

POLIMORFIZM GENU LEPTYNY I JEJ RECEPTORA  
**W CIĄŻY POWIKŁANEJ CUKRZYCĄ TYPU 1**

***Lek. med. Rafał ICIEK***

ROZPRAWA DOKTORSKA

*Promotor: Prof. dr hab. med. Ewa WENDER-**OŻEGOWSKA***

Klinika Położnictwa i Chorób Kobiecych

Katedra Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2010

PRACA WYKONANA W RAMACH GRANTU PROMOTORSKIEGO N N407 2783 33

*Pani promotor,*  
***prof. dr hab. med.***  
***Ewie WENDER-OŻEGOWSKIEJ***

*za inspirację i pomoc w  
realizacji niniejszej rozprawy  
składam najserdeczniejsze  
podziękowania.*

<b>SPIS TREŚCI</b>	STRONA
<b>WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI UŻYTYCH W PRACY</b>	6
<b>I. WSTĘP</b>	8
1.1. Cukrzyca	8
1.1.1. Wpływ cukrzycy na przebieg ciąży	10
1.1.2. Wpływ ciąży na przebieg cukrzycy	11
1.2. Nadciśnienie tętnicze w ciąży	13
1.3. Leptyna oraz receptor leptyny	15
1.3.1. Rola leptyny w patomechanizmie niektórych powikłań towarzyszących ciąży	20
1.3.2. Leptyna a nadciśnienie tętnicze w ciąży	21
1.3.3. Leptyna a ciąża powikłana cukrzycą	22
1.3.4. Leptyna a inne zaburzenia metaboliczne	23
<b>II. CEL PRACY</b>	25
<b>III. MATERIAŁ</b>	26
3.1. Charakterystyka grup badanych i protokół wykonywanych badań	26
3.1.1. Ciężarne z cukrzycą	26
3.1.2. Ciężarne z nadciśnieniem tętniczym	29
3.2. Grupa kontrolna z niepowikłanym przebiegiem ciąży	31
<b>IV. METODYKA</b>	32
4.1. Badania w surowicy krwi	32
4.1.1. Badanie stężenia glukozy	32
4.1.2. Badanie stężenia hemoglobiny glikowanej	32
4.1.3. Badanie stężenia frakcji lipidowych	32
4.1.4. Badanie parametrów nerkowych	34
4.1.5. Badanie stężenia leptyny	34
4.1.6. Analiza statystyczna	35
4.2. Badania genetyczne z surowicy krwi	35
4.2.1. Izolacja DNA	35
4.2.2. Ocena jakości otrzymanego DNA	36
4.2.3. Amplifikacja otrzymanego DNA	36
4.2.4. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych	38
4.2.5. Analiza polimorfizmów po trawieniu enzymami restrykcyjnymi	39
4.2.6. Metody statystyczne	41
4.3. Badania ultrasonograficzne	42
4.4. Badania genetyczne łożyska	43
4.4.1. Izolacja RNA z tkanki łożyska	43
4.4.2. Analiza jakościowa kwasów nukleinowych	43
4.4.3. Odwrotna transkrypcja	44
4.4.4. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym	45
4.4.5. Zestawienie wyników analizy RT-PCR w czasie rzeczywistym	47
<b>V. WYNIKI</b>	48
5.1. Wyrównanie metaboliczne, wynik położniczy, stężenie leptyny, rozkład genotypów oraz łożyskowa ekspresja genów w badanych grupach	48
5.1.1. Ocena wyrównania metabolicznego w grupie ciężarnych z cukrzycą w poszczególnych trymestrach ciąży	48
5.1.2. Ocena wyrównania metabolicznego w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym	55
5.1.3. Wynik położniczy w grupie ciężarnych z cukrzycą	56
5.1.4. Wynik położniczy w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym oraz w grupie kontrolnej	59
5.1.5. Stężenie leptyny w grupie ciężarnych z cukrzycą w poszczególnych trymestrach ciąży z uwzględnieniem klasy cukrzycy wg White	61

5.1.6. Stężenie leptyny w surowicy krwi u ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym	63
5.1.7. Stężenie leptyny u ciężarnych z i bez stanu przedrzucawkowego	64
5.1.8. Stężenie leptyny w surowicy krwi u ciężarnych z grupy kontrolnej	66
5.1.9. Porównanie stężeń leptyny pomiędzy badanymi podgrupami w poszczególnych trymestrach ciąży	67
5.1.10. Ocena rozkładu genotypów i alleli polimorfizmów LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G w grupie ciężarnych z cukrzycą	67
5.1.11. Ocena rozkładu genotypów oraz alleli LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym	68
5.1.12. Ocena rozkładu genotypów oraz alleli LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G w grupie kontrolnej	70
5.1.13. Ilościowa analiza ekspresji genu leptyny w łożysku	71
5.1.14. Ilościowa analiza ekspresji genu receptora leptyny w łożysku	72
5.2. Analiza łożyskowej ekspresji genu leptyny i genu receptora leptyny w zależności od wyniku położniczego	73
5.3. Wpływ polimorfizmu genetycznego leptyny i jej receptora (LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G) na przebieg ciąży w poszczególnych podgrupach ciężarnych	80
5.3.1. Wpływ LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G na poziom leptynemii w poszczególnych trymestrach ciąży i ekspresji LEP/LEPR w łożysku w grupie ciężarnych z cukrzycą	80
5.3.2. Parametry metaboliczne w I trymestrze ciąży u ciężarnych z cukrzycą w zależności od genotypu LEP -2548 G/A ORAZ LEPR 668 A/G	85
5.3.3. Wyrównanie metaboliczne w II trymestrze ciąży u ciężarnych z cukrzycą w zależności od genotypu LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G	88
5.3.4. Wyrównanie metaboliczne w III trymestrze ciąży u ciężarnych z cukrzycą w zależności od genotypu LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G	90
5.3.5. Wpływ matczynego polimorfizmu LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G na wynik położniczy w grupie ciężarnych z cukrzycą	90
5.3.6. Wpływ matczynego polimorfizmu LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G na wyrównanie metaboliczne w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym	92
5.3.7. Wpływ matczynego polimorfizmu LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G na wynik położniczy w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym	94
5.3.8. Wpływ matczynego polimorfizmu LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G na przebieg ciąży i wynik położniczy w grupie kontrolnej	95
5.4. Modele regresji wielorakiej i krzywe ROC w przewidywaniu masy urodzeniowej noworodka poszczególnych grupach ciężarnych	97
5.4.1. Analiza wpływu czynników metabolicznych na masę noworodka w grupie ciężarnych z cukrzycą z wariantem homozygotycznym -2548 G/A oraz 668 A/G	97
5.4.2. Analiza wpływu czynników metabolicznych na masę noworodka w grupie ciężarnych z cukrzycą i z co najmniej jednym wariantem heterozygotycznym -2548 G/A oraz 668 A/G	99
5.4.3. Przydatność poszczególnych parametrów opisujących wyrównanie metaboliczne w predykcji masy urodzeniowej noworodka w grupie ciężarnych z cukrzycą z wariantem homozygotycznym -2548 G/A oraz 668 A/G	100
5.4.4. Przydatność poszczególnych parametrów opisujących wyrównanie metaboliczne w predykcji masy urodzeniowej noworodka w grupie ciężarnych z cukrzycą i z co najmniej jednym wariantem heterozygotycznym -2548 G/A oraz 668 A/G	102
5.4.5. Ocena wpływu najczęściej występującego polimorfizmu -2548 G/A i 668 A/G na przebieg ciąży w poszczególnych grupach	104

VI.	DYSKUSJA	107
6.1.	Wzrastanie płodu w ciąży powikłanej cukrzycą i nadciśnieniem tętniczym	107
6.2.	Liczebność badanych grup ciężarnych i ich dobór	108
6.3.	Ocena częstości występowania polimorfizmów i alleli oraz testowanie równowagi Hardy'ego-Weinberga w badanych populacjach	109
6.4.	Analiza występowania poszczególnych polimorfizmów i rekonstrukcja genotypów	110
6.5.	Regulacja stężenia leptyny w ciąży	111
6.6.	Funkcja i ekspresja leptyny w łożysku	114
6.7.	Wpływ łożyskowej leptyny na wynik położniczy w grupie ciężarnych z cukrzycą	115
6.8.	Wpływ chorób ciężarnej na łożyskową ekspresję leptyny	117
6.9.	Polimorfizm genetyczny LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G a przebieg ciąży powikłanej cukrzycą i nadciśnieniem tętniczym	118
6.10.	Przydatność kliniczna wykonanych badań	122
6.11.	Granice badań asocjacyjnych oraz cele dalszych badań	124
VII.	WNIOSKI	126
VIII.	STRESZCZENIE	127
IX.	<b>PIŚMIENNICTWO</b>	131
X.	SPI S TABEL	142
XI.	SPI S RYCIN	143
XII.	SPI S WYKRESÓW	144

## WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI UŻYTYCH W PRACY

ACE-I	<i>Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor</i> – Inhibitor Konwertazy Angiotensyny
AGA	<i>Appropriate for Gestational Age</i> – prawidłowa dla danego tygodnia ciąży masa płodu
AspArt	Analog AspArt insuliny
AUC	<i>Area Under Curve</i> – Pole pod Krzywą
BMI	<i>Body Mass Index</i> – Wskaźnik Masy Ciała
CC	Cięcie Cesarskie
CRP	<i>C-Reactive Protein</i> – Białko C-reaktywne
CSII	<i>Continuous Subcutaneous Insulin Infusion</i> – Ciągły Podskórny Wlew Insuliny
CUN	Centralny Układ Nerwowy
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i> – Badanie DCCT
DEPC	<i>Diethyl pyrocarbonate</i> – dietylopirokarbonian
DIC	<i>Disseminated Intravascular Coagulation</i> – Rozsiane Wykrzepianie Wętroznacyniowe
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Kwas Deoksyrybonukleinowy
dNTPs	<i>Deoxynucleoside 5'-Triphosphate</i> – Trójfosforany Deoksyrybonukleotydów
E	<i>Eclampsia</i> – Rzucawka
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i> – Kwas Etylenodiaminotetraoctowy
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay- Test Immunoenzymatyczny
eNOS	<i>Endothelial Nitric Acid Synthase</i> – Śródbłonkowa Syntaza Tlenku Azotu
ESC	<i>European Society of Cardiology</i> – Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne
ESH	<i>European Society of Hypertension</i> – Europejskie Towarzystwo Nadciśnienia Tętniczego
FCH	<i>Familial Congenital Hyperlipidemia</i> – Wrodzona Rodzinna Hiperlipidemia
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> - Hormon Stymulujący Wzrost Pęcherzyków
GADPH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i> – Dehydrogenaza 3-Fosfogliceraldehydu.
GDM	<i>Gestational Diabetes Mellitus</i> – Cukrzyca Ciężowa
GnRH	<i>Gonadotropin Releasing Hormone</i> – Hormon uwalniający gonadotropinę
HbA <sub>1c</sub>	Hemoglobina glikowana
HDL	<i>High-Density Lipoprotein</i> – Lipoproteiny o wysokiej gęstości
hVEGF-A	<i>human Vascular Endothelial Growth Factor-A</i> – Ludzki Śródbłonkowy Naczyniowy Czynniki Wzrostu-A
H-W	prawo Hardy'ego-Weinberga
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i> – Międzykomórkowa Molekuła Adhezyjna-1
IDF	<i>International Diabetes Federation</i> – Międzynarodowa Federacja Diabetologiczna
IUGR	<i>Intrauterine Growth Restriction</i> – Wewnątrzmaciczne Zahamowanie Wzrostu
JAK-STAT	<i>Janus Kinase-Signal Transducers and Activator of Transcription</i> – Układ Kinaz Janusa
LAD	<i>Left Anterior Descending</i> – Tętnica lewa zstępująca przednia
LD	<i>Linkage Disequilibrium</i> – Nierównowaga sprzężeń
LDL	<i>Low-Density Lipoprotein</i> – Lipoproteiny o niskiej gęstości
LEP	Gen Leptyny
LEPR	Gen Receptora Leptyny
LGA	<i>Large for Gestational Age</i> – zbyt wysoka dla danego tygodnia ciąży masa płodu
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> – Hormon Luteinizujący
LisPro	Analog LisPro insuliny
MBG	<i>Mean Blood Glucose</i> – Średnia Dobowa Glikemia
MTHFR	<i>Methylenetetrahydrofolate Reductase</i> – Reduktaza Metylenetetrahydrofolianowa
NIC	Nadciśnienie Indukowane Ciężą

