył się między 20-31 tc. 8,2% kobiet urodziło drugie dziecko między 20-31 tc., a 20,1% między 32-36 tc. Wartości te okazały się wyższe w przypadku kobiet rasy czarnej. Autorzy oszacowali, iż wśród 1084 kobiet tej rasy, 13,4% urodziło dziecko między 20-31 tc. i 23,4% między 32-36 tc. Ponadto u kobiet rodzących pierwsze dziecko po 32 tc., zauważono zdecydowanie mniejszą częstość występowania skrajnie przedwczesnych porodów przed 31 tc. w drugiej ciąży: 1,9% dla kobiet rasy białej, a 3,8% dla kobiet rasy czarnej. Dane te, świadczą nie tylko o silniejszej predyspozycji kobiet rasy czarnej do wystąpienia porodu przedwczesnego, ale również o dodatniej zależności między występującymi porodami przedwczesnymi w przeszłości, a predyspozycjami do tego powikłania w kolejnych ciążach. Analiza wskazuje również, iż poród przedwczesny w kolejnych ciążach pojawia się tym częściej, im wcześniej dochodzi do zakończenia pierwszej ciąży [Adams i wsp., 2000].

Wysokie ryzyko porodu przedwczesnego występuje także w przypadku chorób uwarunkowanych genetycznie u płodu i matki, spowodowanych mutacją w odpowiednich genach. Są to m.in: zespół Smith-Lemli-Opitz, neurofibromatoza, dystrofia miotoniczna. Choroby te, predysponują do produkcji zwiększonej ilości płynu owodniowego, a z kolei inne, jak zespół Ehlersa Danlosa i Marfana charakteryzuje błąd w syntezie kolagenu i tym samym destabilizacja błon płodowych oraz niewydolność szyjki macicy [Varner i wsp., 2005, DeVos i wsp., 1999].

Pomimo wielu przeprowadzonych badań nad przyczynami porodu przedwczesnego, uważa się, że ok. 50% przypadków tego powikłania ma nieznaną etiologię. Jedynie 1/2 przypadków wystąpienia porodu przedwczesnego przed 37 tc. może być przyporządkowana do znanych już, wymienionych powyżej czynników [Sheikh i wsp., 2016]. Obecnie badacze zwracają dużą uwagę na genetyczne uwarunkowania porodu przedwczesnego, w tym polimorfizmy genów kandydujących do wystąpienia porodu przed 37 tc. Przykładem są polimorfizmy metaloproteinaz - enzymów poddawanych coraz częściej analizie pod kątem wystąpienia porodu przedwczesnego.

1.6. Metaloproteinazy

Metaloproteinazy, nazywane również matryksynami, to cynkowo-zależne endoproteazy, które powodują lizę białkowych składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Degradują głównie kolagen, ale także żelatynę, lamininę, fibronektynę, elastynę, proteoglikany, witronektynę. Substratem dla metaloproteinaz błonowych jest również nieaktywna forma MMP2 (proMMP2). Enzymy te poprzez swoje działanie utrzymują prawidłową strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej oraz błony podstawnej. Biorą udział w procesach fizjologicznych, jak embrio- czy angiogeneza, ale zaburzenia w ich aktywności warunkują również powstanie wielu patologii [Trojanek i wsp., 2012]. Obecnie uważa się, iż wszystkie komórki organizmu człowieka syntetyzują metaloproteinazy: komórki nabłonkowe, fibroblasty, miocyty, komórki nowotworowe, komórki śródbłonna, osteoblasty, płytki krwi, makrofagi, komórki stanu zapalnego: monocyty, leukocyty i limfocyty. U człowieka występują 23 metaloproteinazy, kodowane przez 24 geny. Badania wskazują, iż MMP23 kodowana jest przez dwa geny, znajdujące się na chromosomie 1. Enzymy te, oprócz występowania u człowieka, zidentyfikowano również u ptaków, płazów, ryb, owadów, bezkręgowców, a także u niektórych gatunków roślin. Metaloproteinazy można podzielić na 4 podstawowe grupy, w zależności od mechanizmu działania i specyficzności substratowej, są to: kolagenazy, żelatynazy, stromielizyny/matrylizyny i metaloproteinazy typu błonowego. Wyróżnia się również dodatkową 5 grupę, do której zalicza się pozostałe metaloproteinazy nie włączane do żadnej z wyżej wymienionych pozostałych grup [Olszyński i wsp., 2009, Trojanek i wsp., 2012]. Poniżej przedstawiono schemat podziału przynależności metaloproteinaz do odpowiednich klas oraz ich specyficzność substratową (Tab. 2).

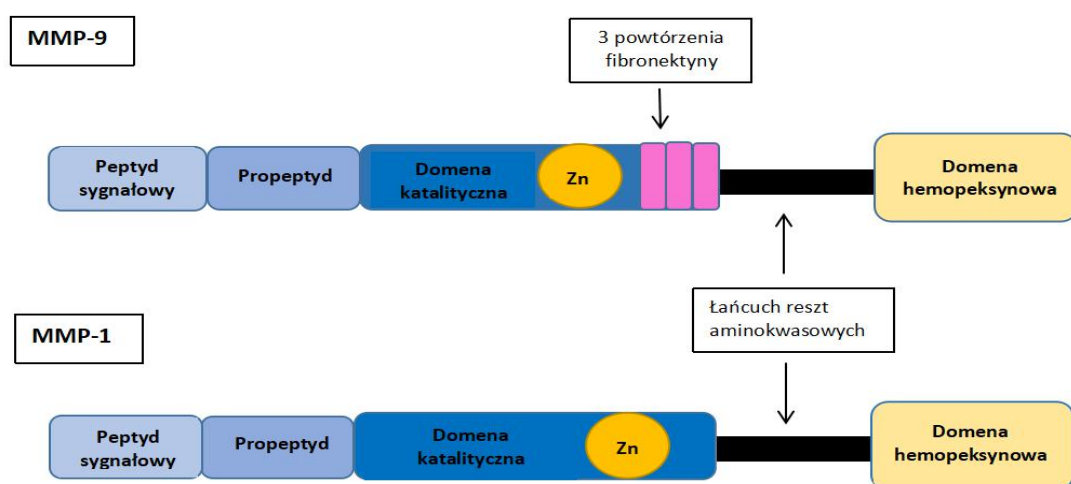
Tabela 2. Podział metaloproteinaz [wg Amalinei i wsp., 2007].

<i>Klasa MMP</i>	<i>Typ MMP</i>	<i>Substraty dla MMP</i>
Kolagenazy	MMP1 MMP8 MMP13	kolagen typu I,II, III, IV, IX, X, XIV, fibronektyna, laminina, agrekan, inhibitory proteazy serynowej, MMP-2,-9
Żelatynazy	MMP2 MMP9	kolagen typu IV, V, VII, X, XI, XIV, żelatyna, elastyna, proteoglikany, fibronektyna, prekursorzy TNF- α , IL-1, serpina, bradykinina, angiotensyna I, substancja P
Stromielizyny	MMP3 MMP10 MMP11	kolagen typu IV, V, IX, X, proteoglikany, żelatyna, fibronektyna, laminina, elastyna
Matrylizyny	MMP7 MMP26	fibronektyna, fibrynogen, witronektyna, zdenaturowany kolagen typu I–IV, α 1-antytrypsyna, α 2-makroglobulina, insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGFBP–1)
Błonowe MMP	MMP14 MMP15 MMP16 MMP17 MMP24 MMP25	kolagen typu I, II, III, żelatyna, fibronektyna, laminina-1, witronektyna, proteoglikany, proMMP-2
Inne MMP	MMP12 MMP19 MMP20 MMP21 MMP23 MMP28 MMP27	elastyna, kolagen typu żelatyna, fibronektyna, laminina, elementy błon podstawnych witronektyna, proteoglikany, α 1-antytrypsyna

Metaloproteinazy są enzymami wielodomenowymi, a w ich budowie wyróżnia się peptyd sygnałowy, prodomenę, domenę katalityczną oraz domenę hemopeksynowa. Domena katalityczna zawiera miejsce aktywne enzymu z 2 jonami cynku oraz 1 do 4 jonów wapnia. Trzy reszty histydyny w obrębie sekwencji HEXXHXXGXXH utrzymują jon cynku. W obrębie domeny katalitycznej dwie metaloproteinazy: MMP2 i MMP9 zawierają również trzy powtórzenia fibronektyny II, odpowiadające za silną reakcję wiązania z kolagenem. Domena hemopeksynowa składa się z ok. 200 aminokwasów. Połączona jest z domeną katalityczną za pomocą kilkunastu do kilkudziesięciu reszt aminokwasowych, co pozwala utrzymać odpowiednią konformację cząsteczki i stabilną strukturę. Odpowiedzialna jest za rozpoznanie substratu i wiązanie enzymu ze składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej. Dodatkowo, dzięki niej, MMP wiąże tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMPs - *Tissue inhibitors of metalloproteinases*). Domena ta, nie występuje w przypadku MMP7, MMP23 i MMP26

z kolei MMP12 traci ją zaraz po aktywacji. Propeptyd, zwany inaczej prodomeną zbudowany jest z około 80 aminokwasów. Jego zadaniem jest utrzymywanie enzymu w formie nieaktywnej. Dzieje się tak za sprawą oddziaływania reszty cysteiny propeptydu z jonem cynku w miejscu aktywnym. Do aktywacji proenzymu dochodzi na skutek odłączenia propeptydu, co powoduje odsłonięcie centrum aktywnego. Z kolei peptyd sygnałowy kieruje metaloproteinazy do pęcherzyków zewnątrzwydzielniczych. Usuwany jest w trakcie procesu translacji.

Metaloproteinazy błonowe stanowią osobną grupę metaloproteinaz. Charakteryzują się obecnością krótkiego ogona cytoplazmatycznego i domeny transmembranowej, która umiejscawia enzym w błonie komórkowej [Murphy i wsp., 2011, Lipka i wsp., 2008, Olszyński i wsp., 2009, Trojanek u wsp., 2012, Löffek i wsp., 2011]. Budowę MMP1 oraz MMP9 przedstawiono na ryc. 1.



Rycina 1. Schemat budowy wybranych metaloproteinaz - MMP9, MMP1.

Metaloproteinazy są ważnymi regulatorami tkankowej homeostazy. Ich niedostateczna lub nadmierna aktywność może być przyczyną inicjacji procesów destrukcyjnych w tkankach, dlatego tak ważne są procesy regulujące ich syntezę i działania. Można przyjąć, iż aktywność metaloproteinaz regulowana jest poprzez 4 mechanizmy [Löffek i wsp., 2011]:

- regulacja w trakcie transkrypcji oraz regulacja potranskrypcyjna
- regulacja wynikająca z lokalizacji pozakomórkowej i kompartmentalizacji

- regulacja poprzez aktywację poprzez odszczepienie propeptydu
- regulacja poprzez oddziaływanie z TIMPs oraz niespecyficznymi czynnikami, jak alfa-2 makroglobulina

Ekspresja genów metaloproteinaz regulowana jest już na etapie transkrypcji. Promotory MMPs zawierają wiele sekwencji regulatorowych tzw. czynników cis, które modułują ekspresję genów poprzez oddziaływanie z tzw. czynnikami transkrypcyjnymi. Czynnikami transkrypcyjnymi mogą być: białkowy aktywator transkrypcji 1 (AP-1 - *activator on protein 1*), aktywator wzmacniający ekspresję genów wirusa polio (PEA3 - *Polymavirus enhancer A-binding protein-3 site*), czynnik transkrypcyjny 1 (Sp-1 - *Specificity protein 1*), jądrowy czynnik kappa - wzmacniacz z aktywowanych limfocytów B (NF-κB - *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). W zależności od budowy promotora genów kodujących metaloproteinazy postuluje się również podział tych enzymów na 3 grupy. Pierwszą grupę stanowi większość znanych metaloproteinaz. Ich promotor wykazuje obecność kasety TATA-box oraz miejsca wiążącego czynnik AP-1, znajdujących się względem pierwszej transkrybowanej zasady, odpowiednio -30 oraz -70 par zasad. Większość tych promotorów zawiera również miejsce wiążące czynnik PEA3. Do drugiej grupy należą geny *MMP8*, *MMP11*, *MMP21*. W ich promotorach występuje sekwencja TATA-box, jednak brak jest sekwencji wiążącej AP-1. Trzecia grupa, do której przynależą geny *MMP2*, *MMP14*, *MMP28* charakteryzuje się brakiem obydwu sekwencji, w tym przypadku mamy do czynienia z konstytutywną ekspresją genów metaloproteinaz [Vincenti i wsp., 2007, Yan i wsp., 2007].

Metaloproteinazy syntetyzowane są w postaci nieaktywnych prekursorów, tzw. zymogenów i po uwolnieniu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej pozostają w tej formie. Aktywacja polegająca na odsłonięciu centrum aktywnego enzymu możliwa jest poprzez działanie m.in. trombiny, plazminy, elastazy, furyny, a również samych aktywnych form MMP w tym *MMP1*, *MMP2*, *MMP7*, *MMP8*, *MMP9*, *MMP13*. Aktywacja metaloproteinaz zachodzi również dzięki reakcjom z wieloma niespecyficznymi czynnikami, jak np. z tlenkiem azotu, na skutek niskiego pH, czy wysokiej temperatury oraz poprzez działanie systemu aktywatora plazminogenu PAS. Aktywność metaloproteinaz podlega kontroli także na skutek oddziaływania ze składnikami macierzy, gromadząc się w pobliżu swojego docelowego substratu. Niektóre z nich, jak *MMP2* wiążą się z błoną komórkową, co powoduje aktywację

enzymu lub ich migrację przez błonę podstawną [Trojanek i wsp., 2012, Stamenkovic i wsp., 2003].

Za regulację aktywności odpowiadają również specyficzne endogenne inhibitory tkankowe metaloproteinaz - TIMPs oraz nieswoiste inhibitory osoczowe, jak α 2-makroglobulina. Wprowadzają odpowiednią równowagę w działaniu metaloproteinaz, zabezpieczając przed nadmierną degradacją macierzy [Löffek i wsp., 2011]. TIMPs są głównym endogennym regulatorem metaloproteinaz. Dokładny mechanizm oddziaływania z MMPs został opisany w 1997 r., dzięki technice krystalografii. Model przedstawiał kompleks MMP3 i TIMP1 [Gomis-Ruth i wsp., 1997]. Pokazano, że N-końiec TIMPs jest głównym miejscem wiązania z miejscem aktywnym MMP. Cztery reszty aminokwasów N-końcowej domeny Cys1-Thr-Cys-Val4 oraz cztery reszty Glu67-Ser-Val-Cys70 połączone mostkami disiarczkowymi wpasowują się w miejsce aktywne enzymu. Dodatkowo Cys-1 bierze udział razem z grupą karbonylową oraz α -aminową końca N w chelatowaniu jonu cynku powodując zablokowanie aktywacji cząsteczki wody [Murphy i wsp., 2008].

1.7. Funkcje metaloproteinaz w organizmie

Główną funkcją MMPs jest degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM - *extracellular matrix*). MMPs oddziałują na wiązania międzykomórkowe i uwalniają komórki prowadząc do ich migracji i zmian w strukturze macierzy zewnątrzkomórkowej. Oprócz hydrolizy składników ECM, reagują z wieloma molekułami znajdującymi się na powierzchni komórek, modyfikując wewnątrzkomórkowe ścieżki sygnałowe. Macierz zewnątrzkomórkowa stanowi nie tylko rusztowanie dla komórek ale także jest rezerwuarem wielu czynników wzrostu, w tym transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- β - *transforming growth factor β*), który uwalniany jest przez degradację dekoryny, dzięki MMP2, MMP3, MMP9. Sam TGF- β ma hamujący wpływ na wydzielanie MMPs. Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej kontrolują także poziom TNF- α oraz interleukiny, jak IL-1 β . W trakcie przebudowy ECM, niedostępne wcześniej regiony cząsteczek mogą zostać wyeksponowane. Przykładem może być migracja komórek śródbłonna, gdzie poprzez działanie MMPs odsłonięty zostaje ukryty region nadający komórkom zdolność migracji.

Metaloproteinazy mają zdolność zarówno do aktywacji, jak i inaktywacji wielu cytokin i chemokin, np: IL-8, czynnika płytkowego (PF-4 - *platelet factor 4*), peptydu

aktywującego granulocyty obojętnochłonne, białka chemotaktycznego monocytów (MCP-3 - *monocyte chemotactic protein 3*). Metaloproteinazy uwalniają także czynniki związane z białkami nienależącymi do macierzy zewnątrzkomórkowej, są nimi np. białkowe czynniki wzrostu, receptory kinazy tyrozynowej, cząsteczki adhezji komórkowej, inne cytokiny i chemokiny [Lipka i wsp., 2008, Olszyński i wsp., 2009].

Poprzez oddziaływanie z wieloma cząstkami, udowodniono udział MMPs w procesach angiogenezy. MMPs mając działanie proangiogenne, mogą również hamować proces angiogenezy. Działanie metaloproteinaz i nasilenie angiogenezy związane jest z nowotworzeniem. MMP9 jest w stanie degradować kolagen typu IV będący składnikiem błony podstawnej, co może mieć szczególne znaczenie w procesie tworzenia odległych przerzutów nowotworowych [Huang i wsp., 2018]. Wszystkie stadia nowotworzenia, jak migracja komórek, inwazja, przerzutowanie oraz angiogeneza są zależne od otaczającego ich mikrośrodowiska. Metaloproteinazy mogą więc być kluczowe w tych procesach, gdyż modulują reakcje komórka-komórka lub komórka-błona podstawna [Gialeli i wsp., 2011]. Udział MMP wykazano w rozwoju takich nowotworów jak m.in. rak piersi, jajnika, okrężnicy, prostaty mózgu, pęcherza moczowego czy płuc [Roy i wsp., 2009]. W przypadku raka piersi zauważono, iż wysoki poziom MMP9 koreluje z mniejszą przeżywalnością chorych [Leifler i wsp., 2013]. Oprócz wspomnianych wyżej procesów nowotworowych, postulowany jest udział metaloproteinaz w chorobach praktycznie każdego z układów człowieka: chorobach sercowo-naczyniowych, neurologicznych, autoimmunologicznych, chorobach układu oddechowego, moczowego, kostno-stawowego czy też przewodu pokarmowego [Shiomi i wsp., 2010].

Na uwagę zasługuje fakt udziału metaloproteinaz w etiologii chorób ginekologicznych, w tym adenomiozy i endometriozy. W endometrium zdrowych kobiet, zwłaszcza podczas fazy miesiączkowej, wykazano wysokie stężenie żelatynaz: MMP2, MMP9, oraz kolagenaz: MMP1, MMP8, MMP13. Nie tylko biorą one udział w fizjologicznym remodelingu endometrium, ale prawdopodobnie odpowiadają za powstawanie ektopowych ognisk endometriozy [Zhang i wsp., 2002]. Badania wskazują na związek polimorfizmu -735 C/T genu *MMP2* oraz -1562 C/T genu *MMP9* z podwyższonym ryzykiem występowania endometriozy wśród kobiet rasy kaukaskiej [Saare i wsp., 2010]. Analizy wykazały również udział MMPs w etiopatogenezie powikłań ciąży, takich jak stan przedrzucawkowy, czy nawracające poronienia. Zauważono związek zachwiania równowagi MMPs-TIMPs a nieprawidłową inwazją

trofoblastu. Znotowano wyższe poziomy MMP9 oraz MMP3 w materiale tkankowym endometrium w przypadku odpowiednio poronień samoistnych oraz indukowanych [Balci i wsp., 2018]. Enzymy te wpływają silnie na procesy implantacji, a tym samym zaburzenia wymiany łożyskowej, co skutkuje powikłaniami takimi jak wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu. Polimorfizmy genów *MMP2* oraz *MMP9* wydają się mieć istotne znaczenie w etiologii tego zaburzenia [Gremlich i wsp., 2007].

1.8. Udział metaloproteinaz w etiologii porodu przedwczesnego

Metaloproteinazy mają duży udział w rozwoju powikłania jakim jest poród przedwczesny. Zmieniają strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej odpowiadając tym samym za przedwczesne oddzielenie łożyska, destabilizację struktur błon płodowych oraz przedwczesną dojrzałość szyjki macicy.

W 1994 r. Malak i wsp. przeprowadzili badanie, pozwalające na dokładne określenie struktury doczesnej i błon płodowych. Przebadano 14 popłodów, z ciąż zakończonych o czasie, w których wskazano obszary błon płodowych, będące przerwanyymi fragmentami tkanki łącznej w miejscu oddzielenia popłodu. Te miejsca o zmienionej morfologii uznano za wynik degradacji kolagenu [Malak i wsp., 1994]. Dalsze badania potwierdziły aktywność MMPs w błonach płodowych. Stężenia MMP9 oraz MMP2 istotnie wzrastają po rozpoczęciu czynności skurczowej w ciążach zakończonych w terminie. W jednej z analiz wzrost stężenia MMP2 oraz obniżenie stężenia TIMP1 zaobserwowano w komórkach doczesnej, natomiast wzrost MMP9 z obniżeniem TIMP1 w owodni. Taka ekspresja MMPs sugeruje ich specyficzny udział w regulacji rozpoczęcia porodu o czasie, powodując najpierw odpływanie płynu owodniowego i oddzielenie łożyska dopiero w III okresie porodu [Goldman i wsp., 2003]. Tym samym zachwianie wyżej wymienionych procesów uznaje się za wynik braku równowagi działania MMPs, także w przypadku wystąpienia porodu przedwczesnego. Szczególnie wysokie stężenia MMP9 występują w okolicach łożyska, gdzie spotykają się elementy maczyno-płodowe. Sugeruje to zależność procesu oddzielania łożyska od wysokości stężeń MMP9. Analiza tego zagadnienia może pomóc w zrozumieniu mechanizmu porodu przedwczesnego [Demir-Weusten i wsp., 2007].

Znany jest także udział metaloproteinaz w pęknięciu błon płodowych, zarówno w przypadku ciąży donoszonej, jak i porodu przedwczesnego. W czasie trwania ciąży, przebudowa macierzy błon płodowych staje się istotnym procesem prowadzącym do

porodu. Zauważono, iż podwyższone stężenia metaloproteinaz w płynie owodniowym, owodni i doczesnej powiązane są z utratą elastyczności oraz wytrzymałości błon płodowych [Geng i wsp., 2016]. Stabilność macierzy zewnątrzkomórkowej odpowiada za wytrzymałość tkanek, w tym pęcherza płodowego stanowiącego ochronę płodu przed szkodliwymi czynnikami zewnętrznymi. Enzymy mające główny udział w degradacji struktury owodni to przede wszystkim żelatynazy: MMP2 i MMP9 oraz kolagenazy: MMP1, MMP8 i MMP13. Metaloproteinazy te rozkładają kolagen typu I, II, III, IV, V, VII i X oraz elastynę, a ich aktywność podlega regulacji przy udziale wielu czynników, w tym np. trombiny stymulującej aktywność MMP9 [Czajka, 2006, Vadillo-Ortega i wsp., 2005].

W badaniach naukowych potwierdzono zwiększone stężenia MMP8 w płynie owodniowym kobiet rodzących przedwcześnie i wykazano w tych przypadkach związek z występowaniem infekcji wewnątrzmacicznej i gorszym rokowaniem noworodków. Badano także przydatność szybkiego testu przyłóżkowego, wykrywającego MMP8 w płynie owodniowym. Test wykazał się 42% czułością i 100% specyficznością w predykcji samoistnego porodu przedwczesnego przed 30 tc. [Chaemsaitong i wsp., 2018, Chaiyasit i wsp., 2017, Kim i wsp., 2016]. Zauważono także korelację podwyższonego stężenia MMP9 w płynie owodniowym w przypadku trwającej infekcji *Ureaplasma urealiticum* w samoistnych porodach przedwczesnych. Nie wykazano natomiast zwiększonego stężenia MMP9 w ciążach zakończonych przedwcześnie z przyczyn jatrogennych [Lal i wsp., 2017].

Metaloproteinazy odpowiadają również za zbyt wczesne dojrzewanie szyjki macicy do porodu, zostały one wyizolowane z wydzieliny szyjkowej i czopu śluzowego [Becher i wsp., 2010]. Szyjka macicy zbudowana jest z tkanki łącznej, fibroblastów i macierzy zewnątrzkomórkowej wzbogaconej kolagenem, elastyną, glikozaminoglikanami, proteoglikanami. Wysokie stężenia metaloproteinaz oraz ich specyficznych inhibitorów tkankowych: MMP2, TIMP1, MMP8 i MMP9 odgrywają rolę w remodelingu szyjki macicy, chroniąc jednocześnie jajo płodowe przed infekcją wstępującą. Metaloproteinazy wpływają na konsystencję szyjki macicy, jej skracanie, rozwieranie i poporodową przebudowę. Ekspresja metaloproteinaz jest zmienna w trakcie trwania ciąży. MMP2 pomimo stałej ekspresji, zwiększa stopniowo swoje stężenie już na początku dojrzewania szyjki macicy. MMP1 i MMP9 wykazują selektywną ekspresję i są aktywowane tylko pod koniec procesu dojrzewania szyjki. Próbkę tkankową pobrane z dolnego odcinka macicy u ciężarnych rodzących o czasie

przez cesarskie cięcie wykazały podwyższone stężenia zarówno MMP8, jak i MMP9. Stężenie było tym większe, im większe było rozwarcie szyjki macicy. Metaloproteinazy biorą również udział w regeneracji narządu rodno po porodzie oraz inwolucji macicy na skutek degradacji kolagenu i innych składników macierzy zewnątrzkomórkowej [Geng i wsp., 2013].

1.9. Wybrane polimorfizmy genów metaloproteinaz

Metaloproteinaza 1 - MMP1

MMP1, nazywana zwyczajowo kolagenazą śródmiąższową, degraduje kolagen oraz żelatynę. MMP1 oddziałuje także na inne metaloproteinazy, np. aktywuje pro-MMP9. Dzięki obecności domeny hemopeksynowej, MMP1 posiada unikalną zdolność do przecinania struktury kolagenu, między wiązaniami Gly-Ile/Leu w łańcuchach α . Najpierw dokonuje rozwinięcia helikalnej struktury kolagenu, by później degradować specyficzne połączenia [Cui i wsp., 2017, Lipka i wsp., 2008, Aimes i wsp., 1995]. Nowa klasyfikacja oparta na podziale MMPs w zależności od mechanizmu regulacji ekspresji genów umieszcza gen *MMP1* w pierwszej grupie, którą charakteryzuje obecność kasety TATA box oraz jednej lub kilku sekwencji wiążących czynnik AP-1.

Gen kodujący MMP1 znajduje się na chromosomie 11(q22.3). Najczęściej badanym polimorfizmem genu *MMP1* jest polimorfizm -1607 1G/2G, charakteryzujący się dodatkową insercją guaniny, co powoduje aż czterokrotny wzrost aktywności promotora na skutek tworzenia domeny Ets. Czynnikiem transkrypcyjnym Ets (*Ets* - *E26 transformation-specific*) współdziała z czynnikiem AP-1 w regulacji aktywności promotorów genu *MMP1* [Becher i wsp., 2010, Cui i wsp., 2017, Pereza i wsp., 2014].

MMP1 jest pierwszą metaloproteinazą, którą zbadano pod kątem procesu regulacji genu. Są to skomplikowane reakcje obejmujące zarówno mechanizmy samej transkrypcji, jak i procesy potranskrypcyjne. Wyróżniono wiele czynników niezbędnych do aktywacji transkrypcji genu *MMP1*. Są to m.in. NF- κ B, białka wiążące się z sekwencją CCAAT (C/EBP- β - *CCAAT enhancer binding proteins β*), lipopolisacharydy (LPS - *lipopolysaccharids*) oraz IL-1 β [Lipka i wsp., 2008, Olszyński i wsp., 2009, Trojanek i wsp., 2012]. Prowadzono także badania nad działaniem nadtlenu wodoru w regulacji *MMP1*. Wykazano, że wrażliwe na działanie nadtlenu wodoru cząsteczki sygnałowe ERK1/2 (*extracellular signaling-regulated kinase*) i JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) w znaczący sposób mogą wpływać na ekspresję *MMP1* [Nelson i wsp., 2006].

Od momentu identyfikacji polimorfizmu -1607 1G/2G przez Ruttera i wsp., badano ten wariant m.in. w kontekście porodu przedwczesnego u kobiet ciężarnych rasy czarnej i białej [Rutter i wsp., 1998, Fujimoto i wsp., 2002, Pereza i wsp., 2014].

Frey i wsp. w 2016 r. analizowali inny polimorfizm genu *MMP1* rs7945189 w grupie Afroamerykanek z samoistnym porodem przedwczesnym z zachowanymi błonami płodowymi. Został on powiązany z wyższym odsetkiem porodów przedwczesnych <34 tc. w porównaniu do grupy kontrolnej [Frey i wsp., 2016].

Metaloproteinaza 9 - MMP9

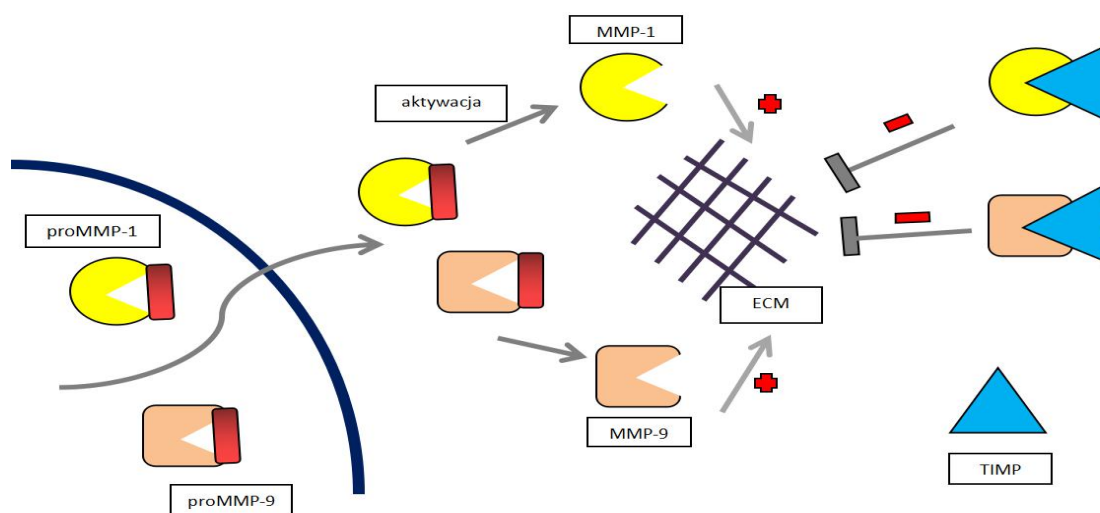
Metaloproteinaza 9, czyli kolagenaza IV, należy razem z MMP2 do żelatynaz. Jej masa cząsteczkowa wynosi 92 kDa. Nazywana jest również żelatynazą B, ze względu na możliwość degradacji nie tylko kolagenu, ale i jego zdenaturowanej formy. Tak samo jak MMP2 charakteryzuje się obecnością 3 sekwencji fibronektyny w domenie katalitycznej. MMP9 syntetyzowana jest m.in. przez komórki owodni. Metaloproteinaza ta silnie degraduje kolagen odpowiedzialny za wytrzymałość tkanek, powoduje lizę połączeń komórkowych i prowadzi do destrukcji błon płodowych. Wykazano znacząco wyższe stężenia MMP9 w płynie owodniowym kobiet rodzących przedwcześnie w porównaniu do kobiet rodzących o czasie. Analiza pokazała także brak zmian w stężeniach MMP9 wraz z zaawansowaniem ciąży [Athayde i wsp., 1999].

Gen *MMP9* zlokalizowany jest na chromosomie 20(q13.12). Na poziomie transkrypcji, gen *MMP9* jest dodatnio regulowany przez wiele czynników, w tym: czynnik transkrypcyjny Ets, NF-κB, PEA3, AP-1, Sp-1 oraz czynnik aktywujący surowiczy amyloid A (SAF - *serum amyloid A-activating factor*) [Yabluchanskiy i wsp., 2013]. W promotorze genu *MMP9* znajduje się kilka miejsc polimorficznych. Najczęściej opisywanym wariantem związanym z występowaniem porodu przedwczesnego jest polimorfizm -1562C>T genu *MMP9*, który charakteryzuje się zamianą cytozyny na tyminę w miejscu 1562. W pracach naukowych wykazano związek tego polimorfizmu z występowaniem porodu przed 37 tc. w przypadku samoistnie rozwijającego się porodu przedwczesnego u kobiet rasy białej, pochodzenia nie-hiszpańskiego [Jones i wsp., 2012]. Wykazano także korelację występowania polimorfizmu -1562C>T z PPRM w populacji chińskiej. Według tej analizy, polimorfizm -1562C>T związany jest ze wzrostem ryzyka PPRM w grupie kobiet rodzących przed 37 tc. Nie zauważono natomiast takiej korelacji u kobiet rodzących o czasie [Fang i wsp., 2010].

Rola pozostałych polimorfizmów genów *MMP9* w etiologii porodu przedwczesnego, w tym polimorfizmu *836A>G* oraz *2003G>A* nie została jeszcze dokładnie zbadana. Polimorfizm *836A>G* związany jest z substytucją adeniny na guaninę w pozycji nukleotydowej 836, co powoduje zamianę glutaminy na argininę w pozycji 279 łańcucha białkowego. Polimorfizm ten wiąże się z częstszym występowaniem powikłań ciążowych, jak cukrzyca ciążowa oraz dolegliwości bólowe w okolicy krzyżowo-lędźwiowej kręgosłupa ciężarnych. Brak natomiast danych o wpływie występowania tego polimorfizmu w przypadku ciąż zakończonych przedwcześnie [Costa i wsp., 2018, Mahmood i wsp., 2018]. Polimorfizm *2003G>A* genu *MMP9* jest związany z substytucją argininy na glutaminę w pozycji 668 białka. Obecnie brak jest analiz dotyczących związku tego polimorfizmu z ryzykiem wystąpienia porodu przedwczesnego.

1.10. Tkankowe inhibitory metaloproteinaz

Tkankowe inhibitory metaloproteinaz przez lata charakteryzowane były jako związki regulujące działanie metaloproteinaz. Obecnie wiadomo, że spełniają znacznie szersze funkcje, jak inhibicja adamalizyn - ADAM (*A disintegrin-like and metalloproteinase*) oraz ADAMTS (*A Disintegrin-like And Metalloprotease with Thrombospondin motifs*) [Brew i wsp., 2010]. U ssaków, w tym również i u człowieka występują cztery rodzaje TIMPs, oznaczane numerami od 1 do 4. U niższych eukariontów zidentyfikowano do tej pory jeden rodzaj TIMP, jednak ich rola u tych organizmów nie została dokładnie poznana [Murphy i wsp., 2011]. Masa cząsteczkowa TIMP waha się w zależności od rodzaju 21-29 kD. Rola TIMPs polega na blokowaniu dostępu substratu do miejsca katalitycznego metaloproteinaz. TIMPs tworzą z metaloproteinazami odwracalne wiązania w stosunku stechiometrycznym 1:1 lub 2:2 [Trojanek i wsp., 2012]. Na ryc. 2. przedstawiono schemat działania TIMP.



Rycina 2. Schemat działania tkankowych inhibitorów metaloproteinaz TIMPs.