OB-R	Izoformy receptora leptyny
OD	<i>Optical Density</i> – Gęstość Optyczna
OGTT	<i>Oral Glucose Tolerance Test</i> – Doustny Test Obciążenia Glukozą
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reakcja Łańcuchowa Polimerazy
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i> – Płytkowy Czynn timerostu
PE	<i>Pre-Eclampsia</i> - Stan Przedzrucawkowy
PGDM	<i>Pre-Gestational Diabetes Mellitus</i> – Cukrzyca Przedciążowa
PIH	<i>Pregnancy Induced Hypertension</i> – Nadciśnienie Indukowane Ciężą
PNT	Przewlekłe Nadciśnienie Tętnicze
PSN	Poród Siłami Natury
PTCA	<i>Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty</i> – Przeskórna Angioplastyka Wieńcowa
PTD	Polskie Towarzystwo Diabetologiczne
RAS	<i>Renin Angiotensin System</i> – Układ Renina-Angiotensyna
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> – Polimorfizm Długości Fragmentów Restrykcyjnych
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> – Kwas Rybonukleinowy
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> – krzywa ROC
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction</i> – Reakcja Łańcuchowa Polimerazy Odwrotnej Transkrypcji
SD	<i>Standard Deviation</i> – Odchylenie Standardowe
SGA	<i>Small for Gestational Age</i> – zbyt niska dla danego tygodnia ciąży masa płodu
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> – Polimorfizm Pojedynczego Nukleotydu
ssDNA	<i>Single Strand Deoxyribonucleic Acid</i> – Jednoniciowy Kwas Deoskrybonukleinowy
sVEGF	<i>soluble Vascular Endothelial Growth Factor</i> – rozpuszczalny Śródbłonkowy Naczyniowy Czynn timerostu
T-CHOL	<i>Total Cholesterol</i> – Cholesterol Całkowity
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i> – Naczyniowa Molekuła Adhezyjna-1
WHO	<i>World Health Organisation</i> – Światowa Organizacja Zdrowia

## I. WSTĘP

### 1.1. Cukrzyca

Zgodnie z definicją zaproponowaną przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) w 1999 roku, mianem cukrzycy określa się zaburzenia metabolizmu o złożonej etiologii, charakteryzujące się przewlekłą hiperglikemią z towarzyszącymi zaburzeniami metabolizmu węglowodanów, tłuszczu i białek, będącą skutkiem defektu wydzielania insuliny, działania insuliny lub obydwu tych procesów jednocześnie. Klasyfikacja cukrzycy, zaproponowana w roku 1999 uwzględnia cukrzycę typu 1, cukrzycę typu 2, szereg innych podtypów cukrzycy oraz cukrzycę ciążową [43].

Cukrzyca (głównie typu 1), przed erą wprowadzenia insuliny, była chorobą śmiertelną, głównie z powodu powikłań o charakterze ostrym (kwasica metaboliczna ze śpiączką hiperglikemiczną). Stanowiła także główną przyczynę zwiększonej śmiertelności z powodu nieuchronnego i przyspieszonego rozwoju powikłań naczyniowych o charakterze mikro- oraz makroangiopatii. Powikłania te, które są efektem przewlekłej ekspozycji śródbłonna naczyń na podwyższone stężenie glukozy, prowadzą do jego uszkodzenia a następnie niewydolności. Zmiany w naczyniach obwodowych o charakterze nasilonej aterogenezy w obrębie naczyń krwionośnych są przyczyną nieodwracalnego uszkodzenia narządu wzroku, rozwoju schyłkowej niewydolności nerek oraz nadciśnienia tętniczego. Uszkodzenie w obrębie naczyń kończyn dolnych jest przyczyną rozwoju zespołu stopy cukrzycowej, która z kolei stanowi główną przyczynę amputacji kończyn. Rozwój miażdżycy naczyń wieńcowych jest podstawą choroby niedokrwiennej serca [39]. Z powodu niekorzystnych następstw przewlekłych powikłań cukrzycy, duży nacisk kładzie się obecnie na możliwość prewencji ich rozwoju, intensyfikując leczenie chorego na cukrzycę. Leczenie chorego na cukrzycę, poza prawidłowym wyrównaniem metabolicznym, powinno obejmować zwalczanie wszystkich czynników ryzyka rozwoju odległych powikłań tej choroby. Stwierdzenie, że chorzy umierający na cukrzycę mają uszkodzoną trzustkę nastąpiło w XIX wieku, a w roku 1869 Paul Langerhans opisał obszary w obrębie tego narządu o charakterystycznym wyspowym rozmieszczeniu, nie wiedząc, że komórki w tych wyspach wydzielają insulinę. Fakt, że bezwzględny niedobór insuliny prowadzi do rozwoju cukrzycy stwierdzili w 1889 roku Oskar Minkowski oraz Joseph von Mering. W badaniach na psach wykazali, że pozbawienie zwierzęcia trzustki, powoduje rozwój objawów identycznych, jak u ludzi z



cukrzycą. Rok 1921 okazał się przełomowy dla chorych na cukrzycę oraz klinicyстів. W roku tym chirurg Francis Banting oraz jego student Charles Best, w laboratoriach Jamesa MacLeoda, wykazali, że podawanie wyciągu z komórek wyspowych powoduje redukcję objawów cukrzycy u ludzi. Wyciąg ten nazwano insuliną. W roku 1954 Frederick Sanger ustalił sekwencję aminokwasową insuliny, a następnie zsyntetyzowano ją chemicznie. W 1982 zaakceptowano insulinę uzyskaną metodami inżynierii genetycznej do leczenia cukrzycy u ludzi. Odkrycie insuliny a następnie szybkie jej upowszechnienie na całym świecie dało doskonałe narzędzie do leczenia tej choroby. Stworzono realne możliwości nie tylko zredukowania śmiertelności z powodu ostrych powikłań cukrzycy, ale także wielu chorym dano szansę na zahamowanie rozwoju odległych jej powikłań. Wobec rozwoju zrozumienia patofizjologii wydzielania insuliny przez trzustkę zdrowego człowieka, możliwe stało się wprowadzenie do powszechnego użytku coraz doskonalszych generacji insulin, których schematy stosowania przez chorych naśladują naturalny model jej wydzielania. Wprowadzenie do leczenia środków technicznych takich jak osobiste glukometry (pierwszy model wprowadzono do użycia klinicznego w roku 1969), umożliwiło lepszą i mniej uciążliwą dla chorego kontrolę wyrównania metabolicznego. Okres życia chorego z cukrzycą zaczął być porównywalny z okresem osoby zdrowej.

W 1989 roku pod egidą WHO oraz Międzynarodowej Federacji Diabetologicznej (IDF) odbyło się w miejscowości St. Vincent we Włoszech spotkanie ekspertów z zakresu diabetologii z całego świata. Efektem tego spotkania było opracowanie dokumentu znanego dziś jako Deklaracja z St. Vincent. Zakłada on wprowadzenie kompleksowych działań mających na celu zmniejszenie śmiertelności oraz powikłań chorobowych występujących u osób chorujących na cukrzycę, a także poprawę komfortu ich życia. W poszczególnych punktach tego dokumentu zapisano cele, do których należy dążyć w diagnostyce i leczeniu chorych na cukrzycę: zredukowanie występowania retinopatii cukrzycowej prowadzącej do utraty wzroku, występowania schyłkowej niewydolności nerek, zespołu stopy cukrzycowej, amputacji i choroby niedokrwiennej serca. Warto podkreślić, iż punkt 5 Deklaracji zakłada poprawę opieki położniczej nad ciężarnymi chorującymi na cukrzycę oraz dążenie do zbliżenia wyniku położniczego w tej grupie pacjentek, do wyniku położniczego pacjentek zdrowych [31].

### 1.1.1. Wpływ cukrzycy na przebieg ciąży

Ciąża powikłana cukrzycą stanowi problem interdyscyplinarny, angażujący wielospecjalistyczny zespół obejmujący położnika, diabetologa, dietetyka oraz psychologa. Ciężarna chorująca na cukrzycę powinna być leczona i kontrolowana w ośrodku referencyjnym, gdyż zaburzenia gospodarki węglowodanowej mają wpływ zarówno na ciążarną, jak i na rozwijający się płód. Niewłaściwie kontrolowana cukrzyca w okresie organogenezy u płodu oraz w okresie przedkonceptyjnym skutkuje większym ryzykiem wystąpienia wady u płodu lub jego obumarcia we wczesnej ciąży, bowiem znaczna hiperglikemia w pierwszym trymestrze ciąży może działać teratogennie na rozwijający się zarodek [67]. W wielu badaniach klinicznych i doświadczalnych wskazano, że wraz ze wzrostem odsetka hemoglobiny glikowanej dochodzi do częstszego występowania wad wrodzonych u płodu [68]. Z kolei brak prawidłowego wyrównania metabolicznego w późniejszym okresie ciąży, może skutkować nadmiernym wzrastaniem płodu (makrosomia, LGA), organomegalia, obumarciem wewnątrzmacicznym oraz zaburzeniami metabolicznymi u noworodka po porodzie [139]. U ciężarnych natomiast, dochodzi częściej niż w grupie kontrolnej do rozwoju nadciśnienia tętniczego, stanu przedrzucawkowego, porodu przedwczesnego oraz do rozwoju i progresji zmian naczyniowych [58]. Dlatego w chwili obecnej, kładzie się szczególny nacisk na odpowiednie przygotowanie ciężarnej do zajścia w ciążę. Należy dążyć do optymalizacji wyrównania metabolicznego w okresie przynajmniej 3-miesięcznym, poprzedzającym koncepcję. Za optymalny dla płodu uznaje się obecnie odsetek  $HbA_{1c} < 6.1\%$  a średni dobowy poziom glikemii około 95 mg/dl [163]. Osiągnięcie tych rezultatów, w większości przypadków staje się możliwe po wdrożeniu u pacjentki tzw. intensywnej insulinoterapii obejmującej wprowadzenie wielokrotnych iniekcji insuliny w ciągu doby, bądź osobistej pompy insulinowej. Udowodniono, że optymalizacja leczenia cukrzycy sprzyja redukcji występowania wad u płodu, a nowoczesne sposoby leczenia pozwalają na osiągnięcie wyniku położniczego i śmiertelności matek zbliżonych do wyniku obserwowanego w populacji ciężarnych zdrowych [41, 98]. Należy zwrócić uwagę, iż optymalizacja leczenia cukrzycy, oznacza uzyskanie u ciężarnej stosunkowo niskich średnich wartości glikemii w ciągu doby, co wiąże się u nich ze wzrostem ryzyka epizodów hipoglikemii. W celu obniżenia ryzyka ich występowania oraz uniknięcia ich potencjalnych skutków dla matki i płodu, integralnym elementem nadzoru staje się edukacja i samokontrola glikemii przez

ciężarną oraz stosowanie odpowiedniej diety. W Tabeli I przedstawiono kryteria prawidłowego wyrównania gospodarki węglowodanowej w ciąży powikłanej cukrzycą. Kryteria te obejmują zalecane wartości glikemii w ciągu dnia i w nocy, oraz odsetka hemoglobiny glikowanej, będącej odzwierciedleniem kontroli metabolicznej w okresie 3-miesięcznym.