Wszystkie TIMPs posiadają w swojej budowie 2 domeny: zbudowaną ze 125 aminokwasów domenę N-końcową, biorącą udział w inhibicji MMPs oraz 65-aminokwasowy C-końiec. Ten ostatni wydaje się uczestniczyć w rozpoznawaniu domeny hemopeksynowej MMPs i spełniać funkcje stabilizacyjne. Dodatkowo domena ta wiąże także zymogeny - pro-MMPs, co jest istotne w procesie ich aktywacji. Częsteczki TIMPs utrzymywane są przez 6 mostków disulfidowych, co zapewnia ich stabilność konformacyjną [Brew i wsp., 2010, Murphy i wsp., 2011]. TIMP3 jest formą nierozpuszczalną, zakotwiczoną w macierzy zewnątrzkomórkowej, podczas gdy pozostałe TIMP1, TIMP2 i TIMP4 stanowią formy rozpuszczalne, krążące w surowicy. Budowa wszystkich TIMPs jest podobna, natomiast poszczególne rodzaje TIMPs różnią się aktywnością. TIMP1 blokuje wszystkie MMPs oprócz MMP19 i metaloproteinaz błonowych MT1-MMP, MT3-MMP, MT5-MMP. Ponadto TIMP1 tworzy wysoce specyficzny związek z MMP9. TIMP3 blokuje działanie MMP2, MMP3, MMP7 i MMP9, a dodatkowo jest również inhibitorem adamalizyn. TIMP4 hamuje funkcję MMP9. Zarówno TIMP4 jak i TIMP2 regulują działanie proMMP1 [Trojanek i wsp., 2012].

Rola tkankowych inhibitorów metaloproteinaz sprowadza się głównie do regulacji działania metaloproteinaz, tym samym TIMPs mają wpływ na przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej i udział w procesach zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych w ciąży i połogu. Prace naukowe dowodzą, że u kobiet rodzących przedwcześnie występują niższe stężenia TIMP1 oraz TIMP2 oraz wyższe stężenie TIMP4 w surowicy. Zanotowano również wyższy stosunek MMP9:TIMP1 oraz

MMP9:TIMP2 w przypadku porodu przedwczesnego w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej rodzących o czasie [Tency i wsp., 2012].

Analizie poddano również poziom metaloproteinaz i ich inhibitorów tkankowych u pacjentek z niewydolnością cieśniowo-szyjkową, którą definiowano jako bezbolesne rozwieranie szyjki macicy >1 cm oraz bezobjawowym skróceniem szyjki macicy <25 mm. Wykazano, iż stężenie TIMP1 w wydzielinie pochwowo-szyjkowej było znacząco wyższe u kobiet z samoistnym porodem przedwczesnym przed ukończonym 32 tc. w porównaniu do kobiet, u których ciąża zakończyła się po 32 tc. Stężenie TIMP1 było również wyższe u kobiet z niewydolnością cieśniowo-szyjkową w porównaniu do ciężarnych z bezobjawowym skracaniem się szyjki macicy [Yoo i wsp., 2017].

Gen *TIMP1* zlokalizowany jest na chromosomie X(p11.23-11.4). Jeden z jego polimorfizmów w eksonie 5 związany jest z zamianą cytozyny na tyminę w pozycji 372. Lokalizacja genu na chromosomie X powoduje brak występowania genotypu heterozygotycznego u płci męskiej. Polimorfizm ten nie był poddany znaczącej analizie pod kątem występowania porodu przedwczesnego.

Gen *TIMP2* zlokalizowany jest na chromosomie 17(q23-25). Należy do genów konstytutywnych, ulega stałej ekspresji w komórce i nie podlega regulacji. Tkankowy inhibitor TIMP2 ma wielkość 220 aminokwasów i może być związany z powierzchnią komórki, jak również wydzielany na zewnątrz komórki. Białko TIMP2 wykazuje 40% homologii sekwencji aminokwasów z TIMP1, zwłaszcza w domenie N-końcowej.

Często występującym wariantem w genie *TIMP2* jest zamiana cytozyny na tyminę w pozycji nukleotydowej 303 (*303C>T*), co powoduje synonimiczną zmianę aminokwasu w kodonie 101 (Ser101Ser) [De Clerc i wsp., 2009, Hammani i wsp., 1996, Vynios, 2009]. Polimorfizm ten został poddany analizie pod kątem współwystępowania z porodem przedwczesnym. Romero i wsp. w 2010 r. opublikowali 2 badania, w których zasugerowali związek występowania porodu przedwczesnego z polimorfizmem *303C>T* [Romero i wsp., 2010 a, Romero i wsp., 2010 b]. W 2016 r. roku powstała kolejna analiza podtrzymująca założenia wpływu polimorfizmu *303C>T* na występowanie samoistnego porodu przedwczesnego w grupie Afroamerykanek [Frey i wsp., 2016].

Kolejnym polimorfizmem, mogącym mieć związek z porodem przedwczesnym jest polimorfizm polegający na substytucji tyminy na guaninę w pozycji -97 intronu drugiego względem sekwencji kodującej DNA przed nukleotydem 232 (*232-97T>G*, rs55743137). Romero i wsp. udokumentowali związek tego polimorfizmu z

występowaniem porodu przedwczesnego dla $p < 0,05$. W powyższym badaniu analizowano kilkaset SNPs, w tym te dotyczące metaloproteinaz. Szczególne wnioski zaprezentowano dla analizy polimorfizmów *TIMP2*: wspomnianym wcześniej polimorfizmie 303C>T oraz polimorfizmie 232-97T>G. Badanie prowadzono wśród hiszpańskich kobiet i noworodków urodzonych samoistnie przed 37 tc. Czynnikiem kwalifikującym do badania był także zachowany pęcherz płodowy. Z badania wykluczone zostały ciążę powikłane chorobami przewlekłymi, zaburzeniami genetycznymi, łożyskowymi, SGA, PROM oraz ciążę wielopłodowe. Badanie prowadzono na licznej grupie badawczej, liczącej 223 matki i 179 noworodków, oraz na grupie kontrolnej: 599 matek i 628 noworodków. Autorzy po raz pierwszy udokumentowali związek powyższych polimorfizmów z samoistnym porodem przedwczesnym z zachowanymi błonami, analizując materiał genetyczny zarówno kobiet, jak i płodów [Romero i wsp., 2010 b].

1.11. Hipoteza badawcza

W chwili obecnej naukowcy są zgodni, iż konieczne jest przeprowadzanie dalszych badań nad polimorfizmami metaloproteinaz i ich tkankowych inhibitorów, w celu lepszego poznania ich roli w etiologii porodu przed 37 tc. Metaloproteinazy budzą szczególne zainteresowanie badaczy ze względu na ich udowodnione działania prowadzące do wystąpienia porodu: dojrzewanie szyjki macicy, czy destrukcję pęcherza płodowego, prowadząc do PPRM lub PROM. Zachwianie równowagi MMP-TIMP może mieć istotny wpływ na wystąpienie porodu przed 37 tc. Badania o tej tematyce przybliżyć mogą niewyjaśnione jeszcze do końca zagadnienia z zakresu przyczyn oraz leczenia porodu przedwczesnego. Mogą wyznaczyć nowe trendy diagnostyczne oraz stać się istotnym punktem uchwytu do wprowadzenia odpowiedniej farmakoterapii, co stanowiłoby przełom w dziedzinie perinatologii. Istotnym zagadnieniem jest również zapobieganie porodowi przedwczesnemu. Nowe analizy mogą przyczynić się do bardziej precyzyjnego określenia grup ryzyka występowania tego powikłania i przeciwdziałania wciąż wzrastającemu trendowi PTD. Jest to niezwykle istotne, biorąc pod uwagę światową skalę problemu, jakim jest poród przedwczesny i wcześniactwo, z wszelkimi ich następstwami. Poród przedwczesny jest niezwykle trudnym zagadnieniem ponieważ pomimo rozwoju nauki, jego mechanizm nadal nie jest w pełni poznany. Dalsze badania nad jego etiologią, w tym nad rolą polimorfizmów genów kandydujących, są niezbędne dla wdrożenia właściwej, nowoczesnej opieki prenatalnej.

2. CEL PRACY

Celem badania była próba oceny znaczenia wybranych polimorfizmów genów układu metaloproteinaz (MMPs) oraz ich inhibitorów tkankowych (TIMPs) w etiologii porodu przedwczesnego w populacji polskich kobiet.

Analizie poddane zostały następujące polimorfizmy:

- **MMP1** (rs1799750) -1607 1G/2G
- **MMP9** (rs17576) 836A>G, (rs17577) 2003G>A
- **TIMP1** (rs4898) 372C>T
- **TIMP2** (rs2277698) 303C>T, (rs55743137) T>G

Cel badania zrealizowany został poprzez ocenę w grupie badanej kobiet rodzących między 22 a 36+6 tc. oraz w kontrolnej pacjentek rodzących między 37 a 41+6 tc. następujących zależności:

1. Parametrów klinicznych kobiet ciężarnych i noworodków z badanych grup
2. Częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmów *MMPs* oraz *TIMPs* w grupie badanej i kontrolnej
3. Asocjacji poszczególnych polimorfizmów w zależności od czasu trwania ciąży u kobiet rodzących przedwcześnie, z podziałem na podgrupy: 22-27+6 tc., 28-31+6 tc., 32-36+6 tc.
4. Częstości występowania haplotypów wybranych polimorfizmów
5. Współwystępowania badanych polimorfizmów genetycznych
6. Analizy związku badanych wariantów genetycznych z parametrami klinicznymi

3. MATERIAŁ I METODYKA

3.1. Material

W badaniach uczestniczyło 240 kobiet ciężarnych z populacji polskiej. Wszystkie kobiety zostały poinformowane o celu i metodyce badania oraz wyraziły na nie pisemną zgodę. Badanie uzyskało akceptację Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (uchwały nr 1005/18 z dnia 11 października 2018 r., nr 382/19 z dnia 07 marca 2019 r., nr 891/20 z dnia 10 grudnia 2020). Pacjentki rekrutowano w Klinice Perinatologii i Chorób Kobietych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu i następnie zakwalifikowano do dwóch grup klinicznych:

Grupa badana

1. Kryteria włączenia

- poród zakończony pomiędzy 22 - 36+6 tc. (wykładniki kliniczne: regularna czynność skurczowa, bóle podbrzusza, oddzielenie czopa śluzowego, rozwieranie szyjki macicy i/lub przedwczesne pęknięcie błon płodowych)
- ciąża pojedyncza
- przynależność do rasy kaukaskiej, narodowość polska

2. Kryteria wyłączenia

- obecność chorób zakaźnych mogących spowodować poród przedwczesny, ciąża wielopłodowa, wady macicy, niewydolność cięśniowo-szyjkowa, obecność wad płodu, cukrzyca ciążowa, wielowodzie i małowodzie, obecność infekcji uogólnionej, jatrogeny poród przedwczesny, obumarcie wewnątrzmaciczne, obecność chorób internistycznych matki
- wiek poniżej 18 roku życia i powyżej 40 roku życia

Grupa kontrolna

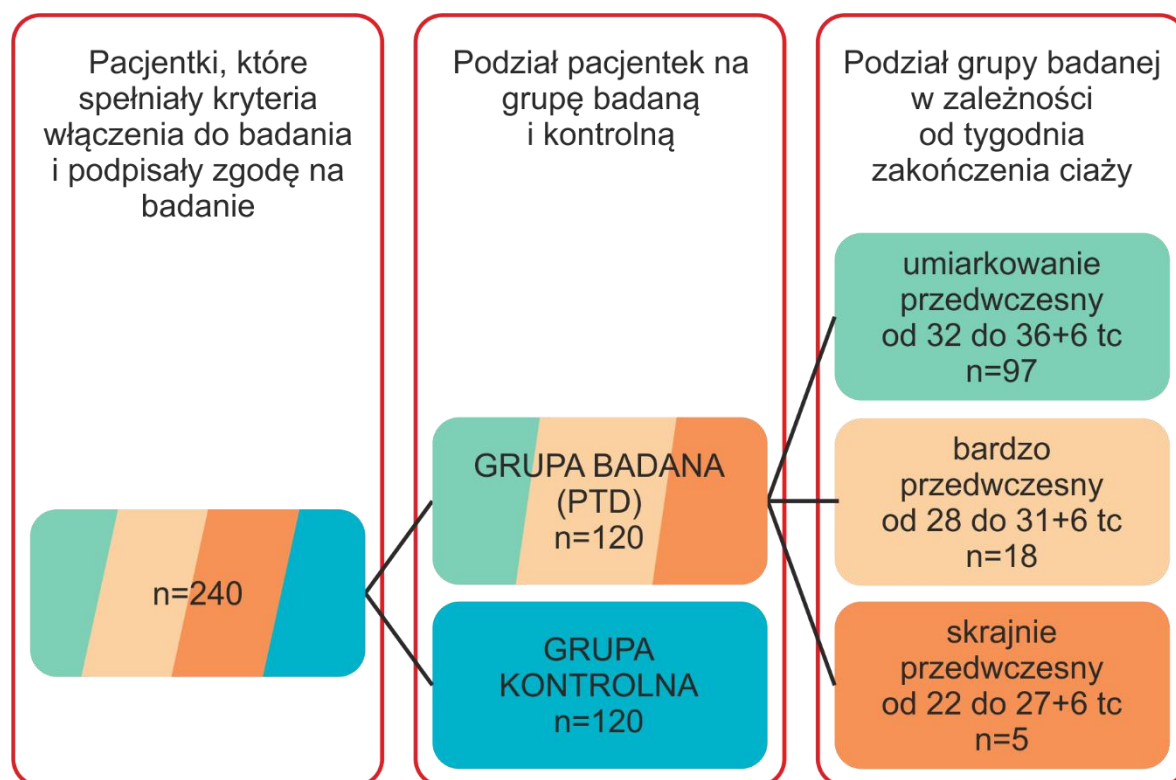
1. Kryteria włączenia

- obecność w wywiadzie co najmniej 2 ciąż o niepowikłanym przebiegu, zakończonych urodzeniem zdrowego, donoszonego noworodka
- ciąża pojedyncza
- przynależność do rasy kaukaskiej, narodowość polska

2. Kryteria wyłączenia

- wykluczenie chorób ogólnoustrojowych, przewlekłych

U wszystkich pacjentek zakwalifikowanych do badania odnotowywano wiek pacjentki, wiek ciążowy i tydzień zakończenia ciąży, wzrost i masę ciała przed ciążą, jak również pod koniec ciąży, wartości ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego. Wskaźnik masy ciała (BMI - *body mass index*) obliczano na podstawie wzoru: masa ciała (kg)/wzrost²(m²). Z każdą ciężarną przeprowadzono dokładny wywiad położniczy, analizowano również sposób ukończenia ciąży oraz parametry stanu urodzeniowego noworodka. Schemat rekrutacji pacjentek do badanych grup przedstawiono na ryc. 3.



Rycina 3. Schemat klasyfikacji pacjentek do badania.

3.2. Metodyka

W toku badań przeprowadzono analizę wariantów genetycznych w Pracowni Biologii Molekularnej w Klinice Perinatologii i Chorób Kobietych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Materiałem do badań była krew obwodowa pobrana od pacjentek podczas rutynowych badań. Od każdej kobiety pobierano krew dzień po porodzie. Do pobierania krwi używano zamkniętego systemu S-Monovette firmy Sarstedt (Niemcy) wykorzystując próbówki zawierające suchy rozpylony wersenian trójpotasowy (K₃EDTA) jako antykoagulant. Stężenie EDTA w próbkach wynosiło 1,6 mg na ml

krwi pełnej w przypadku pobrania próbki o odpowiedniej objętości. Po pobraniu krew była zamrażana w -20°C i przechowywana do czasu izolacji DNA.

3.2.1. Izolacja DNA

Materiały i sprzęt

- zestaw do izolacji QIAamp DNA blood Mini Kit (QIAGEN, Niemcy - nr kat.: 51106)
- etanol 96–100% cz.d.a (POCH, Polska)
- probówki typu Eppendorf (1,5–2 ml)
- pipety automatyczne oraz odpowiednie końcówki do pipet
- rękawiczki jednorazowe
- wirówka 5804 R (Eppendorf, USA) z rotorem na probówki o poj. 1,5–2 ml
- termomikser (Eppendorf, USA)
- wytrząsarka (worteks) WL-1 (Biomix, Polska)
- spektrofotometr NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

DNA izolowano z zamrożonej krwi obwodowej pacjentek używając zestawu firmy Qiagen według zaleceń producenta. Procedura izolacji DNA była przeprowadzana z wykorzystaniem minikolumn zawierających złożę krzemionkowe wiążące kwasy nukleinowe i składa się z czterech etapów przeprowadzanych w temperaturze pokojowej:

1. *Liza*

W pierwszym etapie następowała degradacja błon oraz białek komórkowych. Do probówki typu Eppendorf zawierającej 20 µl enzymu proteolitycznego proteinazy K dodawano 200 µl krwi oraz bufor do lizy (Lysis Buffer), wytrząsano 15 sekund i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 56°C. Po krótkim odwirowaniu dodawano 200 µl etanolu, ponownie wytrząsano przez 15 sekund i odwirowywano krótko w celu usunięcia krople z wnętrza wieczka.

2. *Wiązanie z podłożem*

W tym etapie lizat przenoszono do minikolumny ze złożem krzemionkowym, które selektywnie wiąże kwasy nukleinowe. Ostrożnie przenoszono zawartość probówki Eppendorf na złożę mini kolumny, którą następnie wirowano przez minutę przy prędkości 8000 rpm.

3. *Przemywanie*

Następnie przeprowadzano dwuetapowe przemywanie DNA związanego ze złożem, co miało na celu usunięcie pozostałych zanieczyszczeń i inhibitorów reakcji enzymatycznych. Kolumnę ze związanym DNA umieszczano w nowej probówce,

nanoszono 500 µl buforu AW1 i wirowano przez 1 minutę (8000 rpm). Drugie przemywanie kolumnienki wykonywano dodając 500 µl buforu AW2 i odwirowywaniu przez 3 minuty (14000 rpm).

4. Elucja

W ostatnim etapie oczyszczone DNA eluowano ze złoża buforem o niskiej sile jonowej. Kolumnę umieszczano w sterylnej probówce Eppendorf, nakładano na nią 200 µl buforu AE i po 5 minutach wirowano przez 1 minutę (8000 rpm). Oczyszczone DNA przechowywano w temperaturze -80°C. Po izolacji oceniano spektrofotometrycznie stężenie uzyskanego DNA używając aparat NanoDrop 2000 (przy długości fali R260/280 oraz R260/230).

3.2.2. Reakcja łańcuchowa polimerazy/polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

Materialy i sprzęt

- termocykler Dyad (Bio-Rad, USA)
- probówki typu Eppendorf (1,5-2 ml)
- 96 dołkowe płytki do PCR z wieczkami
- pipety automatyczne oraz odpowiednie końcówki do pipet
- rękawiczki jednorazowe
- komora laminarna (UVP, Stany Zjednoczone)
- wyizolowane genomowe DNA
- woda sterylna
- probówki do PCR
- startery do reakcji PCR (TIB MOLBIOL, Niemcy)
- mieszanina dNTP (Thermo Scientific)
- polimeraza (5 U/µL) DreamTaq Green DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Stany Zjednoczone)
- bufor: 10X DreamTaq Green Buffer zawierający KCl i (NH₄)₂SO₄ oraz jony MgCl₂ w stężeniu 20 mM (substancja zagęszczająca oraz dwa barwniki: niebieski i żółty umożliwiające bezpośrednie nałożenie próbki na żel)

W celu amplifikacji rejonów genów zawierających badane w pracy warianty genetyczne wykorzystano reakcję łańcuchowej polimerazy (PCR - *polymerase chain reaction*). Reakcja PCR składa się z powtarzających się cykli zachodzących w różnej temperaturze obejmujących denaturację, hybrydyzację starterów i elongację czyli wydłużanie przyłączonych starterów. Pierwszym etapem reakcji jest denaturacja wstępna, którą przeprowadzono przez 10 minut w temperaturze 95°C Następnie powtarzano 30 cykli, złożonych z następujących etapów: denaturacja 30 sekund w 95°C, przyłączanie starterów przez 30 sekund w temperaturze zależnej od ich sekwencji oraz elongacja

przez 30 sekund w 72°C. Ostatnim etapem była elongacja końcowa przeprowadzana w 72°C przez 10 minut. Do poszczególnych reakcji PCR użyto starterów, których sekwencję zaczerpnięto z danych literaturowych. Temperatury przyłączania starterów, zostały ustalone poprzez wykonanie PCR w gradiencie temperatur (50°C-65°C).

Analiza produktów amplifikacji

Materialy i sprzęt

- standard wielkości DNA (50 pz)
- agaroz (Prona, Hiszpania)
- bufor TBE (Skład 1x roztworu: 89 mM Tris base, 89 mM kwas borowy, 2 mM EDTA, pH 8,2, woda bidestylowana)
- barwnik Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics, Japonia)
- aparat do elektroforezy (Scie-Plas, Wielka Brytania)
- zasilacz (Consort, Wielka Brytania)
- UV UVI-KS4000/Image PC (Syngen Biotech, Stany Zjednoczone)
- pipety automatyczne oraz odpowiednie końcówki do pipet
- rękawiczki jednorazowe

Aby ocenić jakość i ilość uzyskanego DNA, 5 µl produktu reakcji PCR poddano analizie elektroforetycznej w żelu agarozowym. Metoda ta pozwala określić wielkość oraz czystość i ilość powstałych produktów. Elektroforezę prowadzono w 2% żelach agarozowych zawierających Midori Green Advance DNA Stain w ilości 5 µl/100 ml żelu. Zastosowanie w reakcji PCR buforu DreamTaq™ Green Buffer zawierającego obciążacz i barwniki umożliwiło nakładanie prób bezpośrednio na żel. Proces prowadzono w temperaturze pokojowej, w aparacie do elektroforezy horyzontalnej w buforze 1xTBE przy napięciu 120 V. Wielkość fragmentów DNA porównywano z wzorcem mas cząsteczkowych nanoszonym równocześnie z próbami. Produkty amplifikacji analizowano w świetle UV i zarchiwizowano w komputerowym systemie wizualizacji i analizy obrazu UV UVI-KS4000/Image PC.

Charakterystykę analizowanych polimorfizmów przedstawiono w tabeli 3. Sekwencje starterów, temperatury ich hybrydyzacji i wielkości uzyskiwanych produktów oraz publikacje, z których zostały zaczerpnięte przedstawiono w tabeli 4. Reakcje amplifikacji DNA metodą PCR prowadzono w objętości 15 µl. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 3. Charakterystyka badanych w pracy genów i polimorfizmów.

<i>Nazwa genu</i>	<i>metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej-1</i>	<i>metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej-9</i>		<i>tkankowy inhibitor metaloproteinaz-1</i>	<i>tkankowy inhibitor metaloproteinaz-2</i>	
Symbol genu w HGNC	<i>MMP1</i>	<i>MMP9</i>		<i>TIMP1</i>	<i>TIMP2</i>	
Inne stosowane symbole genu	CLG, CLGN	GELB, CLG4B, MANDP2		TIMP, CLGI	DDC8; CSC-21K	
Pozycja cytogenetyczna	11q22.2	20q13.12		Xp11.3	17q25.3	
Nr Komisji Enzymów	EC.3.4.24.7	EC.3.4.24.35		—	—	
Numer rs	rs1799750	rs17576	rs17577	rs4898	rs2277698	rs55743137
Nazwa SNP (GRCh38.p12)	NC_000011.10:g.10279 9766del	NC_000020.11:g.460115 86A>G	NC_000020.11:g.460144 72G>A	NC_000023.11:g.475 85586T>C	NC_000017.11:g.78870935 C>T	NC_000017.11:g.78871103 T>G
Tradycyjna nazwa	-1607 1G/2G	836A>G	2003G>A	372C>T	303C>T	Brak
Zmiana sekwencji białka	Brak	Gln279Arg Q279R	Arg668Gln R668Q	Phe124= F124=	Ser101= S101=	Brak
Miejsce w genie	2 kb w górę od promotora	Exon 6	Exon 12	Exon 5	Exon 3	Intron 2

GRCh38 – *Genome Reference Consortium Human genome build 38*HGNC – *HUGO Gene Nomenclature Committee*HGVS – *Human Genome Variation Society*

Tabela 4. Sekwencje starterów do reakcji PCR.

Gen (Polimorfizm)	Sekwencja starterów	Temperatura*	Produkt PCR	Literatura
MMP1 (rs1799750) -1607 <i>1G/2G</i>	5' –TGACTTTTAAAACATAGTCTATGTTCA 3' 5' -TCTTGGATTGATTTGAGATAAGTCATAGC-3'	50°C	269 pz	Zhu i wsp., 2001
MMP9 (rs17576) <i>R279Q</i>	5'-GAG AGATGGGATGAACTG-3' 5'-GTGGTGGAAATGTGGTGT-3'	60°C	439 bp	Hu i wsp., 2005
MMP9 (rs17577) <i>R668Q</i>	5'-ACA CGC ACG ACG TCT TCC AGT ATC-3' 5'-GGG GCA TTT GTT TCC ATT TCC A-3'	63°C	138 pz	Hu, i wsp., 2005
TIMP1 (rs4898) <i>372 C>T</i>	5'-GCA CAT CAC TAC CTG CAG TCT-3' 5'-GAA ACA AGC CCA CGA TTT AG-3'	54°C	175 pz	Lorente i wsp., 2013
TIMP2 (rs2277698) <i>303C>T</i>	5'-CCA GGA AAT TGG CAG GTA GT-3' 5'-GAA TTC ACC AAC TGT GTG GC-3'	60°C	369 pz	Lee i wsp., 2008
TIMP2 (rs55743137) <i>T>G</i>	5'-CCT TTG AAC ATC TGG AAA GAC AA-3' 5'-TAA CCC ATG TAT TTG CAC TTC CT-3'	58°C	160 pz	Lathouras i wsp., 2018

*Temperatury przyłączania starterów

Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej do metody PCR.

<i>Skład mieszaniny</i>	<i>Stężenie wyjściowe</i>	<i>Objętość</i>
DNA	5 µg/µl	1 µl
H₂O sterylna	—	10,65 µl
Bufor do PCR	10X	1,5 µl
dNTP	12,5 mM	1,2 µl
Starter F	10 µM	0,25 µl
Starter R	25 µM	0,25 µl
Polimeraza	5 U/µl	0,15 µl
Objętość końcowa		15 µl

Hydroliza enzymami restrykcyjnymi

Materiały i sprzęt

Enzymy restrykcyjne:

- **AluI** (10 U/µL) (Thermo Fisher Scientific), numer katalogowy: ER0011
- **MspI (HpaII)** (10 U/µL) (Thermo Fisher Scientific), numer katalogowy: ER0542
- **TaqI** (10 U/µL) (Thermo Fisher Scientific), numer katalogowy: ER0672
- **BauI (BssSI)** (10 U/µL) (Thermo Fisher Scientific), numer katalogowy: ER1841
- **BseNI (BsrI)** (10 U/µL) (Thermo Fisher Scientific), numer katalogowy: ER0881

Bufoery

- 1X Thermo Scientific Tango Buffer (33 mM Tris-acetate (pH 7,9), 10 mM magnesium acetate, 66 mM potassium acetate, 0,1 mg/mL BSA)
- 1X Buffer TaqI (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 mg/mL BSA)
- 1X Buffer B (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 0,1 mg/mL BSA)

Cieplarka (Mettmert, Niemcy)

Po amplifikacji fragmentów i pozytywnej weryfikacji produktów PCR wykonano analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP- ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Rozdział produktów reakcji RFLP prowadzono wykorzystując całą objętość mieszaniny reakcyjnej w 2,5% żelu agarozowym w buforze 1xTBE przy napięciu 120 V prze około 2 godziny w obecności wzorca wielkości 50 pz. Na podstawie wyników rozdziału elektroforetycznego po wizualizacji w świetle UV określano poszczególne genotypy.

W tabeli 6 zestawiono stosowane enzymy restrykcyjne, długości fragmentów uzyskiwanych po hydrolizie oraz temperatury i czas trwania przeprowadzanych reakcji hydrolizy.

Tabela 6. Warunki reakcji hydrolizy dla badanych polimorfizmów.

	<i>Polimorfizm</i>					
	rs1799750 -1607 1G/2G	rs17576 Q279R	rs17577 R668Q	rs4898 372C>T	rs2277698 303C>T	rs55743137 T>G
Enzym restrykcyjny	<i>AluI</i>	<i>MspI</i>	<i>TaqI</i>	<i>BauI</i> (<i>BssSI</i>)	<i>BsrI</i>	<i>AluI</i>
Rozpoznawana sekwencja	AG↓CT	C↓CGG	T↓CGA	CACGAG (-5/-1)	ACTGG (1/-1)	AG↓CT
Bufor	Tango	Tango	TaqI	Tango	B	Tango
Temperatura i czas hydrolizy	37°C, 16 godzin	37°C, 16 godzin	65°C, 16 godzin	37°C, 16 godzin	65°C, 16 godzin	37°C, 16 godzin
Uzyskane fragmenty po hydrolizie	1G 241, 28 pz 2G 269 pz	A 252, 187 pz G 187, 129, 123 pz	G 115, 23 pz A 138 pz	C 153,22 pz T 175 pz	C 369 pz T 231, 138 pz	T 160 pz G 108, 52 pz

3.3. Obliczenia statystyczne

Obliczenia statystyczne wykonywano przy użyciu programu R, wersja 4.1.1 (R Foundation for Statistical Computing, Wiedeń, Austria – dostęp 01 września 2021) [R Core Team, 2021]. W przypadku zmiennych ilościowych normalność rozkładu sprawdzono testem Shapiro–Wilka. Zmienne ciągłe o rozkładzie normalnym przedstawiono jako średnią $\pm$ odchylenie standardowe (SD - *standard deviation*), a przy braku rozkładu normalnego jako medianę i rozstęp międzykwartylowy (IQR - *interquartile range*). Zmienne kategoryczne wyrażono jako liczby i procenty. Charakterystykę kliniczną między grupami porównywano za pomocą testu t-Studenta (porównania 2 grup) bądź analizy wariancji ANOVA (porównania więcej niż 2 grup). Zmienne niespełniające założeń rozkładu normalnego analizowane były za pomocą testów nieparametrycznych U Manna-Whitneya (porównania 2 grup) bądź testu rang Kruskala-Wallisa (porównania więcej niż 2 grup). Różnice istotne statystyczne pomiędzy średnimi arytmetycznymi oznaczono testami post-hoc (Tukey HSD dla analizy wariancji i Duna w przypadku testu rang). Zastosowano testy χ^2 Pearsona oraz Fischera dla zmiennych nominalnych. Dla każdego SNP została oceniona równowaga Hardy'ego-Weinberga (HWE – *Hardy-Weinberg Equilibrium*) za pomocą testu χ^2 Pearsona. Różnice w częstości występowania alleli i genotypów pomiędzy grupami oceniano metodą regresji logistycznej przy użyciu pakietu SNPassoc dla R [González i wsp., 2007] i przedstawiano jako ilorazy szans (OR - *odds ratio*) i związane z nimi 95% przedziały ufności (95% CI - *95% confidence interval*). Za statystycznie istotne przyjęto wartości dwustronnego $p < 0,05$.

Analizę haplotypów przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Haploview w wersji 4.2 (<https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview> - dostęp 1 października 2020). Obliczono parametry nierównowagi sprzężeń (LD - *linkage disequilibrium*) r^2 i D' oraz częstości haplotypów. Porównano rozkład haplotypów w grupach chorych i kontrolnych testami chi-kwadrat. Znaczące wartości p skorygowano stosując 10000 - krotny test permutacji.

4. WYNIKI

4.1. Charakterystyka danych klinicznych pacjentek i ich noworodków

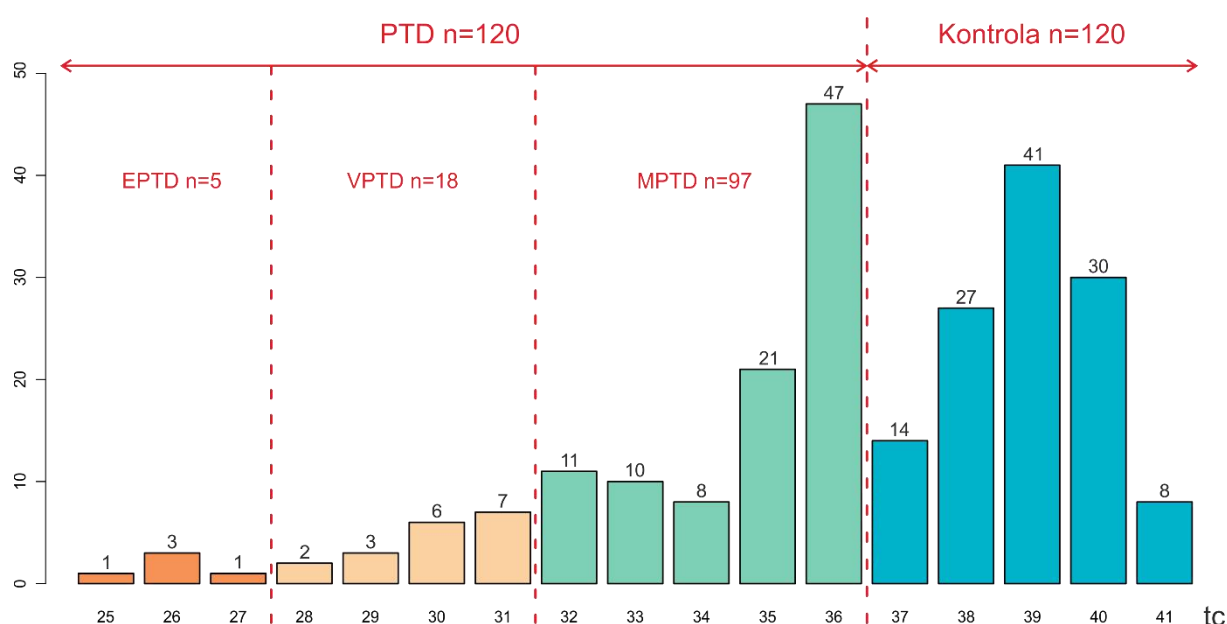
Analizie poddano łącznie 240 pacjentek, które ze względu na tydzień wystąpienia porodu podzielono na dwie grupy:

Grupa badana - 120 kobiet z porodem przedwczesnym (przed 37 tygodniem ciąży). W pracy podzielono pacjentki ze względu na tydzień zakończenia ciąży:

- skrajnie przedwczesny (**EPTD** - *extremely preterm delivery*) <28 tc.
- bardzo przedwczesny (**VPTD** - *very preterm delivery*) 28-31+6 tc.
- umiarkowanie przedwczesny (**MPTD** - *moderately preterm delivery*) 32-36+6 tc.

Grupa kontrolna - 120 zdrowych kobiet, u których w wywiadzie odnotowano obecność co najmniej 2 ciąż o niepowikłanym przebiegu, zakończonych urodzeniem zdrowego, donoszonego noworodka.

Schemat podziału analizowanych pacjentek ze względu na tydzień zakończenia ciąży przedstawiono na rycinie 4.



Rycina 4. Podział badanych kobiet ze względu na tydzień zakończenia ciąży.

Analizując grupę kobiet z PTD tylko 5 (4%) pacjentek zakwalifikowano do podgrupy EPTD (od 25 do 27+6 tc.), 18 kobiet (15%) do podgrupy VPTD (od 28 do 31+6 tc.) oraz 97 (81%) do podgrupy MPTD (od 32 do 36+6 tc.). Ze względu na zbyt

małą liczebność grupy kobiet rodzących skrajnie przedwcześnie, w dalszych analizach połączono te pacjentki z grupą rodzących bardzo przedwcześnie (EPTD+VPTD).

Charakterystykę danych klinicznych pacjentek z PTD oraz kontrolnej przedstawiono w tabeli 7. Wiek pacjentek w grupie PTD mieścił się w granicach 18-40 lat (średnio $29,06 \pm 5,51$ lat), natomiast w grupie kontrolnej 21-40 lat (średnio $30,21 \pm 3,60$ lat), nie stwierdzono jednak istotnej statystycznie różnicy pomiędzy grupami ($p=0,0568$). Średni czas zakończenia ciąży był istotnie statystycznie niższy w grupie badanej PTD i wynosił $33,79 \pm 2,73$ tc. w porównaniu do grupy kontrolnej: $38,92 \pm 1,10$ tc. ($p<0,001$). Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w średnich wartościach skurczowego i rozkurczowego ciśnienia krwi oraz wzrostu, masy ciała przed jak i pod koniec trwania ciąży. W grupie badanej PTD średnia wartość wskaźnika masy ciała BMI przed ciążą była statystycznie istotnie wyższa w porównaniu do grupy badanej ($21,48 \pm 2,92$ vs. $20,72 \pm 1,75 \text{ kg/m}^2$, $p=0,0156$), natomiast pod koniec ciąży nie odnotowano różnicy pomiędzy grupami ($26,28 \pm 3,81$ vs. $25,93 \pm 2,42 \text{ kg/m}^2$, $p=0,3913$). Również przyrost BMI nie różnił się istotnie w obu grupach. W grupie badanej PTD stwierdzono większą liczbę wieloródek (wieloródki vs. pierwiastki - 65,83% vs. 34,17%), natomiast w grupie kontrolnej wszystkie kobiety rodziły wielokrotnie, co było kryterium zakwalifikowania do tej grupy. W grupie pacjentek rodzących przedwcześnie aż 33,33% porodów przeprowadzono operacyjnie, natomiast w grupie kontrolnej zdrowych ciążarnych tylko 20,00%, ($p=0,0200$) (Tab.7).