*Tabela 1. Kryteria optymalnego wyrównania metabolicznego u ciężarnej [163].*

Na czczo (mg/dl/mmol/l)	60-90/3,3-5,0	Po posiłku (mg/dl/mmol/l)	<120/6,7
Przed posiłkiem w ciągu dnia (mg/dl/mmol/l)	60-90/3,3-5,0	Pomiędzy 2.00- 4.00 w nocy (mg/dl/mmol/l)	>60/3,3
Srednia dobowa glikemia (mg/dl/mmol/l)	95/5,3	Odsetek HbA <sub>1c</sub> (%)	<6,1

### 1.1.2. Wpływ ciąży na przebieg cukrzycy

Ciąża u pacjentki chorej na cukrzycę przedciążową może stanowić czynnik ryzyka wystąpienia lub progresji zmian naczyniowych uprzednio istniejących [127]. Tłem powikłań naczyniowych charakterystycznych dla cukrzycy jest mikroangiopatia, której cechy obserwuje się w naczyniach nerek (nefropatia) oraz naczyniach dna oka i siatkówki (retinopatia). Postuluje się rolę czynników zapalnych (CRP, interleukina-6, V-CAM-1) oraz hiperglikemii, których podwyższenie stężenie w trakcie ciąży może indukować progresję zmian naczyniowych na dnie oka, natomiast nie udowodniono roli takich czynników angiogennych, jak angiopoetyna 1 i 2, sVEGF, hVEGF-A [87, 88]. Ponadto niższa aktywność układu renina-angiotensyna (RAS) i związany z nią hiperdynamiczny przepływ krwi przez naczynia dna oka w ciąży może wpływać na ich stan po rozwiązaniu [89]. U niektórych pacjentek, pomimo optymalnego wyrównania metabolicznego w trakcie ciąży, może dojść jednak do pogorszenia się istniejących uprzednio zmian na dnie oka, a także do rozwoju nowych zmian, zwłaszcza pod postacią makulopatii, czy obrzęku plamki. Zmiany te niekorzystnie wpływają na stan narządu wzroku. W pracy McCance'a opisano przypadek trwałego pogorszenia się wzroku oraz funkcji nerek, które nie uległy poprawie w okresie 2 lat po rozwiązaniu, jednakże takie przypadki pozostają w mniejszości [96]. W innym badaniu, które obejmowało 139 kobiet ciężarnych z cukrzycą typu 1 stwierdzono, że postęp retinopatii dotyczył tylko 5% ogółu ciężarnych, u których czas trwania cukrzycy był dłuższy niż 10 lat, z istniejącymi już przed ciążą zmianami [146]. U większości pacjentek obserwuje się także samoistną regresję zmian

naczyniowych po zakończeniu ciąży, zwłaszcza, jeśli miały one charakter retinopatii nieproliferacyjnej [138, 127]. Dowodzi tego badanie również badanie DCCT: po 12-miesiącach od rozwiązania, nie zaobserwowano istotnej statystycznej różnicy w obecności tych zmian u pacjentek, które nie rodziły, w porównaniu do grupy ciężarnych [32].

Obecność retinopatii przed ciążą, zwłaszcza retinopatii proliferacyjnej (klasa R cukrzycy wg White), wymaga oceny stopnia jej nasilenia przed zajściem w ciążę i wdrożenia leczenia. Natomiast w sytuacji, gdy w procesie diagnostycznym, z różnych przyczyn, pominięto etap planowania ciąży, a w trakcie jej trwania wykryto retinopatię proliferacyjną, zabiegi laseroterapii, jeśli okulista je zleci, powinny być wykonane w trakcie jej trwania. Optymalna kontrola glikemii, a zwłaszcza uniknięcie gwałtownych wahań poziomu glukozy oraz kontrola ciśnienia tętniczego, ma kluczowe znaczenie w zredukowaniu ryzyka pogorszenia się stanu dna oka [61].

Kluczowym zadaniem zespołu opiekującego się chorą z cukrzycą jest ocena nasilenia zmian naczyniowych, jeszcze przed zajściem pacjentki w ciążę. Stanowi to bowiem ewentualną podstawę do odradzania planowania rozrodu.

Nefropatię u ciężarnej z cukrzycą definiuje się, jako obecność białkomoczu przed ciążą lub w trakcie jej trwania, na poziomie 300mg/dl w dobowej zbiorce [163]. Badania dotyczące wpływu ciąży na funkcję nerek u ciężarnej z cukrzycą są niejednoznaczne. Chore ze znamienym białkomoczem oraz nadciśnieniem tętniczym przed ciążą, znajdują się w grupie ryzyka trwałego pogorszenia się funkcji nerek po zakończeniu ciąży; w niektórych przypadkach wymagają one leczenia nerkozastępczego – hemodializ lub dializ otrzewnowych [11]. Zaobserwowano pogorszenie funkcji nerek w trakcie trwania ciąży, zwłaszcza u ciężarnych z długoletnią cukrzycą, które we wczesnym etapie ciąży manifestowały białkomocz (klasa F wg white), z podwyższonym wyjściowym stężeniem kreatyniny  $>1.4\text{mg/dl}$ , u których w trakcie ciąży doszło do rozwoju stanu przedrzucawkowego. U tych ciężarnych w 40% doszło do trwałego pogorszenia funkcji nerek, łącznie z koniecznością zastosowania leczenia nerkozastępczego w okresie 5-57 miesięcy po rozwiązaniu [115]. Sytuacje te dotyczą jednak grupy pacjentek ze znacząco wyjściowo obniżonymi parametrami funkcji nerek.

W badaniach obejmujących grupy ciężarnych z zachowaną prawidłową funkcją nerek i prawidłowymi ich parametrami filtracyjnymi przed ciążą, nie

zaobserwowano istotnego pogorszenia się ich funkcji po rozwiązaniu, a więc odległy wpływ ciąży na progresję zmian naczyniowych nie został potwierdzony [124]. Progresja nefropatii po ciąży, mierzona nasileniem mikroalbuminurii, nie została też potwierdzona w badaniu DCCT [32]. Ze względu na zaawansowanie zmian naczyniowych w długoletniej cukrzycy, istnieje grupa pacjentek, którym odradza się zajście w ciążę, głównie z powodu ryzyka wystąpienia potencjalnie śmiertelnych powikłań dla matki. Są to chore z klinicznie jawną chorobą niedokrwienną lub po zawale serca (klasa H wg White), z nieustabilizowanym, niepoddającym się leczeniu nadciśnieniem tętniczym, z zaawansowaną nefropatią manifestującą się poziomem kreatyniny w osoczu krwi żyłnej >2.75mg/dl (250 μmol/l) oraz klinicznie z zespołem nerczycowym. Do tej grupy można także zaliczyć chore z klinicznie jawną neuropatią autonomiczną manifestującą się np. gastroparą [163]. Opisywano jednak przypadki pomyślnego zakończenia ciąży u pacjentek dializowanych z powodu niewydolności nerek w przebiegu nefropatii cukrzycowej [149, 64]. Stąd ostateczną decyzję o zajściu w ciążę, po jej poinformowaniu pozostawiamy ciężarnej.

## 1.2. Nadciśnienie tętnicze w ciąży

Nadciśnienie tętnicze w ciąży występuje u około 7-10% ciężarnych i stanowi czynnik ryzyka powikłań okołoporodowych zarówno dla matki jak i dla płodu [1, 148]. Za nadciśnienie tętnicze w ciąży przyjęto sytuację, w której u ciężarnej po 2-krotnym pomiarze ciśnienia krwi w odstępie 6-godzinny, uzyskano wartości równe lub przekraczające 140/90mmHg [1]. W Tabeli II przedstawiono obowiązującą obecnie klasyfikację nadciśnienia tętniczego w ciąży wg Europejskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego (ESH 2007) oraz Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego (ESC 2007) [1].

*Tabela II. Klasyfikacja nadciśnienia tętniczego w ciąży (ESH/ESC 2007) [1].*

Nadciśnienie przewlekłe (PNT)	Istniejące przed ciążą lub rozwijające się przed 20 t.c., nie ustępuje po porodzie, przebiegające z białkomoczem
Nadciśnienie ciążowe (NIC)	Rozwija się po 20t.c., ustępuje po 42 dniach po porodzie, przebiega bez białkomoczu
Stan przedrzucawkowy (PE)	Rozwija się po 20t.c., ustępuje po 42 dniach po porodzie, przebiega z białkomoczem $\geq 300\text{mg}/24\text{h}$
Rzucawka (E)	Napad drgawek toniczno-klonicznych u ciężarnej z nadciśnieniem tętniczym, nie związany z innymi chorobami przebiegającym z drgawkami
Nadciśnienie przewlekłe z nałożonym stanem przedrzucawkowym	Istniejące przed ciążą lub rozwijające się przed 20 t.c., nie ustępuje po porodzie, przebiegające z białkomoczem występującym po 20t.c.
Nadciśnienie nieokreślone przed porodem	Brak określenia początku wystąpienia nadciśnienia, konieczna weryfikacja 42 dni po porodzie

W Tabeli III przedstawiono podział nadciśnienia tętniczego w ciąży w zależności od czasu jego wystąpienia oraz obecności lub braku białkomoczu [13].

*Tabela III. Uproszczony schemat klasyfikacji nadciśnienia tętniczego w ciąży, w zależności od czasu jego wystąpienia oraz obecności białkomoczu [13].*

Białkomocz	Obecny	Nadciśnienie tętnicze przewlekłe z nałożonym stanem przedrzucawkowym	Stan Przedrzucawkowy
	Nieobecny	Nadciśnienie tętnicze przewlekłe	Nadciśnienie tętnicze indukowane ciążą
		20 tydzień ciąży	po 20 tygodniu ciąży
Czas trwania ciąży w momencie wystąpienia nadciśnienia tętniczego			

Etipatogeneza stanu przedrzucawkowego nie jest jednoznacznie określona. Postuluje się rolę zmniejszonego przepływu łożyskowego, będącego skutkiem niepełnej inwazji trofoblastu w ściany tętnic spiralnych, w rozwoju tego powikłania [44, 153]. Inwazja trofoblastu obejmuje liczne interakcje pomiędzy cytokinami, enzymami, molekułami adhezyjnymi (VCAM-1, ICAM-1) i naczyniowym czynnikiem wzrostu (sVEGF), płytkowym czynnikiem wzrostu (PDGF), których końcowym efektem jest przebudowa naczyń z wysokooporowych na niskooporowe [90]. Ma to na celu przystosowanie macicy do zwiększonego przepływu krwi w trakcie ciąży [90, 91]. Postulowana jest także rola czynników genetycznych, polimorfizmów genów-kandydatów, takich jak gen angiotensynogenu, konwertazy angiotensyny (ACE), syntazy tlenu azotu (eNOS), reduktazy metylenotetrahydrofolianu (MTHFR), których zaburzona ekspresja może prowadzić do wystąpienia nadciśnienia [126]. Podkreśla się także rolę czynników immunologicznych, w szczególności zaburzenia w interakcjach limfocytów Th1, Th2 i komórek NK, aktywację komórek zapalnych, których końcowym efektem może być uszkodzenie śródbłonna naczyń [19, 125]. Ponadto niepełna inwazja trofoblastu może być wynikiem nietolerancji obcych antygenów przez układ immunologiczny matki [120]. Postuluje się także rolę stresu oksydacyjnego, utleniania lipidów przez aktywne rodniki tlenowe w odpowiedzi na niedokrwienie łożyska oraz zmniejszonego stężenia antyoksydantów w patogenezie stanu przedrzucawkowego [52, 134].

Spośród wszystkich postaci nadciśnienia tętniczego w ciąży, stan przedrzucawkowy (PE), czyli współistnienie nadciśnienia tętniczego z obrzękami i białkomoczem  $\geq 300\text{mg}/24\text{h}$ , stanowi najczęstszą oraz najpoważniejszą przyczynę powikłań związanych z podwyższonym ciśnieniem tętniczym. Określa się częstość występowanie PE na około 7-8% wszystkich ciąż [129]. Do najczęściej spotykanych powikłań PE dla matki zalicza się: zespół rozsianego wykrzepiania wewnątrznaczyniowego (DIC), krwawienia do centralnego układu nerwowego, siatkówki, niewydolność wątroby i nerek, obrzęk płuc oraz przedwczesne oddzielenie łożyska. Natomiast do najczęstszych powikłań płodowych należą: wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu płodu (IUGR), małowodzie, przedwczesne oddzielenie łożyska, wystąpienie porodu przedwczesnego i obumarcie płodu [79, 103]. Uzasadnia to konieczność wdrożenia odpowiedniego leczenia u matki, monitorowania stanu płodu, a także identyfikację ciężarnych z grupy ryzyka.

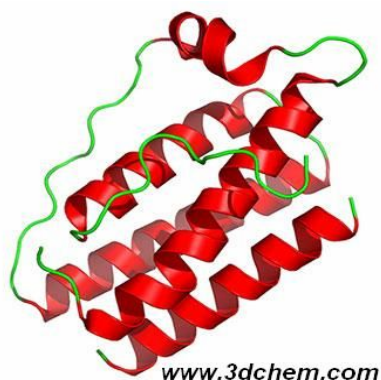
Ryzyko wystąpienia samego PE, jak i jego powikłań, może być zwiększone, jeżeli ciężarna choruje także na cukrzycę typu 1, szczególnie wtedy, gdy kontrola metaboliczna w I trymestrze ciąży była niewłaściwa [130]. Potwierdzono, że podwyższony odsetek hemoglobiny glikowanej w pierwszej połowie ciąży w istotny sposób zwiększa ryzyko wystąpienia stanu przedrzucawkowego po 20 tygodniu ciąży, natomiast podwyższony odsetek HbA<sub>1c</sub> w 2 połowie ciąży nie zwiększał ryzyka wystąpienia PE. Warto zauważyć, że nie zaobserwowano powyższych zależności dla samego nadciśnienia indukowanego ciążą [50].

### 1.3. Leptyna oraz receptor leptyny

Leptyna (z gr. leptos - szczupły) jest hormonem polipeptydowym, będącym produktem tzw. genu otyłości ob. Produkt genu ob opisany został po raz pierwszy w 1994 roku przez Zhanga i wsp. w badaniach dotyczących pozycyjnego klonowania przeprowadzonych na myszach [164]. Gen Ob u myszy położony jest na chromosomie 6. U ludzi homologiczny gen (gen LEP) znajduje się na ramieniu długim chromosomu 7 (7q31.3) i składa się z 3 odcinków kodujących (eksony) i 2 odcinków nie kodujących (introny), zbudowany jest z ok. 20 tysięcy par zasad. W genie tym wykazano istnienie kilku polimorfizmów m.in. polimorfizmu funkcjonalnego *V110M*, polimorfizmów w regionie promotorowym *-188 C/A* oraz *-2548 G/A*. Jednym z najwcześniej poznanych polimorfizmów jest delecja guaniny w kodonie 133 genu leptyny, co zostało opisane u dwójki dzieci, u

których przy bardzo małym stężeniu leptyny jednocześnie występowała otyłość, nadmierne łaknienie przy prawidłowej temperaturze ciała, prawidłowym poziomie kortyzolu i glukozy [102]. Leptyna jest białkiem o ciężarze gatunkowym 16kDa, składającym się z 167 aminokwasów. Wytwarzana i wydzielana jest głównie przez adipocyty białej tkanki tłuszczowej [142]. W ostatnim czasie udowodniono także możliwość syntezy leptyny i jej receptora w łożysku oraz niektórych nowotworach pochodzenia trofoblastycznego [85]. Leptyna uważana jest dzisiaj za hormon sytości. Hamuje wydzielanie neuropeptydu Y w podwzgórzu oraz prowadzi do zmniejszenia łaknienia, dając organizmowi sygnał „sytości”. Jednocześnie prowadzi do nasilenia procesów metabolicznych i zwiększenia zużycia energii. Zdaniem niektórych autorów w czasie przemian ewolucyjnych leptyna powstała jako czynnik zabezpieczający organizm przed głodem lub śmiercią w okresach braku pokarmu lub przed nadmierną otyłością w okresach, kiedy dysponowano nadmierną ilością pożywienia [59]. Leptyna reguluje ilość tkanki tłuszczowej w ustroju, wywiera wpływ na masę ciała redukując ją, ma związek z regulacją ciśnienia krwi, pobudza wydzielanie GnRH oraz FSH i LH, ma wpływ na zwiększoną hematopoezę szpikową oraz procesy związane z rozrodem [4]. Strukturę przestrzenną leptyny przedstawiono na Rycinie 1 [51].

*Rycina 1. Struktura przestrzenna leptyny [99].*



Rola leptyny zarówno w metabolizmie, jak i procesach rozrodczych człowieka nie została dotąd jednoznacznie określona. Przyjmuje się, że działanie tego hormonu jest plejotropowe, wpływające na wiele szlaków metabolicznych. Wczesne badania nad stężeniem i ekspresją leptyny w narządach człowieka ujawniły, że wraz ze wzrostem ilości tkanki tłuszczowej w organizmie rośnie także stężenie



leptyny w surowicy krwi, co stało się podstawą hipotezy, że adipocyty białej tkanki tłuszczowej stanowią bogate źródło tego hormonu. W badaniach Weigle'a i wsp., jak i w wielu innych projektach, udowodniono powyższą hipotezę [158, 142, 59]. Wszystkie swoje działania leptyna wywiera przez specyficzne receptory. Początkowo sądzono, że biologiczne działanie leptyny polega na pobudzaniu receptorów zlokalizowanych w podwzgórzcu [133]. Obecnie wiadomo jednak, że receptory te znajdują się także w wielu innych tkankach, m.in. w tkance tłuszczowej, wątrobie, żołądku śledzionie, płucach, sercu, grasicy, mięśniakach macicy, gruczole sutkowym, łożysku i endometrium, jajnikach i jądrach [27, 145]. W podwzgórzcu biologiczne działanie leptyny opiera się na zasadzie pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego pomiędzy stężeniem tego hormonu w surowicy krwi a ekspresją jego receptora [132]. Wyraża się ono przede wszystkim spadkiem łaknienia, zwiększeniem wydatku energetycznego, aktywacją układu współczulnego, głównie poprzez hamowanie wydzielania neuropeptydu Y, który ma działanie przeciwstawne do leptyny, a więc m.in. nasila apetyt [158]. Leptyna ma więc działanie regulujące przyrost masy ciała, które to działanie jest uwarunkowane zarówno prawidłową strukturą samego hormonu, jak i funkcjonalnością jego receptora.

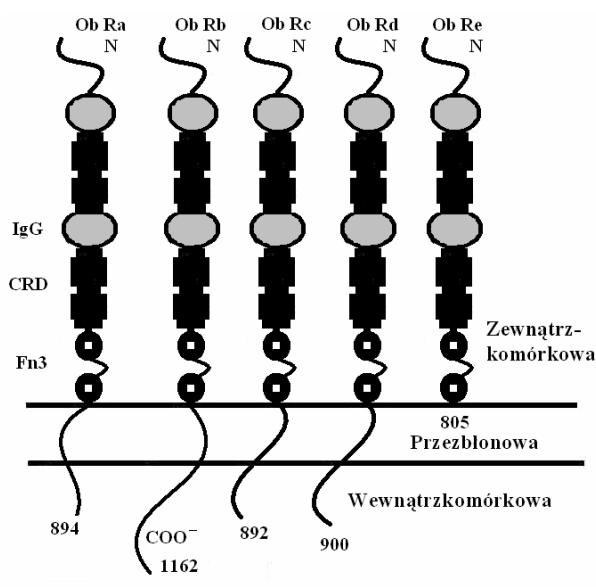
Receptor leptyny jest receptorem polipeptydowym, stanowiącym produkt translacji genu LEPR, który znajduje się na chromosomie 1 (1p31) i składa się z 20 odcinków kodujących (eksonów) [148]. Receptor ten należy do rodziny receptorów cytokinowych klasy pierwszej (podobnie jak receptor dla interferonu, interleukiny 2 oraz hormonu wzrostu) [8].