Tabela 7. Charakterystyka porównawcza kobiet z PTD oraz grupy kontrolnej.

<i>Dane kliniczne pacjentek średnia $\pm$ SD</i>	<i>PTD (n=120)</i>	<i>Grupa kontrolna (n=120)</i>	<i>p</i>
<i>Wiek (lata)</i>	$29,06 \pm 5,51$	$30,21 \pm 3,60$	0,0568
<i>Tydzień zakończenia ciąży</i>	$33,79 \pm 2,73$	$38,92 \pm 1,10$	<0,001
<i>RR skurczowe (mmHg)</i>	$107,62 \pm 10,39$	$105,42 \pm 10,64$	0,1052
<i>RR rozkurczowe (mmHg)</i>	$67,79 \pm 8,12$	$66,83 \pm 7,70$	0,3489
<i>Wzrost (cm)</i>	$165,60 \pm 5,74$	$166,93 \pm 5,78$	0,0742
<i>Masa przed ciążą (kg)</i>	$59,01 \pm 9,21$	$57,86 \pm 6,67$	0,2689
<i>Masa pod koniec ciąży (kg)</i>	$72,19 \pm 11,74$	$72,30 \pm 8,04$	0,9336
<i>BMI przed ciążą (kg/m^2)</i>	$21,48 \pm 2,92$	$20,72 \pm 1,75$	0,0156
<i>BMI pod koniec ciąży (kg/m^2)</i>	$26,28 \pm 3,81$	$25,93 \pm 2,42$	0,3913
<i>Różnica BMI (kg/m^2)</i>	$4,80 \pm 1,90$	$5,20 \pm 1,62$	0,0768
<i>Pierwiastki</i>	45 (34,17%)	0 (0,00%)	—
<i>Wieloródki</i>	75 (65,83%)	120 (100,00%)	
<i>Poród samoistny</i>	80 (66,67%)	96 (80,00%)	0,0200
<i>Poród operacyjny</i>	40 (33,33%)	24 (20,00%)	

W dalszej kolejności w obydwu grupach porównano parametry noworodków, które przedstawiono w tabeli 8. Masa urodzeniowa noworodków matek rodzących przedwcześnie była istotnie niższa niż masa ciała noworodków matek z grupy kontrolnej ($2411,17 \pm 722,00$ vs. $3483,75 \pm 399,83$, $p < 0,001$). Również punktacja w skali Apgar w pierwszej i piątej minucie była statystycznie wyższa w grupie kontrolnej, natomiast wartości pH żylnego jak i tętniczego nie różniły się istotnie w obu analizowanych grupach. Średnia masa łożyska w grupie noworodków kobiet rodzących przedwcześnie wynosiła $556,19 \pm 153,25$ g i była istotnie statystycznie niższa, od noworodków z grupy kontrolnej - $629,96 \pm 112,48$ g ($p = 0,0003$). W grupie PTD urodziło się 42,50% noworodków płci żeńskiej i 57,50% męskiej, natomiast w kontrolnej było to odpowiednio 35,83 i 64,17% ($p = 0,2910$) (Tab. 8).

Tabela 8. Dane noworodków kobiet z porodem przedwczesnym oraz grupy kontrolnej.

<i>Dane kliniczne noworodków średnia $\pm$ SD</i>	<i>PTD (n=120)</i>	<i>Grupa kontrolna (n=120)</i>	<i>p</i>
<i>Masa urodzeniowa (g)</i>	2411,17 $\pm$ 722,00	3483,75 $\pm$ 399,83	<0,001
<i>Apgar w 1 minucie, mediana (IQR)</i>	9 (7 – 10)	10 (10 – 10)	<0,001
<i>Apgar w 5 minucie, mediana (IQR)</i>	10 (8 - 10)	10 (10 - 10)	<0,001
<i>pH żyłne</i>	7,35 $\pm$ 0,10	7,35 $\pm$ 0,11	0,9962
<i>pH tętnicze</i>	7,28 $\pm$ 0,10	7,26 $\pm$ 0,07	0,2809
<i>Masa łożyska (g)</i>	556,19 $\pm$ 153,25	629,96 $\pm$ 112,48	0,0003
<i>Płeć noworodka</i>			
<i>córka</i>	51 (42,50%)	43 (35,83%)	0,2910
<i>syn, n(%)</i>	69 (57,50%)	77 (64,17%)	

Następnie w analizie i opisie wyników danych klinicznych matek i noworodków przeprowadzono podział grupy badanej na dwie podgrupy ze względu na tydzień zakończenia ciąży: skrajnie i bardzo przedwcześnie (EPTD+VPTD) oraz umiarkowanie przedwcześnie (MPTD). Średni czas zakończenia ciąży różnił się statystycznie istotnie pomiędzy wszystkimi analizowanymi grupami ($p < 0,001$). Wiek pacjentek, ciśnienie skurczowe i rozkurczowe, wzrost i masa ciała przed ciążą jak i pod koniec ciąży nie różniły się statystycznie istotnie w badanych grupach kobiet. Natomiast zaobserwowano różnicę w BMI przed ciążą ($p = 0,034$). Najwyższa średnia wskaźnika masy ciała przed ciążą występowała w grupie MPTD, a najniższa w grupie kontrolnej ($21,58 \pm 3,07$ kg/m² vs. $20,72 \pm 1,75$ kg/m², $p = 0,0256$). Grupy nie różniły się średnimi wskaźnikami BMI obliczonymi pod koniec ciąży, natomiast zaobserwowana statystyczną istotność

pomiędzy średnimi różnicy BMI pod koniec i na początku ciąży ($p=0,0045$). Różnica BMI w grupie EPTD+VPTD ($3,89\pm 1,27$ kg/m²) była najmniejsza i różniła się statystycznie istotnie zarówno ze średnią dla grupy MPTD ($5,02\pm 1,96$ kg/m², $p=0,0029$) jak i kontroli ($5,20\pm 1,62$ kg/m², $p=0,0154$). W analizowanych grupach większy odsetek stanowiły wieloródki, 100% w grupie kontrolnej, 60,82% w MPTD i 69,57% w EPTD+VPTD ($p<0,001$). Różnice statystycznie istotne obserwowano także porównując grupy pod względem sposobu ukończenia ciąży ($p=0,0153$). W grupie EPTD+VPTD dominował poród operacyjny (47,83% vs. 29,90% w grupie MPTD, $p=0,1390$ oraz 20,00% w kontrolnej, $p=0,0229$) (Tab.9).

Kolejnym etapem była analiza porównawcza parametrów dotyczących noworodków matek z grup wyodrębnionych na podstawie tygodnia zakończenia ciąży oraz z grupy kontrolnej, które przedstawiono w tabeli 10. Średnia masa urodzeniowa noworodka z grupy EPTD+VPTD wynosiła $1496,52\pm 556,29$ g, z MPTD $2628,04\pm 572,10$ g, natomiast w grupie kontrolnej $3483,75\pm 399,83$ g, co stanowiło statystycznie istotną różnicę ($p<0,0001$). Zaobserwowano również że punktacja w skali Apgar w pierwszej i piątej minucie była statystycznie wyższa w grupie kontrolnej ($p<0,0001$), natomiast wartości pH żylnego jak i tętniczego nie różniły się istotnie pomiędzy analizowanymi grupami. Najniższą średnią masę łożyska odnotowano w grupie rodzących przed 32 tygodniem ciąży i wynosiła $416,67\pm 99,82$ g. Była ona niższa od średniej uzyskanej dla pacjentek rodzących między 32 a 36 tygodniem ciąży ($596,69\pm 142,22$ g, $p<0,001$) oraz grupy kontrolnej ($629,96\pm 112,48$ g, $p<0,001$). Częstość występowania płci żeńskiej i męskiej noworodków nie różniła się statystycznie istotnie pomiędzy badanymi grupami.

Tabela 9. Dane kliniczne pacjentek w grupach wydzielonych w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.

<i>Dane kliniczne pacjentek średnia ± SD</i>	<i>Kontrola n=120</i>	<i>EPTD+VPTD n=23</i>	<i>MPTD n=97</i>	<i>p (Anova)</i>	<i>p Tukey HSD</i>
<i>Wiek (lata)</i>	30,21 ± 3,60	28,87 ± 5,38	29,10 ± 5,56	0,159	a) 0,4180, b) 0,1935, c) 0,9746
<i>Tydzień zakończenia ciąży</i>	38,92 ± 1,10	29,13 ± 1,94	34,86 ± 1,41	<0,001	a) <0,001, b) <0,001, c) <0,001
<i>RR skurczowe (mmHg)</i>	105,42 ± 10,64	107,83 ± 10,85	107,58 ± 10,34	0,268	a) 0,5748, b) 0,2921, c) 0,9943
<i>RR rozkurczowe (mmHg)</i>	66,83 ± 7,70	68,70 ± 8,15	67,58 ± 8,14	0,536	a) 0,5567, b) 0,7707, c) 0,8154
<i>Wzrost (cm)</i>	166,93 ± 5,78	165,26 ± 6,25	165,68 ± 5,64	0,194	a) 0,4117, b) 0,2519, c) 0,9473
<i>Masa przed ciążą (kg)</i>	57,86 ± 6,67	57,52 ± 7,01	59,36 ± 9,65	0,334	a) 0,9815, b) 0,3589, c) 0,5862
<i>Masa pod koniec ciąży (kg)</i>	72,30 ± 8,04	68,26 ± 7,91	73,12 ± 12,33	0,112	a) 0,1799, b) 0,8182, c) 0,0923
<i>BMI przed ciążą (kg/m²)</i>	20,72 ± 1,75	21,05 ± 2,17	21,58 ± 3,07	0,034	a) 0,8200, b) 0,0256 , c) 0,6090
<i>BMI pod koniec ciąży (kg/m²)</i>	25,93 ± 2,42	24,94 ± 1,95	26,60 ± 4,07	0,055	a) 0,3583, b) 0,2673, c) 0,0635
<i>Różnica BMI (kg/m²)</i>	5,20 ± 1,62	3,89 ± 1,27	5,02 ± 1,96	0,0045	a) 0,0029 , b) 0,7072, c) 0,0154
<i>Pierwiastki Wieloródki, n (%)</i>	0 (0,00%) 120 (100,00%)	7 (30,43%) 16 (69,57%)	38 (39,18%) 59 (60,82%)	<0,001*	a) <0,001 , b) <0,001 , c) <0,001
<i>Poród samoistny Poród operacyjny, n (%)</i>	96 (80,00%) 24 (20,00%)	12 (52,17%) 11 (47,83%)	68 (70,10%) 29 (29,90%)	0,0153*	a) 0,0229 , b) 0,1390, c) 0,1390

*p Fisher a) kontrola vs. EPTD+VPTD, b) MPTD vs. kontrola, c) MPTD vs. EPTD+VPTD

Tabela 10. Dane noworodków w grupach kobiet wydzielonych w zależności tygodnia zakończenia ciąży.

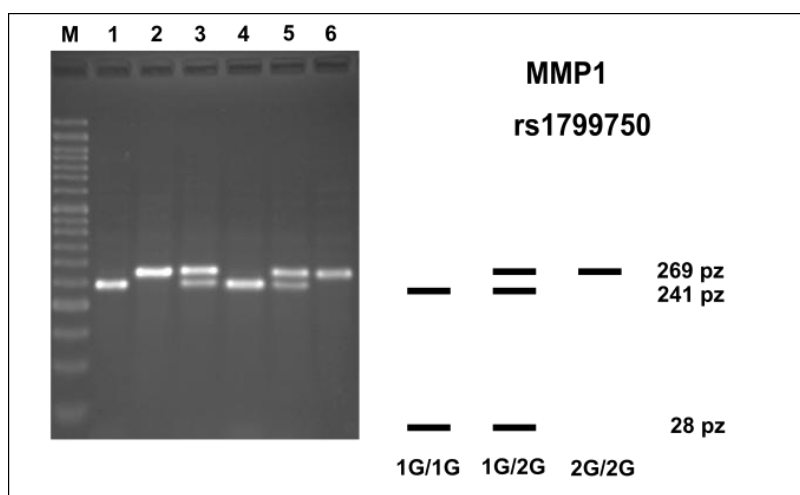
<i>Dane kliniczne średnia ± SD</i>	<i>Kontrola n=120</i>	<i>EPTD+VPTD n=23</i>	<i>MPTD n=97</i>	<i>p (Anova)</i>	<i>p TukeyHSD</i>
<i>Masa (g)</i>	3483,75 ± 399,83	1496,52 ± 556,29	2628,04 ± 572,10	<0,001	a) <0,001 , b) <0,001 c) <0,001
<i>Apgar w 1 minucie mediana (IQRx)</i>	10 (10 - 10)	7,00 (2 - 9)	9 (8 - 10)	<0,001	a) <0,001 , b) <0,001 , c) <0,001
<i>Apgar w 5 minucie mediana (min – max)</i>	10 (10 - 10)	8,00 (6 – 9,5)	10 (9 - 10)	<0,001	a) <0,001 , b) <0,001 , c) <0,001
<i>pH żyłne</i>	7,35 ± 0,11	7,33 ± 0,15	7,36 ± 0,08	0,486	a) 0,5883, b) 0,8902, c) 0,4528
<i>pH tętnicze</i>	7,26 ± 0,07	7,27 ± 0,15	7,28 ± 0,08	0,480	a) 0,9511, b) 0,4466, c) 0,9094
<i>Masa łóżyska (g)</i>	629,96 ± 112,48	416,67 ± 99,82	596,69 ± 142,22	<0,001	a) <0,001 , b) 0,1904, c) <0,001
<i>Płeć noworodka</i> córka syn	43 (35,83%) 77 (64,17%)	9 (39,13%) 14 (60,87%)	42 (43,30%) 55 (56,70%)	0,5094*	a) 0,816, b) 0,804, c) 0,816

*p Fisher; a) kontrola vs. EPTD+VPTD, b) MPTD vs. kontrola, c) MPTD vs. EPTD+VPTD

4.2. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów u kobiet z porodem przedwczesnym oraz w grupie kontrolnej

Polimorfizm rs1799750 genu *MMP1*

Pierwszym z analizowanych w pracy wariantów była insercja/delecja guaniny w pozycji -1607 promotora genu *MMP1*. W przypadku obecności homozygoty *1G/1G* w wyniku działania enzymu restrykcyjnego *AluI* uzyskano dwa prążki wielkości 241, 28 pz, przy obecności heterozygoty *1G/2G* obserwowano obraz trzech prążków odpowiadających fragmentom 269, 241, 28 pz. Dla genotypu *2G/2G* zawierającego oba allele z insercją guaniny nie występowało miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny *AluI* i uzyskiwano na żelu jeden prążek 269 pz, równy produktowi PCR (Ryc. 5).



Rycina 5. Przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów po reakcji hydrolizy enzymem *AluI* dla polimorfizmu rs17577 genu *MMP1*. M - marker wielkości 50 pz, tory 1, 4, genotyp homozygotyczny *1G/1G*, tory 3, 5 genotyp heterozygotyczny *1G/2G*, tory 2, 6 genotyp homozygotyczny insercja guaniny *2G/2G*.

Dla tego wariantu nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w częstości występowania genotypów i alleli pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną. Zaobserwowano jednak, że allel insercyjny *2G* częściej występował w grupie kontrolnej (45,0 vs. 37,9% w grupie PTD, OR=0,75, $p=0,115$). Genotyp *1G/1G* występował częściej u pacjentek PTD (42,5%) w porównaniu z grupą kontrolną (30,8%) i w modelu dominującym uzyskano $p=0,0603$, OR=1,66, 95%PU=0,98-2,82 (Tab. 11). Wartości oczekiwane i obserwowane poszczególnych genotypów były zgodne z założeniami prawa Hardy'ego-Weinberga (grupa kontrolna $p=0,854$, PTD $p=0,080$).

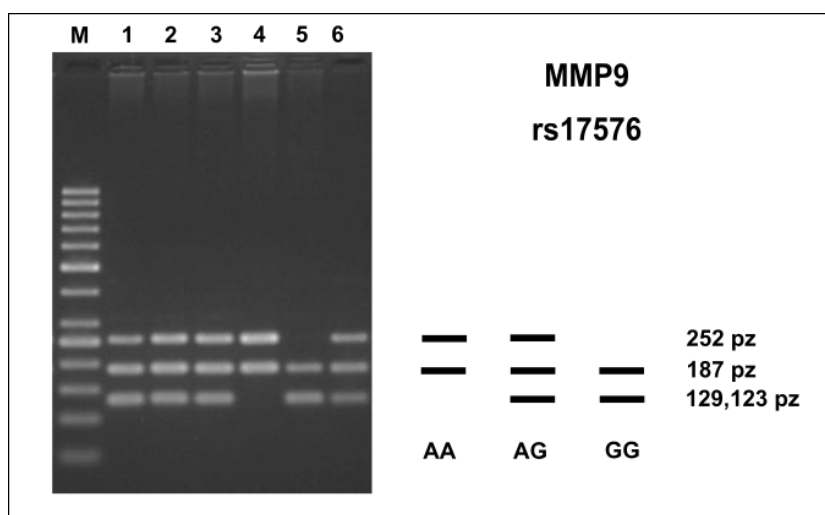
Tabela 11. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu –1607 (1G>2G) genu *MMP1* w grupie kobiet z PTD oraz w grupie kontrolnej.

<i>Model genetyczny</i>	<i>MMP1 rs1799750</i>	<i>PTD n (%)</i>	<i>Kontrola n (%)</i>	<i>OR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
<i>kodominujący</i>	<i>1G/1G</i>	51 (42,5)	37 (30,8)	1,00	-	0,1667
	<i>1G/2G</i>	47 (39,2)	58 (48,4)	1,70	0,96-3,01	
	<i>2G/2G</i>	22 (18,3)	25 (20,8)	1,57	0,77-3,19	
<i>dominujący</i>	<i>1G/1G</i>	51 (42,5)	37 (30,8)	1,00	-	0,0603
	<i>1G/2G+2G/2G</i>	69 (57,5)	83 (69,2)	1,66	0,98-2,82	
<i>recesywny</i>	<i>1G/1G+1G/2G</i>	98 (81,7)	95 (79,2)	1,00	-	0,6255
	<i>2G/2G</i>	22 (18,3)	25 (20,8)	1,17	0,62-2,22	
<i>allele</i>	<i>1G</i>	149 (62,1)	132 (55,0)	1,00	-	0,1150
	<i>2G</i>	91 (37,9)	108 (45,0)	0,75	0,52 - 1,07	

Allele: Chi² Pearson's *p*

Polimorfizmy rs17576 oraz rs17577 genu *MMP9*

Do analizy RFLP polimorfizmu *Gln279Arg* zlokalizowanego w eksonie 6 wykorzystano enzym *MspI*. Po hydrolizie restrykcyjnej genotyp homozygotyczny niezmutowany *AA* widoczny był na żelach agarozowych jako dwa prążki powstałe w wyniku przecięcia produktu reakcji PCR 439 pz na dwa fragmenty o wielkości 252 oraz 187 pz. Dzięki obecności dwóch miejsc restrykcyjnych dla enzymu *MspI* dla homozygot *GG* powstawały trzy fragmenty 187, 129 i 123 pz (Ryc.6).



Rycina 6. Przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów po reakcji hydrolizy enzymem *MspI* dla polimorfizmu rs17576 genu *MMP9*. M - marker wielkości 50 pz, tor 4 genotyp homozygotyczny niezmutowany *AA*, tory 1, 2, 3, 6 genotyp heterozygotyczny *AG*, tor 5 genotyp homozygotyczny zmutowany *GG*.

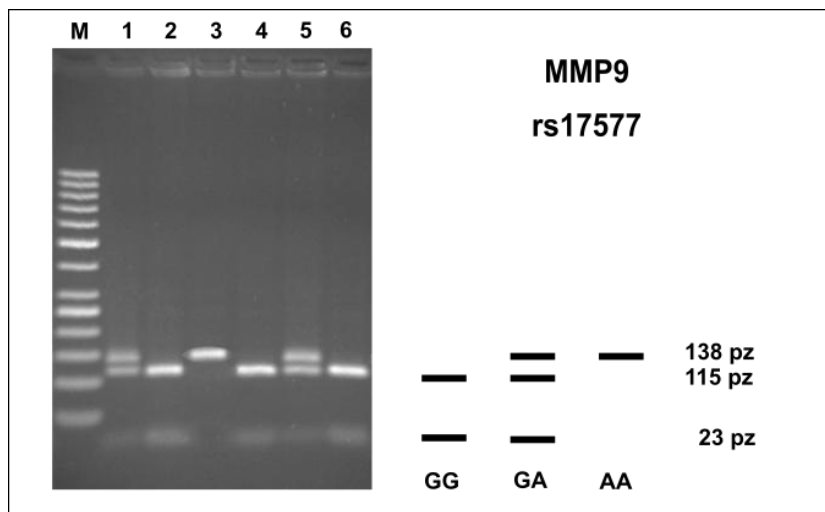
Częstość występowania alleli dla tego wariantu spełniała założenia prawa Hardy'ego-Weinberga (grupa kontrolna $p=0,545$, PTD $p=0,682$). Analiza statystyczna nie ujawniła istotnych statystycznie różnic w częstości występowania genotypów i alleli dla tego wariantu. Genotyp heterozygotyczny *AG* w obu grupach występował u 42,5% pacjentek. Również allele występowały z podobną częstością w grupie badanej i kontrolnej (allel *A*: 67,1 vs. 65,4%, allel *G*: 32,9 vs. 34,6 w grupie kontrolnej OR=0,93, $p=0,6990$) (Tab.12).

Tabela 12. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *R279Q* genu *MMP9* w grupie kobiet z PTD oraz w grupie kontrolnej.

<i>Model genetyczny</i>	<i>MMP9 rs17576</i>	<i>PTD n (%)</i>	<i>Kontrola n (%)</i>	<i>OR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
<i>kodominujący</i>	<i>AA</i>	55 (45,8)	53 (44,2)	1,00	-	0,9183
	<i>AG</i>	51 (42,5)	51 (42,5)	1,04	0,6-1,78	
	<i>GG</i>	14 (11,7)	16 (13,3)	1,19	0,53-2,67	
<i>dominujący</i>	<i>AA</i>	55 (45,8)	53 (44,2)	1,00	-	0,7952
	<i>AG+GG</i>	65 (54,2)	67 (55,8)	1,07	0,64-1,78	
<i>recesywny</i>	<i>AA+AG</i>	106 (88,3)	104 (86,7)	1,00	-	0,6962
	<i>GG</i>	14 (11,7)	16 (13,3)	1,16	0,54-2,51	
<i>allele</i>	<i>A</i>	161 (67,1)	157 (65,4)	1,00	-	0,6990
	<i>G</i>	79 (32,9)	83 (34,6)	0,93	0,63-1,36	

Allele: Chi² Pearson's p

Kolejnym z badanych w pracy wariantów była tranzycja *G* na *A* zlokalizowana w eksonie 12 genu *MMP9*. Powoduje ona zmianę sekwencji aminokwasowej białka w pozycji 668 (*Arg>Gln*). Zamiana guaniny na adeninę eliminuje istniejące miejsce restrykcyjne dla endonukleazy *TaqI* i dlatego w analizie RFLP dla genotypu *GG* uzyskiwano dwa prążki o wielkości 115 i 23 par zasad, natomiast dla genotypu *AA* jeden prążek równy wielkością produktowi PCR 138 pz (Ryc. 7).



Rycina 7. Przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów po reakcji hydrolizy enzymem *TaqI* dla polimorfizmu rs17577 genu *MMP9*. M - marker wielkości 50 pz, tor 2, 4, 6 genotyp homozygotyczny niezmutowany *GG*, tor 2, 5 genotyp heterozygotyczny *GA*, tor 4 genotyp homozygotyczny zmutowany *AA*.

W obu badanych grupach uzyskano wyniki zgodne z prawem równowagi Hardy'ego-Weinberga (grupa kontrolna $p=0,435$, PTD $p=0,747$). Analizy statystyczne, przeprowadzone na podstawie częstości występowania genotypów otrzymanych z badań tego polimorfizmu genu *MMP9* nie wykazały związku z występowaniem porodu przedwczesnego u badanych kobiet. W grupie PTD nieznacznie częściej obserwowano występowanie genotypów zawierających zmutowany allel *A* (*GA*: 27,5% vs. 21,7% w grupie kontrolnej, oraz *AA*: 3,0% vs. 2,5%) i w modelu dominującym uzyskano $p=0,2470$ (Tab. 13).

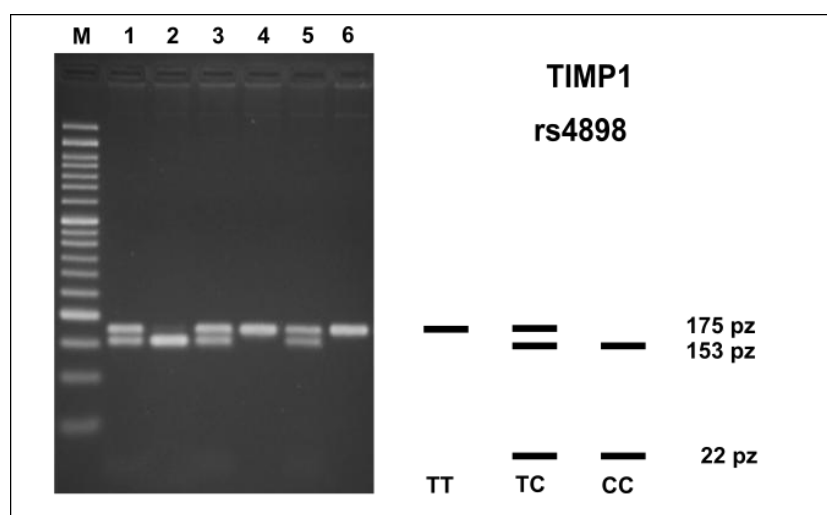
Tabela 13. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *R668Q* genu *MMP9* w grupie kobiet z PTD oraz w grupie kontrolnej.

<i>Model genetyczny</i>	<i>MMP9 rs17577</i>	<i>PTD n (%)</i>	<i>Kontrola n (%)</i>	<i>OR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
<i>kodominujący</i>	<i>GG</i>	83 (69,2)	91 (75,8)	1,00	-	0,5107
	<i>GA</i>	33 (27,5)	26 (21,7)	0,72	0,4-1,3	
	<i>AA</i>	4 (3,3)	3 (2,5)	0,68	0,15-3,15	
<i>dominujący</i>	<i>GG</i>	83 (69,2)	91 (75,8)	1,00	-	0,2470
	<i>GA-AA</i>	37 (30,8)	29 (24,2)	0,71	0,4-1,26	
<i>recesywny</i>	<i>GG-GA</i>	116 (96,7)	117 (97,5)	1,00	-	0,7008
	<i>AA</i>	4 (3,3)	3 (2,5)	0,74	0,16-3,4	
<i>allele</i>	<i>G</i>	199 (82,9)	208 (86,7)	1,00	-	0,2520
	<i>A</i>	41 (17,1)	32 (13,3)	1,34	0,81-2,21	

Allele: χ^2 Pearson's p

Polimorfizm rs4898 genu *TIMP1*

Zbadanie związku wariantu polimorficznego $372C>T$ z występowaniem porodu przedwczesnego umożliwiła analiza RFLP fragmentu eksonu 5 genu *TIMP1* z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego *BauI* (*BssSI*).



Rycina 8. Przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów po reakcji hydrolizy enzymem *BauI* (*BssSI*) dla polimorfizmu rs4898 genu *TIMP1*. M - marker wielkości 50 pz, tor 4, 6 genotyp homozygotyczny zmutowany *TT*, tor 1, 3, 5 genotyp heterozygotyczny *TC*, tor 2 genotyp homozygotyczny niezmutowany *CC*.

Ponieważ allel *C* tworzy miejsce restrykcyjne dla tej endonukleazy genotyp homozygotyczny zmutowany *TT* tworzył pojedynczy prążek o wielkości 175 pz. Dla heterozygoty *TC* otrzymywano trzy prążki: 172, 130 i 42 pz. W genotypie niezmutowanym *CC* otrzymywano dwa prążki o długości 153 i 22 pz (ryc. 8).

Rozkład genotypów tego polimorfizmu był zgodny z prawem Hardy'ego-Weinberga zarówno w grupie badanej ($p=0,855$) jak i w grupie kontrolnej ($p=0,273$). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów i alleli polimorfizmu $372C>T$ genu *TIMP1* wśród analizowanych kobiet. W grupie pacjentek z PTD zaobserwowano niewielką przewagę genotypu homozygotycznego zmutowanego *TT* w porównaniu do grupy kontrolnej (24,2 vs. 21,7%). Allele *C* i *T* w grupie badanej występowały z taką samą częstością (50,0%) (Tab. 14).

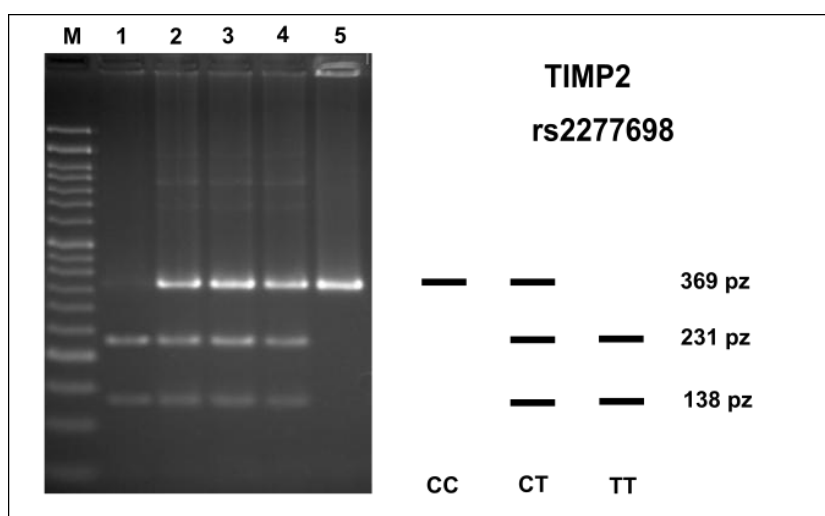
Tabela 14. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 372C>T genu *TIMP1* w grupie kobiet z PTD oraz w grupie kontrolnej.

<i>Model genetyczny</i>	<i>TIMP1 rs4898</i>	<i>PTD n (%)</i>	<i>Kontrola n (%)</i>	<i>OR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
<i>kodominujący</i>	<i>CC</i>	29 (24,2)	27 (22,5)	1,00	-	0,8069
	<i>TC</i>	62 (51,7)	67 (55,8)	1,16	0,62-2,17	
	<i>TT</i>	29 (24,2)	26 (21,7)	0,96	0,46-2,03	
<i>dominujący</i>	<i>CC</i>	29 (24,2)	27 (22,5)	1,00	-	0,7602
	<i>TC+TT</i>	91 (75,8)	93 (77,5)	1,10	0,60-2,00	
<i>recesywny</i>	<i>CC+TC</i>	91 (75,8)	94 (78,3)	1,00	-	0,6449
	<i>TT</i>	29 (24,2)	26 (21,7)	0,87	0,48-1,59	
<i>allele</i>	<i>C</i>	120 (50,0)	121 (50,4)	1,00	-	0,9270
	<i>T</i>	120 (50,0)	119 (49,6)	1,02	0,71-1,45	

Allele: Chi² Pearson's *p*

Polimorfizmy rs2277698 i rs55743137 genu *TIMP2*

Ostatnim z analizowanych genów był *TIMP2*, w którym oceniano częstość występowania dwóch wariantów rs2277698 i rs55743137. Pierwszym z nich jest polimorfizm 303C>T w eksonie 3 genu, a tranzycja cytozyny na tyminę tworzy miejsce restrykcyjne dla endonukleazy *Bsr*I. W rezultacie powstały od jednego do trzech fragmentów uwidacznianych na żelach. W przypadku genotypu homozygotycznego *CC* nie występowało miejsce hydrolizy rozpoznawane przez endonukleazę i uwidocznił się jeden prążek długości 369 pz. W genotypie heterozygotycznym *CT* otrzymano trzy fragmenty o wielkości 369, 231 i 138 pz, natomiast w genotypie homozygotycznym zmutowanym *TT* uzyskano dwa prążki, o wielkości 231 i 138 pz (Ryc. 9).



Rycina 9. Przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów po reakcji hydrolizy enzymem *Bsr*I dla polimorfizmu rs2277698 genu *TIMP2*. M - marker wielkości 50 pz, tor 5 genotyp homozygotyczny niezmutowany *CC*, tory 2, 3, 4 genotyp heterozygotyczny *CT*, tor 1 genotyp homozygotyczny zmutowany *TT*.

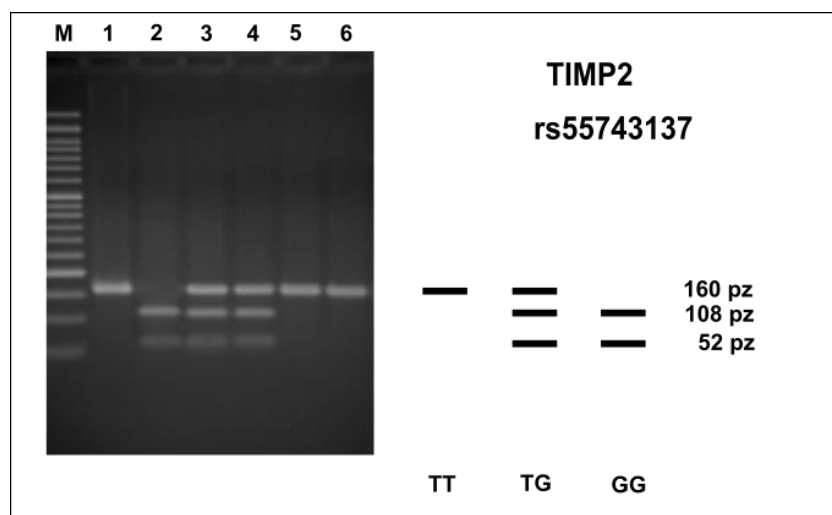
Uzyskane częstości występowania genotypów oraz alleli polimorfizmu 303C>T genu *TIMP2* przedstawiono w tabeli 15. Zaobserwowano częstsze występowanie genotypu *CC* w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną (85,8% vs. 76,7%), Genotypy zawierające zmutowany allel *T* częściej występowały w grupie kontrolnej i w modelu dominującym uzyskano OR=1,84, 95%PU=0,95-3,59, $p=0,0677$. Analizując częstość występowania alleli w badanych grupach stwierdzono różnicę statystycznie istotną. Obecność allela *T* zmniejsza prawie o połowę ryzyko występowania porodu przedwczesnego: OR=0,53, 95%PU=0,29-0,97, $p=0,0360$. Wartości oczekiwane i obserwowane poszczególnych genotypów były zgodne z założeniami prawa Hardy'ego-Weinberga (grupa kontrolna $p=0,221$, PTD $p=0,498$).

Tabela 15. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 303C>T genu *TIMP2* w grupie kobiet z PTD oraz w grupie kontrolnej.