Znanych jest kilka izoform receptora leptyny, które oznaczono jako Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re. Cztery pierwsze izoformy są to tzw. izoformy długie, składające się z 3 podjednostek: N-końcowej podjednostki zewnątrz błonowej, odpowiedzialnej za wiązanie ligandu oraz podjednostek śródbłonowej i wewnątrzkomórkowej (C-końcowej), które pełnią rolę transdukcji sygnału do wnętrza komórki, poprzez kinazę tyrozyny Janusa (JAK-STAT) [21, 42]. Natomiast izoforma krótka Ob-Re jest formą receptora pozbawioną podjednostek śródbłonowej i wewnątrzkomórkowej. Według niektórych badaczy jest to izoforma wydzielnicza, pozbawiona zdolności transdukcji sygnału dokomórkowo, a więc nie mająca udziału w biologicznej funkcji leptyny, a jedynie pełniąc rolę transportera (jako białko wiążące leptynę) tego hormonu w surowicy krwi, sprzyjając jednocześnie jej biostabilności [8]. Obecnie uważa się, że tylko

izoformy długie są funkcjonalnymi receptorami leptyny, a w szczególności izoforma Ob-Rb reprezentowana w podwzgórzu [7].

U ludzi zidentyfikowano cztery izoformy receptora leptyny: należą do nich izoforma długa receptora składająca się z 1165 aminokwasów oraz trzy izoformy krótkie będące wynikiem alternatywnego splicingu [150]. We krwi udowodniono także występowanie postaci rozpuszczalnej receptora leptyny [108]. Obecnie uważa się, że tylko izoforma długa jest funkcjonalnym receptorem leptyny i może brać udział w przekazywaniu sygnału komórkowego w podwzgórzu, gdzie anorektyczne działanie leptyny wyrażone jest najbardziej [38, 78]. Wszystkie długie izoformy receptora leptyny są białkami transbłonowymi, jeden raz przechodzącymi przez błonę komórkową (Rycina 2) [8].

Rycina 2. Izoformy receptora leptyny (modyfikacja własna) [55].

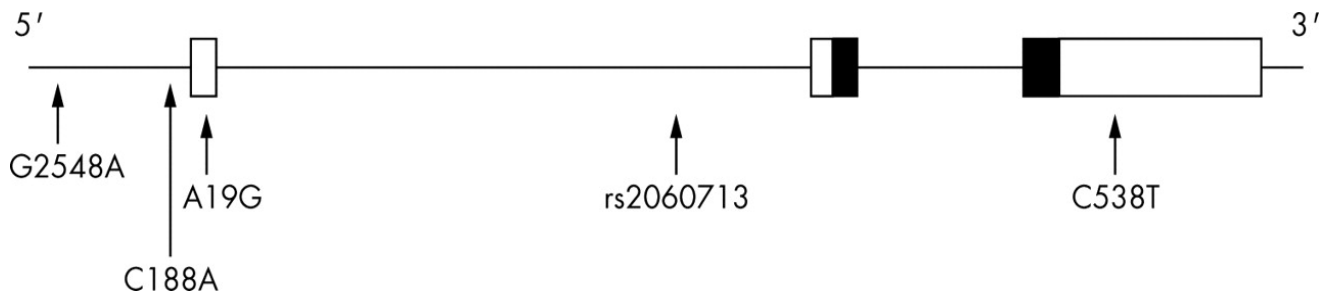


Najczęściej badanymi polimorfizmami genu receptora leptyny są polimorfizmy funkcjonalne, jak *Q223R (A/G)* w eksonie 6 oraz *Lys109Arg (A/G)* w eksonie 4 [63]. Oprócz tego wymienia się mutację cichą T/C w kodonie 343 oraz G/A w kodonie 1019 genu receptora. Ponadto znanych jest także kilka innych polimorfizmów w obrębie genu receptora leptyny, znajdujących się zarówno w rejonie promotorowym oraz poza nim.

W niniejszej pracy wzięto pod uwagę rolę polimorfizmu *-2548 G/A*, zlokalizowanego w regionie promotorowym genu leptyny, wobec postulowanego jego wpływu na wzrastanie płodu i stężenie leptyny [2]. W polimorfizmie tym dochodzi do wymiany guaniny na adeninę w pozycji *-2548* regionu

promotorowego genu leptyny. Na Rycinie 3 przedstawiono schemat genu leptyny z występującymi w nim polimorfizmami pojedynczych nukleotydów (SNP).

Rycina 3. Polimorfizm genetyczny genu leptyny. W regionie 5` promotorowym badany polimorfizm -2548 G/A.



Natomiast w polimorfizmie genu receptora leptyny 668 A/G dochodzi do wymiany adeniny na guaninę w pozycji 668 łańcucha nukleotydowego tego genu. Rezultatem tej wymiany jest zamiana aminokwasu kwasu glutaminowego na kwas asparaginianowy w pozycji 223 łańcucha peptydowego (*Gln223Arg* lub wg innej nominacji *Q223R*).

Poziom krążącej leptyny rośnie zarówno u chłopców, jak i u dziewcząt wraz z rozpoczęciem się okresu dojrzewania [22]. Wyższe stężenia leptyny zaobserwowano u dorosłych zdrowych kobiet w porównaniu do mężczyzn, natomiast u kobiet po menopauzie lub w okresie okołomenopauzalnym stężenie leptyny jest niższe [122]. Podczas prawidłowego cyklu miesięczkowego zaobserwowano, że poziom leptyny rośnie podczas fazy folikularnej, osiąga szczyt w środkowej części fazy lutealnej, po czym spada w fazie lutealnej do wyjściowych wartości [118].

W pewnych sytuacjach obserwuje się upośledzone działanie leptyny na przyrost masy ciała, uwarunkowane prawdopodobnie brakiem prawidłowej odpowiedzi ze strony receptora albo nieprawidłową budową samej leptyny. Może być to spowodowane obecnością mutacji w genie leptyny lub jej receptora, co zostało wskazane w badaniach Chena i wsp. oraz Clementa i wsp. [21, 23]. W grupie badanych myszy ze zmutowaną, homozygotyczną formą receptora db/db oraz mutacją w genie leptyny (homozygoty ob/ob) obserwowano wczesny rozwój otyłości olbrzymiej z powodu nasilonej hyperfagii, znikomego wydatku energetycznego oraz nasilonej insulinooporności. Dodatkowym efektem tych

mutacji była niepłodność. Natomiast wstrzyknięcie egzogennej leptyny myszom ze zmutowanym genem leptyny całkowicie odwracało ten defekt i manifestowało się spadkiem apetytu, spadkiem masy ciała oraz zwiększonym wydatkiem energetycznym. Redukowało to także insulinooporność oraz przywracało badanym zwierzętom zdolność rozrodu poprzez zwiększenie wydzielania LH, zwiększenie masy jajników i macicy oraz dzięki korzystnym zmianom histologicznym w tych narządach [24, 53, 6]. Myszy z genotypem homozygotycznym ob/ob są niepłodne z powodu braku cykliczności cyklu miesięczkowego, natomiast wstrzyknięcie egzogennej leptyny usuwało ten defekt, co może potwierdzać fakt, że leptyna jest polipeptydem regulatorowym, również w układzie rozrodczym [20].

### **1.3.1. Rola leptyny w patomechanizmie niektórych powikłań towarzyszących ciąży**

Rolę leptyny rozważa się w aspekcie rozwoju osteoporozy, otyłości, nadciśnienia tętniczego, nowotworów trzonu macicy jak również w ciąży i podczas laktacji. W położnictwie rolę leptyny i jej receptorów obserwuje się zarówno w ciąży fizjologicznej, jak i powikłanej cukrzycą ciążową i przedciążową, wewnątrzmacicznym zahamowaniem wzrastania płodu, nadciśnieniem tętniczym, przewlekłym bądź indukowanym ciążą [147, 77, 162, 105]. Charakterystyczny profil wydzielania leptyny podczas ciąży o przebiegu prawidłowym oraz znamienne różnice w jej poziomach w ciąży powikłanej cukrzycą, nadciśnieniem tętniczym czy zaburzeniami wzrastania płodu sugerują rolę tego hormonu, jako czynnika wpływającego na wystąpienie tych powikłań [156].

Stężenie leptyny oraz profil jej wydzielania w ciąży fizjologicznej analizowano na modelu zwierzęcym oraz ludzkim. Obserwacje te potwierdziły, że stężenie leptyny jest wyższe w okresie ciąży i laktacji w porównaniu do kobiet nieciążarnych [104]. Na podstawie badań m.in. Tamasa i wsp. oraz Tamury i wsp. wykazano, że poziom tego hormonu jest najniższy we wczesnej ciąży, rośnie 2,7-razy w II trymestrze, osiąga plateau w III trymestrze, i ulega gwałtownemu obniżeniu w okresie 24 godzin po porodzie do wartości obserwowanych przed ciążą [29, 30].

### 1.3.2. Leptyna a **nadciśnienie tętnicze w ciąży**

Badanie roli leptyny, rozpuszczalnej frakcji jej receptora oraz polimorfizmów tego receptora w odniesieniu do nadciśnienia indukowanego ciążą oraz stanu przedrzucawkowego podejmowało jak dotąd niewielu autorów [69, 113]. Przy użyciu takich metod jak hybrydyzacja in-situ, RT-PCR czy Western Blotting wykazano ekspresję receptora leptyny także w łożysku/trofoblaście [48, 95, 80]. Stąd niektórzy autorzy postulują rolę tego hormonu w patogenezie nadciśnienia indukowanego ciążą. Przemawia za tym m.in. fakt, iż oprócz ekspresji receptora leptyny w łożysku, w komórkach cytotrofoblastu zachodzi także biosynteza samej leptyny, która jest transportowana do krążenia zarówno matczynego oraz płodowego [95]. Dotyczy to zarówno ciąży o przebiegu fizjologicznym, powikłanej nadciśnieniem tętniczym, jak i cukrzycą wymagającą leczenia insuliną [80]. W badaniach Muy-Rivery i wsp. wykazano, że stężenie leptyny i rozpuszczalnej frakcji jej receptora w surowicy krwi, w ciąży powikłanej stanem przedrzucawkowym była 3-krotnie wyższa niż w ciąży o przebiegu fizjologicznym [105]. Również w ciąży powikłanej stanem przedrzucawkowym w stosunku do ciąży o przebiegu prawidłowym stwierdzano ponad trzykrotne podwyższenie indeksu wolnej leptyny, opisywanego jako iloraz stężenia wolnej leptyny do rozpuszczalnej frakcji jej receptora (krótkiej izoformy Ob-Re). Natomiast ekspresja wydzielniczej izoformy receptora leptyny w surowicy krwi w obu grupach pacjentek była podobna. W pracy tej badano także występowanie polimorfizmu (*TTTC*)<sub>n</sub> w regionie 3-końcowym genu leptyny, określając jako allel *I* wariant o ilości powtórzeń krótszej niż 160 par zasad, a jako allel *II* powtórzenia dłuższe niż 160 par zasad. Wykazano, że ryzyko wystąpienia stanu przedrzucawkowego było prawie 4-krotnie wyższe u kobiet z podwyższonym poziomem leptyny w surowicy oraz z wariantem *I/III* polimorfizmu leptyny w porównaniu do wariantu *I/I*. Z badań tych wynika, że w patogenezie stanu przedrzucawkowego może brać udział nie tylko sam podwyższony poziom hormonu, ale także niektóre warianty jego genu. Zaobserwowano więc, że zarówno stężenie leptyny jak i frakcji rozpuszczalnej jego receptora mogą być markerami oceniającymi ryzyko wystąpienia stanu przedrzucawkowego [105]. Wyniki tych badań obserwowane wprawdzie na niedużej liczbie pacjentek, są jednak zgodne z innymi badaniami zajmującymi się tym problemem [18, 101]. Ekspresja zarówno leptyny, jak i jej izoformy długiej w łożysku, sugeruje

autokryny mechanizm działania tego hormonu w patogenezie nadciśnienia indukowanego ciążą [48, 36].

W dostępnej literaturze można znaleźć doniesienia, w których badano, czy występowanie niektórych polimorfizmów genu leptyny oraz genu jej receptora może wpływać na przebieg ciąży. Badania dotyczące występowania polimorfizmów receptora leptyny u kobiet ciężarnych prowadzili Rigo i wsp. a dotyczyły one wpływu występowania polimorfizmów *Lys109Arg* (A326G) oraz *Gln223Arg* (A668G) receptora leptyny na ciężkość stanu przedrzucawkowego. W grupie 124 ciężarnych wykazano, że postać homozygotyczna (genotyp *Arg223Arg*) lub heterozygotyczna (genotyp *Gln223Arg*) polimorfizmu *Gln223Arg* wiąże się z wystąpieniem ciężkiej postaci stanu przedrzucawkowego 2-krotnie częściej niż postać genotypu *Gln223Gln*. Natomiast polimorfizm receptora *Lys109Arg* nie wpływał w znaczący sposób na rozwój tego powikłania [119].

W badaniach Williamsa i wsp. wykazano, że w grupach kobiet ciężarnych, u których rozwinął się stan przedrzucawkowy, stężenie leptyny korelowało ujemnie ze współczynnikiem masy ciała (BMI) przed ciążą oraz z bezwzględną ilością tkanki tłuszczowej. Najwyższe poziomy leptyny zaobserwowano u szczupłych kobiet, u których rozpoznano stan przedrzucawkowy [160]. Inni badacze wykazali natomiast, że stężenie leptyny w I trymestrze ciąży nie różni się pomiędzy grupami kobiet z i bez stanu przedrzucawkowego, a nawet może być niższe w grupie kobiet z tym powikłaniem [94, 75].

Niektóre polimorfizmy pojedynczych nukleotydów w genie leptyny mogą mieć związek z występowaniem nadciśnienia ciążowego oraz stanu przedrzucawkowego. W pracy Drewsa i wsp. wykazano związek nadekspresji wariantu AA polimorfizmu -2548 G/A oraz allelu A w grupie ciężarnych z nadciśnieniem indukowanym ciążą i stanem przedrzucawkowym [34].

### 1.3.3. **Leptyna a ciąża powikłana cukrzycą**

W surowicy kobiet z ciążą powikłaną cukrzycą ciążową zaobserwowano wyższe poziomy leptyny, jak i wyższe stężenia rozpuszczalnej formy receptora leptyny w porównaniu do ciąży o przebiegu fizjologicznym. Zmiany te obserwuje się szczególnie pomiędzy 29-33 tygodniem ciąży. Wykazano także dodatnią korelację pomiędzy poziomem matczynej leptyny a poziomem glukozy w 1 godzinie doustnego testu obciążenia 50g glukozy [83]. W ciąży powikłanej cukrzycą przedciążową wymagającą leczenia insuliną zaobserwowano wzrost

leptynemii wprost proporcjonalny do dawki insuliny [33]. Ponadto w przypadkach ciąży powikłanych cukrzycą przedciążową wymagającą leczenia insuliną, ze współistniejącą makrosomią płodu, zaobserwowano znamienne wyższe poziomy leptyny we krwi pępowinowej w porównaniu do grupy kobiet bez tego powikłania [140]. Sugeruje to regulatorową rolę leptyny w akumulacji tkanki tłuszczowej u płodu, szczególnie zaznaczoną w przypadkach płodowej makrosomii w tej grupie ciężarnych. W przypadkach ciąży wymagającej stosowania glikokortykoterapii, zaobserwowano wyższe stężenia leptyny we krwi pępowinowej i u noworodka w porównaniu do ciąży cukrzycowej, nie wymagającej takiego leczenia [141].

W pracach Kołaczyńskiego i wsp. badano wpływ stosowania insuliny na ekspresję genu leptyny w warunkach *in vitro* w kulturach tkanki tłuszczowej oraz *in vivo* u ludzi, przy użyciu kłamry hiperglikemicznej [71]. Zaobserwowano, że w długotrwałym stanie hiperglikemii, zastosowanie insuliny wpływało na wzrost ekspresji genu leptyny, co manifestowało się podwyższeniem stężenia tego hormonu w surowicy krwi. Natomiast krótkotrwałe stany hiperglikemii nie wpływały na wystąpienie tego efektu.

Badania dotyczące ekspresji genu leptyny w łożysku w ciąży powikłanej cukrzycą, wymagającej leczenia insuliną wykazały 3-5 krotny wzrost jego ekspresji w porównaniu z grupą kontrolną oraz dodatnią korelację ze stężeniem leptyny i insuliny w krwi pępowinowej, bez istotnego wpływu na stężenie tych substancji w surowicy krwi [80].

#### 1.3.4. Leptyna a inne zaburzenia metaboliczne

Badania nad wymienionymi polimorfizmami genu leptyny i genu jej receptora prowadzono również pod kątem występowania otyłości w różnych populacjach. W pracy Wanga i wsp. przeprowadzonej w grupie ponad 200 otyłych członków populacji Tajwanu badano zależność pomiędzy otyłością a występowaniem poszczególnych polimorfizmów genu leptyny. Wykazano, że homozygota LEP - 2548 G/G może być związana z rozwojem patologicznej otyłości. Natomiast nie stwierdzono związku pomiędzy występowaniem tej jednostki chorobowej a polimorfizmem LEPR *Gln223Arg* [157].

Wykazano również korelację występowania zaburzeń lipidowych w grupie pacjentów zarówno otyłych, jak i z prawidłową masą ciała z pewnymi polimorfizmami genu leptyny i jej receptora. W pracy van der Vleuetena i wsp. badano wpływ występowania polimorfizmu w receptorze dla leptyny LEPR

*Gln223Arg* na rozwinięcie się wrodzonej rodzinnej hiperlipidemii (FCH). W badaniu tym przeprowadzonym na dużej grupie pacjentów (664 osób, 158 z rozpoznaną FCH), stwierdzono wyższe ryzyko wystąpienia FCH u osób z genotypami *Gln223Arg* lub *Gln223Gln* w porównaniu z grupą pacjentów z genotypem *Arg223Arg* [154].



## II. CEL PRACY

Celem rozprawy było zbadanie związku leptyny z przebiegiem ciąży u kobiet chorujących na cukrzycę typu 1. Z uwagi na towarzyszące często cukrzycy powikłania naczyniowe, m. in. nadciśnienie i zaburzenia funkcji nerek w pracy zaplanowano odniesienie wyników w grupie chorych z cukrzycą do grupy ciężarnych z nadciśnieniem oraz do grupy kontrolnej, którą stanowiły zdrowe ciężarne, bez żadnych powikłań ciąży.

Cel ten realizowano w oparciu o analizę:

- a. stężenia leptyny w surowicy u pacjentek z ciążą powikłaną cukrzycą typu 1.
- b. stężenia leptyny u ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym indukowanym ciążą lub nadciśnieniem tętniczym przewlekłym.
- c. ekspresji polimorfizmu substytucyjno-insercyjnego regionu promotorowego genu leptyny -2548 G/A oraz ekspresji polimorfizmu substytucyjnego-insercyjnego genu receptora leptyny 668 A/G w wymienionych grupach ciężarnych.
- d. ekspresji genu leptyny i genu receptora leptyny w łożysku w wymienionych grupach ciężarnych.
- e. wpływu stężenia badanego hormonu w surowicy ciężarnej na przebieg ciąży w wymienionych grupach ciężarnych.
- f. zależności pomiędzy występowaniem wymienionych polimorfizmów genu leptyny i genu receptora leptyny a przebiegiem ciąży w wymienionych grupach ciężarnych.
- g. zależności pomiędzy poziomem ekspresji genu leptyny i genu receptora leptyny w łożysku a przebiegiem ciąży w wymienionych grupach ciężarnych.

### III. MATERIAŁ

Badaniem objęto 220 ciężarnych hospitalizowanych w Klinice Położnictwa i Chorób Kobietych Katedry Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2005-2009. Pacjentki zostały szczegółowo poinformowane o zakresie badania (Formularz Informacyjny dla pacjentki), jego celu oraz wyraziły pisemną zgodę na udział w badaniu (Formularz Świadomej Zgody na udział w badaniu). Na prowadzenie przedstawionych poniżej badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej działającej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 1219/06). Na realizację badania uzyskano grant promotorski nr N N407 2783 33. Strukturę badanych grup przedstawiono poniżej.

#### 3.1. Charakterystyka grup badanych i **protokół wykonywanych badań**

##### 3.1.1. **Ciężarne z cukrzycą**

100 ciężarnych z rozpoznaną przed ciążą cukrzycą typu 1, w ciąży klasyfikowaną wg P. White [99]. Dodatkowo tę grupę badaną podzielono retrospektywnie na podgrupy:

- a. bez powikłań naczyniowych cukrzycy
- b. z retinopatią oraz nefropatią cukrzycową
  - z prawidłowym przebiegiem ciąży,
  - z nadciśnieniem przewlekłym istniejącym przed ciążą,
  - z nadciśnieniem indukowanym ciążą,
- c. z zaburzeniami we wzrastaniu płodu
- d. ze współistniejącym nadciśnieniem tętniczym  
(SGA – zbyt małe dla danego wieku ciążowego, poniżej 10 percentyla,  
LGA – zbyt duże dla danego wieku ciążowego, powyżej 95 percentyla)

U wszystkich ciężarnych chorujących na cukrzycę zebrano dane z wywiadu położniczego i ogólnolekarskiego. Zastosowany schemat postępowania w ciąży obejmował okresowe kontrole w Poradni Przyszpitalnej oraz co najmniej 3-krotne przyjęcia do Kliniki Położnictwa i Chorób Kobietych. Podczas każdej hospitalizacji, ciężarna przechodziła szkolenie ukierunkowane na doskonalenie samokontroli w zakresie wyrównania metabolicznego, stosowania diety cukrzycowej z