<i>Model genetyczny</i>	<i>TIMP2 rs2277698</i>	<i>PTD n (%)</i>	<i>Kontrola n (%)</i>	<i>OR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
<i>kodominujący</i>	<i>CC</i>	103 (85,8)	92 (76,7)	1,00	-	0,1250
	<i>CT</i>	16 (13,3)	24 (20,0)	1,68	0,84-3,36	
	<i>TT</i>	1 (0,8)	4 (3,3)	4,48	0,49-40,79	
<i>dominujący</i>	<i>CC</i>	103 (85,8)	92 (76,7)	1,00	-	0,0677
	<i>CT+TT</i>	17 (14,2)	28 (23,3)	1,84	0,95-3,59	
<i>recesywny</i>	<i>CC+CT</i>	119 (99,2)	116 (96,7)	1,00	-	0,1609
	<i>TT</i>	1 (0,8)	4 (3,3)	4,10	0,45-37,22	
<i>allele</i>	<i>C</i>	222 (92,5)	208 (86,7)	1,00	-	0,0360
	<i>T</i>	18 (7,5)	32 (13,3)	0,53	0,29-0,97	

Allele: Chi² Pearson's p

Ostatnim z badanych w pracy był intronowy wariant rs55743137 genu *TIMP2*. Zamiana *T* na *G* powoduje miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny *AluI*. Na rycinie 10 pokazano przykładową analizę RFLP tego polimorfizmu. Genotyp *TT* nie podlegał hydrolizie, co w rezultacie dawało obraz jednego prążka o wielkości równej produktowi PCR - 160 par zasad, Dla genotypów *GG* otrzymano fragmenty o wielkości 108 i 52 pz, a dla genotypu heterozygotycznego *TG* trzy prążki odpowiadające fragmentom o wielkości 160, 108 i 52 pz.



Rycina 10. Przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów po reakcji hydrolizy enzymem *AluI* dla polimorfizmu rs55743137 genu *TIMP2*. M - marker wielkości 50 pz, tory 1, 5, 6 genotyp homozygotyczny niezmutowany *TT*, tory 3, 4 genotyp heterozygotyczny *TG*, tor 2 genotyp homozygotyczny zmutowany *GG*.

Analizy statystyczne, przeprowadzone na podstawie otrzymanych danych przedstawiono w tabeli 16. W zakresie tego polimorfizmu nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w częstości występowania genotypów pomiędzy grupami PTD i kontrolną. Allel *G* występował częściej w grupie kontrolnej (16,3 vs. 12,1% w grupie badanej, OR=0,71, 95%PU=0,42-1,19, $p=0,1920$). W teście sprawdzającym równowagę Hardy'ego-Weinberga uzyskano $p=0,678$ dla grupy badanej oraz $p=0,306$ dla kontrolnej.

Tabela 16. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs55743137 genu *TIMP2* w grupie kobiet z PTD oraz w grupie kontrolnej.

<i>Model genetyczny</i>	<i>TIMP2 rs55743137</i>	<i>PTD n (%)</i>	<i>Kontrola n (%)</i>	<i>OR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
<i>kodominujący</i>	<i>TT</i>	93 (77,5)	82 (68,3)	1,00	-	0,1855
	<i>TG</i>	25 (20,8)	37 (30,8)	1,68	0,93-3,02	
	<i>GG</i>	2 (1,7)	1 (0,8)	0,57	0,05-6,37	
<i>dominujący</i>	<i>TT</i>	93 (77,5)	82 (68,3)	1,00	-	0,1094
	<i>TG+GG</i>	27 (22,5)	38 (31,7)	1,60	0,9-2,84	
<i>recesywny</i>	<i>TT+TG</i>	118 (98,3)	119 (99,2)	1,00	-	0,5575
	<i>GG</i>	2 (1,7)	1 (0,8)	0,50	0,04-5,54	
<i>allele</i>	<i>T</i>	211 (87,9)	201 (83,7)	1,00	-	0,1920
	<i>G</i>	29 (12,1)	39 (16,3)	0,71	0,42-1,19	

Allele: Chi² Pearson's p

Kolejnym etapem pracy była ocena częstości występowania genotypów w grupach EPTD+VPTD oraz MPTD. W tabeli 17 przedstawiono wyniki uzyskane dla badanych wariantów genów metaloproteinaz: *MMP1* i *MMP9*. Najciekawsze rezultaty uzyskano analizując insercyjno-delecyjny wariant genu *MMP1*. W modelu dominującym odnotowano przewagę genotypów zawierających allel 2G w grupie kontrolnej w porównaniu z grupą EPTD+VPTD (OR=0,41, 95%PU=0,17-1,01, $p=0,0534$) oraz grupą MPTD (OR=0,66, 95%PU=0,38-1,16, $p=0,1506$). Obserwowane różnice w częstości występowania badanych wariantów genów *MMP1* i *MMP9* pomiędzy badanymi grupami nie były statystycznie istotne.

Częstość występowania analizowanych w pracy polimorfizmów genów *TIMP1* i *TIMP2* w grupach wyodrębnionych na podstawie tygodnia zakończenia ciąży zebrano w tabeli 18. Dla wariantów *372C>T* genu *TIMP1* oraz *303C>T* genu *TIMP2* nie odnotowano różnic statystycznie istotnych pomiędzy analizowanymi grupami pacjentek. Bardzo ciekawe wyniki uzyskano natomiast w zakresie intronowego polimorfizmu rs55743137. Genotyp *TT* w grupie EPTD+VPTD występował aż u 82,6% pacjentek, a w grupie MPTD u 76,3% i kontrolnej 68,3%. W modelu kodominującym różnice statystycznie istotne uzyskano porównując grupę kobiet rodzących skrajnie i bardzo przedwcześnie zarówno z grupą MPTD ($p=0,0160$) jak i kontrolną ($p=0,0118$). Różnice obserwowano również w modelu recesywnym (grupa EPTD+VPTD vs. MPTD $p=0,0354$, EPTD+VPTD vs. kontrola $p=0,0465$).

Tabela 17. Częstość występowania genotypów wariantów genów *MMP1* i *MMP9* po podziale kobiet ze względu na tydzień zakończenia ciąży.

<i>Genotyp/ Model genetyczny</i>	<i>Kontrola n=120 (%)</i>	<i>EPTD+ VPTD n=23 (%)</i>	<i>MPTD n=97 (%)</i>	<i>Kontrola vs. EPTD+VPTD</i>		<i>Kontrola vs. MPTD</i>		<i>MPTD vs. EPTD+VPTD</i>	
				<i>OR (95%PU)</i>	<i>p-value</i>	<i>OR (95%PU)</i>	<i>p-value</i>	<i>OR (95%PU)</i>	<i>p-value</i>
<i>MMP1rs179975</i>									
<i>1G/1G</i>	37 (30,8)	12 (52,2)	39 (40,2)	1,00	0,1518	1,00	0,3368	1,00	0,5460
<i>1G/2G</i>	58 (48,4)	8 (34,8)	39 (40,2)	0,43 (0,16-1,14)		0,64 (0,35-1,17)		0,67 (0,25-1,81)	
<i>2G/2G</i>	25 (20,8)	3 (13,0)	19 (19,6)	0,37 (0,09-1,45)		0,72 (0,34-1,52)		0,51 (0,13-2,04)	
<i>1G/2G-2G/2G</i>	83 (69,2)	11 (47,8)	58 (59,8)	0,41 (0,17-1,01)	0,0534	0,66 (0,38-1,16)	0,1506	0,62 (0,25-1,54)	0,2989
<i>1G/1G-1G/2G</i>	95 (79,2)	20 (87,0)	78 (80,4)	0,57 (0,16-2,07)	0,3692	0,93 (0,47-1,80)	0,8203	0,62 (0,17-2,29)	0,4510
<i>MMP9rs17576</i>									
<i>AA</i>	53 (44,2)	9 (39,1)	46 (47,4)	1,00	0,8868	1,00	0,8533	1,00	0,7713
<i>AG</i>	51 (42,5)	11 (47,8)	40 (41,2)	1,27 (0,49-3,32)		0,90 (0,51-1,60)		1,41 (0,53-3,74)	
<i>GG</i>	16 (13,3)	3 (13,0)	11 (11,3)	1,10 (0,27-4,57)		0,79 (0,33-1,88)		1,39 (0,32-6,02)	
<i>AG-GG</i>	67 (55,8)	14 (60,9)	51 (52,6)	1,23 (0,49-3,06)	0,6541	0,88 (0,51-1,50)	0,6321	1,40 (0,56-3,55)	0,4712
<i>AA-AG</i>	104 (86,7)	20 (87,0)	86 (88,7)	0,98 (0,26-3,66)	0,9700	0,83 (0,37-1,89)	0,6574	1,17 (0,30-4,60)	0,8212
<i>MMP9rs17577</i>									
<i>GG</i>	91 (75,8)	17 (73,9)	66 (68,0)	1,00	0,8742	1,00	0,4236	1,00	0,9148
<i>GA</i>	26 (21,7)	6 (26,1)	27 (27,8)	1,24 (0,44-3,45)		1,43 (0,77-2,67)		0,86 (0,31-2,42)	
<i>AA</i>	3 (2,5)	0 (0,0)	4 (4,1)	—		1,84 (0,40-8,49)		—	
<i>GA-AA</i>	29 (24,2)	6 (26,1)	31 (32,0)	1,11 (0,40-3,07)	0,8453	1,47 (0,81-2,68)	0,2028	0,75 (0,27-2,09)	0,5790
<i>GG-GA</i>	117 (97,5)	23 (100,0)	93 (95,9)	—	1,0000	1,68 (0,37-7,68)	0,5024	—	1,0000

Tabela 18. Częstość występowania genotypów wariantów genów *TIMP1* i *TIMP2* po podziale kobiet ze względu na tydzień zakończenia ciąży.

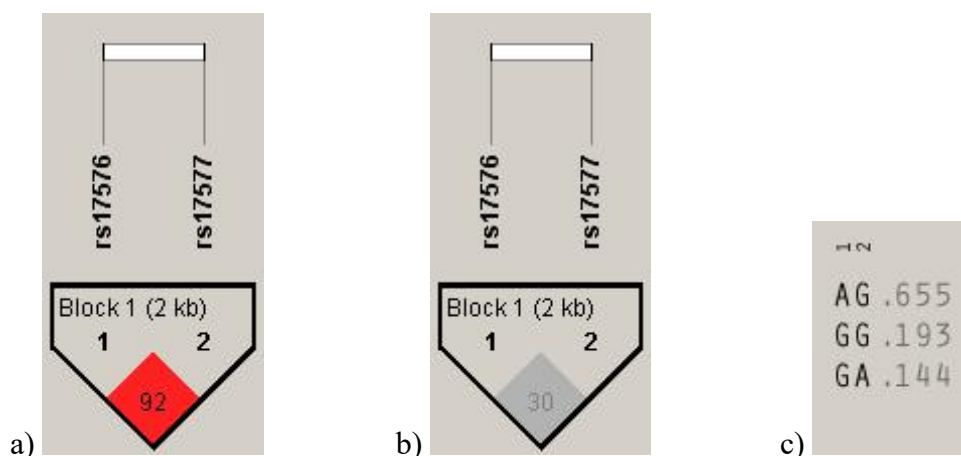
<i>Genotyp/ Model genetyczny</i>	<i>Kontrola n=120 (%)</i>	<i>EPTD+ VPTD n=23 (%)</i>	<i>MPTD n=97 (%)</i>	<i>Kontrola vs. EPTD+VPTD</i>		<i>Kontrola vs. MPTD</i>		<i>MPTD vs. EPTD+VPTD</i>	
				<i>OR (95%PU)</i>	<i>p-value</i>	<i>OR (95%PU)</i>	<i>p-value</i>	<i>OR (95%PU)</i>	<i>p-value</i>
<i>TIMP1rs4898</i>									
<i>CC</i>	27 (22,5)	8 (34,8)	21 (21,6)	1,00	0,3833	1,00	0,6742	1,00	0,2353
<i>TC</i>	67 (55,8)	12 (52,2)	50 (51,5)	0,60 (0,22-1,64)		0,96 (0,49-1,89)		0,63 (0,23-1,76)	
<i>TT</i>	26 (21,7)	3 (13,0)	26 (26,8)	0,39 (0,09-1,63)		1,29 (0,58-2,83)		0,30 (0,07-1,29)	
<i>TC-TT</i>	93 (77,5)	15 (65,2)	76 (78,4)	0,54 (0,21-1,42)	0,2239	1,05 (0,55-2,00)	0,8806	0,52 (0,19-1,39)	0,1995
<i>CC-TC</i>	94 (78,3)	20 (87,0)	71 (73,2)	0,54 (0,15-1,97)	0,3252	1,32 (0,71-2,47)	0,3789	0,41 (0,11-1,49)	0,1440
<i>TIMP2rs2277698</i>									
<i>CC</i>	92 (76,7)	20 (87,0)	83 (85,6)	1,00	0,3807	1,00	0,1167	1,00	0,2065
<i>CT</i>	24 (20,0)	2 (8,7)	14 (14,4)	0,38 (0,08-1,76)		0,65 (0,31-1,33)		0,59 (0,12-2,82)	
<i>TT</i>	4 (3,3)	1 (4,3)	0 (0,0)	1,15 (0,12-10,85)		—		—	
<i>CT-TT</i>	92 (76,7)	20 (87,0)	83 (85,6)	0,49 (0,14-1,78)	0,2496	0,55 (0,27-1,12)	0,0956	0,89 (0,23-3,39)	0,8624
<i>CC-CT</i>	116 (96,7)	22 (95,7)	97 (100,0)	1,32 (0,14-12,36)	0,8137	—	0,1300	—	0,1917
<i>TIMP2rs55743137</i>									
<i>TT</i>	82 (68,3)	19 (82,6)	74 (76,3)	1,00	0,0118	1,00	0,3184	1,00	0,0160
<i>TG</i>	37 (30,8)	2 (8,7)	23 (23,7)	0,23 (0,05-1,05)		0,69 (0,38-1,27)		0,34 (0,07-1,56)	
<i>GG</i>	1 (0,8)	2 (8,7)	0 (0,0)	8,63 (0,74-100,20)		—		—	
<i>TG-GG</i>	38 (31,7)	4 (17,4)	23 (23,7)	0,45 (0,14-1,43)	0,1510	0,67 (0,37-1,23)	0,1930	0,68 (0,21-2,19)	0,5042
<i>TT-TG</i>	119 (99,2)	21 (91,3)	97 (100,0)	11,33 (0,98-130,66)	0,0465	—	1,0000	—	0,0354

4.3. Analiza nierównowagi sprzężeń i częstości występowania haplotypów analizowanych wariantów genów *MMP9* oraz *TIMP2*

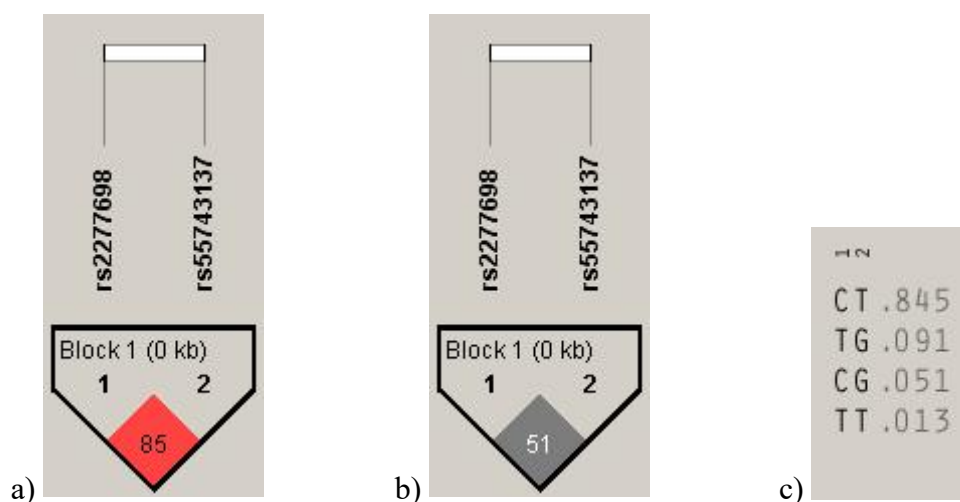
Analizę nierównowagi sprzężeń (LD) pomiędzy SNP i częstości występowania haplotypów badanych polimorfizmów genów *MMP9* i *TIMP2* przeprowadzono wykorzystując program Haploview 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>). Wykazano wysokie wartości D' i logarytm szans (LOD – *logarithm of the odds*) oraz współczynnika korelacji r^2 dla analizowanych wariantów obu omawianych genów *MMP9* i *TIMP2*, co wskazuje, że są one w nierównowadze sprzężeń (oba wskaźniki $D' > 0,8$). Warianty rs17576 i rs17577 genu *MMP9* oddalone są od siebie o 2886 par zasad, natomiast rs2277698 i rs55743137 genu *TIMP2* dzieli tylko 168 par zasad. Szczegółowe wyniki analizy nierównowagi sprzężeń w całej badanej grupie 240 kobiet przedstawiono w tabeli 19 i na rycinach 11 i 12.

Tabela 19. Odległości oraz siła nierównowagi sprzężeń pomiędzy analizowanymi wariantami genów *MMP9* i *TIMP2*

SNP	Odległość	D' Lewontina	95%PU	r^2	LOD
rs17576/rs17577	2886 pz	0,924	0,81 – 0,98	0,301	20,4
rs2277698/rs55743137	168 pz	0.852	0.74 - 0.93	0.512	25.28



Rycina 11. Wyniki analizy nierównowagi sprzężeń pomiędzy polimorfizmami rs17576 i rs17577 genu *MMP9* a) wskaźnik D' Lewontine'a wyrażony w procentach, b) wartość współczynnika korelacji r^2 wyrażona w procentach, c) częstość występowania haplotypów.



Rycina 12. Wyniki analizy nierównowagi sprzężeń pomiędzy polimorfizmami rs2277698 i rs5574313 genu *TIMP2* a) wskaźnik D' Lewontine'a wyrażony w procentach, b) wartość współczynnika korelacji r^2 wyrażona w procentach, c) częstość występowania haplotypów.

Porównując częstości występowania haplotypów genu *MMP9* w grupach badanej i kontrolnej nie wykazano ich związku z ryzykiem występowania porodu przedwczesnego (Tab. 20). Najczęściej w obu grupach występował haplotyp utworzony z allele A polimorfizmu rs17576 oraz allele G polimorfizmu rs17577. Haplotyp GG był częściej spotykany w grupie kontrolnej (21,3% vs. 16,6%, $p=0,164$) natomiast haplotyp zawierający oba zmutowane allele GA występował nieznacznie częściej w grupie badanej (16,2% vs. 12,9%, $p=0,303$).

Tabela 20. Częstość występowania haplotypów genu *MMP9* w grupie badanej i kontrolnej.

Haplotype	PTD (freq)	Kontrola (freq)	OR (95% PU)	χ^2	<i>p</i>
AG	159 (0,662)	156 (0,650)	1,056 (0,73 – 1,54)	0,083	0,773
GG	40 (0,166)	52 (0,216)	0,723 (0,46 – 1,14)	1,936	0,164
GA	39 (0,162)	31 (0,129)	1,308 (0,79 – 2,18)	1,063	0,303

Pearson's *p*

Częstości występowania haplotypów genu *TIMP2* w grupach badanej i kontrolnej przedstawiono w tabeli 21. Stwierdzono istotną różnicę w rozkładzie częstości haplotypu CT, zawierającego oba niezmutowane allele, który występował częściej w grupie pacjentek z PTD (87,9% vs. 81,2% w grupie kontrolnej, $p=0,043$, $p_{\text{corr}}=0,088$).

Tabela 21. Częstość występowania haplotypów genu *TIMP2* w grupie badanej i kontrolnej.

<i>Haplotyp</i>	<i>PTD (freq)</i>	<i>Kontrola (freq)</i>	<i>OR (95% PU)</i>	χ^2	<i>p</i>
CT	211 (0,879)	195 (0,812)	1,679 (1,01 - 2,78)	4,09	0,043
TG	18 (0,075)	26 (0,108)	0,667 (0,36 - 1,25)	1,601	0,205
CG	11 (0,045)	13 (0,054)	0,838 (0,37 - 1,91)	0,175	0,675

Pearson's p

4.4. Związek częstości współwystępowania genotypów badanych wariantów genetycznych z porodem przedwczesnym

Za występowanie porodu przedwczesnego odpowiadają czynniki środowiskowe oraz genetyczne, a jego patogeneza ma charakter poligenowy. Efekty niektórych SNP mogą być niezauważane, gdy są badane pojedynczo, w związku z tym w następnym etapie pracy analizowano w modelu kodominującym wzajemne interakcje pomiędzy wariantami genów, aby zidentyfikować ich możliwy wspólny wpływ na PTD. Do obliczeń zastosowano pakiet „SNPassoc” z oprogramowania R, który wykorzystuje test największej wiarygodności (LRT - *likelihood-ratio test*).

Tabela 22. Interakcje pomiędzy badanymi wariantami genów *MMPs* i *TIMPs*.

<i>SNP 1</i>	<i>SNP 2</i>	<i>p</i>
<i>MMP1</i> rs1799750	<i>MMP9</i> rs17576	0,7551
<i>MMP1</i> rs1799750	<i>MMP9</i> rs17577	0,7737
<i>MMP1</i> rs1799750	<i>TIMP1</i> rs4898	0,9201
<i>MMP1</i> rs1799750	<i>TIMP2</i> rs2277698	0,2501
<i>MMP1</i> rs1799750	<i>TIMP2</i> rs55743137	0,2054
<i>MMP9</i> rs17576	<i>MMP9</i> rs17577	0,5804
<i>MMP9</i> rs17576	<i>TIMP1</i> rs4898	0,0235
<i>MMP9</i> rs17576	<i>TIMP2</i> rs2277698	0,1864
<i>MMP9</i> rs17576	<i>TIMP2</i> rs55743137	0,2719
<i>MMP9</i> rs17577	<i>TIMP1</i> rs4898	0,0990
<i>MMP9</i> rs17578	<i>TIMP2</i> rs2277698	0,4853
<i>MMP9</i> rs17579	<i>TIMP2</i> rs55743137	0,4348
<i>TIMP1</i> rs4898	<i>TIMP2</i> rs2277698	0,3456
<i>TIMP1</i> rs4898	<i>TIMP2</i> rs55743137	0,6207
<i>TIMP2</i> rs2277698	<i>TIMP2</i> rs55743137	0,0815

Największe różnice w częstości współwystępowania genotypów pomiędzy grupą badaną i kontrolną zaobserwowano pomiędzy rs2277698 i rs55743137 genu *TIMP2* ($p=0,0815$) oraz *TIMP1* rs4898 i polimorfizmami genu *MMP9* ($p=0,0990$ z rs17577, oraz $p=0,0235$ z wariantem rs17576). W przeprowadzonej wcześniej analizie haplotypów wykazano, że warianty genów *MMP9* i *TIMP2* są w nierównowadze sprzężeń, dlatego szczegółowej analizie poddano jedyną statystycznie istotną interakcję pomiędzy *TIMP1* rs4898 i *MMP9* rs17576 (Tab. 23). Ryzyko urodzenia przedwcześnie wzrasta ponad dwukrotnie u pacjentek z genotypami *AG/CC* (13,3 vs. 7,5%, OR=2,22, 95%PU=0,73-6,78, $p=0,177$) i *AA/TT* (11,7 vs. 5,8%, OR=2,50, 95%PU=0,77-8,16, $p=0,153$) i ponad sześciokrotnie gdy oba omawiane warianty genów *MMP9* i *TIMP1* zawierają zmutowane allele: *GG/TT* (4,2 vs. 0,8%, OR=6,25, 95%PU=0,64-60,94, $p=0,175$) w porównaniu do współwystępowania genotypów *AA/CC*.

Tabela 23. Częstość współwystępowania genotypów polimorfizmów rs4898 *TIMP1* i rs17576 *MMP9* w grupach PTD i kontrolnej.

Grupa	<i>TIMP1</i> rs4898	<i>MMP9</i> rs17576			Suma
	genotyp	<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	
<i>PTD</i>	<i>CC</i>	12 (10,0%)	16 (13,3%)	1 (0,8%)	29 (24,2%)
	<i>CT</i>	29 (24,2%)	25 (20,8%)	8 (6,7%)	62 (51,7%)
	<i>TT</i>	14 (11,7%)	10 (8,3%)	5 (4,2%)	29 (24,2%)
	<i>Suma</i>	55 (45,8%)	51 (42,5%)	14 (11,7%)	120 (100,0%)
<i>Kontrolna</i>	<i>CC</i>	15 (12,5%)	9 (7,5%)	3 (2,5%)	27 (22,5%)
	<i>CT</i>	31 (25,8%)	24 (20,0%)	12 (10,0%)	67 (55,8%)
	<i>TT</i>	7 (5,8%)	18 (15,0%)	1 (0,8%)	26 (21,7%)
	<i>Suma</i>	53 (44,2%)	51 (42,5%)	16 (13,3%)	120 (100,0%)

4.5. Asocjacja danych klinicznych matek i ich noworodków z badanymi wariantami polimorficznymi

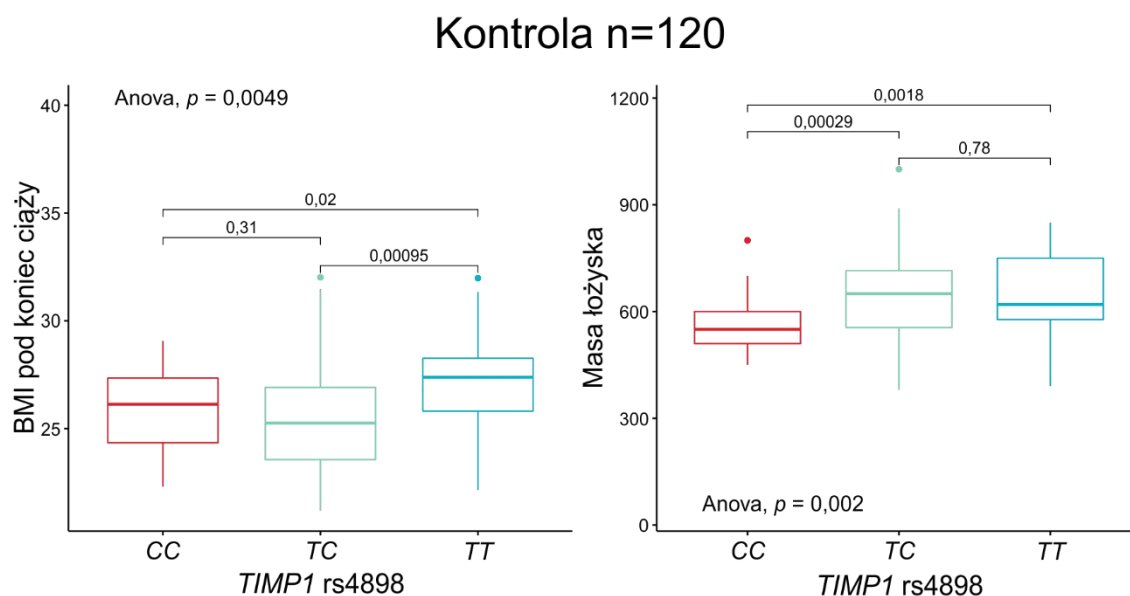
W kolejnym etapie pracy analizowano związek badanych wariantów polimorficznych genów *MMP1*, *MMP9*, *TIMP1* i *TIMP2* z danymi klinicznymi matek oraz ich noworodków. W tabeli 24 przedstawiono wartości p obliczone podczas asocjacji genotypów z parametrami klinicznymi w całej badanej grupie 240 kobiet dla trzech modeli genetycznych: kodominującego, dominującego i recesywnego. Zaobserwowano w całej grupie pacjentek ($n=240$) związek rs4898 genu *TIMP1* z

wartością wskaźnika BMI przed ciążą (model kodominujący $p=0,0396$), BMI pod koniec ciąży (model kodominujący $p=0,0041$, oraz recesywny $p=0,0018$) oraz masą łożyska w modelu kodominującym ($p=0,0011$) i dominującym ($p=0,0003$). Warianty rs17576 *MMP9* i *TIMP2* rs55743137 związane były z masą łożyska w modelu kodominującym ($p=0,0353$ i $p=0,0485$) i recesywnym ($p=0,0128$ i $p=0,0194$). Wariant rs22743137 wykazywał również w modelach kodominujących i recesywnych asocjację z masą noworodka ($p=0,0129$ i $p=0,0087$) oraz tygodniem zakończenia ciąży ($p=0,0141$ i $p=0,0222$).

Tabela 24. Asocjacje badanych wariantów polimorficznych z danymi klinicznymi matek i ich noworodków w całej badanej grupie kobiet (n=240)

<i>SNP</i>	<i>MMP1</i> rs1799750	<i>MMP9</i> rs17576	<i>MMP9</i> rs17577	<i>TIMP1</i> rs4898	<i>TIMP2</i> rs2277698	<i>TIMP2</i> rs55743137
<i>RR skurczowe</i>						
model kodominujący	0,3551	0,1201	0,2330	0,3180	0,7710	0,2303
model dominujący	0,1587	0,0578	0,1166	0,1298	0,6013	0,9578
model recesywny	0,8001	0,9174	0,8379	0,6777	0,7522	0,0939
<i>RR rozkurczowe</i>						
model kodominujący	0,7357	0,4637	0,1218	0,3878	0,3539	0,4069
model dominujący	0,4832	0,4154	0,1103	0,1741	0,4534	0,6511
model recesywny	0,5562	0,5485	0,4334	0,5330	0,3449	0,1850
<i>BMI przed ciążą</i>						
model kodominujący	0,8820	0,7660	0,3655	0,0396	0,1245	0,4344
model dominujący	0,6539	0,4728	0,7426	0,2316	0,1240	0,1962
model recesywny	0,7064	0,7080	0,1561	0,0767	0,4191	0,7932
<i>BMI pod koniec ciąży</i>						
model kodominujący	0,8219	0,5757	0,7045	0,0041	0,0743	0,5435
model dominujący	0,5322	0,5805	0,5678	0,9157	0,0850	0,2731
model recesywny	0,7761	0,3030	0,4540	0,0018	0,3710	0,7317
<i>Tydzień zakończenia ciąży</i>						
model kodominujący	0,3047	0,9391	0,7168	0,8144	0,6215	0,0141
model dominujący	0,1245	0,7521	0,9463	0,8139	0,3289	0,1781
model recesywny	0,6620	0,9649	0,4459	0,6184	0,7556	0,0222
<i>Masa noworodka</i>						
model kodominujący	0,3687	0,4212	0,6978	0,4697	0,8217	0,0129
model dominujący	0,1939	0,2280	0,6688	0,2252	0,5400	0,4059
model recesywny	0,3156	0,3640	0,5599	0,8681	0,9534	0,0087
<i>Masa łożyska</i>						
model kodominujący	0,3336	0,0353	0,7829	0,0011	0,6881	0,0485
model dominujący	0,4324	0,1383	0,5828	0,0003	0,7686	0,7729
model recesywny	0,1449	0,0128	0,7853	0,1282	0,5004	0,0194

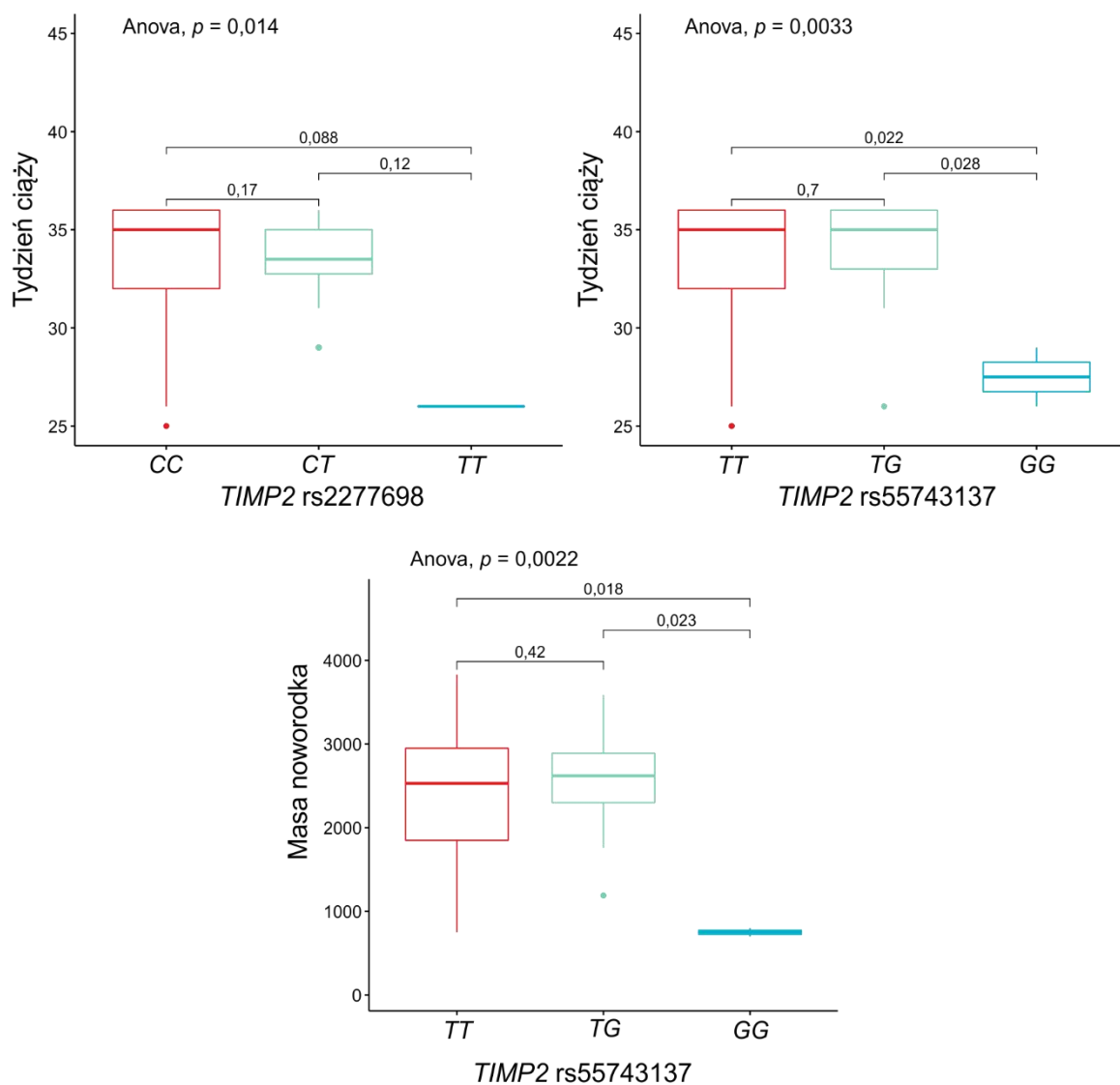
Następnie sprawdzono czy asocjacje te występują w obu badanych grupach kobiet PTD i kontrolnej. W grupie kontrolnej wariant *TIMP1* rs4898 wykazywał związek ze wskaźnikiem BMI pod koniec ciąży (model kodominujący $p=0,0049$ oraz recesywny $p=0,0013$) oraz masą łożyska (model kodominujący $p=0,0020$ oraz dominujący $p=0,0004$) (Ryc. 13).



Ryc. 13. Asocjacje polimorfizmów rs4898 *TIMP2* z danymi klinicznymi.

W grupie kobiet z porodem przedwczesnym zaobserwowano asocjację obu badanych SNP genu *TIMP2* z tygodniem zakończenia ciąży w modelu kodominującym (dla rs2277698 $p=0,0136$, a dla rs55743137 $p=0,0033$) i recesywnym (rs2277698 $p=0,0038$, rs55743137 $p=0,0009$) oraz masą noworodka w modelu kodominującym (rs2277698 $p=0,0576$, rs55743137 $p=0,0022$) i recesywnym (rs2277698 $p=0,0167$, rs55743137 $p=0,0008$) (Ryc. 14).

PTD n=120



Ryc. 14. Asocjacje polimorfizmów rs2277698 i rs55743137 genu *TIMP2* z danymi klinicznymi.