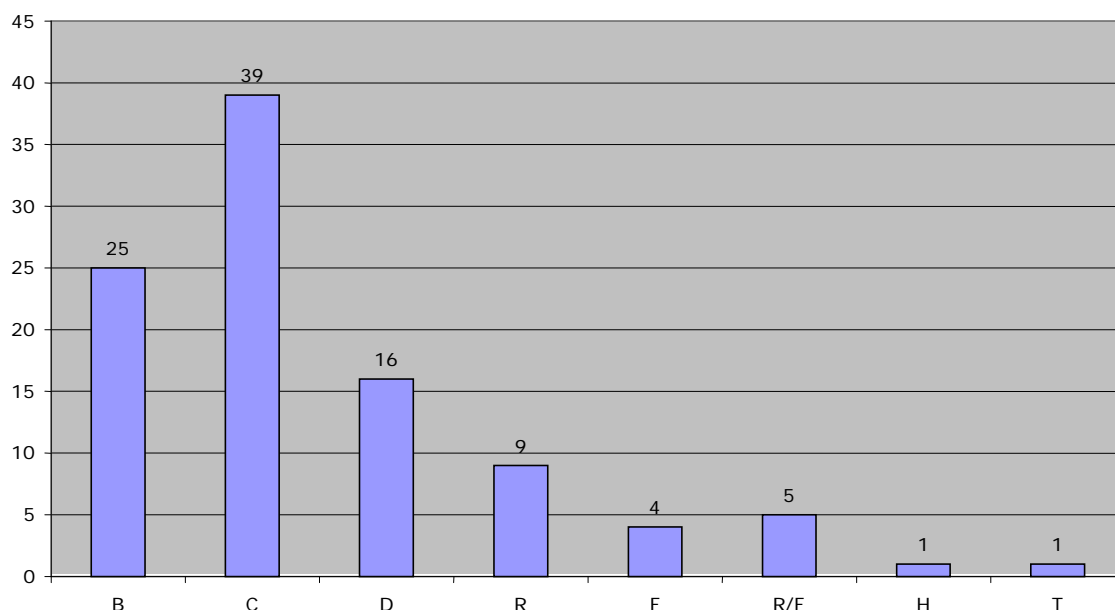
uwzględnieniem podaży kalorycznej dostosowanej do należnej masy ciała (kcal/kg). Kontrolę wyrównania metabolicznego prowadzono przy użyciu osobistych glukometrów, oznaczając glikemię w krwi włosniczkowej. Jako wartości prawidłowe wyrównania metabolicznego przyjęto: glikemia na czczo 60-90mg/dl, 1 godzinę po posiłku poniżej 140mg/dl, 2 godziny po posiłku poniżej 120mg/dl, w godzinach nocnych 60-80mg/dl. Ciężarne chorujące na cukrzycę typu 1 leczone były za pomocą intensywnej czynnościowej insulinoterapii przy użyciu wstrzykiwaczy typu pen lub osobistej pompy insulinowej. Jako środka leczniczego używano rekombinowanych ludzkich insulin długo i krótko działających oraz analogów insulin (LisPro, AspArt). U wszystkich ciężarnych przeprowadzono wymienione w Tabeli IV badania dodatkowe wg przedstawionego schematu.

*Tabela IV. Protokół badań wykonywanych u ciężarnych z cukrzycą.*

Parametr	I trymestr	II trymestr	III trymestr/ Okoloporodowo
LEP -2548 G/A	Pobranie jednokrotne		
LEPR 668 A/G			
Leptyna	+	+	+
LEP łożysko	Pobranie po porodzie		
LEPR łożysko			
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	+	+	+
RR (mmHg)	+	+	+
Dobowy profil glikemii (mg/dl)	+	+	+
HbA <sub>1c</sub> (%)	+	+	+
Cholesterol całkowity (mg/dl)	+	+	+
Cholesterol LDL (mg/dl)	+	+	+
Cholesterol HDL (mg/dl)	+	+	+
Triglicerydy (mg/dl)	+	+	+
Klirens kreatyniny (ml/min)	+	+	+
Kreatynina (mg/dl)	+	+	+
Dobowa utrata białka (g/24h)	+	+	+
Dawka insuliny (U)	+	+	+

Na Wykresie 1 przedstawiono badane ciężarne wg klasyfikacji White. Do klasy B należało 25 ciężarnych, klasy C - 39 ciężarnych, klasy D – 16 ciężarnych, klasy R – 9 ciężarnych, klasy F – 4 ciężarne, klasy R/F – 5 ciężarnych, po jednej ciężarnej do klas H i T.

Wykres 1. Przynależność ciężarnych do klas cukrzycy wg White w momencie objęcia opieką położniczą.



W Tabeli V przedstawiono charakterystykę kliniczną ciężarnych z cukrzycą. Średni wiek badanych ciężarnych wynosił 28 lat a średni czas objęcia opieką położniczą wynosił 9 tydzień ciąży.

Tabela V. Charakterystyka kliniczna ciężarnych z cukrzycą (N=100).

Parametr opisujący	Średnia $\pm$ SD	Min.	Max.
Wiek (lata)*	28 $\pm$ 5	18	42
Wzrost (cm)	164 $\pm$ 7	150	180
Masa ciała (kg)	66 $\pm$ 12	47	113
Początek opieki (tydzień ciąży)*	9 $\pm$ 4	5	37
BMI przed ciążą (kg/m <sup>2</sup> )*	24,6 $\pm$ 4,7	17,9	42,5
BMI okołoporodowo (kg/m <sup>2</sup> )*	28,9 $\pm$ 4,8	20,1	43,6
Przyrost masy ciała w ciąży (kg)*	12	6	21
Czas trwania cukrzycy (lata)*	12 $\pm$ 7	2	39
Średni wiek wystąpienia cukrzycy (lata)*	17 $\pm$ 9	2	29
Liczba ciężarnych z obciążonym wywiadem rodzinnym w kierunku cukrzycy*	27	-	-

\* - podano wartość średnią, odchylenie standardowe (SD), wartość minimalną (Min), maksymalną (Max)

W Tabeli VI przedstawiono dane dotyczące początku opieki nad ciężarnymi w zależności od klasy cukrzycy wg White. Najwcześniej objęto opieką pacjentki z długoletnią cukrzycą, z powikłaniami naczyniowymi w obrębie nerek i narządu wzroku (klasa R/F wg White, 8 tydzień ciąży). Najpóźniej zgłaszały się do Kliniki

ciężarne z wykładnikami jedynie nefropatii cukrzycowej (średnio 15 tydzień ciąży, klasa F wg White).

*Tabela VI. Początek opieki nad ciężarnymi w zależności od klasy cukrzycy wg White. (N=100).*

White	Do 12 t.c.	13-23 t.c	24-28 t.c.	> 28t.c	Średni t.c. w danej grupie*
B	17	6	1	1	12 ± 6
C	31	6	1	1	11 ± 6
D	13	2	0	1	12 ± 6
F	3	0	0	1	15 ± 6
R	7	0	2	0	12 ± 6
R/F	5	0	0	0	8 ± 2
H	1	0	0	0	7
T	1	0	0	0	11
Suma	78	14	4	4	12 ± 6

\* - podano wartość średnią oraz odchylenie standardowe (SD)

### 3.1.2. Ciężarne z nadciśnieniem tętniczym (N=60)

- a. z nadciśnieniem tętniczym indukowanym ciążą (N=39). Za nadciśnienie tętnicze uznano wartości ciśnienia równe lub przekraczające 140/90 mmHg, mierzone dwukrotnie w odstępie 6-godzinnym u ciężarnej po odpoczynku. Za nadciśnienie indukowane ciążą uznano przypadki nadciśnienia ujawniające się po 20 tygodniu ciąży.
- b. z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym (N=21), za które uznano wszystkie przypadki nadciśnienia występujące przed ciążą oraz ujawniające się w ciąży przed ukończeniem 20 tygodnia.

W tej podgrupie ciężarnych wykonywano badania diagnostyczne oraz dodatkowe wg schematu przedstawionego w Tabeli VII.

Tabela VII. Protokół badań wykonywanych u ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym.

Parametr	W momencie wystąpienia nadciśnienia tętniczego w ciąży lub momencie hospitalizacji w przypadku nadciśnienia przewlekłego	III trymestr/ Okoloporodowo
LEP -2548 G/A	Pobranie jednokrotne	
LEPR 668 A/G		
Leptyna	+	+
LEP łożysko	Pobranie jednokrotne po porodzie	
LEPR łożysko		
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	+	+
RR (mmHg)	+	+
Klirens kreatyniny (ml/min)	+	+
Kreatynina (mg/dl)	+	+
Dobowa utrata białka (g/24h)	+	+

W Tabeli VIII przedstawiono zbiorczą charakterystykę kliniczną ciężarnych w grupie z nadciśnieniem tętniczym, bez podziału na podtypy nadciśnienia tętniczego.

Tabela VIII. Charakterystyka ogólna ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym.

Badany parametr	Średnia ± SD	Min.	Max.
Wiek (lata)	31 ± 5	21	43
Wzrost (cm)	165 ± 6	150	178
Masa ciała przed ciążą (kg)	70 ± 14	45	120
Masa ciała okołoporodowo (kg)	85 ± 19	48	138
BMI przed ciążą (kg/m <sup>2</sup> )	26,0 ± 4,9	16,7	42,8
BMI przed porodem (kg/m <sup>2</sup> )	31 ± 5,7	17,8	48,8
Maksymalne wartości RR skurczowe (mmHg)	170 ± 20	140	210
Maksymalne wartości RR rozkurczowe (mmHg)	100 ± 20	80	120

W Tabeli IX przedstawiono charakterystykę kliniczną ciężarnych zakwalifikowanych do grupy z nadciśnieniem tętniczym uwzględniając podział na dwie podgrupy: z przewlekłym nadciśnieniem tętniczym (PNT) oraz nadciśnieniem indukowanym ciążą (NIC). Średni wiek badanych ciężarnych z nadciśnieniem przewlekłym wynosił 33 lata, w grupie z nadciśnieniem indukowanym ciążą średni wiek 28 lat, wystąpienie NIC zaobserwowano średnio w 30 tygodniu ciąży.

Tabela IX. Charakterystyka kliniczna ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym.

Parametr opisujący	Grupa z PNT N=21	Grupa z NIC N=39	P <sup>3</sup>
Wiek (lata) <sup>1</sup>	33 ± 5	28 ± 4	NS
Tydzień ciąży, w którym rozpoznano NIC oraz objęcie opieką w przypadku PNT <sup>1</sup>	25 ± 4	30 ± 6 <sup>2</sup>	NS
BMI przed ciążą (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	27,2 ± 6,4	25 ± 3,3	NS
BMI okołoporodowo (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	33,3 ± 7,2	29 ± 4,0	NS
Przyrost masy ciała w ciąży (kg) <sup>1</sup>	18 ± 4	12 ± 3	NS
Wiek wystąpienia nadciśnienia tętniczego w przypadku PNT (lata) <sup>1</sup>	29 ± 4	-	-

<sup>1</sup> - podano wartość średnią oraz odchylenie standardowe (SD).

<sup>2</sup> - w grupie z NIC dotyczy tygodnia ciąży, w którym wystąpiło nadciśnienie.

<sup>3</sup> - test t-studenta

### 3.2. Grupa kontrolna z **niewpikłanym przebiegiem ciąży** (N=60)

Grupę kontrolną stanowiło 60 zdrowych ciężarnych, tj. bez współistniejącej cukrzycy przedciążowej, z wykluczoną na podstawie testu OGTT 75g (24-28 t.c.) cukrzycą ciążową, z prawidłowym ciśnieniem tętniczym przed i w trakcie trwania ciąży, oraz bez innych istotnych powikłań w ciąży. W tej podgrupie ciężarnych wykonywano badania diagnostyczne oraz dodatkowe wg schematu przedstawionego w Tabeli X.