5. DYSKUSJA

5.1. Częstość występowania na świecie analizowanych w pracy wariantów genetycznych

Uzyskane w badaniach laboratoryjnych częstości występowania wariantów genetycznych metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej i ich tkankowych inhibitorów porównywano z częstościami występowania tych polimorfizmów w innych populacjach europejskich i światowych. Wykorzystywano do tego bazę danych „1000Genomes Project” (www.internationalgenome.org). Ten międzynarodowy projekt stworzył katalog ludzkich polimorfizmów genetycznych, wykorzystując próbki od zdrowych osób z 26 populacji, które następnie zostały zakwalifikowane do 5 super populacji oznaczonych trzyliterowym kodem: AFR (afrykańska), AMR (amerykańska), EAS (wschodnioazjatycka), EUR (europejska) oraz SAS (południowoazjatycka). Super populacja europejska składa się z pięciu populacji: CEU (mieszkańcy Utah w Stanach Zjednoczonych, których przodkowie pochodzą z Północnej oraz Zachodniej Europy), GBR (Brytyjczycy, mieszkańcy Anglii i Szkocji), TSI (Włosi, zamieszkujący Toskanię), FIN (mieszkańcy Finlandii), IBS (populacja iberyjska w Hiszpanii) (Ryc. 15).



Ryc. 15. Mapa populacji europejskich włączonych do fazy 3 Projektu 1000Genomes. LDlink (<http://analysistools.nci.nih.gov/LDlink>)

Procentowy rozkład częstości występowania alleli badanych w pracy wariantów genetycznych metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej i ich tkankowych

inhibitorów w populacjach uzyskane w trzeciej fazie Projektu 1000 Genomów oraz w grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych w prezentowanej pracy przedstawia tabela 25.

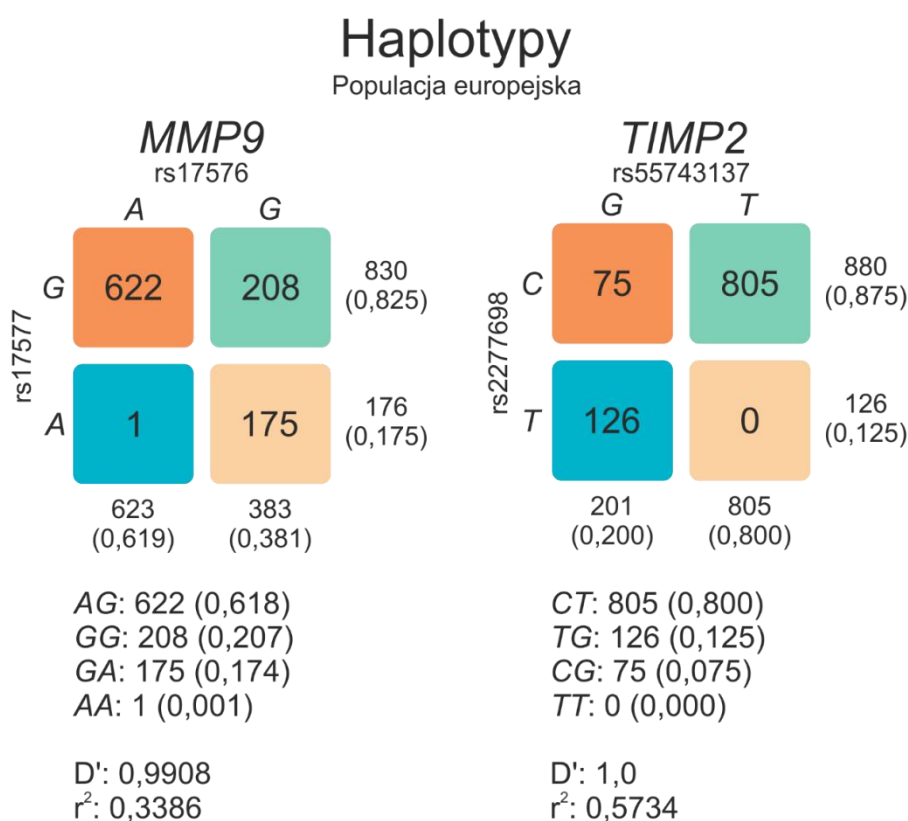
Insercja guaniny w pozycji -1607 promotora genu *MMP1* najczęściej występuje w populacjach Azji Wschodniej (67%), a najrzadziej w afrykańskich (48%). W Europie częstość występowania insercyjnego allele 2G wynosi od 43 do 62%. W grupie kontrolnej prezentowanej pracy allele 2G występował u 45% kobiet, a w innych pracach przeprowadzonych w Polsce u 58% [Sakowicz i wsp., 2018] oraz u 46% pacjentek z grupy kontrolnej [Skorupski i wsp., 2010]. Zmutowane allele genu *MMP9* G (rs17576) oraz A (rs17577) występują średnio u 38% oraz 17% mieszkańców Europy. W badaniach przeprowadzonych w toku omawianej pracy allele G (rs17576) występował u 33% w grupie kobiet z porodem przedwczesnym i 35% w grupie kontrolnej, a allele A (rs17577) u 17% w grupie PTD i 13% w kontrolnej. Polimorfizmy te w populacji polskiej analizowane były również w 2017 roku przez badaczy ze Szczecina. W grupie kontrolnej 421 zdrowych mężczyzn (średnia wieku 34,3±8,4) allele G (rs17576) występował u 38%, a allele A (rs17577) u 18% badanych [Kurzawski i wsp., 2017]. Allele C (rs4898) w exonie 5 genu *TIMP1* występuje w populacjach europejskich u 38% - 53% osób, a w analizowanej w pracy grupie kontrolnej występował u połowy badanych (50%). U 120 pacjentów Kliniki Gastroenterologii i Chorób Wewnętrznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego zakwalifikowanych do grupy kontrolnej częstość występowania alleli tego wariantu *TIMP1* wynosiła: 53% allele T i 47% allele C [Nehring i wsp., 2021]. Rzadziej występujące allele wariantów genu *TIMP2*: T (rs2277698) i G (rs55431370) występują dwukrotnie częściej w populacjach azjatyckich w porównaniu do europejskich, w których średnio występują odpowiednio u 13% i 20%. W Polsce, w cytowanej już poprzednio pracy Kurzawskiego i wsp., badano wariant rs2277698 i allele T stwierdzono u 11% zdrowych mężczyzn, natomiast w prezentowanej populacji u 13% zdrowych kobiet. Allele G wariantu rs55431370 genu *TIMP2* w populacjach europejskich wg 3 fazy Projektu 1000 Genomów występuje u 18-25% badanych. Lathouras i wsp. w retrospektywnym badaniu analizowali częstość występowania tego wariantu *TIMP2* u pacjentek szpitala w greckim mieście Saloniki. Badanie przeprowadzono w grupach badawczej 66 ciężarnych w 24–37 tygodniu ciąży, wykazujących klasyczne objawy zagrażającego porodu przedwczesnego i kontrolnej 66 zdrowych ciężarnych w 24–37 tygodniu ciąży. Uzyskane przez nich wyniki były porównywalne do prezentowanych w pracy, allele G występował u 17% zdrowych greczynek i u 16% kobiet z Polski [Lathouras i wsp., 2018].

Tabela 25. Geograficzny rozkład częstości występowania alleli (wyrażony procentowo) badanych w pracy polimorfizmów metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej i ich tkankowych inhibitorów w populacjach wg 3 fazy Projektu 1000 Genomów oraz grupy kontrolnej z prezentowanej pracy.

<i>Wariant/ allele</i>	<i>Populacje światowe</i>						<i>Populacje europejskie</i>					<i>Grupa kontrolna</i>
	<i>ALL</i>	<i>AFR</i>	<i>AMR</i>	<i>EAS</i>	<i>EUR</i>	<i>SAS</i>	<i>CEU</i>	<i>FIN</i>	<i>GBR</i>	<i>IBS</i>	<i>TSI</i>	
rs1799750												
<i>IG</i>	44	52	38	33	50	41	57	38	54	48	52	55
<i>2G</i>	56	48	62	67	50	59	43	62	46	52	48	45
rs17576												
<i>A</i>	54	66	77	26	62	45	65	56	68	61	61	65
<i>G</i>	46	34	23	74	38	55	35	44	32	39	39	35
rs17577												
<i>G</i>	81	84	92	84	83	65	82	78	85	83	84	87
<i>A</i>	19	16	8	16	17	35	18	22	15	17	16	13
rs4898												
<i>T</i>	53	52	58	54	54	50	48	52	62	60	47	50
<i>C</i>	47	48	42	46	46	50	52	48	38	40	53	50
rs2277698												
<i>C</i>	83	90	88	74	87	76	85	89	88	88	87	87
<i>T</i>	17	20	12	26	13	24	15	11	12	12	13	13
rs55743137												
<i>T</i>	65	65	79	53	80	49	75	82	82	81	80	84
<i>G</i>	35	35	21	47	20	51	25	18	18	19	20	16

W pracy oceniano również częstość występowania haplotypów genów *MMP9* i *TIMP2*. Wykorzystując oprogramowanie LDlink (<http://analysistools.nci.nih.gov/LDlink>) oszacowano częstość występowania haplotypów i nierównowagę sprzężeń w grupie 1006 osób z populacji europejskich fazy 3 Projektu 1000Genomes i przedstawiono na rycinie 16.

Nierównowaga sprzężeń w całej badanej grupie 240 Polskich kobiet dla obu genów ($D'=0,92$; $r^2=0,30$ dla *MMP9* i $D'=0,85$; $r^2=0,51$ dla *TIMP2*) była podobna do uzyskanej dla populacji europejskiej $D'=0,99$; $r^2=0,34$ dla *MMP9* i $D'=1,00$; $r^2=0,57$ dla *TIMP2*. Dvornyk i wsp. w badaniu analizującym związek funkcjonalnie istotnych polimorfizmów genów *MMP* z rozwojem wrzodów żołądka u rasy kaukaskiej z centralnej Rosji w grupie kontrolnej 347 osób pomiędzy wariantami rs17576/ rs17577 uzyskali wartości $D'=0,91$ i $r^2=0,30$ [Dvornyk i wsp., 2021].



Ryc. 16. Szacunkowa częstość występowania haplotypów badanych w pracy wariantów genów *MMP9* i *TIMP2* w populacjach europejskich fazy 3 Projektu 1000Genomes. Wartości zostały wygenerowane przez oprogramowanie LDlink

Częstość występowania poszczególnych haplotypów uzyskanych w toku pracy dla grupy kontrolnej również jest porównywalna z populacją 1006 Europejczyków.

Najczęstszy haplotyp genu *MMP9* (rs17576/ rs17577) w obu populacjach to *AG* występujący u 61,8% (Europa) i 65,0% badanych w pracy osób. Haplotypy *GG* i *GA* stwierdzono u 21,6% i 12,9% badanych kobiet z wielkopolski i 20,7% i 17,4% mieszkańców Europy. W grupie kontrolnej zdrowych mężczyzn z Polski częstości występowania haplotypów rs17576/ rs17577 genu *MMP9* oszacowano następująco: *AG* – 61,8%, *GG* – 20,5% i *GA* – 17,7% [Kurzawski i wsp., 2017]. Częstość haplotypów genu *TIMP2* (rs2277698/rs55743137) w grupie kontrolnej omawianej pracy przedstawiała się następująco: *CT* – 81,2%, *TG* – 10,8% i *CG* – 5,4% , natomiast częstości oszacowane dla mieszkańców Europy to: *CT* – 80,0%, *TG* – 12,5% i *CG* – 7,5%.

5.2. Związek metaloproteinaz i ich inhibitorów tkankowych z porodem przedwczesnym

Badania naukowe wskazują, iż około 1/3 porodów przedwczesnych spowodowana jest przedwczesnym pęknięciem błon płodowych. Spośród wszystkich ciąż, powikłanie to występuje z częstością 0,4-0,7% przed 28 tc. co skutkuje wystąpieniem skrajnego wcześniactwa [Tchirikov i wsp., 2018]. Pęcherz płodowy będący barierą mechaniczną oddzielającą płód od środowiska zewnętrznego, zbudowany jest z 5 warstw, z czego głównymi budulcami odpowiadającymi za wytrzymałość błon są kolagen typu I oraz kolagen typu III [Strauss i wsp., 2013, Lannon i wsp., 2014]. Taka budowa błon, zapewnia ich wytrzymałość oraz odporność mechaniczną. Z drugiej strony dzięki takiej budowie oraz obecności enzymów macierzy zewnątrzkomórkowej - metaloproteinaz, możliwa jest przebudowa tkanki łącznej w trakcie ciąży, porodu i połogu. Brak równowagi w działaniu enzymów macierzy zewnątrzkomórkowej prowadzi do zaburzenia procesów fizjologicznych prowadzących do porodu i tym samym do przedwczesnego zakończenia ciąży.

Budowa szyjki macicy oraz jej dojrzewanie ma równie istotne znaczenie w utrzymaniu ciąży. Przedwczesne rozwieranie szyjki macicy może być przyczyną 12% porodów przedwczesnych [Timmons i wsp., 2010]. Zaobserwowano nasilenie procesu degradacji kolagenu oraz wzrost aktywności MMPs podczas dojrzewania szyjki macicy [Stygar i wsp., 2002]. Procesy te wydają się również być odpowiedzialne za przedwczesne zmiany w szyjce prowadzące do porodu przed 37 tc. Prowadzono badania porównujące zmiany w budowie histologicznej szyjki macicy u kobiet. W jednym z nich pobrano próbki z szyjki macicy od ciężarnych oraz kobiet niebędących w ciąży,

wykazując, iż stężenia kolagenu, kwasu hialuronowego oraz glikozaminoglikanów zmniejszają się, a aktywność kolagenaz zwiększa się wraz z czasem trwania ciąży. Zaobserwowano także wydłużony czas trwania I okresu porodu u kobiet z wysokim stężeniem kolagenu w próbkach pobranych z szyjki macicy [Uldbjerg i wsp., 1983]. U pacjentek nieciężarnych z wywiadem obciążonym niewydolnością szyjki macicy, skutkującym urodzeniem dziecka przed 28 tc. zaobserwowano istotnie mniejsze stężenia kolagenu w szyjce macicy w porównaniu do kobiet bez obciążonego wywiadu położniczego [Vink i wsp., 2015].

W etiologii porodu przedwczesnego od lat uznaje się udział metaloproteinaz. Mają one właściwości degradujące elementy macierzy zewnątrzkomórkowej, przede wszystkim kolagen, co wpływa na destabilizację błon płodowych oraz szyjki macicy. MMP1 szczególnie efektywnie rozkłada kolagen typu III, natomiast MMP2 oraz MMP9 kolagen typu V, który jest odporny na działanie większości kolagenaz [Strauss i wsp., 2013].

Draper i wsp. już w 1995 r. opublikowali pracę ukazującą aktywność proteaz w błonach płodowych, tym samym zaznaczając ich dużą rolę w patogenezie PPRM. Badano błony płodowe 14 ciężarnych z PPRM, 6 pacjentek z porodem przedwczesnym bez współistniejącego PPRM oraz 3 pacjentki rodzące o czasie. Praca wykazała 10 do 40 razy wyższą aktywność proteolityczną w przypadku PPRM, szczególnie metaloproteinaz. Podczas badań uzyskano białka o masie cząsteczkowej podobnej do żelatynaz oraz stromielizyn [Draper i wsp., 1995]. W kolejnych pracach naukowych, sukcesywnie udowodniano związek działania MMPs z występowaniem porodu przedwczesnego.

MMP1 katalizuje pierwsze etapy rozkładu kolagenu fibrylarnego. W badaniach została potwierdzona jej funkcja w przedwczesnym pęknięciu pęcherza płodowego. Maymon i wsp. w 2000 r. przeprowadzili badanie w grupie 353 kobiet, dzieląc je na kilka podgrup w zależności od braku lub obecności odpływania płynu owodniowego, terminowego lub przedwczesnego ukończenia ciąży oraz obecności lub braku współistniejącej infekcji. Infekcję wewnątrzrodniową rozpoznawano pobierając próbkę płynu owodniowego do badań bakteriologicznych. W każdej grupie mierzono również stężenia MMP1 w płynie owodniowym. Okazało się, iż MMP1 wykryto w ponad 80% próbek pobranych od pacjentek z zakażeniem wewnątrzrodniowym, a stężenie MMP1 było tym wyższe im bardziej zaawansowana była ciąża. Infekcja korelowała ze wzrostem stężenia MMP1 zarówno w ciążach z PPRM oraz tych z

zachowanymi błonami. MMP1 została uznana jako stały składnik płynu owodniowego, którego stężenia wzrastają w przypadku PPRM [Maymon i wsp., 2000].

Fortunato i wsp. udowodnili z kolei obecność stromielizyn, w tym MMP3 w błonach płodowych i płynie owodniowym. Autorzy zauważyli, iż stromielizyny wraz z żelatynazami mają zdolność do degradacji praktycznie wszystkich elementów macierzy zewnątrzkomórkowej. Ponadto MMP3 charakteryzuje się zdolnością aktywacji MMP1. W jednym z badań hodowano fragmenty błon płodowych, pobranych od 8 pacjentek, u których ciąża zakończyła się elektywnym cięciem cesarskim. Tkanki poddano 48 godzinnej preinkubacji, a następnie stymulowano bakteryjnymi lipopolisacharydami przez 24 godziny. Błony płodowe pobrano także od 16 pacjentek rodzących siłami natury celem wykazania obecności i lokalizacji mRNA MMPs. Płyn owodniowy przebadano u 15 pacjentek z PPRM oraz u 25 pacjentek rodzących o czasie drogą cięcia cesarskiego. mRNA wszystkich badanych stromielizyn, tj. MMP3, MMP10, MMP11 obecne było w owodni oraz kosmówce. Dodatkowo wykazano istotnie wyższe stężenia stromielizyny 1 (MMP3) w przypadku PPRM w porównaniu do pacjentek rodzących o czasie z zachowanymi błonami. Zanotowano także wzrost stężeń MMP3 w badaniach *in vitro* po stymulacji lipopolisacharydami. Wykazano jednak iż poziom MMP3 w płynie owodniowym w przypadku współistnienia PPRM oraz infekcji nie różni się od poziomu MMP3 pacjentek z negatywną hodowlą. Sugeruje to udział MMP3 w patogenezie pęknięcia błon płodowych na drodze zapalnej i niezapalnej [Fortunato i wsp., 1999 a].

Z kolei Park i wsp. przeprowadzili analizę dotyczącą pomiarów stężeń w płynie owodniowym samej MMP3. Metaloproteinaza ta, uznana została jako fizjologiczny składnik płynu owodniowego a jej stężenie nie zmieniało się wraz z zaawansowaniem ciąży. W badaniu tym, odwrotnie niż w badaniu Fortunato, nie wykazano korelacji stężenia MMP3 z pęknięciem błon płodowych. Wyniki wskazywały natomiast na obecność wyższych stężeń MMP3 w przypadku samoistnego porodu przedwczesnego oraz porodu o czasie. Istotnie wyższe stężenia MMP3 zauważono w przypadku współistniejącej infekcji wewnątrzowodniowej u kobiet z PPRM oraz porodem przedwczesnym z zachowanymi błonami [Park i wsp., 2003].

W 1999 r. Fortunato, w niewielkiej grupie 51 kobiet oznaczał w płynie owodniowym żelatynazy: MMP2, MMP9 oraz ich inhibitory TIMP1 i TIMP2. Wyniki wskazywały na wyższe stężenia obydwu metaloproteinaz w przypadku PPRM, w porównaniu do pacjentek w ciąży donoszonej oraz z porodem przedwczesnym z

zachowanymi błonami. Zaobserwowano również wzrost TIMP1 oraz obniżenie stężenia TIMP2 w przypadku PPRM [Fortunato i wsp., 1995 b]. Xu i wsp., wykazali istotnie wyższą ekspresję MMP9 w błonach płodowych kobiet rodzących zarówno o czasie, jak i przedwcześnie w porównaniu do grupy kobiet niebędących w trakcie porodu. Łożyskowa ekspresja MMP9 była także wyższa u kobiet rodzących o czasie, w porównaniu do kobiet nierodzących >37 tc. [Xu i wsp., 2002].

Badanie Romero i wsp. z 2002 r. pokazało różnice w stężeniach MMP9 u kobiet i płodów z PPRM oraz porodem przedwczesnym z zachowanymi błonami. Poprzez amniocentezę i kordocentezę pobierano próbki mierząc MMP9 w płynie owodniowym oraz w osoczu ciężarnych i płodów. Dodatkowo w osoczu oznaczano: IL-1 β , IL-6, rozpuszczalny receptor dla TNF typu 1 (sTNF-R1 - *Soluble TNF Receptor 1*) oraz rozpuszczalny receptor dla TNF typu 2 (sTNF-R2 - *Soluble TNF Receptor 2*). Wyniki ukazały wyższą medianę stężeń MMP9 w próbkach pochodzących od płodu (płyn owodniowy, osocze) w przypadku PPRM w porównaniu do porodu przedwczesnego z zachowanymi błonami. Oznaczenia IL-1 β , sTNF-R1 i sTNF-R2 charakteryzowały się odwrotną zależnością. Były wyższe u płodów z porodem przedwczesnym przy zachowanych błonach płodowych. Oznacza to, iż MMP9 nie jest elementem ogólnej, płodowej odpowiedzi zapalnej. Stężenia MMP9 w osoczu matek nie wykazały istotnej różnicy w dwóch badanych grupach. Może to wskazywać na istotną rolę płodu w inicjacji pęknięcia błon płodowych, co wymagałoby potwierdzenia w dalszych badaniach [Romero i wsp., 2002]. Powstało wiele badań potwierdzających udział MMP9 w pęknięciu błon płodowych <37 tc. Jej związek z tym powikłaniem wydaje się być niezaprzeczalny. Dowodzą temu też inne prace ukazujące istotny udział MMP9 w etiologii porodu przedwczesnego, ale także w inicjacji porodu o czasie [Athayde i wsp., 1998, Wang i wsp., 2005, Zuo i wsp., 2017, Litwiniuk i wsp., 2017]. Wpływ MMP9 na wytrzymałość błon płodowych pacjentek rodzących o czasie został potwierdzony w badaniu Uchide i wsp. Analiza wykazała zależność między wzrostem MMP9 a zmniejszoną wytrzymałością mechaniczną błon [Uchide i wp., 2000].

Badania wskazują także na udział MMPs w etiologii spontanicznego porodu. Lee i wsp. udowodnili obecność wyższych stężeń MMP1, MMP3, MMP8, MMP9 w płynie owodniowym kobiet z samoistnym porodem przedwczesnym <34 tc. Według autorów konieczne jest oznaczanie markerów, takich jak metaloproteinazy, w płynie owodniowym oraz zestawienie ich z kryteriami klinicznymi pacjentek. Model taki może w sposób bardziej precyzyjny określać ciężarne będące w grupie ryzyka PTD [Lee i

wsp., 2016]. Zauważono także związek infekcji *Ureaplasma urealyticum* ze wzrostem stężenia MMP9 w przypadku samoistnego porodu przedwczesnego. Sugeruje się udział *Ureaplasma* w indukcji wydzielania MMP9, a tym samym w degradacji kolagenu co skutkuje m.in przedwczesnym pęknięciem błon płodowych [Lal i wsp., 2017].

W pracach naukowych próbowano także określić udział MMP9 w predykcji pęknięcia błon płodowych oraz inicjacji spontanicznego porodu przedwczesnego. W jednym z badań wykazano, iż stężenia osoczowej MMP9 pozostają na stałym poziomie podczas trwania ciąży, nawet 7 dni przed wystąpieniem porodu. Tym samym nie wykazano użyteczności oznaczania MMP9 w surowicy celem predykcji porodu przedwczesnego [Tu i wsp., 1998]. Do podobnych wniosków doszli Poon i wsp. badając przydatność oznaczeń MMP9 w matczynej surowicy podczas wykonywania badań skriningowych I trymestru. W przypadku ciąż zakończonych samoistnym porodem przedwczesnym (SPTD - *spontaneous preterm delivery*), niewielki wzrost stężeń MMP9 nie mógł zostać uznany za wystarczający do predykcji wystąpienia porodu przed 37 tc. [Poon i wsp., 2009]. Z kolei w 2006 r. Menon i wsp. opublikowali analizę badającą aktywność proteaz w ślinie pacjentek ciężarnych. MMP9 oznaczano u pacjentek z PPRM, u pacjentek w II trymestrze ciąży, u kobiet w aktywnej fazie porodu o czasie, u pacjentek 3 godziny po porodzie oraz w grupie kontrolnej kobiet niebędących w ciąży. Najwyższe wartości MMP9 wykazano w grupie pacjentek z PPRM, wskazując na możliwe wykorzystanie tego typu testu w predykcji porodu przedwczesnego [Menon i wsp., 2006]. Park i wsp., w ostatnio opublikowanej pracy badali stężenia MMP9, TIMP1, IL-6 oraz białka C3a i C5a w płynie owodniowym kobiet z niewydolnością szyjkową lub krótką szyjką macicy. Nie zauważono istotnych zależności między wartościami MMP9 oraz TIMP1 u tych kobiet [Park i wsp., 2020]. W badaniu opublikowanym 2 lata wcześniej, ci sami autorzy uznali, iż pomiar w osoczu MMP9 nie może być markerem toczącej się infekcji wewnątrzowodniowej, ani zbliżającego się porodu przedwczesnego [Park i wsp., 2018].

Metaloproteinaza MMP8 jest syntetyzowana przez neutrofile. W związku z tym uznaje się ją za marker współistniejącej infekcji. W jednej z analiz, badano stężenia MMP8 w 2 grupach kobiet: z PPRM oraz z porodem przedwczesnym z zachowanymi błonami. Wśród ciężarnych, 30 pacjentek miało potwierdzoną infekcję wewnątrzowodniową, z czego 21 z nich miało zachowany pęcherz płodowy. Wykazano statystycznie istotne różnice w obecności MMP8 u kobiet ze współistniejącą infekcją w porównaniu do grupy kontrolnej. Uznano, iż MMP8 może być markerem toczącej się

infekcji wewnątrzowodniowej w ciążach powikłanych przedwczesnym porodem [Angus i wsp., 2001]. Badano również przydatność szybkiego testu przyłóżkowego mającego wykazać obecność MMP8 w płynie owodniowym. Badanie przeprowadzono pobierając płyn owodniowy podczas amniopunkcji genetycznej w II trymestrze ciąży. Test ukazał pozytywny wynik na obecność MMP8 w 27 na 64 próbki płynu owodniowego u pacjentek z samoistnym porodem przedwczesnym. Test był negatywny we wszystkich próbkach z grupy kontrolnej, czyli kobiet rodzących >37 tc. Analiza wykazała, iż test ten ma 100% specyficzność i 42% czułość w predykcji porodu przedwczesnego. W sytuacji dodatniego wyniku MMP8 przy braku obecności mikroorganizmów chorobotwórczych, MMP8 mogłaby być markerem tzw. „sterylnego zakażenia”. Komórki zapalne wydzielające MMP8 w płynie owodniowym są pochodzenia płodowego. Wiadomo zatem, że dodatni test na obecność MMP8 w płynie owodniowym może wskazywać na systemową, płodową odpowiedź zapalną [Kim i wsp., 2016]. Podobne doniesienia publikowali Nien i wsp., którzy wykazali istotne znaczenie szybkiego 15 minutowego testu na obecność MMP8 w płynie owodniowym u kobiet z PTD z zachowanymi błonami. Test identyfikował pacjentki będące w grupie wysokiego ryzyka porodu przedwczesnego [Nien i wsp., 2006]. Badanie porównujące pomiary MMP8 oraz IL-6 w płynie owodniowym ciężarnych z objawami porodu przedwczesnego potwierdziły większą specyficzność testu MMP8 w rozpoznawaniu infekcji niż IL-6 [Chaemsaihong i wsp., 2018]. Stężenia MMP8 analizowano także w wydzielinie pochwowej 64 kobiet w III trymestrze ciąży, z czego ponad połowa z nich charakteryzowała się obecnością krótkiej szyjki macicy. W grupie pacjentek z krótką szyjką, wszystkie z nich wykazywały się wysokimi stężeniami MMP8. Wykazano również odwrotnie proporcjonalną zależność między stężeniami MMP8, a długością szyjki macicy. Uznano tym samym, iż MMP8 razem z innymi czynnikami może odpowiadać za brak stabilności szyjki macicy i prowadzić do jej przedwczesnego skracania [Sisti i wsp., 2020].

Wraz z metaloproteinazami, często badane są także ich specyficzne inhibitory. Zachwiana równowaga w układzie MMPs-TIMPs może stanowić istotny czynnik prowadzący do inicjacji porodu. Oprócz wyżej wymienionych prac analizujących udział TIMPs w porodzie przedwczesnym na uwagę zasługują także prace Sundrani i wsp. Przeprowadzili oni analizę oceniającą ekspresję genów *MMPI*, *MMP2*, *MMP9* oraz *TIMP1* i *TIMP2* w łożyskach kobiet, których ciąża zakończyła się przedwcześnie w porównaniu do grupy kontrolnej kobiet rodzących o czasie. Wykazano, iż ekspresja

genów *MMP1* oraz *MMP2* jest wyższa, a *TIMP1*, *TIMP2* niższa w łożyskach kobiet rodzących <37 tc w porównaniu do kobiet rodzących >37 tc. Ekspresja genu *MMP9* była porównywalna w obydwu grupach. Poziomy mRNA wszystkich trzech MMPs były wyższe w łożyskach kobiet, które były w aktywnej fazie porodu [Sundrani i wsp., 2017]. Dane odnoszące się do ekspresji *MMPs* w łożyskach pozostają w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami Sundrani i wsp. Z kolei wnioski odnośnie ekspresji *TIMPs* są różne. W badaniu z 2012 r. ekspresja genów *TIMP1* oraz *TIMP2* w łożyskach była porównywalna dla porodu przedwczesnego i porodu o czasie. W badaniu tym zasygnalizowano także obecność negatywnej korelacji między stężeniami DHA w łożysku, a MMPs [Sundrani i wsp., 2012]. Tency i wsp. analizowali stężenia MMP3, MMP9, wszystkich czterech TIMPs, jak i również stosunek MMP:TIMP w grupie kobiet z PTD. Wykazano, zgodne z innymi doniesieniami, obniżenie stężeń TIMP1 oraz TIMP2 w osoczu kobiet z PTD. Znacząco wyższe stężenia MMP9, TIMP4 oraz wyższe stosunki MMP9:TIMP1 oraz MMP9:TIMP2 zaobserwowano podczas porodu przedwczesnego [Tency i wsp., 2012].

5.3. Badania asocjacyjne genów kandydujących w etiologii porodu przedwczesnego

Czas trwania ciąży jest kontrolowany przez wiele procesów fizjologicznych, jednak odpowiedzialne za to mechanizmy biologiczne pozostają nadal słabo poznane. Nowych informacji dostarczają badania genetyczne, które identyfikują związki wariantów genetycznych i szlaków metabolicznych z występowaniem porodu przedwczesnego. Ponieważ w rozpoczęcie porodu zaangażowane są substancje wydzielane zarówno przez matkę jak i płód wyjaśnienie mechanizmów inicjujących poród przedwczesny wymaga badania genomów zarówno matek jak i ich noworodków [Zhang i wsp., 2018, Chaudhari i wsp., 2008]. Podejmowane są liczne próby wyznaczenia genetycznych czynników warunkujących wystąpienie porodu przedwczesnego, tzw. genów kandydujących. Większość badań genetycznych dotyczących PTD u ludzi koncentruje się na porównaniu częstości występowania polimorfizmów genów kandydujących w badaniach kliniczno-kontrolnych, ale również na analizie sprzężeń, badaniach asocjacyjnych całego genomu (GWAS – *Genome-wide association studies*), analizie rzadkich wariantów oraz badaniach genomu mitochondrialnego. Badane są często polimorfizmy genów w różnych prawdopodobnych szlakach przyczyniających się do wcześniejszego rozpoczęcia

porodu, takich jak: stany zapalne, odpowiedź na stres, sygnalizacja progesteronowa, przebudowa tkanek łącznych, czynność mięśniówki macicy i czynność łożyska [Monangi i wsp., 2015]. Infekcja wciąż pozostaje najlepiej poznanym czynnikiem wiodącym do wystąpienia porodu przedwczesnego. Bardzo dużo uwagi poświęca się cytokinom: IL-1, IL-6, IL-8 oraz TNF- α , które syntetyzowane są podczas inwazji mikroorganizmów do sterylnego płynu owodniowego. Są one głównymi cytokinami prozapalnymi, zaangażowanymi w produkcję prostaglandyn i kolagenaz, inicjując tym samym czynność skurczową macicy oraz wpływając na integralność błon płodowych [Barlik i wsp., 2010]. W przypadku genu kodującego *TNF*, w etiologii porodu przedwczesnego największe znaczenie mogą mieć polimorfizmy: $-163G>A$, $-238G>A$, $-308G>A$, $-376G>A$, $-863G>A$ oraz $-857C>T$ [Drews i wsp., 2006]. W polskiej populacji wykazano związek nosicielstwa polimorfizmu $-238A$ z większą predyspozycją do występowania porodu przedwczesnego [Drews-Piasecka i wsp., 2014]. Szeroko badany w kontekście występowania porodu przedwczesnego był wariant $-308G>A$. Wykazano związek nosicielstwa tego zmutowanego allele ze statystycznie częstszym występowaniem porodu przed 37 tc. oraz z waginozą bakteryjną [Liang i wsp., 2010, Macones i wsp., 2004].

Kolejnym ważnym badanym genem w przebiegu pęknięcia błon płodowych oraz infekcji wewnątrzmacicznej jest gen *IL6*. Produktem tego genu jest cytokina prozapalna, wykrywana w zwiększonej ilości w surowicy matki rodzącej przedwcześnie, wydzielinie szyjkowo-pochwowej i płynie owodniowym [Wu i wsp., 2013]. W Polsce, w 2009 r. opublikowano badanie oceniające kilka polimorfizmów w grupie kobiet z PPRM lub SPTD. Badano następujące polimorfizmy: *IL6* ($-174G>C$), *TNF* ($-308G>A$), *IL1 β* ($+3953C>T$), antagonistę receptora interleukiny 1 (*IL1RN* - *interleukin 1 receptor antagonist*) (allele 1-5). Wykazano, iż tylko nosicielstwo allele *IL1RN**2 skutkowało wzrostem ryzyka porodu przedwczesnego. Nie wykazano takich zależności dla innych badanych polimorfizmów, w tym genu *IL6*. Wykazano również, iż występowanie zarówno *IL1RN**2 jak i allele *G* genu *IL6* powoduje dodatkowy wzrost ryzyka urodzenia przedwcześnie [Kalinka i wsp., 2009]. Rok później opublikowano pracę oceniającą wybrane polimorfizmy w grupie polskich kobiet z PPRM. Nosicielstwo u matek polimorfizmów genów: *IL6*, *TNF* *IL-1 β* oraz *IL-1RN* nie miało wpływu na wzrost ryzyka PPRM [Bitner i wsp., 2010]. W innym badaniu, polimorfizmy genów *IL6* oraz receptora *IL6* (*IL6R* - *Interleukin 6 receptor*) zostały powiązane ze wzrostem stężenia tej cytokiny w płynie owodniowym ciąż zakończonych

przedwcześnie [Velez i wsp., 2008]. Najnowsze badania pokazują także, iż nosicielstwo allele *G IL6* (wariant –174 *G>C*) u matek, powoduje wzrost ekspresji białka MMP9, co koreluje z wystąpieniem porodu przedwczesnego [Pandey i wsp., 2020 a].

W patogenezie porodu przedwczesnego swój udział mają także polimorfizmy genów receptorów Toll-like (TLR - *Toll like receptor*). Rodzina tych receptorów składa się z 13 białek. Rozpoznają peptydoglikany bakterii Gram dodatnich oraz lipopolisacharydy bakterii Gram ujemnych, dzięki czemu inicjują wczesną odpowiedź immunologiczną. Szczególnie badanymi genami, były geny *TLR2* oraz *TLR4*. Przyjmuje się, iż *TLR4* jako regulator odpowiedzi immunologicznej w trakcie ciąży, wpływa na długość jej trwania [Pandey i wsp., 2017]. W populacji polskich kobiet ciężarnych przeprowadzono badanie oceniające wpływ nosicielstwa polimorfizmów genu *TLR4* na ryzyko wystąpienia porodu przed 37 tc. Autorzy zwrócili uwagę na możliwość występowania mniejszego ryzyka PTD <33 tc. w przypadku matczyngo nosicielstwa allele *1196T* genu *TLR4* [Bitner i wsp., 2013].

Należy także wspomnieć o genach, kodujących białka odpowiedzialne za aktywację układu krzepnięcia i wykrzepiania w naczyniach łożyska. Dziedzicznie uwarunkowane trombofilie, na skutek zakrzepicy łożyskowej, mogą powodować niedotlenienie i niedokrwienie łożyska. Dochodzi wtedy do reakcji stresowej płodu, aktywacji mechanizmu oś podwzgórze-przysadka-nadnercza, co prowadzi do wystąpienia porodu przedwczesnego. Badacze najczęściej analizowali polimorfizm czynnika V - mutację Leiden, genu protrombiny oraz genu reduktazy metylenotetrahydrofolianu [Hiltunen i wsp., 2011, Härtel i wsp., 2005, Wu i wsp., 2017].

W inicjacji porodu przedwczesnego bierze się również pod uwagę gen kodujący enzym cyklooxygenazę 2 (*COX2 - cyclooxygenase 2*). Nadekspresja tego genu związana może być ze wzrostem syntezy prostaglandyn i przedwczesną inicjacją czynności skurczowej macicy. Dalsze badania nad tym zagadnieniem mogą istotnie wpłynąć na możliwości lecznicze oraz zapobieganie PTD [Khanprakob i wsp., 2012; Kuć i wsp., 2012].

Badania naukowe dotyczą także genu receptora progesteronowego (*PGR - progesterone receptor*), odpowiedzialnego za czas trwania ciąży. W jednej z prac analizowano 17 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu genu receptora progesteronowego. Zauważono istotne zależności występowania polimorfizmów *PGR* u matek i płodów z porodem przedwczesnym [Ehn i wsp., 2007]. Dostępne są również inne analizy, które także wskazują na możliwy związek polimorfizmów genów *PGR* z

PTD, między innymi polimorfizmy +770($C > T$), +660($G > T$) [Manuck i wsp., 2010, Guoyang i wsp., 2008].

Postuluje się także udział polimorfizmu genu 20-alfa-hydroksysteroidowej dehydrogenazy oraz białka SP-A (*Surfactant protein A*), wydzielanego przez pneumocyty płodu, które inicjują reakcje prowadzące do porodu przedwczesnego. W szlaku tym uczestniczy NF kappaB, czynnik jądrowy mający duże znaczenie w regulacji genów m.in *COX2*, *IL1*, *IL-8*, *MMP8* [Drews i wsp., 2006].

Obszerne podsumowanie przeprowadzanych na świecie kliniczno-kontrolnych badań asocjacyjnych genów z porodem przedwczesnym przedstawiono w pracy Plunkett i Muglia, których wyniki zestawiono w tabeli 26 [Plunkett i wsp., 2008].

Tabela 26. Geny matek i niemowląt związane z porodem przedwczesnym w opublikowanych badaniach kliniczno-kontrolnych [wg Plunkett i Muglia, 2008].

<i>Szlak metaboliczny</i>	<i>Symbol genu</i>	<i>Nazwa genu</i>	<i>Nazwa angielska</i>
Infekcja i stan zapalny	<i>TNF, TNFR1, TNFR2, TNFRSF6B</i>	Czynnik martwicy nowotworu oraz jego receptory	<i>tumor necrosis factor TNF receptor superfamily member 1A TNF receptor superfamily member 1B TNF receptor superfamily member 6b</i>
	<i>IL1A, IL1B, IL1R1, IL1R2, IL1RN, IL2, IL4, IL6, IL6R, IL8, IL10, IL10RA, IL11, IL12A, IL18</i>	Interleukiny i ich receptory	<i>interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 1 receptor type 1, interleukin 1 receptor type 2, interleukin 1 receptor antagonist, interleukin 2, interleukin 4, interleukin 6, interleukin 6 receptor, interleukin 8, interleukin 10, interleukin 10 receptor subunit alpha, interleukin 11, interleukin 12A, interleukin 18</i>
	<i>LTA</i>	limfotoksyna alfa	<i>lymphotoxin alpha</i>
	<i>CSF3</i>	Czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów	<i>colony stimulating factor 3</i>
	<i>IFNGR1</i>	Receptor 1 interferonu gamma	<i>interferon gamma receptor 1</i>
	<i>TGFB1</i>	Transformujący czynnik wzrostu beta 1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
	<i>MBL2</i>	Lektyna wiążąca mannozę 2	<i>mannose binding lectin 2</i>
	<i>CD14</i>	Antygen różnicowania komórkowego 14	<i>CD14 molecule</i>
	<i>TLR2, TLR4</i>	Receptory Toll-like 2 i 4	<i>toll like receptor 2, toll like receptor 4</i>
	<i>ALOX5AP</i>	Białko aktywujące 5-lipooksygenazę	<i>arachidonate 5-lipoxygenase activating protein</i>
Przebudowa tkanek łącznych	<i>NOD2</i>	Białko zawierające domenę oligomeryzacyjną wiążącą nukleotyd 2	<i>nucleotide binding oligomerization domain containing 2</i>
	<i>MMP1, MMP9</i>	Metaloproteinazy 1 i 9	<i>matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 9</i>

<i>Szlak metaboliczny</i>	<i>Symbol genu</i>	<i>Nazwa genu</i>	<i>Nazwa angielska</i>
	<i>PLAT</i>	Tkankowy aktywator plazminogenu	<i>plasminogen activator, tissue type</i>
	<i>SERPINH1</i>	Członek rodziny Serpin H1	<i>serpin family H member 1</i>
	<i>SLC23A1</i>	Członek 1 rodziny rozpuszczalnych nośników	<i>solute carrier family 23 member 1</i>
Przedwczesne skurcze macicy	<i>ADRB2</i>	Receptor adrenergiczny beta 2	<i>adrenoceptor beta 2</i>
	<i>DRD2</i>	Receptor dopaminy D2	<i>dopamine receptor D2</i>
	<i>PDE4D</i>	Fosfodiesteraza 4D	<i>phosphodiesterase 4D</i>
	<i>PTGER2</i>	Receptor 2 prostaglandyny E	<i>prostaglandin E receptor 2</i>
	<i>PTGES</i>	Syntaza prostaglandyny E	<i>prostaglandin E synthase</i>
	<i>PTGFR</i>	Receptor prostaglandyny F	<i>prostaglandin F receptor</i>
Funkcje łożyska	<i>F2, F5, F7</i>	Czynniki 2, 5 i 7 krzepnięcia	<i>coagulation factor II, coagulation factor V, coagulation factor VII</i>
	<i>F13A1</i>	Łańcuch A czynnika XIII krzepnięcia	<i>coagulation factor XIII A chain</i>
	<i>NOS2, NOS3</i>	Syntazy tlenu azotu 2 i 3,	<i>nitric oxide synthase 2, nitric oxide synthase 3</i>
	<i>FGB</i>	Łańcuch beta fibrynogenu	<i>fibrinogen beta chain</i>
	<i>TFPI</i>	Inhibitor szlaku czynnika tkankowego	<i>tissue factor pathway inhibitor</i>
	<i>PROC, PROCR</i>	Białko C i jego receptor	<i>protein C, protein C receptor</i>
	<i>ANXA5</i>	Aneksyna A5	<i>annexin A5</i>
	<i>ADD1</i>	Adducyna 1	<i>adducin 1</i>
	<i>SERPINE1</i>	Członek 1 rodziny serpin E	<i>serpin family E member 1</i>
	<i>SERPINB2</i>	Członek 2 rodziny serpin B	<i>serpin family B member 2</i>
	<i>THBD</i>	Trombomodulina	<i>thrombomodulin</i>
	<i>VEGFA</i>	Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu A	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
Reakcja na zanieczyszczenie środowiska	<i>ADH1C</i>	Dehydrogenaza alkoholowa 1C (klasa I)	<i>alcohol dehydrogenase 1C (class I)</i>
	<i>PON1, PON2</i>	Paraoksonaza 1 i 2	<i>paraoxonase 1, paraoxonase 2</i>
	<i>OPRM1</i>	Receptor opioidowy mu 1	<i>opioid receptor mu 1</i>
	<i>GSTT1</i>	S-transferaza glutationu T1	<i>glutathione S-transferase theta 1</i>

<i>Szlak metaboliczny</i>	<i>Symbol genu</i>	<i>Nazwa genu</i>	<i>Nazwa angielska</i>
	<i>CYP1A1, CYP2E1</i>	Cytochromy P450 członek rodziny 1 podrodziny A i członek rodziny 2 podrodziny E1	<i>cytochrome P450 family 1 subfamily A member, cytochrome P450 family 2 subfamily E member 1</i>
	<i>GSTM1</i>	Transferaza S-glutationowa mu1	<i>glutathione S-transferase mu 1</i>
	<i>NAT2</i>	N-acetylotransferaza 2	<i>N-acetyltransferase 2</i>
Szlak stresu płodowego	<i>CRHBP</i>	Białko wiążące hormon uwalniający kortykotropinę	<i>corticotropin releasing hormone binding protein</i>
Funkcjonalne zaburzenia progesteronu	<i>PGR</i>	Receptor progesteronowy	<i>progesterone receptor</i>
Inne	<i>CBS</i>	Beta-syntaza cystationiny	<i>cystathionine beta-synthase</i>
	<i>MTHFR</i>	Reduktaza metylenotetrahydrofolianu	<i>methylenetetrahydrofolate reductase</i>
	<i>MTR</i>	Metylotransferaza 5-metylotetrahydrofolianu-homocysteiny	<i>5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase</i>
	<i>MTRR</i>	Reduktaza metylotransferazy 5-metylotetrahydrofolianowej-homocysteiny	<i>5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase reductase</i>
	<i>SHMT1</i>	Hydroksymetylotransferaza serynowa 1	<i>serine hydroxymethyltransferase 1</i>
	<i>PPARG</i>	Receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów gamma	<i>peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>

Procesy związane z dojrzewaniem szyjki macicy oraz PPRM są szeroko badane w kontekście etiologii porodu przedwczesnego. W procesy te, zaangażowane są metaloproteiny i ich tkankowe inhibitory. W szczególności do tej pory badacze skupili się na polimorfizmach genów *MMP1*, *MMP9* oraz *TIMP2*. Pomimo licznych prowadzonych badań nad genetyczną etiologią porodu przedwczesnego, metaloproteiny oraz ich inhibitory tkankowe nadal stanowią nie w pełni poznany obszar wiedzy. Bibliografia dotycząca polimorfizmów genów metaloprotein i ich tkankowych inhibitorów jest nieliczna. W Polsce do tej pory nie przeprowadzano badań w tym zakresie.

5.4. Polimorfizmy genów metaloprotein w etiologii porodu przedwczesnego

Większość publikacji dotyczących polimorfizmów MMPs dotyczy populacji afroamerykańskiej, ze względu na udowodnione częstsze występowanie tego powikłania wśród populacji rasy czarnej. Fujimoto i wsp. poddali analizie polimorfizm -1607 1G/2G genu *MMP1*, który badano również w powyższej rozprawie doktorskiej. Do badania włączono afroamerykańskie noworodki z ciąż zakończonych PPRM. Autorzy potwierdzili doniesienia Rutera z 1998 r. o zwiększonej aktywności promotora w przypadku insercji guaniny oraz zwiększeniu transkrypcji *MMP1* i syntezie MMP1 w komórkach błon płodowych. Ponadto udowodnili, iż nosicielstwo allele 2G u płodów związane było z częstszym występowaniem PPRM [Fujimoto i wsp., 2002].

Po raz pierwszy w populacji europejskiej polimorfizmy MMPs zostały zbadane w 2014 r. W analizie uwzględniono polimorfizm -1607 1G/2G *MMP1* oraz polimorfizm 1562 C/T *MMP9*. Badanie przeprowadzono w Słowenii. Grupą badaną było 113 kobiet charakteryzujących się wystąpieniem samoistnego porodu przedwczesnego z zachowanym pęcherzem płodowym. Wyniki tego badania nie potwierdziły wcześniejszych doniesień dla kobiet rasy czarnej. Nie wykazano dowodów na związek wyżej wymienionych polimorfizmów z występowaniem porodu przedwczesnego w grupie kobiet rasy kaukaskiej [Pereza i wsp., 2014].

W toku analizy polimorfizmu -1607 1G/2G *MMP1* w powyższej rozprawie doktorskiej, podobnie jak w pracy Perezy i wsp., nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w częstości występowania genotypów i alleli pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną. Genotyp 1G/1G występował częściej u pacjentek z PTD, a allel 2G w grupie

kontrolnej. Z kolei w badaniu Fujimoto i wsp., to właśnie nosicielstwo allele 2G u płodów miało istotnie statystyczny związek z wystąpieniem PPRM.

W kolejnym badaniu prowadzonym wśród rasy czarnej analizowano kilkaset SNPs, w tym trzy polimorfizmy: *MMP1* rs7945189, *MMP2* rs11639960 oraz badany również w powyższej rozprawie polimorfizm *TIMP2* rs2277698. W grupie badanej znalazły się kobiety ciężarne rasy czarnej z samoistnym porodem przedwczesnym lub PPRM, odbytym między 20, a 36+6 tc. Grupa badana liczyła 77 kobiet (42 pacjentki z PPRM oraz 35 pacjentek z SPTD), podczas gdy do grupy kontrolnej włączono 756 kobiet, w ciąży pojedynczej, rodzących o czasie. Autorzy wykazali, iż z badanych polimorfizmów, te dotyczące modeli recesywnych: *MMP2* oraz *TIMP2* związane były z występowaniem spontanicznego porodu przedwczesnego <37 tc. (dla *MMP2* OR=8,26, $p=0,000048$, dla *TIMP2* OR=8,6, $p=0,00047$). Według tej analizy, modele recesywne genów *MMP1* oraz *MMP2* związane były również z wyższym odsetkiem porodów <34 tc. (dla *MMP1* OR=17,05, $p=0,0003$, dla *MMP2* OR=10,32, $p=0,0002$) [Frey i wsp., 2016].

Do podobnych wniosków odnośnie polimorfizmu genu *TIMP2* doszli wcześniej Romero i wsp., publikując w 2010 r. dwie obszerne prace dotyczące badań nad SNPs w etiologii porodu przedwczesnego. Pierwsza z nich dotyczyła analizy SNP w grupie hiszpańskich kobiet i noworodków z ciąż powikłanych PPRM. Była to duża praca obejmująca 225 matek oraz 155 noworodków z grupy badanej oraz 599 matek i 628 noworodków z grupy kontrolnej. Analiza dotyczyła 190 genów i 775 SNPs. Badanie to wykazało po raz pierwszy, iż matczyny polimorfizm genu *TIMP2* rs 2277698 był istotnie statystycznie związany z występowaniem PPRM (OR=2,12, $p=0,000068$). Nie wykazano natomiast związku tego polimorfizmu z chorioamniotitis. Dla płodowego polimorfizmu *MMP19* rs 1056784 także wykazano związek z PPRM (OR=6,81, $p=0,003$) [Romero i wsp., 2010 a]. W tym samym roku opublikowano podobną analizę prowadzoną tym razem wśród kobiet z samoistnym porodem przedwczesnym z zachowanymi błonami. Badano 223 matki i 179 noworodków z grupy badanej oraz 599 matek i 628 noworodków z grupy kontrolnej. Badanie dotyczyło podobnie ludności hiszpańskiej. Udowodniono związek polimorfizmu *TIMP2* rs2277698 u matek (OR=1,98, $p=0,000197$) i płodów (OR=1,82, $p=0,001$) z porodem przedwczesnym z zachowanymi błonami. Wykazano także, iż matczyny oraz płodowy polimorfizm *TIMP2* rs55743137 mają istotnie statyczny związek z występowaniem SPTD dla wartości $p<0,05$ (dla matek: OR=1,36, $p=0,034$; dla płodów: OR=1,49, $p=0,011$).

Związek z samoistnym porodem <37 tc. wykazano także dla polimorfizmów matczyńskich *MMP16* rs3739382 (OR=2,56, $p=0,017$), *MMP10* rs486055 (OR=1,76, $p=0,022$) oraz dla płodowego *TIMP1* rs 11551797 (OR=0,45, $p=0,04$) [Romero i wsp., 2010 b].

Inne wnioski dotyczące polimorfizmu *TIMP2* pochodzą z pracy Predy i wsp. z 2020 roku. Zespół ten analizował m.in polimorfizm *TIMP2* rs2277698 w populacji kobiet pochodzących z Rumunii. Grupa badana obejmowała 79 matek i noworodków z SPTD. Grupę kontrolną stanowiło 81 par matek i noworodków urodzonych o czasie. Badanie to nie wykazało związku tego polimorfizmu genu *TIMP2* z ryzykiem samoistnego porodu przedwczesnego [Preda i wsp., 2020].

W powyższej rozprawie doktorskiej, badano 2 polimorfizmy genu *TIMP2*. W toku analizy polimorfizmu rs2277698, porównując grupę badaną i kontrolną, podobnie jak w badaniu Predy i wsp., nie wykazano związku występowania tego wariantu z PTD, jednak genotypy zawierające zmutowany allel *T* częściej występowały w grupie kontrolnej (dla modelu dominującego: OR=1,84, 95%PU=0,95-3,59, $p=0,0677$). Ciekawy wniosek dotyczy analizy częstości występowania alleli: obecność allela *T* zmniejszała prawie o połowę ryzyko występowania PTD (OR=0,53, 95%PU=0,29-0,97, $p=0,0360$).

Analizując wariant rs55743137 genu *TIMP2*, wykazano brak związku występowania tego polimorfizmu z PTD w grupie polskich kobiet. Z kolei analiza tego polimorfizmu w grupach wyodrębnionych w zależności od tygodnia zakończenia ciąży, pokazuje istotnie statystyczny związek genotypu *TT* z PTD w modelu kodominującym, porównując grupę kobiet rodzących skrajnie i bardzo przedwcześnie zarówno z grupą MPTD ($p=0,0160$) jak i kontrolną ($p=0,0118$). W modelu recesywnym również zaobserwowano takie różnice (grupa EPTD+VPTD vs. MPTD $p=0,0465$, EPTD+VPTD vs. kontrola $p=0,0354$).

W powyższej rozprawie doktorskiej, badania nad wariantem polimorficznym *372C>T* genu *TIMP1* nie wykazały istotnych statystycznie różnic w częstościach występowania genotypów i alleli wśród analizowanych kobiet. Tym samym nie stwierdzono wpływu tego wariantu na wzrost ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego u badanych Polek.

Oprócz wyżej opisanych prac, na przestrzeni kilkunastu lat powstało zaledwie kilka analiz związanych z tematyką badającą związek polimorfizmów MMPs z porodem

przedwczesnym. Badania dotyczyły głównie polimorfizmów genu *MMP9*. Trzy prace oceniały polimorfizm *-1562 C/T MMP9*. Do tej pory nie opublikowano prac analizujących inne polimorfizmy *MMP9*, jak na przykład: rs17576 *c.836A>G* oraz rs17577 *c.2003 G>A*. Analiza tych dwóch ostatnich polimorfizmów znalazła się w powyższej rozprawie doktorskiej, co stanowi nowy element oceny polimorfizmów *MMP9* i ich związku z występowaniem porodu <37 tc.

Ferrand i wsp. opublikowali badanie analizujące zmienną liczę powtórzeń tandemowych oraz polimorfizm *-1562C/T* genu *MMP9*. Grupą badaną były afroamerykańskie noworodki z cięż powikłanych PPRM. Nie wykazano istotnie zwiększonej aktywności promotora w przypadku polimorfizmu *-1562C/T*. Badanie nie wykazało również związku polimorfizmu *1562C/T MMP9* z PPRM [Ferrand i wsp., 2002].

W innym badaniu oceniającym polimorfizm *-1562 C/T MMP9* w grupie amerykańek rasy białej pochodzenia niehiszpańskiego, udowodniono związek występowania tego polimorfizmu z porodem przedwczesnym. Autorzy nie zaznaczyli jednak, który genotyp jest najbardziej związany z tym powikłaniem [Jones i wsp., 2012].

Fang i wsp. również dokonali oznaczeń polimorfizmu *-1562C/T MMP9*. Badanie prowadzone było wśród kobiet rasy żółtej z PPRM. Grupa badana liczyła 206 kobiet, grupa kontrolna 287 pacjentek. Autorzy udowodnili, iż genotyp *TC/TT* związany jest z ryzykiem PPRM (OR=5,31, 95%CI: 1,07-26,44). Również nosicielstwo genotypu *CC* istotnie zwiększyło ryzyko wystąpienia PPRM (OR=4,20, 95% CI:1,16-15,21) [Fang i wsp., 2009].

Dla dwóch badanych polimorfizmów genu *MMP9*: rs17576 i rs17577 w powyższej rozprawie doktorskiej, w żadnym przypadku nie wykazano bezpośredniego związku z występowaniem porodu przedwczesnego u polskich ciężarnych. Są to nowe, istotne wnioski, gdyż wcześniej nie analizowano wyżej wymienionych polimorfizmów w kontekście występowania porodu przedwczesnego.

Autorzy pozostałych prac o tej tematyce skupiali się na mniej znanych polimorfizmach MMPs. Wang i wsp. w 2008 r. zidentyfikowali nowy polimorfizm AF007878.1 (*MMP-1*): *3447T>C* w promotorze genu *MMPI*. Badano 284 afroamerykańskie noworodki urodzone przedwcześnie z powodu PPRM. Grupę kontrolną stanowiło 361 noworodków rasy czarnej urodzonych o czasie. Wykazano iż noworodki z genotypem *TT* mają 3,5 razy większe ryzyko PPRM w porównaniu do noworodków o genotypie *CC* ($p=0,007$). Udowodniono, iż allel *C* wpływa na

zmniejszenie aktywności promotora, transkrypcji *MMP1* oraz działa protekcyjnie wobec PPRM [Wang i wsp., 2008].

W badaniu opublikowanym 4 lata wcześniej, Wang i wsp. analizowali trzy polimorfizmy *MMP8*: -799C/T, -381A/G, +17C/G. Badając genotypy noworodków rasy czarnej, autorzy udowodnili brak istotnie statystycznego związku między badanymi polimorfizmami a PPRM. Z drugiej strony, analiza haplotypów wykazała, iż nosicielstwo -799T, -381G, +17G związane było ze zwiększeniem aktywności promotora *MMP8* i było istotnie częstsze w przypadku PPRM (OR=4,63, $p=0,0001$). Haplotyp -799C, -381A, +17C związany był ze zmniejszonym ryzykiem wystąpienia PPRM (OR=0,52, $p=0,0002$) [Wang i wsp., 2004].

W kolejnej publikacji z 2009 r. badano 130 genów pod kątem występowania 1432 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu. W badaniu wykorzystano próbki DNA pobrane z krwi od matek oraz płodów z ciąż zakończonych samoistnym porodem przedwczesnym. Badanie określiło, iż wpływ na wystąpienie samoistnego porodu przedwczesnego u rasy czarnej mają warianty genów związane z infekcją oraz odpowiedzią zapalną. Wśród badanych genów, znalazły się także *MMP2* oraz *MMP9*. Analiza genotypu płodów wykazała związek polimorfizmu *MMP2* rs233832 (model GG) z występowaniem SPTD (OR=2,93, 95%CI=1,56-5,49, $p=0,001$). Badając polimorfizmy *MMP9* rs6104420-rs3918260, analiza haplotypów, wykazała z kolei, iż haplotyp GC ma największy związek z porodem przedwczesnym (OR=2,27, 95% CI 1,31-3,91, $p=0,002$) [Velez i wsp., 2009].

Jedno z nowszych badań o tej tematyce opublikowane zostało w 2018 r. Lathouras i wsp. oznaczali polimorfizmy *MMP1* rs1144393, *MMP2* rs11639960, *MMP3* rs3025039 oraz *TIMP2* 7503607. Grupa badana liczyła 66 greczynek, będących w przedziale 24-37 tc. z obecną samoistną czynnością skurczową lub przedwczesnym pęknięciem pęcherza płodowego. Grupę kontrolną stanowiło 66 bezobjawowych, zdrowych kobiet, będących w ciąży pojedynczej między 24-37 tc. Analiza wykazała brak istotnych zależności między występowaniem tych czterech polimorfizmów a porodem przedwczesnym w grupie greckich kobiet [Lathouras i wsp., 2018].

W latach 2015-2017 prowadzono badanie na grupie 225 indyjskich kobiet. Badanie opublikowano w 2020 r. Pandey i wsp. pobierając próbki krwi, oznaczali polimorfizmy genów trzech metaloproteinaz: *MMP1* (-16071G/2G), *MMP8* (+17C/G, -799C/T) oraz *MMP9* (-1562 C/T). W przypadku *MMP9* genotypy CT ($p = 0,001$; OR = 1,44) i TT ($p = 0,05$; OR = 2,6) związane były z wyższym ryzykiem wystąpienia porodu

przedwczesnego. Analiza haplotypów ukazała też zależność między częstością występowania haplotypu *GT MMP8 (+17C/G, -799C/T)* a porodem przed 37 tc. [Pandey i wsp., 2020 b].

5.5. Implikacje kliniczne badań w zakresie etiologii porodu przedwczesnego

Dotychczasowe badania udowodniły, że metaloproteinazy oraz inhibitory tkankowe metaloproteinaz, poprzez wpływ na homeostazę tkanki łącznej, wpływają na częstość występowania wielu powikłań położniczych, jak poród przedwczesny, stan przedrzucawkowy, wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu. Dalszy rozwój badań nad tymi białkami może istotnie wpłynąć na farmakoterapię tych zaburzeń.

W 2007 r. Goldman i wsp. opublikowali pracę badającą wpływ progesteronu na ekspresję *MMP2*. Udowodniono wtedy hamujący wpływ progesteronu na sekrecję *pro-MMP2*, ekspresję oraz aktywność promotora genu *MMP2* w łożysku. Wpływ ten zauważono tylko przed rozpoczęciem czynności skurczowej macicy. Po wystąpieniu czynności skurczowej macicy progesteron nie hamował aktywności *MMP2* [Goldman i wsp., 2007].

Inne badania pokazują również wpływ syntetycznych form progesteronu na aktywność $\text{TNF-}\alpha$, który z kolei powoduje aktywację *MMP9*. Allen i wsp. opisali hamujący wpływ octanu medroksyprogesteronu na oś $\text{TNF-}\alpha$ w komórkach owodni. Zademonstrowali tym samym możliwy punkt uchwytu dla działania gestagenów, co mogłoby w przyszłości zapobiegać przedwczesnemu odpływaniu płynu owodniowego [Allen i wsp., 2015].

Inhibitory $\text{TNF-}\alpha$ stosowane są z pomyślnością w wielu dziedzinach medycyny np. w reumatologii. Leki biologiczne obecnie nie są zalecane w leczeniu powikłań położniczych. Biorąc pod uwagę działanie $\text{TNF-}\alpha$ i jego wpływ na MMPs, leki anty- $\text{TNF-}\alpha$ mogą również wpływać na zmniejszenie częstości występowania porodu przed 37 tc. Badanie Holmgrena i wsp. pokazuje, że stosowanie inhibitorów $\text{TNF-}\alpha$ redukuje ryzyko zgonu wewnątrzmacicznego płodu i porodu przedwczesnego indukowanego przez lipopolisacharydy [Holmgren i wsp., 2008].

Fortunato i wsp., zbadali wpływ IL-10 na zmiany stężenia mRNA żelatynaz w błonach płodowych. Próbkę błon stymulowano lipopolisacharydami lub lipopolisacharydami oraz IL-10. Następnie zastosowano metodę PCR oraz ELISA do ilościowego oszacowania mRNA *MMP2* i *MMP9*. Wynikiem badań był spadek stężenia

metaloproteinaz podczas kostymulacji próbek LPS i IL-10. Uznano tym samym, że IL-10 może eliminować zależną od LPS indukcję żelatynaz w błonach płodowych. Jest to kolejny punkt uchwytu dla potencjalnego wprowadzenia farmakoterapii porodu przedwczesnego spowodowanego przedwczesnym odpływaniem wód płodowych [Fortunato i wsp., 2001].

Żelatynazy były także przedmiotem badań w pracy Mano i wsp. Naukowcy badali wpływ tocilizumabu na zależną od IL-6 indukcję MMP2 oraz MMP9. Po raz pierwszy udowodniono hamujące działania tocilizumabu na IL-6, co istotnie zmniejszyło produkcję MMP2 i MMP9 w błonach płodowych u kobiet z PPRM [Mano i wsp., 2009].

Nutrigenetyka jest obecnie szeroko rozwijającą się dziedziną, badającą zależności gen-dieta. Sundrani i wsp. po raz pierwszy zauważyli znaczący związek ekspresji MMP3 i MMP2 w łożysku z odpowiednio witaminą B12 ($p=0,049$) oraz folianami ($p=0,007$) w surowicy kobiet rodzących przed 37 tc. Nie udowodniono takiego związku dla TIMP1 oraz TIMP2. We wcześniejszych pracach wykazano, że zaburzenia stężenia witaminy B12 oraz hiperhomocysteinemia mogą powodować degradację macierzy zewnątrzkomórkowej oraz indukować stan zapalny, co z kolei aktywuje MMPs. Potrzebne są dalsze badania, aby potwierdzić, czy prawidłowe odżywianie i podaż mikroelementów wpływa na modyfikacje epigenetyczne DNA i rozwój powikłania, jakim jest poród przedwczesny [Tobin i wsp., 2009, Sundrani i wsp., 2013].

5.6. Ograniczenia przeprowadzonych badań

Etiopatogeneza porodu przedwczesnego jest wieloczynnikowa, z podkreśleniem dużego udziału czynników genetycznych. Wydaje się, że na wystąpienie porodu przedwczesnego prawdopodobnie wpływają liczne warianty genetyczne, z których każdy wywiera mały efekt, stąd określenie asocjacji w tym zakresie wymaga badań w dużych liczebnie grupach pacjentek.

W przedstawianej rozprawie doktorskiej grupy ciężarnych, w związku z precyzyjnym doбором pacjentek i ściśle określonymi kryteriami włączenia do badania, były stosunkowo nieliczne. Szczególnie małą liczebnie była grupa rodzących przed zakończeniem 28 tc., co ma jednak swoje odzwierciedlenie w dostępnych doniesieniach światowych, ukazujących najmniejszy odsetek porodów skrajnie przedwczesnych

spośród wszystkich wcześniaków. Biorąc pod uwagę niewielką liczbę pacjentek rodzących <28 tc. w powyższym badaniu, do celów statystycznych połączono tę grupę z pacjentkami rodzącymi między 28-32 tc.

Dodatkowo podkreślić należy, że dotychczasowe analizy polimorfizmów genów metaloproteinaz i ich tkankowych inhibitorów przeprowadzane w Europie obejmowały również niewielkie liczebnie grupy badawcze, co niewątpliwie jest ograniczeniem wcześniejszych badań, jak również prezentowanej rozprawy doktorskiej. Dlatego niezbędne jest kontynuowanie prac w tym zakresie na większych liczebnie populacjach.

W powyższej rozprawie doktorskiej oznaczano 6 polimorfizmów, z czego, co należy podkreślić, warianty rs17576 (836A>G) oraz rs17577 (2003G>A) genu *MMP9* nigdy wcześniej nie zostały zbadane w kontekście występowania porodu przedwczesnego. Wyjaśnienie mechanizmów inicjujących poród przedwczesny opiera się na badaniach genomów matek jak i ich noworodków, ponieważ w rozpoczęcie porodu zaangażowane są substancje wydzielane zarówno przez matkę jak i płód. W prezentowanej pracy analizowano tylko genotypy matek, co jest również ograniczeniem tej rozprawy i wymaga kontynuacji badań.

Przeprowadzona w rozprawie analiza danych klinicznych pacjentek nie wykazała ich udziału w etiologii porodu przedwczesnego. Istotną zależność uzyskano dla tygodnia zakończenia ciąży pomiędzy grupami badaną oraz kontrolną, co świadczy o prawidłowym doborze pacjentek do wyżej wymienionych grup. Niższy przyrost masy ciała w ciąży (wyrażony jako różnica BMI) wśród pacjentek rodzących przedwcześnie może sygnalizować wpływ przyrostu masy ciała na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego. Jednak wartości BMI przed ciążą we wszystkich grupach były prawidłowe i przyjmując, że w II i III trymestrze ciąży następuje przyrost masy ciężarnej ok. 0,5 kg tygodniowo, obserwowany niższy przyrost masy w grupie EPTD+VPTD wynikał prawdopodobnie tylko z wcześniejszego zakończenia ciąży. Dlatego na podstawie wyżej wymienionych analiz danych klinicznych nie można sformułować jednoznacznych wniosków dotyczących wartości BMI i ryzyka porodu przedwczesnego.

5.7. Podsumowanie

Pomimo prowadzenia wielu badań nad patogenezą porodu przedwczesnego, powikłanie to pozostaje wciąż wiodącym problemem współczesnego położnictwa.

Wcześnieństwo wiąże się z dużą śmiertelnością oraz zachorowalnością wśród noworodków natomiast u kobiet, poród przed 37 tc. zwiększa ryzyko wystąpienia tego powikłania w kolejnych ciążach, indukuje wzrost powikłań w połogu jak infekcje, czy problemy z laktacją, ma także wpływ na sposób zakończenia ciąży i zwiększenie odsetka cięć cesarskich w tej grupie pacjentek. W związku z możliwym udziałem czynników środowiskowych, hormonalnych oraz genetycznych w etiologii tej jednostki, nadal prowadzone są czynne liczne analizy w tym zakresie. Dodatkowo niejasna patogeneza powoduje, że możliwości farmakologiczne terapii tego powikłania są nadal bardzo ograniczone.

W ostatnich latach zwrócono uwagę na rolę metaloproteinaz w etiologii porodu przedwczesnego. Udowodnione działanie MMPs, powodujące lizę macierzy zewnątrzkomórkowej oraz degradację tkanki łącznej wskazuje na ich udział w przedwczesnym dojrzewaniu szyjki macicy, przedwczesnym pęknięciu błon płodowych oraz porodzie przedwczesnym. W powyższej rozprawie doktorskiej skupiono się na metaloproteinazach: MMP1 i MMP9 oraz inhibitorach tkankowych metaloproteinaz: TIMP1 i TIMP2. Do chwili obecnej, w populacji polskiej kobiet ciężarnych brak jest badań zajmujących się tą tematyką. Również nieliczne doniesienia w literaturze światowej skupiają się głównie na analizie wpływu polimorfizmów genów metaloproteinaz na występowanie porodu przedwczesnego u rasy czarnej.

W prezentowanej rozprawie doktorskiej, pomimo jej ograniczeń, po raz pierwszy pokazano zależności między poszczególnymi polimorfizmami genów układu MMPs-TIMPs i ich wpływem na czas zakończenia ciąży. Wykazano również udział niektórych haplotypów oraz współwystępowanie genotypów MMPs oraz TIMPs w patogenezie porodu przedwczesnego. Na podstawie przeprowadzonych badań wydaje się, że poznanie etiologii porodu przed 37 tc. oraz określenie udziału genów metaloproteinaz i ich inhibitorów tkankowych w występowaniu porodu przedwczesnego może przyczynić się do powstania nowych możliwości diagnostycznych oraz terapeutycznych.

6. WNIOSKI

1. Analiza genotypów oraz alleli polimorfizmów rs1799750 *MMP1*, rs17576 i rs17577 *MMP9*, rs4898 *TIMP1* oraz rs55743137 *TIMP2* sugeruje brak bezpośredniego związku tych wariantów genetycznych z występowaniem porodu przedwczesnego.
2. Przewaga występowania zmutowanego allele *T* polimorfizmu rs2277698 genu *TIMP2* w grupie kontrolnej sugeruje jego ochronny wpływ na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego.
3. Obserwowane częstsze występowanie haplotypu *CT* (rs2277698/rs55743137) genu *TIMP2* w grupie badanej z PTD ujawnia możliwą rolę niezmutowanych alleli tych wariantów w patogenezie porodu przedwczesnego.
4. Analiza współwystępowania genotypów wskazuje możliwy sumaryczny wpływ wariantów rs4898 genu *TIMP1* oraz rs17576 genu *MMP9* na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego.
5. Asocjacje genotypów polimorfizmów rs2277698 i rs55743137 genu *TIMP2* z tygodniem zakończenia ciąży mogą wskazywać na ich wpływ na czas trwania ciąży.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1 Adams MM, Elam-Evans LD, Wilson HG, Gilbertz DA. Rates of and factors associated with recurrence of preterm delivery. *JAMA*. 2000 Mar 22-29;283(12):1591-6.
- 2 Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem*. 1995 Mar 17;270(11):5872-6. doi: 10.1074/jbc.270.11.5872. PMID: 7890717.
- 3 Allen TK, Feng L, Nazzal M, Grotegut CA, Buhimschi IA, Murtha AP. The Effect of Progestins on Tumor Necrosis Factor α -Induced Matrix Metalloproteinase-9 Activity and Gene Expression in Human Primary Amnion and Chorion Cells In Vitro. *Anesth Analg*. 2015 May;120(5):1085-94. doi: 10.1213/ANE.0000000000000708. PMID: 25806402; PMCID: PMC4406818.
- 4 Amălinei C, Căruntu ID, Bălan RA. Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol*. 2007;48(4):323-334.
- 5 Angus SR, Segel SY, Hsu CD, Locksmith GJ, Clark P, Sammel MD, Macones GA, Strauss JF 3rd, Parry S. Amniotic fluid matrix metalloproteinase-8 indicates intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2001 Nov;185(5):1232-8. doi: 10.1067/mob.2001.118654.
- 6 Athayde N, Edwin SS, Romero R, Gomez R, Maymon E, Pacora P, Menon R. A role for matrix metalloproteinase-9 in spontaneous rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 1998 Nov;179(5):1248-53. doi: 10.1016/s0002-9378(98)70141-3.
- 7 Athayde N, Romero R, Gomez R, Maymon E, Pacora P, Mazor M, Yoon BH, Fortunato S, Menon R, Ghezzi F, Edwin SS. Matrix metalloproteinases-9 in preterm and term human parturition. *J Matern Fetal Med*. 1999 Sep-Oct;8(5):213-9. doi: 10.1002/(SICI)1520-6661(199909/10)8:5<213::AID-MFM3>3.0.CO;2-R. PMID: 10475503.
- 8 Balci M, Özdemir G. Differential Expression of EGFR-1, MMP-3, and MMP-9 in Spontaneous Abortions, Induced Abortions, and Tubal Pregnancies. Differential Expression of EGFR-1, MMP-3, and MMP-9 in Spontaneous Abortions, Induced Abortions, and Tubal Pregnancies. *Turk Patoloji Derg*. 2019;35(1):1-8. doi:10.5146/tjpath.2018.01432.
- 9 Barfield WD. Public Health Implications of Very Preterm Birth. *Clin Perinatol*. 2018;45(3):565-577. doi:10.1016/j.clp.2018.05.007.
- 10 Barlik M, Łukaszewski T, Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K. Znaczenie polimorfizmu genów czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α) oraz interleukiny-6 (IL-6) w porodzie przedwczesnym *Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia*, tom 3, zeszyt 4, 249-254, 2010.
- 11 Basso O, Olsen J, Christensen K. Low birthweight and prematurity in relation to paternal factors: a study of recurrence. *Int J Epidemiol*. 1999, 28(4):695-700. doi: 10.1093/ije/28.4.695.
- 12 Becher N, Hein M, Danielsen CC, Uldbjerg N. Matrix metalloproteinases in the cervical mucus plug in relation to gestational age, plug compartment, and preterm labor. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010 Sep 24;8:113. doi: 10.1186/1477-7827-8-113.
- 13 Beck S, Wojdyla D, Say L, Betran AP, Merialdi M, Requejo JH, Rubens C, Menon R, Van Look PF. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic

- review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Health Organ.* 2010 Jan;88(1):31-8. doi: 10.2471/BLT.08.062554. Epub 2009 Sep 25. PMID: 20428351; PMCID: PMC2802437.
- 14 Behrman RE, Butler AS. Institute of Medicine (US) Committee on Understanding Premature Birth and Assuring Healthy Outcomes. *Preterm Birth: Causes, Consequences, and Prevention.* Washington (DC): National Academies Press (US); 2007. PMID: 20669423.
 - 15 Bitner A, Kalinka J. IL-1 β , IL-6 promoter, TNF- α promoter and IL-1RA gene polymorphisms and the risk of preterm delivery due to preterm premature rupture of membranes in a population of Polish women. *Arch Med Sci.* 2010 Aug 30;6(4):552-7. doi: 10.5114/aoms.2010.14467.
 - 16 Bitner A, Sobala W, Kalinka J. Association between maternal and fetal TLR4 (896A>G, 1196C>T) gene polymorphisms and the risk of pre-term birth in the Polish population. *Am J Reprod Immunol.* 2013 Mar;69(3):272-80. doi: 10.1111/aji.12068. Epub 2013 Jan 7. PMID: 23289411.
 - 17 Blencowe H, Cousens S, Chou D, et al. Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births. *Reprod Health.* 2013;10 Suppl 1(Suppl 1):S2. doi:10.1186/1742-4755-10-S1-S2
 - 18 Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, Adler A, Vera Garcia C, Rohde S, Say L, Lawn JE. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet.* 2012 Jun 9;379(9832):2162-72. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60820-4.
 - 19 Bomba-Opoń D, Wielgoś M. *Epidemiologia i etiopatogeneza.* W: Biblioteka Ginekologa praktyka. Poród przedwczesny, Gdańsk, Wydawnictwo Via Medica, 2016, 1-5.
 - 20 Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(1):55–71. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.01.003.
 - 21 Chaemsaitong P, Romero R, Docheva N, Chaiyasit N, Bhatti G, Pacora P, Hassan SS, Yeo L, Erez O. Comparison of rapid MMP-8 and interleukin-6 point-of-care tests to identify intra-amniotic inflammation/infection and impending preterm delivery in patients with preterm labor and intact membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2018 Jan;31(2):228-244. doi: 10.1080/14767058.2017.1281904. Epub 2017 Mar 1. PubMed PMID: 28081646; PubMed Central PMCID: PMC5769687.
 - 22 Chaiyasit N, Romero R, Chaemsaitong P, Docheva N, Bhatti G, Kusanovic JP, Dong Z, Yeo L, Pacora P, Hassan SS, Erez O. Clinical chorioamnionitis at term VIII: a rapid MMP-8 test for the identification of intra-amniotic inflammation. *J Perinat Med.* 2017 Jul 26;45(5):539-550. doi: 10.1515/jpm-2016-0344.
 - 23 Chaudhari BP, Plunkett J, Ratajczak CK, Shen TT, DeFranco EA, Muglia LJ. The genetics of birth timing: insights into a fundamental component of human development. *Clin Genet.* 2008 Dec;74(6):493-501. doi: 10.1111/j.1399-0004.2008.01124.x. PMID: 19037974.
 - 24 Costa CD, Teleginski A, Al-Lahham Y, Souza EM, Valdameri G, Alberton D, Rego FGM, Picheth G. Association of Polymorphism rs17576 of the Metalloproteinase 9 Gene with Gestational Diabetes in Euro-Brazilian Pregnant Women. *Clin Lab.* 2018 Apr 1;64(4):645-649. doi: 10.7754/Clin.Lab.2017.171125. PMID: 29739074.

- 25 Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;147:1–73. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.02.005.
- 26 Culpeper N, Cole A, Rowland W. The practice of physick. Londyn. George Sawbridge. 1678
- 27 Czajka R. Etiopatogeneza porodu przedwczesnego. W: Poród przedwczesny. pod red. Bręborowicz GH, Paszkowski T. Ośrodek Wydawnictw Naukowych. Poznań. 2006, 11-18.
- 28 De Clerck Y, Szpirer C, Aly MS, Cassiman JJ, Eeckhout Y, Rousseau G. The gene for tissue inhibitor of metalloproteinases-2 is localized on human chromosome arm 17q25. *Genomics.* 1992;14(3):782-784. doi:10.1016/s0888-7543(05)80186-7.
- 29 De Vos M, Nuytinck L, Verellen C, De Paepe A. Preterm premature rupture of membranes in a patient with the hypermobility type of the Ehlers-Danlos syndrome. a case report. *Fetal Diagn Ther.* 1999 Jul-Aug;14(4):244-7. doi: 10.1159/000020930. PubMed PMID: 10420050.
- 30 Demir-Weusten AY, Seval Y, Kaufmann P, Demir R, Yucel G, Huppertz B. Matrix metalloproteinases-2, -3 and -9 in human term placenta. *Acta Histochem.* 2007;109(5):403-12. doi: 10.1016/j.acthis.2007.04.001.
- 31 Draper D, McGregor J, Hall J, Jones W, Beutz M, Heine RP, Porreco R. Elevated protease activities in human amnion and chorion correlate with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1995 Nov;173(5):1506-12. doi: 10.1016/0002-9378(95)90640-1. PMID: 7503192.
- 32 Drews K, Seremak Mrozikiewicz A., Czynniki ryzyka i diagnostyka porodu przedwczesnego.W: Biblioteka Ginekologa praktyka.Poród przedwczesny, Gdańsk, Wydawnictwo Via Medica, 2016, 6-14.
- 33 Drews K, Seremak-Mrozikiewicz A, Genetyczne uwarunkowania porodu przedwczesnego. W: Poród przedwczesny. pod red. Bręborowicz GH, Paszkowski T. Ośrodek Wydawnictw Naukowych. Poznań. 2006, 19-26
- 34 Drews-Piasecka E, Seremak-Mrozikiewicz A, Barlik M, Kurzawińska G, Wolski H, Woyciechowska A, Czerny B, Drews K. The significance of TNF-alpha gene polymorphisms in preterm delivery. *Ginekol Pol.* 2014 Jun;85(6):428-34. doi: 10.17772/gp/1748. PMID: 25029807.
- 35 Dunbar, F. Emotions and Bodily Change: A Survey of Literature on Psychosomatic Interrelationships. 3rd Ed. New York: Columbia University Press. 1946
- 36 Dvornyk V, Ponomarenko I, Minyaylo O, Reshetnikov E, Churnosov M. Association of the functionally significant polymorphisms of the MMP9 gene with H. pylori-positive gastric ulcer in the Caucasian population of Central Russia. *PLoS One.*2021 Sep 7;16(9):e0257060. doi: 10.1371/journal.pone.0257060. PMID: 34492072; PMCID: PMC8423286.
- 37 Ehn NL, Cooper ME, Orr K, Shi M, Johnson MK, Caprau D, Dagle J, Steffen K, Johnson K, Marazita ML, Merrill D, Murray JC. Evaluation of fetal and maternal genetic variation in the progesterone receptor gene for contributions to preterm birth. *Pediatr Res.* 2007 Nov;62(5):630-5. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181567bfc. PMID: 17805208; PMCID: PMC2734951.
- 38 Fang X, Li H, Diao Y, Shan R, Dong J, Li H, Ma Q, Hou Y, Kong B, Cui J. Polymorphisms in the MTHFR, VDR, MMP-9 and IL- β genes and the risk of premature rupture of membranes. *Gynecol Obstet Invest.* 2010;70(3):206-14. doi: 10.1159/000318867. Epub 2010 Jul 17. PubMed PMID: 20639647.

- 39 Ferrand PE, Parry S, Sammel M, Macones GA, Kuivaniemi H, Romero R, Strauss JF 3rd. A polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with increased risk of preterm premature rupture of membranes in African Americans. *Mol Hum Reprod.* 2002 May;8(5):494-501. doi: 10.1093/molehr/8.5.494. PMID: 11994547.
- 40 Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ, LaFleur B. Interleukin-10 inhibition of gelatinases in fetal membranes: therapeutic implications in preterm premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol.* 2001 Aug;98(2):284-8. doi: 10.1016/s0029-7844(01)01441-7. PMID: 11506846.
- 41 Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Stromelysins in placental membranes and amniotic fluid with premature rupture of membranes. *Obstet Gynecol.* 1999 Sep;94(3):435-40. doi: 10.1016/s0029-7844(99)00336-1. PMID: 10472874. (a)
- 42 Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. MMP/TIMP imbalance in amniotic fluid during PROM: an indirect support for endogenous pathway to membrane rupture. *J Perinat Med.* 1999;27(5):362-8. doi: 10.1515/JPM.1999.049. PMID: 10642956. (b)
- 43 Frey HA, Stout MJ, Pearson LN, Tuuli MG, Cahill AG, Strauss JF 3rd, Gomez LM, Parry S, Allsworth JE, Macones GA. Genetic variation associated with preterm birth in African-American women. *Am J Obstet Gynecol.* 2016 Aug;215(2):235.e1-8. doi: 10.1016/j.ajog.2016.03.008. Epub 2016 Mar 12. PMID: 26979631; PMCID: PMC4967390.
- 44 Fujimoto T, Parry S, Urbanek M, Sammel M, Macones G, Kuivaniemi H, Romero R, Strauss JF 3rd. a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter influences amnion cell MMP-1 expression and risk for preterm premature rupture of the fetal membranes. *J Biol Chem.* 2002 Feb 22;277(8):6296-302. doi: 10.1074/jbc.M107865200. Epub 2001 Dec 11. PubMed PMID: 11741975.
- 45 Geng J, Huang C, Jiang S. Roles and regulation of the matrix metalloproteinase system in parturition. *Mol Reprod Dev.* 2016 Apr;83(4):276-86. doi: 10.1002/mrd.22626. Epub 2016 Mar 2.
- 46 Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 2011 Jan;278(1):16-27. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07919.x. Epub 2010 Nov 19. Review. PubMed PMID: 21087457.
- 47 Główny Urząd Statystyczny. Rocznik demograficzny 2018. <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/roczniki-statystyczne/roczniki-statystyczne/rocznik-demograficzny-2018,3,12.html>
- 48 Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet.* 2008;371(9606):75-84. doi:10.1016/S0140-6736(08)60074-4
- 49 Goldman S, Weiss A, Eyali V, Shalev E. Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and decidua, associated with labour. *Mol Hum Reprod.* 2003 Jun;9(6):367-73. doi: 10.1093/molehr/gag040. PMID: 12771238.
- 50 Goldman S, Weiss A, Shalev E. The effect of progesterone on gelatinase expression in the decidua and fetal membranes before and after contractions. *Am J Obstet Gynecol.* 2007 Nov;197(5):521.e1-7. doi: 10.1016/j.ajog.2007.03.075. PMID: 17980194.
- 51 Gomis-Rüth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W. Mechanism of

- inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature*. 1997;389 (6646):77–81
- 52 Gonçalves LF, Chaiworapongsa T, Romero R. Intrauterine infection and prematurity. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002; 8(1):3-13.
 - 53 González, J.R.; Armengol, L.; Solé, X.; Guinó, E.; Mercader, J.M.; Estivill, X.; Moreno, V. SNPassoc: An R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 2007, 23, 644–645. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm025>.
 - 54 Goodwin TM. a role for estriol in human labor, term and preterm. *Am J Obstet Gynecol*. 1999 Jan;180(1 Pt 3):S208-13. doi: 10.1016/s0002-9378(99)70702-7. Review. PubMed PMID: 9914619.
 - 55 Gravett MG, Novy MJ. Endocrine-immune interactions in pregnant non-human primates with intrauterine infection. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 1997;5(2):142–153. doi:10.1155/S1064744997000227
 - 56 Gremlich S, Nguyen D, Reymondin D, Hohlfeld P, Vial Y, Witkin SS, Gerber S. Fetal MMP2/MMP9 polymorphisms and intrauterine growth restriction risk. *J Reprod Immunol*. 2007 Jun;74(1-2):143-51. doi: 10.1016/j.jri.2007.02.001. Epub 2007 Mar 23. PMID: 17367869.
 - 57 Guoyang Luo, Morgan T, Bahtiyar MO, Snegovskikh VV, Schatz F, Kuczynski E, Funai EF, Dulay AT, Huang ST, Buhimschi CS, Buhimschi IA, Fortunato SJ, Menon R, Lockwood CJ, Norwitz ER. Single nucleotide polymorphisms in the human progesterone receptor gene and spontaneous preterm birth. *Reprod Sci*. 2008 Feb;15(2):147-55. doi: 10.1177/1933719107310990. PMID: 18276950.
 - 58 Hammani K, Blakis A, Morsette D, Bowcock A. M, Schmutte C, Henriët P, DeClerck, Y.A. Structure and characterization of the human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene. *J Biol Chem*. 1996;271(41):25498-25505.doi:10.1074/jbc.271.41.25498
 - 59 Härtel C, von Otte S, Koch J, Ahrens P, Kattner E, Segerer H, Möller J, Diedrich K, Göpel W. Polymorphisms of haemostasis genes as risk factors for preterm delivery. *Thromb Haemost*. 2005 Jul;94(1):88-92. doi: 10.1160/TH04-10-0653. PMID: 16113789.
 - 60 Hiltunen LM, Laivuori H, Rautanen A, Kaaja R, Kere J, Krusius T, Rasi V, Paunio M. Factor V Leiden as a risk factor for preterm birth--a population-based nested case-control study. *J Thromb Haemost*. 2011 Jan;9(1):71-8. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04104.x. PMID: 20946152.
 - 61 Hobel CJ, Dunkel-Schetter C, Roesch SC, Castro LC, Arora CP. Maternal plasma corticotropin-releasing hormone associated with stress at 20 weeks' gestation in pregnancies ending in preterm delivery. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1999;180(1 Pt 3):S257–S263.
 - 62 Holmgren C, Esplin MS, Hamblin S, Molenda M, Simonstein S, Silver R. Evaluation of the use of anti-TNF- α in an LPS-induced murine model., *J. Report Immunol*. 2008.
 - 63 Howson CP, Kinney MV, McDougall L, Lawn JE. March of Dimes, PMNCH, Save the Children, WHO. Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth. World Health Organization. Geneva, 2012
 - 64 Hu Z, Huo X, Lu D, Qian J, Zhou J, Chen Y, Xu L, Ma H, Zhu J, Wei Q, Shen H. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(15):5433-5439. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0311

- 65 Huang H. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances. *Sensors (Basel)*. 2018;18(10):3249. Published 2018 Sep 27. doi:10.3390/s18103249
- 66 Jones NM, Holzman C, Tian Y, Witkin SS, Genc M, Friderici K, Fisher R, Sezen D, Babula O, Jernigan KA, Chung H, Wirth J. Innate immune system gene polymorphisms in maternal and child genotype and risk of preterm delivery. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012 Mar;25(3):240-7. doi: 10.3109/14767058.2011.569614. Epub 2011 Jun 1. PMID: 21627550; PMCID: PMC4643033.
- 67 Kalinka J, Bitner A, Nieprawidłowy czas trwania ciąży. W: *Położnictwo*. Tom2. *Medycyna matczyno-płodowa*. Pod red.: Bręborowicz GH. Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL. 2012, 2, 19-38.
- 68 Kalinka J, Bitner A. Ocena związku polimorfizmów genów kodujących wybrane cytokiny z występowaniem porodu przedwczesnego w populacji kobiet polskich [Selected cytokine gene polymorphisms and the risk of preterm delivery in the population of Polish women]. *Ginekol Pol*. 2009, 80(2):111-117.
- 69 Khanprakob T, Laopaiboon M, Lumbiganon P, Sangkomkamhang US. Cyclo-oxygenase (COX) inhibitors for preventing preterm labour. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012, Issue 10. Art. No.: CD007748. DOI: 10.1002/14651858.CD007748.pub2. Accessed 02 November 2021.
- 70 Kim SM, Romero R, Lee J, Chaemsathong P, Lee MW, Chaiyasit N, Lee HJ, Yoon BH. About one-half of early spontaneous preterm deliveries can be identified by a rapid matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) bedside test at the time of mid-trimester genetic amniocentesis. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016;29(15):2414-22. doi: 10.3109/14767058.2015.1094049.
- 71 Kuć P, Laudański P, Kowalczyk O, Chyczewski L, Laudański T. Expression of selected genes in preterm premature rupture of fetal membranes. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2012 Aug;91(8):936-43. doi: 10.1111/j.1600-0412.2012.01445.x. Epub 2012 Jun 27. PMID: 22568870.
- 72 Kurzawski M, Kaczmarek M, Kłysz M, Malinowski D, Kazienko A, Kurzawa R, Drożdżik M. MMP2, MMP9 and TIMP2 polymorphisms affect sperm parameters but not fertility in Polish males. *Andrologia*. 2017 Jun;49(5). doi: 10.1111/and.12654. Epub 2016 Jul 12. PMID: 27401679.
- 73 Lal CV, Xu X, Jackson P, Atkinson TP, Faye-Petersen OM, Kandasamy J, Waites K, Biggio JR, Gaggar A, Ambalavanan N. Ureaplasma infection-mediated release of matrix metalloproteinase-9 and PGP: a novel mechanism of preterm rupture of membranes and chorioamnionitis. *Pediatr Res*. 2017, 81(1-1): 75-79. doi: 10.1038/pr.2016.176.
- 74 Lannon SM, Vanderhoeven JP, Eschenbach DA, Gravett MG, Adams Waldorf KM. Synergy and interactions among biological pathways leading to preterm premature rupture of membranes. *Reprod Sci*. 2014;21(10):1215–1227. doi:10.1177/1933719114534535
- 75 Lathouras K, Saso S, Tzafetas M, Kalinderi K, Fidani S, Zournatzi V, Kyrgiou M, Fotopoulou C, Ghaem-Maghami S, Tzafetas I. Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases 1-3 and their inhibitor are not associated with premature labor. *Future Sci OA*. 2018 Aug 24;4(9):FSO332. doi: 10.4155/fsoa-2018-0047.
- 76 Lee HJ, Lee GH, Nah S, et al. Association of TIMP-4 gene polymorphism with the risk of osteoarthritis in the Korean population. *Rheumatol Int*. 2008;28(9):845-850. doi:10.1007/s00296-008-0545-4

- 77 Lee SM, Park KH, Jung EY, Cho SH, Ryu A. Prediction of spontaneous preterm birth in women with cervical insufficiency: Comprehensive analysis of multiple proteins in amniotic fluid. *J Obstet Gynaecol Res.* 2016, 42(7): 776-783. doi: 10.1111/jog.12976.
- 78 Leifler KS, Svensson S, Abrahamsson A, Bendrik C, Robertson J, Gauldie J, Olsson AK, Dabrosin C. Inflammation induced by MMP-9 enhances tumor regression of experimental breast cancer. *J Immunol.* 2013 Apr 15;190(8):4420-30. doi: 10.4049/jimmunol.1202610.
- 79 Leszczyńska-Gorzelak B, Poniedziałek-Czajkowska E, Oleszczuk J. Czynniki ryzyka przedwczesnego zakończenia ciąży. W: *Poród przedwczesny*. pod red. Bręborowicz GH, Paszkowski T. Ośrodek Wydawnictw Naukowych. Poznań. 2006, 27-37.
- 80 Li L, Liu J, Qin S, Li R. The association of polymorphisms in promoter region of MMP2 and MMP9 with recurrent spontaneous abortion risk in Chinese population. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(40):e12561. doi:10.1097/MD.00000000000012561
- 81 Li S, Zhang M, Tian H, Liu Z, Yin X, Xi B. Preterm birth and risk of type 1 and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2014 Oct;15(10):804-11. doi: 10.1111/obr.12214.
- 82 Liang M, Wang X, Li J, Yang F, Fang Z, Wang L, et al. Association of combined maternal-fetal TNF-alpha gene G308A genotypes with barfield delivery: a gene-gene interaction study. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:396184. Return to ref 110 in article
- 83 Lipka D, Boratyński J, Metaloproteinazy MMP. Struktura i funkcja. *Postepy Hig Med Dosw.* (online), 2008; 62: 328-336
- 84 Litwiniuk M, Radowicka M, Krejner A, Wielgoś M, Grzela T. The MMP-9/TIMP-1 imbalance and the reduced level of TGF- β in the cervical area of amniotic membrane is a possible risk factor of PROM and premature labor - proof-of-concept study. *Ginekol Pol.* 2017;88(7):379-384. doi:10.5603/GP.a2017.0071
- 85 Lorente L, Martín M, Plasencia F, Solé-Violán J, Blanquer J, Labarta L, Díaz C, Borreguero-León JM, Jiménez A, Páramo JA, Orbe J, Rodríguez JA, Salido E. The 372 T/C genetic polymorphism of TIMP-1 is associated with serum levels of TIMP-1 and survival in patients with severe sepsis. *Crit Care.* 2013 May 25;17(3):R94. doi: 10.1186/cc12739. PMID: 23706069; PMCID: PMC3706773.
- 86 Loudon JA, Sooranna SR, Bennett PR, Johnson MR. Mechanical stretch of human uterine smooth muscle cells increases IL-8 mRNA expression and peptide synthesis. *Molecular Human Reproduction.* 2004;10:895–899.
- 87 Löffek S., Schilling O., Franzke C-W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance *European Respiratory Journal* 2011 38: 191-208; DOI: 10.1183/09031936.00146510
- 88 Macones GA, Parry S, Elkousy M, Clothier B, Ural SH, Strauss JF 3rd. A polymorphism in the promoter region of TNF and bacterial vaginosis: preliminary evidence of gene-environment interaction in the etiology of spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2004 Jun;190(6):1504-8; discussion 3A. doi: 10.1016/j.ajog.2004.01.001. PMID: 15284722.
- 89 Mahmood AK, Moen A, Stafne SN, Robinson HS, Vøllestad NK, Salvesen KÅ, Mørkved S, Gjerstad J. The MMP9 rs17576 A>G polymorphism is associated with increased lumbopelvic pain-intensity in pregnant women. *Scand J Pain.* 2018 Jan 26;18(1):93-98. doi: 10.1515/sjpain-2017-0168. PMID: 29794283.

- 90 Malak TM1, Bell SC. Structural characteristics of term human fetal membranes: a novel zone of extreme morphological alteration within the rupture site. *Br J Obstet Gynaecol.* 1994 May;101(5):375-86.
- 91 Mano Y, Shibata K, Sumigama S, Hayakawa H, Ino K, Yamamoto E, Kajiyama H, Nawa A, Kikkawa F. Tocilizumab inhibits interleukin-6-mediated matrix metalloproteinase-2 and -9 secretions from human amnion cells in preterm premature rupture of membranes. *Gynecol Obstet Invest.* 2009;68(3):145-53. doi: 10.1159/000229021. Epub 2009 Jul 24. PMID: 19628948.
- 92 Manuck TA, Major HD, Varner MW, Chettier R, Nelson L, Esplin MS. Progesterone receptor genotype, family history, and spontaneous preterm birth. *Obstet Gynecol.* 2010 Apr;115(4):765-770. doi: 10.1097/AOG.0b013e3181d53b83. PMID: 20308837.
- 93 Martin JA, Hamilton BE, Osterman MJK. Births in the United States, 2018. *NCHS Data Brief.* 2019 Jul;(346):1-8.
- 94 Maymon E, Romero R, Pacora P, Gervasi MT, Bianco K, Ghezzi F, Yoon BH. Evidence for the participation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2000 Oct;183(4):914-20. doi: 10.1067/mob.2000.108879. PMID: 11035337.
- 95 McLean M, Bisits A, Davies J, Woods R, Lowry P, Smith R. a placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nat Med.* 1995, 1(5):460-3. doi: 10.1038/nm0595-460.
- 96 Menon R, McIntyre JO, Matrisian LM, Fortunato SJ. Salivary proteinase activity: a potential biomarker for preterm premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Jun;194(6):1609-15; discussion 1615. doi: 10.1016/j.ajog.2006.02.052.
- 97 Monangi NK, Brockway HM, House M, Zhang G, Muglia LJ. The genetics of preterm birth: Progress and promise. *Semin Perinatol.* 2015 Dec;39(8):574-83. doi: 10.1053/j.semperi.2015.09.005. Epub 2015 Oct 14. PMID: 26459968.
- 98 Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med.* 2008;29(5):290–308. doi:10.1016/j.mam.2008.05.002
- 99 Murphy G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol.* 2011;12(11):233. Published 2011 Nov 11. doi:10.1186/gb-2011-12-11-233
- 100 National Cancer Institute. Welcome to LD link. <https://analysistools.nci.nih.gov/LDlink/>. Data dostępu 20 września 2021.
- 101 Nehring P, Gromadzka G, Giermaziak A, Jastrzębski M, Przybyłkowski A. Genetic variants of tissue inhibitors of matrix metalloproteinase 1 (rs4898) and 2 (rs8179090) in diverticulosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2021 Mar 12. doi: 10.1097/MEG.0000000000002122. Epub ahead of print. PMID: 33731593.
- 102 Nelson KK, Subbaram S, Connor KM, Dasgupta J, Ha XF, Meng TC, Tonks NK, Melendez JA. Redox-dependent matrix metalloproteinase-1 expression is regulated by JNK through Ets and AP-1 promoter motifs. *J Biol Chem.* 2006 May 19;281(20):14100-10. Epub 2006 Mar 28.
- 103 Nien JK, Yoon BH, Espinoza J, Kusanovic JP, Erez O, Soto E, Richani K, Gomez R, Hassan S, Mazor M, Edwin S, Bahado-Singh R, Romero R. A rapid MMP-8 bedside test for the detection of intra-amniotic inflammation identifies patients at risk for imminent preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2006 Oct;195(4):1025-30. doi: 10.1016/j.ajog.2006.06.054. PMID: 17000236.
- 104 Olszyński K, Zimowska M. Budowa i funkcja metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej. *Postępy Biochemii* 55 (1) 2009

- 105 Pandey M, Awasthi S, Baranwal S. IL-6: An endogenous activator of MMP-9 in preterm birth. *J Reprod Immunol.* 2020 Sep;141:103147. doi: 10.1016/j.jri.2020.103147. Epub 2020 Jun 3. PMID: 32574873. (a)
- 106 Pandey M, Awasthi S. Role of MMP-1, MMP-8 and MMP-9 gene polymorphisms in preterm birth. *J Genet.* 2020;99:2. PMID: 32089521. (b)
- 107 Pandey M, Chauhan M, Awasthi S. Interplay of cytokines in preterm birth. *Indian J Med Res.* 2017;146(3):316–327. doi:10.4103/ijmr.IJMR_1624_14
- 108 Park H, Hong S, Yoo HN, Kim YM, Lee SJ, Park KH. The Identification of Immune-Related Plasma Proteins Associated with Spontaneous Preterm Delivery and Intra-Amniotic Infection in Women with Premature Cervical Dilation or an Asymptomatic Short Cervix. *J Korean Med Sci.* 2020 Feb 24;35(7):e26. doi: 10.3346/jkms.2020.35.e26. PMID: 32080985; PMCID: PMC7036344.
- 109 Park H, Park KH, Kim YM, Kook SY, Jeon SJ, Yoo HN. Plasma inflammatory and immune proteins as predictors of intra-amniotic infection and spontaneous preterm delivery in women with preterm labor: a retrospective study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2018 May 9;18(1):146. doi: 10.1186/s12884-018-1780-7. PMID: 29743041; PMCID: PMC5944139.
- 110 Park KH, Chaiworapongsa T, Kim YM, Espinoza J, Yoshimatsu J, Edwin S, Gomez R, Yoon BH, Romero R. Matrix metalloproteinase 3 in parturition, premature rupture of the membranes, and microbial invasion of the amniotic cavity. *J Perinat Med.* 2003;31(1):12-22. doi: 10.1515/JPM.2003.002. PMID: 12661139.
- 111 Perez N, Pleša I, Peterlin A, Jan Ž, Tul N, Kapović M, Ostojić S, Peterlin B. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinases 1 and 9 genes in women with spontaneous preterm birth. *Dis Markers.* 2014;2014:171036. doi: 10.1155/2014/171036. Epub 2014 Oct 28. PMID: 25530657; PMCID: PMC4228702.
- 112 Plunkett J, Muglia LJ. Genetic contributions to preterm birth: implications from epidemiological and genetic association studies. *Ann Med.* 2008;40(3):167-95. doi: 10.1080/07853890701806181. PMID: 18382883.
- 113 Poisner AM. The human placental renin-angiotensin system. *Front Neuroendocrinol* 1998;19:232–52.
- 114 Poon LC, Nekrasova E, Anastassopoulos P, Livanos P, Nicolaides KH. First-trimester maternal serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and adverse pregnancy outcome. *Prenat Diagn.* 2009 Jun;29(6):553-9. doi: 10.1002/pd.2234. PMID: 19242924
- 115 Porter TF, Fraser AM, Hunter CY, Ward RH, Varner MW. The risk of preterm birth across generations. *Obstet Gynecol.* 1997 Jul;90(1):63-7. doi: 10.1016/S0029-7844(97)00215-9. PubMed PMID: 9207815.
- 116 Preda A, Caracostea G, Ona D, Zaharie G, Stamatian F. Association between maternal/newborn genetic variants, placental pathology and spontaneous preterm birth risk: a Romanian population-based study. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2020 Apr;33(7):1171-1177. doi: 10.1080/14767058.2018.1517311. Epub 2018 Sep 25. PMID: 30249138.
- 117 Preterm Birth: Causes, Consequences, and Prevention. 2007;. doi: 10.17226/11622. Review. PubMed PMID: 20669423.
- 118 Price SJ, Greaves DR, Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele-

- specific transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2001 Mar 9;276(10):7549-58. doi: 10.1074/jbc.M010242200. Epub 2000 Dec 12. PubMed PMID: 11114309.
- 119 Purisch SE, Gyamfi-Bannerman C. Epidemiology of preterm birth. *Semin Perinatol*. 2017 Nov;41(7):387-391. doi: 10.1053/j.semperi.2017.07.009.
 - 120 R Core Team R. A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2021. <https://www.R-project.org/>.
 - 121 Rocznik Demograficzny. Główny Urząd Statystyczny, Warszawa 2019.
 - 122 Romero R, Chaiworapongsa T, Espinoza J, Gomez R, Yoon BH, Edwin S, Mazor M, Maymon E, Berry S. Fetal plasma MMP-9 concentrations are elevated in preterm premature rupture of the membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2002 Nov;187(5):1125-30. doi: 10.1067/mob.2002.127312. PMID: 12439489.
 - 123 Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science*. 2014, 345(6198):760-5. doi: 10.1126/science.1251816.
 - 124 Romero R, Espinoza J, Erez O, Hassan S. The role of cervical cerclage in obstetric practice: can the patient who could benefit from this procedure be identified?. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194(1):1-9. doi:10.1016/j.ajog.2005.12.002. (a)
 - 125 Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, Chaiworapongsa T, Mazor M. The preterm parturition syndrome. *BJOG*. 2006, 113(3):17-42. doi: 10.1111/j.1471-0528.2006.01120.x. (b)
 - 126 Romero R, Friel LA, Velez Edwards DR, Kusanovic JP, Hassan SS, Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E, Kim CJ, Erez O, Chaiworapongsa T, Pearce BD, Bartlett J, Salisbury BA, Anant MK, Vovis GF, Lee MS, Gomez R, Behnke E, Oyarzun E, Tromp G, Williams SM, Menon R. A genetic association study of maternal and fetal candidate genes that predispose to preterm prelabor rupture of membranes (PROM). *Am J Obstet Gynecol*. 2010 Oct;203(4):361.e1-361.e30. doi: 10.1016/j.ajog.2010.05.026. Epub 2010 Jul 31. PMID: 20673868; PMCID: PMC2989662. (a)
 - 127 Romero R, Velez Edwards DR, Kusanovic JP, Hassan SS, Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E, Kim CJ, Chaiworapongsa T, Pearce BD, Friel LA, Bartlett J, Anant MK, Salisbury BA, Vovis GF, Lee MS, Gomez R, Behnke E, Oyarzun E, Tromp G, Williams SM, Menon R. Identification of fetal and maternal single nucleotide polymorphisms in candidate genes that predispose to spontaneous preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2010 May;202(5):431.e1-34. doi: 10.1016/j.ajog.2010.03.026. (b)
 - 128 Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(31):5287-5297. doi:10.1200/JCO.2009.23.5556
 - 129 Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, Brinckerhoff CE. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res*. 1998, 1;58(23):5321-5325.
 - 130 Saare M, Lamp M, Kaart T, Karro H, Kadastik Ü, Metspalu A, Peters M, Salumets A. Polymorphisms in MMP-2 and MMP-9 promoter regions are associated with endometriosis. *Fertil Steril*. 2010 Sep;94(4):1560-1563. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.12.024. Epub 2010 Jan 25. PMID: 20100617.
 - 131 Saigal S, Doyle LW. An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. *Lancet*. 2008, 371(9608):261-269. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60136-1.

- 132 Sakowicz A, Lisowska M, Biesiada L, Rybak-Krzyszkowska M, Gach A, Sakowicz B, Grzesiak M, Huras H, Pietrucha T. Association of Maternal and Fetal Single-Nucleotide Polymorphisms in Metalloproteinase (*MMP1*, *MMP2*, *MMP3*, and *MMP9*) Genes with Preeclampsia. *Dis Markers*. 2018 Feb 18;2018:1371425. doi: 10.1155/2018/1371425. PMID: 29670668; PMCID: PMC5835279.
- 133 Sheikh IA, Ahmad E, Jamal MS, Rehan M, Assidi M, Tayubi IA, AlBasri SF, Bajouh OS, Turki RF, Abuzenadah AM, Damanhour GA, Beg MA, Al-Qahtani M. Spontaneous preterm birth and single nucleotide gene polymorphisms: a recent update. *BMC Genomics*. 2016 Oct 17;17(Suppl 9):759. doi: 10.1186/s12864-016-3089-0. PMID: 27766960; PMCID: PMC5073925.
- 134 Shiomi, T., Lemaître, V., D'Armiento, J. and Okada, Y. (2010), Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathology International*, 60: 477-496. doi:10.1111/j.1440-1827.2010.02547.x
- 135 Sisti G, Paccosi S, Parenti A, Seravalli V, Linari C, Di Tommaso M, Witkin S. Pro-inflammatory mediators in vaginal fluid and short cervical length in pregnancy. *Bratisl Lek Listy*. 2020;121(4):278-281. doi: 10.4149/BLL_2020_042. PMID: 32356442.
- 136 Skorupski P, Miotła P, Jankiewicz K, Rechberger T. Polimorfizm genów kodujących MMP-1 oraz MMP-3 a ryzyko wystąpienia wysiłkowego nietrzymania moczu i zaburzeń statyki dna miednicy mniejszej [MMP-1 and MMP-3 gene encoding polymorphism and the risk of the development of pelvic organ prolapse and stress urinary incontinence]. *Ginekol Pol*. 2010 Aug;81(8):594-9. Polish. PMID: 20873121.
- 137 Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol*. 2003 Jul;200(4):448-64. doi: 10.1002/path.1400. Review. PubMed PMID: 12845612
- 138 Strauss JF 3rd. Extracellular matrix dynamics and fetal membrane rupture. *Reprod Sci*. 2013;20(2):140-153. doi:10.1177/1933719111424454
- 139 Stygar D, Wang H, Vladic YS, Ekman G, Eriksson H, Sahlin L. Increased level of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the ripening process of the human cervix. *Biol Reprod*. 2002 Sep;67(3):889-94. doi: 10.1095/biolreprod.102.005116. PMID: 12193399.
- 140 Sundrani D, Narang A, Mehendale S, Joshi S, Chavan-Gautam P. Investigating the expression of MMPs and TIMPs in preterm placenta and role of CpG methylation in regulating MMP-9 expression. *IUBMB Life*. 2017 Dec;69(12):985-993. doi: 10.1002/iub.1687. Epub 2017 Nov 11. PMID: 29130646.
- 141 Sundrani DP, Chavan-Gautam PM, Pisal HR, Mehendale SS, Joshi SR. Matrix metalloproteinase-1 and -9 in human placenta during spontaneous vaginal delivery and caesarean sectioning in preterm pregnancy. *PLoS One*. 2012;7(1):e29855. doi: 10.1371/journal.pone.0029855. Epub 2012 Jan 12. PMID: 22253805; PMCID: PMC3257231.
- 142 Sundrani, D., Chavan-Gautam, P., Pisal, H., Mehendale, S., & Joshi, S. (2013). Matrix metalloproteinases-2, -3 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2 in placentas from preterm pregnancies and their association with one-carbon metabolites, *REPRODUCTION*, 145(4), 401-410. Retrieved Aug 30, 2021, from <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/145/4/401.xml>

- 143 Tacheva T, Chelenkova P, Dimov D, Petkova R, Chakarov S, Vlaykova T. Frequency of the common promoter polymorphism MMP2 -1306 C>T in a population from central Bulgaria. *Biotechnol Equip.* 2015;29(2):351–356. doi:10.1080/13102818.2014.995411
- 144 Tchirikov M, Schlabritz-Loutsevitch N, Maher J, Buchmann J, Naberezhnev Y, Winarno AS, Seliger G. Mid-trimester preterm premature rupture of membranes (PPROM): etiology, diagnosis, classification, international recommendations of treatment options and outcome. *J Perinat Med.* 2018 Jul 26;46(5):465-488. doi: 10.1515/jpm-2017-0027. PMID: 28710882.
- 145 Tency I, Verstraelen H, Kroes I, Holtappels G, Verhasselt B, Vaneechoutte M, Verhelst R, Temmerman M. Imbalances between matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in maternal serum during preterm labor. *PLoS One.* 2012;7(11):e49042. doi: 10.1371/journal.pone.0049042. Epub 2012 Nov 8. PubMed PMID: 23145060; PubMed Central PMCID: PMC3493509.
- 146 Timmons B, Akins M, Mahendroo M. Cervical remodeling during pregnancy and parturition. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(6):353-361. doi:10.1016/j.tem.2010.01.011
- 147 Tobin KA, Holven KB, Retterstøl K, Strøm E, Ose L, Aukrust P & Nenseter MS 2009 Cystatin C levels in plasma and peripheral blood mononuclear cells among hyperhomocysteinaemic subjects: effect of treatment with B-vitamins. *British Journal of Nutrition* 102 1783–1789. (doi:10.1017/S0007114509991048)
- 148 Trojanek J, Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej i ich tkankowe inhibitory. *Postępy Biochemii* 58 (3) 2012
- 149 Tu FF, Goldenberg RL, Tamura T, Drews M, Zucker SJ, Voss HF. Prenatal plasma matrix metalloproteinase-9 levels to predict spontaneous preterm birth. *Obstet Gynecol.* 1998 Sep;92(3):446-9. doi: 10.1016/s0029-7844(98)00222-1. PMID: 9721787.
- 150 Uchide K, Ueno H, Inoue M, Sakai A, Fujimoto N, Okada Y. Matrix metalloproteinase-9 and tensile strength of fetal membranes in uncomplicated labor. *Obstet Gynecol.* 2000 Jun;95(6 Pt 1):851-5. doi: 10.1016/s0029-7844(00)00811-5. PMID: 10831980.
- 151 Uldbjerg N, Ekman G, Malmström A, Olsson K, Ulmsten U. Ripening of the human uterine cervix related to changes in collagen, glycosaminoglycans, and collagenolytic activity. *Am J Obstet Gynecol.* 1983 Nov 15;147(6):662-6. doi: 10.1016/0002-9378(83)90446-5. PMID: 6638110.
- 152 Vadillo-Ortega F, Estrada-Gutiérrez G. Role of matrix metalloproteinases in preterm labour. *BJOG.* 2005 Mar;112 Suppl 1:19-22. doi: 10.1111/j.1471-0528.2005.00579.x. Review. PubMed PMID: 15715589.
- 153 Varner MW, Esplin MS. Current understanding of genetic factors in preterm birth. *BJOG.* 2005 Mar;112 Suppl 1:28-31. doi: 10.1111/j.1471-0528.2005.00581.x. Review. PubMed PMID: 15715591.
- 154 Velez DR, Fortunato S, Thorsen P, Lombardi SJ, Williams SM, Menon R. Spontaneous preterm birth in African Americans is associated with infection and inflammatory response gene variants. *Am J Obstet Gynecol.* 2009 Feb;200(2):209.e1-27. doi: 10.1016/j.ajog.2008.08.051. Epub 2008 Nov 18. PMID: 19019335; PMCID: PMC4829203.
- 155 Velez DR, Fortunato SJ, Williams SM, Menon R. Interleukin-6 (IL-6) and receptor (IL6-R) gene haplotypes associate with amniotic fluid protein

- concentrations in preterm birth. *Hum Mol Genet.* 2008;17:1619–30. Return to ref 99 in article
- 156 Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Signal transduction and cell-type specific regulation of matrix metalloproteinase gene expression: can MMPs be good for you?. *J Cell Physiol.* 2007 Nov;213(2):355-64. doi: 10.1002/jcp.21208. Review. PubMed PMID: 17654499.
 - 157 Vink J, Davis G, Zork N, Yoshida K, Jiang H, Cremers S, Ananth C, Kitajewski J, Wapner R, Myers K. (2015). 816: Nonpregnant women with previous premature cervical remodeling have weaker cervical collagen crosslink maturity ratios. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 212. S393. 10.1016/j.ajog.2014.10.1022.
 - 158 Vynios, DH. TIMP2 (TIMP metalloproteinase inhibitor 2). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2009;13(3):229-231.
 - 159 Wang H, Ogawa M, Wood JR, Bartolomei MS, Sammel MD, Kusanovic JP, Walsh SW, Romero R, Strauss JF 3rd. Genetic and epigenetic mechanisms combine to control MMP1 expression and its association with preterm premature rupture of membranes. *Hum Mol Genet.* 2008 Apr 15;17(8):1087-96. doi: 10.1093/hmg/ddm381. Epub 2008 Jan 4. PMID: 18178580.
 - 160 Wang H, Parry S, Macones G, Sammel MD, Ferrand PE, Kuivaniemi H, Tromp G, Halder I, Shriver MD, Romero R, Strauss JF 3rd. Functionally significant SNP MMP8 promoter haplotypes and preterm premature rupture of membranes (PPROM). *Hum Mol Genet.* 2004 Nov 1;13(21):2659-69. doi: 10.1093/hmg/ddh287. Epub 2004 Sep 14. PMID: 15367487.
 - 161 Wang HL, Zhou C, Zhang YZ. Role of matrix metalloproteinase-2,9 and their inhibitors in premature rupture of membranes. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2005 Jan;40(1):29-33. Chinese. PMID: 15774089.
 - 162 Ward K, Argyle V, Meade M, Nelson L. The heritability of preterm delivery. *Obstet Gynecol.* 2005 Dec;106(6):1235-9. doi: 10.1097/01.AOG.0000189091.35982.85. PubMed PMID: 16319246
 - 163 Weinberg CR, Shi M. The genetics of preterm birth: using what we know to design better association studies. *Am J Epidemiol.* 2009 Dec 1;170(11):1373-81. doi: 10.1093/aje/kwp325. Epub 2009 Oct 23. PubMed PMID: 19854804; PubMed Central PMCID: PMC2800265.
 - 164 Winkvist A, Mogren I, Högberg U. Familial patterns in birth characteristics: impact on individual and population risks. *Int J Epidemiol.* 1998 Apr;27(2):248-54. doi: 10.1093/ije/27.2.248. PubMed PMID: 9602406.
 - 165 Wu H, Zhu P, Geng X, Liu Z, Cui L, Gao Z, Jiang B, Yang L. Genetic polymorphism of MTHFR C677T with preterm birth and low birth weight susceptibility: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet.* 2017 May;295(5):1105-1118. doi: 10.1007/s00404-017-4322-z. Epub 2017 Mar 10. PMID: 28283826.
 - 166 Wu W, Clark EA, Stoddard GJ, Watkins WS, Esplin MS, Manuck TA, Xing J, Varner MW, Jorde LB. Effect of interleukin-6 polymorphism on risk of preterm birth within population strata: a meta-analysis. *BMC Genet.* 2013 Apr 25;14:30. doi: 10.1186/1471-2156-14-30. PMID: 23617681; PMCID: PMC3639799.
 - 167 Xu P, Alfaidy N, Challis JR. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in human placenta and fetal membranes in relation to preterm and term labor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Mar;87(3):1353-61. doi: 10.1210/jcem.87.3.8320. PMID: 11889208.

- 168 Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)*. 2013;28(6):391–403. doi:10.1152/physiol.00029.2013
- 169 Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol*. 2007 Apr;211(1):19-26. doi: 10.1002/jcp.20948. Review. PubMed PMID: 17167774.
- 170 Yoo HN, Park KH, Jung EY, Kim YM, Kook SY, Jeon SJ. Non-invasive prediction of preterm birth in women with cervical insufficiency or an asymptomatic short cervix (≤ 25 mm) by measurement of biomarkers in the cervicovaginal fluid. *PLoS One*. 2017 Jul 10;12(7):e0180878. doi: 10.1371/journal.pone.0180878. PMID: 28700733; PMCID: PMC5507270.
- 171 Zeitlin J, Szamotulska K, Drewniak N, Mohangoo AD, Chalmers J, Sakkeus L, Irgens L, Gatt M, Gissler M, Blondel B; Euro-Peristat Preterm Study Group. Preterm birth time trends in Europe: a study of 19 countries. *BJOG*. 2013 Oct;120(11):1356-65. doi: 10.1111/1471-0528.12281. Epub 2013 May 24. PMID: 23700966; PMCID: PMC4285908.
- 172 Zhang G, Srivastava A, Bacelis J, Juodakis J, Jacobsson B, Muglia LJ. Genetic studies of gestational duration and preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018 Oct;52:33-47. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2018.05.003. Epub 2018 Jun 15. PMID: 30007778; PMCID: PMC6290110.
- 173 Zhang J, Salamonsen LA. In vivo evidence for active matrix metalloproteinases in human endometrium supports their role in tissue breakdown at menstruation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 May;87(5):2346-51. doi: 10.1210/jcem.87.5.8487. PMID: 11994386.
- 174 Zhu Y, Spitz MR, Lei L, Mills GB, Wu X. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances lung cancer susceptibility. *Cancer Res*. 2001;61(21):7825-7829.
- 175 Zuo G, Dong JX, Zhao FF, Chen Y. Expression of matrix metalloproteinase-9 and its substrate level in patients with premature rupture of membranes. *J Obstet Gynaecol*. 2017 May;37(4):441-445. doi: 10.1080/01443615.2016.1250734. Epub 2017 Feb 21. PMID: 28421903.

8. STRESZCZENIE

Wstęp: Poród przedwczesny (PTD - *preterm delivery*) jest jednym z najistotniejszych wyzwań medycyny XXI wieku. Pomimo ciągłego postępu wiedzy, problem ten nadal dotyczy dużej grupy społecznej. Wcześnieństwo ma swoje poważne konsekwencje zarówno w okresie noworodkowym jak i w późniejszych etapach życia. W ostatnich latach badania dotyczące etiologii porodu przedwczesnego szczególnie skupiają się na jego genetycznych aspektach. Pod uwagę bierze się udział metaloproteinaz (MMPs) i ich tkankowych inhibitorów (TIMPs), które odpowiadają za przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej.

Cel pracy: Celem badania była próba oceny znaczenia wybranych polimorfizmów genów układu metaloproteinaz oraz ich inhibitorów tkankowych w etiologii porodu przedwczesnego w populacji polskich kobiet. Analizie poddane zostały następujące polimorfizmy: **MMP1** (rs1799750) -1607 1G/2G, **MMP9** (rs17576) 836A>G, (rs17577) 2003G>A, **TIMP1** (rs4898) 372C>T, **TIMP2** (rs2277698) 303C>T, (rs55743137) T>G.

W grupie badanej oraz w grupie kontrolnej badano następujące zależności:

1. Parametry kliniczne kobiet ciężarnych i noworodków z badanych grup
2. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmów *MMPs* oraz *TIMPs* w
3. grupie badanej i kontrolnej
4. Asocjacje poszczególnych polimorfizmów w zależności od czasu trwania ciąży u kobiet rodzących przedwcześnie, z podziałem na podgrupy: 22-27+6 tc., 28-31+6 tc., 32-36+6tc.
5. Częstość występowania haplotypów wybranych polimorfizmów
6. Współwystępowanie badanych polimorfizmów genetycznych
7. Analizę związku badanych wariantów genetycznych z parametrami klinicznymi

Materiał i metody: W badaniach uczestniczyło 240 kobiet ciężarnych z populacji polskiej. Do grupy badanej włączono 120 kobiet rodzących w przedziale 22-36+6 tc. natomiast do grupy kontrolnej zakwalifikowano 120 ciężarnych, które urodziły między 37-41+6 tc. W grupie pacjentek z PTD dokonano podziału na trzy podgrupy w zależności od czasu trwania ciąży: pacjentki rodzące skrajnie przedwcześnie (**EPTD** - *extremely preterm delivery*) <28 tc., bardzo przedwcześnie (**VPTD** - *very preterm*

delivery) 28-31+6 tc. oraz umiarkowanie przedwcześnie (**MPTD** - *moderately preterm delivery*) 32-36+6 tc.

U wszystkich pacjentek zakwalifikowanych do badania odnotowywano wiek pacjentki, wiek ciążowy i tydzień zakończenia ciąży, wzrost i masę ciała przed ciążą, jak również pod koniec ciąży, wartości ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego. Analizowano również sposób ukończenia ciąży oraz parametry stanu urodzeniowego noworodka. Ocenę wariantów genetycznych przeprowadzono w Pracowni Biologii Molekularnej w Klinice Perinatologii i Chorób Kobiety Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Do analizy badanych polimorfizmów zastosowano metodę reakcji łańcuchowej polimerazy oraz polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych. Analizę haplotypów przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Haploview w wersji 4.2. Obliczenia statystyczne wykonywano przy użyciu programu R, wersja 4.1.1

Wyniki: Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów u kobiet z porodem przedwczesnym oraz w grupie kontrolnej

Dla polimorfizmu rs1799750 genu *MMP1*, rs17576 oraz rs17577 genu *MMP9*, rs4898 genu *TIMP1*, rs55743137 genu *TIMP2* nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w częstości występowania genotypów i alleli pomiędzy grupą badaną PTD a grupą kontrolną. Analizując częstość występowania alleli polimorfizmu rs2277698 genu *TIMP2* w badanych grupach stwierdzono, że obecność allela *T* zmniejsza prawie o połowę ryzyko występowania porodu przedwczesnego: OR=0,53, 95%PU=0,29-0,97, $p=0,0360$.

Po dokonaniu podziału grupy badanej PTD na podgrupy w zależności od czasu zakończenia ciąży, w przypadku polimorfizmu rs55743137, genotyp *TT* najczęściej występował w grupie EPTD+VPTD (82,6%) natomiast w grupie MPTD u 76,3% i kontrolnej 68,3%. W modelu kodominującym różnice statystycznie istotne uzyskano porównując grupę EPTD+VPTD zarówno z grupą MPTD ($p=0,0160$) jak i kontrolną ($p=0,0118$). Różnice obserwowano również w modelu recesywnym (grupa EPTD+VPTD vs. MPTD $p=0,0465$, EPTD+VPTD vs. kontrola $p=0,0354$).

Analiza nierównowagi sprzężeń i częstości występowania haplotypów analizowanych wariantów genów *MMP9* oraz *TIMP2*

Porównując częstości występowania haplotypów genu *MMP9* w grupach badanej i kontrolnej nie wykazano ich związku z ryzykiem występowania porodu przedwczesnego. Stwierdzono z kolei istotną różnicę w rozkładzie częstości haplotypu *CT* genu *TIMP2*, zawierającego oba niezmutowane allele, który występował częściej w grupie pacjentek z PTD (87,9% vs. 81,2% w grupie kontrolnej, $p=0,043$, $p_{\text{corr}}=0,088$).

Związek częstości współwystępowania genotypów badanych wariantów genetycznych z porodem przedwczesnym

W zakresie częstości współwystępowania genotypów najciekawszy wynik otrzymano analizując interakcję *TIMP1* rs4898 i *MMP9* rs17576. Ryzyko urodzenia przedwcześnie wzrasta ponad dwukrotnie u pacjentek z genotypami *AG/CC* (13,3 vs. 7,5%, $OR=2,22$, $p=0,177$) i *AA/TT* (11,7 vs. 5,8%, $OR=2,50$, $p=0,153$) i ponad sześciokrotnie gdy oba omawiane warianty genów *MMP9* i *TIMP1* zawierają zmutowane allele: *GG/TT* (4,2 vs. 0,8%, $OR=6,25$, $p=0,175$) w porównaniu do współwystępowania genotypów *AA/CC*.

Asocjacja danych klinicznych matek i ich noworodków z badanymi wariantami polimorficznymi

W grupie kobiet z porodem przedwczesnym zaobserwowano asocjację obydwu badanych polimorfizmów genu *TIMP2* z tygodniem zakończenia ciąży w modelu kodominującym (dla rs2277698 $p=0,0136$, a dla rs55743137 $p=0,0033$) i recesywnym (rs2277698 $p=0,0038$, rs55743137 $p=0,0009$) oraz masą noworodka w modelu kodominującym (rs2277698 $p=0,0576$, rs55743137 $p=0,0022$) i recesywnym (rs2277698 $p=0,0167$, rs55743137 $p=0,0008$).

Wnioski:

1. Analiza genotypów oraz alleli polimorfizmów rs1799750 *MMP1*, rs17576 i rs17577 *MMP9*, rs4898 *TIMP1* oraz rs55743137 *TIMP2* sugeruje brak bezpośredniego związku tych wariantów genetycznych z występowaniem porodu przedwczesnego.
2. Przewaga występowania zmutowanego allele *T* polimorfizmu rs2277698 genu *TIMP2* w grupie kontrolnej sugeruje jego ochronny wpływ na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego.

3. Obserwowane częstsze występowanie haplotypu *CT* (rs2277698/rs55743137) genu *TIMP2* w grupie badanej z PTD ujawnia możliwą rolę niezmutowanych alleli tych wariantów w patogenezie porodu przedwczesnego.
4. Analiza współwystępowania genotypów wskazuje możliwy sumaryczny wpływ wariantów rs4898 genu *TIMP1* oraz rs17576 genu *MMP9* na ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego.
5. Asocjacje genotypów polimorfizmów rs2277698 i rs55743137 genu *TIMP2* z tygodniem zakończenia ciąży mogą wskazywać na ich wpływ na czas trwania ciąży.

9. SUMMARY

Introduction: Preterm delivery (PTD) is one of the greatest challenges of 21st century medicine. Despite extensive progress in medical knowledge, complications affecting pregnancy term are still prevalent. Prematurity can have negative consequences, both during the neonatal period and during later stages of life. In recent years, research on the etiology of preterm delivery has focused particularly on genetic aspects, including the involvement of metalloproteinases (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs), which are responsible for the remodeling of the extracellular matrix.

Aim of the study: The aim of the study was to assess the impact of certain polymorphisms in the genes encoding the matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases on the etiology of preterm delivery in a cohort of Polish women. The following polymorphisms were analyzed: *MMP1* (rs1799750) -1607 1G/2G, *MMP9* (rs17576) 836A>G, (rs17577) 2003G>A, *TIMP1* (rs4898) 372C>T, *TIMP2* (rs2277698) 303C>T, (rs55743137) T>G.

In the study group and the control group, the following relationships were investigated:

1. Clinical observations in pregnant women and newborns from the two groups.
2. The frequency of occurrence of genotypes and alleles of *MMP* and *TIMP* polymorphisms in the study and control groups.
3. Correlation between individual polymorphisms and the duration of pregnancy in women who experienced preterm delivery, divided into the following subgroups: 22-27 + 6 weeks, 28-31 + 6 weeks, 32-37 weeks.
4. The frequency of certain polymorphism haplotypes.
5. Co-occurrence of the polymorphisms of interest.
6. Correlation between the researched genetic variants and clinical observations.

Material and methods: A cohort of 240 pregnant Polish women participated in the study. The study group included 120 women who gave birth between 22-36 + 6 weeks (preterm delivery), while 120 pregnant women, who gave birth between 37-41 + 6 weeks, were qualified as the control group. PTD study group was divided into three subgroups: delivery <28 weeks (**EPTD** - *extremely preterm delivery*), 28-31+6 weeks

(**VPTD** - *very preterm delivery*) and 32-36+6 weeks (**MPTD** - *moderately preterm delivery*).

For all patients enrolled in the study the following data were recorded: the patient's age, gestational age, completed week of gestation at the time of delivery, height and body weight before and at the end pregnancy, as well as systolic and diastolic blood pressure values. The type of delivery and the parameters of the newborn's birth score were also analyzed. The evaluation of genetic variants was carried out at the Laboratory of Molecular Biology at the Division of Perinatology and Women's Diseases at the Poznań University of Medical Sciences. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphisms were used to analyze the polymorphisms. Haplotype analysis was performed using Haploview version 4.2. Statistical analyses were performed using the R program, version 4.1.1.

Results: The frequency of genotypes and alleles of polymorphisms of interest in women with preterm delivery and in the control group

With respect to the rs1799750 polymorphisms of the *MMP1* gene, rs17576 and rs17577 of the *MMP9* gene, rs4898 of the *TIMP1* gene and rs55743137 of the *TIMP2* gene, no statistically significant differences were found in the frequency of genotypes and alleles between the PTD group and the control group.

Analysis of the frequency of alleles of the rs2277698 polymorphism of the *TIMP2* gene in the studied groups found that the presence of the *T* allele almost halved the risk of preterm labor (OR = 0.53, 95 % CI = 0.29-0.97, $p = 0.0360$).

After dividing the PTD group into subgroups depending on the week of pregnancy, with respect to the rs55743137 polymorphism, the *TT* genotype was most common in the EPTD + VPTD group (82.6 %), while its frequency was found to be 76.3 % in the MPTD group and 68.3 % in the control group. In the codominant model, statistically significant differences were obtained by comparing the EPTD + VPTD group with both the MPTD group ($p = 0.0160$) and the control group ($p = 0.0118$). Differences were also observed in the recessive model (EPTD + VPTD group vs. MPTD, $p = 0.0465$; EPTD + VPTD vs. control, $p = 0.0354$).

Analysis of linkage disequilibrium and the frequency of haplotypes of MMP9 and TIMP2 gene variants

Comparing the frequencies of the *MMP9* haplotypes in the study and control groups, no correlation between these haplotypes and a risk of preterm labor was demonstrated. On the other hand, a significant difference was found in the frequency of the CT haplotype of the *TIMP2* gene containing both unmutated alleles, which was more common in the PTD group (87.9 %) compared with 81.2 % prevalence in the control group ($p = 0.043$, $p_{\text{corr}} = 0.088$).

Correlation between the frequency of coexistence of variant genotypes with preterm labor

In terms of the frequency of coexisting genotypes, the most interesting observation was made upon analyzing the interaction of *TIMP1* rs4898 and *MMP9* rs17576. The risk of premature birth more than doubled in patients with the *AG/CC* genotypes (13.3 vs. 7.5 %, OR = 2.22, $p = 0.177$) and *AA/TT* (11.7 vs. 5.8 %, OR = 2.50, $p = 0.153$) and more than six-fold when both aforementioned variants of the *MMP9* and *TIMP1* genes contained mutated alleles: *GG/TT* (4.2 vs. 0.8 %, OR = 6.25, $p = 0.175$) relative to the coexistence of *AA/CC* genotypes.

Analysis of clinical data of mothers and their newborns with the investigated polymorphic variants

In the group of women who underwent preterm labor, a correlation between the frequency *TIMP2* gene polymorphisms and the week of pregnancy achieved was observed in terms of the codominant model ($p = 0.0136$ for rs2277698, $p = 0.0033$ for rs55743137) and the recessive model ($p = 0.0038$ for rs2277698 and $p = 0.0009$ for rs55743137) as well as the weight of the newborn in the codominant ($p = 0.0576$ for rs2277698 and $p = 0.0022$ for rs55743137) and the recessive ($p = 0.0167$ for rs2277698 and $p = 0.0008$ for rs55743137) models.

Conclusions:

1. No direct relationship was observed between genotypes and alleles of *MMP1* rs1799750, *MMP9* rs17576 and rs17577, *TIMP1* rs4898 and *TIMP2* rs55743137 polymorphisms and the risk of preterm labor.
2. The predominance of the mutated *T* allele of the rs2277698 polymorphism of the *TIMP2* gene in the control group suggests a protective role diminishing the risk of preterm labor.

3. A higher prevalence of the *CT* haplotype (rs2277698 / rs55743137) of the *TIMP2* gene in the PTD group suggests a possible role of the unmutated alleles of these variants in the pathogenesis of preterm labor.
4. The analysis of the coexistence of genotypes indicates the possible combined effect of the rs4898 variants of the *TIMP1* gene and the rs17576 variants of the *MMP9* gene on the risk of preterm labor.
5. Correlation between genotypes of the rs2277698 and rs55743137 polymorphisms of the *TIMP2* gene in the PTD group relative to the control group may indicate their influence on the duration of pregnancy.

10. SPIS TABEL, RYCIN

SPIS TABEL

Tabela 1. Czynniki ryzyka porodu przedwczesnego [wg Leszczyńskiej-Gorzelak i wsp., 2006].

Tabela 2. Podział metaloproteinaz [wg Amalinei i wsp., 2007].

Tabela 3. Charakterystyka badanych w pracy genów i polimorfizmów.

Tabela 4. Sekwencje starterów do reakcji PCR.

Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej do metody PCR.

Tabela 6. Warunki reakcji hydrolizy dla badanych polimorfizmów.

Tabela 7. Charakterystyka porównawcza kobiet z PTD oraz grupy kontrolnej.

Tabela 8. Dane noworodków kobiet z porodem przedwczesnym oraz grupy kontrolnej.

Tabela 9. Dane kliniczne pacjentek w grupach wydzielonych w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.

Tabela 10. Dane noworodków w grupach kobiet wydzielonych w zależności tygodnia zakończenia ciąży.

Tabela 11. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-1607 (1G>2G)$ genu *MMP1* w grupie kobiet z PTD oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 12. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *R279Q* genu *MMP9* w grupie kobiet z PTD oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 13. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *R668Q* genu *MMP9* w grupie kobiet z PTD oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 14. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $372C>T$ genu *TIMP1* w grupie kobiet z PTD oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 15. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $303C>T$ genu *TIMP2* w grupie kobiet z PTD oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 16. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu rs55743137 genu *TIMP2* w grupie kobiet z PTD oraz w grupie kontrolnej.

Tabela 17. Częstość występowania genotypów wariantów genów *MMP1* i *MMP9* po podziale kobiet ze względu na tydzień zakończenia ciąży.

Tabela 18. Częstość występowania genotypów wariantów genów *TIMP1* i *TIMP2* po podziale kobiet ze względu na tydzień zakończenia ciąży.

Tabela 19. Odległości oraz siła nierównowagi sprzężeń pomiędzy analizowanymi wariantami genów *MMP9* i *TIMP2*.

Tabela 20. Częstość występowania haplotypów genu *MMP9* w grupie badanej i kontrolnej.

Tabela 21. Częstość występowania haplotypów genu *TIMP2* w grupie badanej i kontrolnej.

Tabela 22. Interakcje pomiędzy badanymi wariantami genów *MMPs* i *TIMPs*.

Tabela 23. Częstość współwystępowania genotypów polimorfizmów rs4898 *TIMP1* i rs 17576 *MMP9* w grupach PTD i kontrolnej.

Tabela 24. Asocjacje badanych wariantów polimorficznych z danymi klinicznymi matek i ich noworodków w całej badanej grupie kobiet (n=240).

Tabela 25. Geograficzny rozkład częstości występowania alleli (wyrażony procentowo) badanych w pracy polimorfizmów metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej i ich tkankowych inhibitorów w populacjach wg 3 fazy Projektu 1000 Genomów oraz grupy kontrolnej z prezentowanej pracy.

Tabela 26. Geny matek i niemowląt związane z porodem przedwczesnym w opublikowanych badaniach kliniczno-kontrolnych [wg Plunkett i Muglia, 2008].

SPIS RYCIN

Rycina 1. Schemat budowy wybranych metaloproteinaz - MMP9, MMP1.

Rycina 2. Schemat działania tkankowych inhibitorów metaloproteinaz TIMPs.

Rycina 3. Schemat klasyfikacji pacjentek do badania.

Rycina 4. Podział badanych kobiet ze względu na tydzień zakończenia ciąży.

Rycina 5. Przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów po reakcji hydrolizy enzymem *AluI* dla polimorfizmu rs17577 genu *MMP1*. M - marker wielkości 50 pz, tory 1, 4, genotyp homozygotyczny *1G/1G*, tory 3, 5 genotyp heterozygotyczny *1G/2G*, tory 2, 6 genotyp homozygotyczny insercja guaniny *2G/2G*.

Rycina 6. Przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów po reakcji hydrolizy enzymem *MspI* dla polimorfizmu rs17576 genu *MMP9*. M - marker wielkości 50 pz, tor 4 genotyp homozygotyczny niezmutowany *AA*, tory 1, 2, 3, 6 genotyp heterozygotyczny *AG*, tor 5 genotyp homozygotyczny zmutowany *GG*.

Rycina 7. Przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów po reakcji hydrolizy enzymem *TaqI* dla polimorfizmu rs17577 genu *MMP9*. M - marker wielkości 50 pz, tory 2, 4, 6 genotyp homozygotyczny niezmutowany *GG*, tory 2, 5 genotyp heterozygotyczny *GA*, tor 4 genotyp homozygotyczny zmutowany *AA*.

Rycina 8. Przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów po reakcji hydrolizy enzymem *BauI* (*BssSI*) dla polimorfizmu rs4898 genu *TIMP1*. M - marker wielkości 50 pz, tor 4, 6 genotyp homozygotyczny zmutowany *TT*, tory 1, 3, 5 genotyp heterozygotyczny *TC*, tor 2 genotyp homozygotyczny niezmutowany *CC*.

Rycina 9. Przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów po reakcji hydrolizy enzymem *BsrI* dla polimorfizmu rs2277698 genu *TIMP2*. M - marker wielkości 50 pz, tor 5 genotyp homozygotyczny niezmutowany *CC*, tory 2, 3, 4 genotyp heterozygotyczny *CT*, tor 1 genotyp homozygotyczny zmutowany *TT*.

Rycina 10. Przykładowe zdjęcie elektroforezy produktów po reakcji hydrolizy enzymem *AluI* dla polimorfizmu rs55743137 genu *TIMP2*. M - marker wielkości 50 pz, tory 1, 5, 6 genotyp homozygotyczny niezmutowany *TT*, tory 3, 4 genotyp heterozygotyczny *TG*, tor 2 genotyp homozygotyczny zmutowany *GG*.

Rycina 11. Wyniki analizy nierównowagi sprzężeń pomiędzy polimorfizmami rs17576 i rs17577 genu *MMP9* a) wskaźnik D' Lewontine'a wyrażony w procentach, b) wartość współczynnika korelacji r^2 wyrażona w procentach, c) częstość występowania haplotypów.

Rycina 12. Wyniki analizy nierównowagi sprzężeń pomiędzy polimorfizmami rs2277698 i rs55743137 genu *TIMP2* a) wskaźnik D' Lewontine'a wyrażony w procentach, b) wartość współczynnika korelacji r^2 wyrażona w procentach, c) częstość występowania haplotypów.

Rycina 13. Asocjacje polimorfizmów rs4898 *TIMP2* z danymi klinicznymi.

Rycina 14. Asocjacje polimorfizmów rs2277698 i rs55743137 genu *TIMP2* z danymi klinicznymi.

Rycina 15. Mapa populacji europejskich włączonych do fazy 3 Projektu 1000Genomes. LDlink (<http://analysistools.nci.nih.gov/LDlink>)

Rycina 16. Szacunkowa częstość występowania haplotypów badanych w pracy wariantów genów *MMP9* i *TIMP2* w populacjach europejskich fazy 3 Projektu 1000Genomes. Wartości zostały wygenerowane przez oprogramowanie LDlink