Tabela X. Protokół badań wykonywanych u pacjentek z grupy kontrolnej.

Parametr	I trymestr	III trymestr/ Okołoporodowo
LEP -2548 G/A	Pobranie jednokrotne	
LEPR 668 A/G		
Leptyna	+	+
LEP łożysko	Pobranie jednokrotne po porodzie	
LEPR łożysko		
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	+	+
RR (mmHg)	+	+

W Tabeli XI przedstawiono charakterystykę kliniczną ciężarnych zakwalifikowanych do grupy kontrolnej. Średni wiek badanych ciężarnych wynosił 28 lat.

Tabela XI. Charakterystyka kliniczna ciężarnych z grupy kontrolnej (N=60).

Badany parametr	Średnia ± SD	Min.	Max.
Wiek (lata) <sup>1</sup>	28 ± 5	18	37
Wzrost (cm) <sup>1</sup>	165 ± 5	153	179
Masa ciała przed ciążą (kg) <sup>1</sup>	62 ± 8	48	85
Masa ciała okołoporodowo (kg) <sup>1</sup>	76 ± 8	61	95
Przyrost masy ciała w ciąży (kg) <sup>1</sup>	14 ± 1	12	20
BMI w I trymestrze (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	22,5 ± 3,1	16,1	29,7
BMI przed porodem (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>1</sup>	27,5 ± 2,8	20,1	33,8
Zmiana (delta) BMI (kg/m <sup>2</sup> )	5 ± 4	-	-
Początek opieki (tydzień ciąży)*	12 ± 2	8	34

<sup>1</sup> - podano wartość średnią, odchylenie standardowe (SD), wartość minimalną (Min), maksymalną (Max)

#### IV. METODYKA

##### 4.1. Badania w surowicy krwi

Badania w surowicy krwi zostały wykonane w Centralnym Laboratorium Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, ul. Polna 33, Poznań.

##### 4.1.1. Badanie stężenia glukozy

Oznaczenie stężenia glukozy w osoczu krwi żyłnej wykonano za pomocą testu enzymatyczno – kolorymetrycznego. Normy laboratoryjne dla tej metody to 70 – 105 mg/dl (SI 3,9 – 5,8 mmol/l). W przypadku oznaczania glikemii we krwi włosniczkowej, używano osobistych glukometrów, w które zaopatrzone były pacjentki.

##### 4.1.2. Badanie odsetka hemoglobiny glikowanej (HbA<sub>1c</sub>)

Oznaczenie odsetka HbA<sub>1c</sub> wykonano w hemolizacji krwi pełnej za pomocą turbidymetrycznej metody immunoinhibicyjnej. Normy laboratoryjne dla tej metody wynoszą 3,8 – 6,3%.

##### 4.1.3. Badanie stężenia frakcji lipidowych

Materiałem do badań stężenia frakcji lipidowych była surowica krwi obwodowej, pobierana na czczo, do próbek Monovette z wykrzepiaczem, w ilości około 10ml

##### a. Oznaczanie cholesterolu całkowitego

Stężenie cholesterolu całkowitego w surowicy krwi wykonano za pomocą ilościowego enzymatycznego testu kolorymetrycznego z wykorzystaniem esterazy cholesterolowej i oksydazy cholesterolowej, używając odczynników



dostarczonych przez firmę Boehringer Mannheim, zgodnie z protokołem zalecanym przez producenta. W metodzie tej natężenie barwy produktu końcowego jest proporcjonalne do stężenia substratu początkowego (cholesterolu) dla reakcji utleniania tego związku pod wpływem peroksydazy. Normy laboratoryjne dla tej metody to zakres 50-239 mg/dl (SI 1,3 – 6,2mmol/l) – wartości te odczytano na spektrofotometrze Hitachi 912.

b. Oznaczanie stężenia cholesterolu zawartego w lipoproteinach o wysokiej gęstości (HDL – Cholesterolu)

Stężenie frakcji HDL cholesterolu oznaczane było w ilościowym enzymatycznym teście kolorymetrycznym z zastosowaniem modyfikowanej glikolem polietylenowym esterazy cholesterolowej i oksydazy cholesterolowej, oraz siarczanu dekstranu. Natężenie barwy produktu końcowego jest proporcjonalne do stężenia substratu początkowego, czyli HDL, analogicznie jak w metodyce oznaczania cholesterolu całkowitego. Wykorzystano zestaw odczynników dostarczonych przez firmę Boehringer Mannheim. Normy laboratoryjne dla tej metody to 45 – 65 mg/dl (SI 1,2 – 1,7mmol/l).

c. Oznaczanie stężenia cholesterolu zawartego w lipoproteinach o niskiej gęstości (LDL - Cholesterolu)

Stężenie cholesterolu zawartego w lipoproteinach o niskiej gęstości zostało obliczone ze wzoru:

$LDL = \text{Cholesterol całkowity [mg/dl]} - \text{Cholesterol HDL [mg/dl]} - \text{Triglicerydy/5 [mg/dl]}$ . Normy laboratoryjne dla tej metody to 35 – 155mg/dl (SI 0,9 – 4,0mmol/l).

d. Oznaczanie stężenia triglicerydów (TG).

Stężenie triglicerydów zostało wykonane w ilościowym enzymatycznym teście kolorymetrycznym wg Wahlefelda. W teście tym natężenie barwy produktu końcowego odpowiedniego ciągu reakcji, jest proporcjonalne do stężenia

triglicerydów. Normy laboratoryjne dla tej metody to 50 – 200[mg/dl] (SI 0,6 – 2,3 [mmol/l]) - spektrofotometr Hitachi 912.

#### 4.1.4. Badanie parametrów nerkowych

Klirens kreatyniny obliczany był w oparciu o stężenie kreatyniny w dwóch próbkach surowicy krwi i próbce moczu pobranej z dobowej zbiórki moczu, zmodyfikowaną metodą Jaffego z próbą ślepa i kompensacją. Oznaczono także dobową utratę białka, oznaczoną w moczu z dobowej zbiórki.

#### 4.1.5. Badanie stężenia leptyny

Materiałem do badania stężenia leptyny była surowica krwi obwodowej. Krew pobierano na czczo, w ilości 10ml, do probówek Monovette z wykrzepiaczem. Następnie krew odwirowano przez 5 minut, przy obrotach 5000 rpm/min. celem oddzielenia elementów morfotycznych krwi. Uzyskaną surowicę zamrażono w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  celem przechowania do czasu wykonania oznaczeń. Oznaczenie stężenia leptyny w surowicy krwi wykonano za pomocą zestawów do ilościowego oznaczenia stężenia substancji badanej metodą ELISA przy użyciu zestawów Quantikine Human Leptin Immunoassay (R&D Systems), zgodnie z odpowiednim protokołem zalecanym przez producenta. Wykonano 100-krotne rozcieńczenie badanej próbki (10 $\mu\text{L}$  próbki oraz 990 $\mu\text{L}$  Kalibrator Diluent RD5P). Dodano 100 $\mu\text{L}$  reagentu RD1-19 do każdej probówki. Następnie dodano 100 $\mu\text{L}$  badanej surowicy do każdej probówki oraz inkubowano przez 2 godziny. Po upływie 2 godzin zaaspirowano zawartość każdej probówki oraz płukano 4-krotnie. Dodano 200 $\mu\text{L}$  koniugatu leptyny do każdej probówki oraz inkubowano przez 1 godzinę. Ponownie zaaspirowano zawartość każdej probówki oraz płukano 4-krotnie. Dodano 200 $\mu\text{L}$  substratu do każdej probówki oraz inkubowano przez 30 minut, ochraniając przed światłem. W końcowym etapie dodawano 50 $\mu\text{L}$  reagentu zatrzymującego reakcję do każdej probówki. Wynik odczytywano przy długości fali 450nm w ciągu 30min, korekcję przeprowadzono przy długości światła 540nm do 570nm. Wynik odczytywano nanosząc otrzymane wyniki na krzywą standardową.

#### 4.1.6. Analiza statystyczna

Do analizy danych zastosowano testy odpowiednie dla rozkładu (rozkład normalny lub jego brak), skali danych (interwałowa, porządkowa, nominalna) oraz wzajemnych relacji badanych parametrów. Badanie normalności rozkładu badano testami Kołmogorowa-Smirnowa, Lillieforsa i Shapiro-Wilka. W przypadku analizy danych, których rozkład był zgodny z rozkładem normalnym stosowano testy parametryczne: t-studenta dla dwóch prób niezależnych, analiza ANOVA oraz testy post-hoc dla więcej niż dwóch prób. W przypadku braku zgodności rozkładu danych z rozkładem normalnym stosowano testy nieparametryczne: U-Manna-Whitneya dla dwóch prób, Kruskala-Wallisa dla więcej niż dwóch prób. Zależności pomiędzy dwiema zmiennymi badano za pomocą współczynnika korelacji Pearsona. Do zbadania wpływu wielu czynników na efekt końcowy stosowano metodę regresji wielorakiej oraz wykreślono krzywe ROC dla określenia wartości predykcyjnej danego testu, badając pole pod krzywą (AUC), czułość, specyficzność oraz punkt odcięcia. Współczynnik istotności statystycznej ustalono na poziomie  $p < 0,05$ . Do obliczeń statystycznych używano programów Statistica 8.0, SPSS v. 16.0, MS Excel 2003.

#### 4.2. Badania genetyczne z surowicy krwi

Badania genetyczne w zakresie identyfikacji polimorfizmów genu leptyny oraz genu receptora leptyny przeprowadzono w Pracowni Biologii Molekularnej Kliniki Perinatologii i Chorób Kobięcych Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu u wszystkich pacjentek z analizowanych podgrup.

##### 4.2.1. Izolacja DNA

Materiał genetyczny (DNA) do badań molekularnych dla oznaczenia genotypu w zakresie istniejących polimorfizmów substytucyjno-insercyjnych genu leptyny i genu receptora leptyny uzyskano z leukocytów krwi obwodowej. Krew pobierano w ilości 10ml, do probówek Monovette z etylenodwuaminoczteroocyanem dipotasu ( $K_2EDTA$ ) jako antykoagulantem. Materiał zamrażono w temperaturze  $-70^{\circ}C$ . Izolacji genomowego DNA dokonano za pomocą komercyjnego zestawu QIAamp DNA Blood mini Kit (Qiagen Inc. Germany).

Do izolacji DNA wykorzystano krew w ilości 200  $\mu$ l. Celem rozbicia błony komórkowej leukocytów dodano enzym proteolityczny proteinazę K (20 $\mu$ l). Uwolnienie materiału genetycznego uzyskano dzięki dodaniu buforu do lizy (200  $\mu$ l). Następnie próbki ogrzewano przez 20 minut w cieplarni i dodano etanol w ilości 200  $\mu$ l. Uzyskany materiał przeniesiono do nowych probówek z membraną silikonową, po czym odwirowano przez 1 minutę przy liczbie obrotów 8000rpm/min. Celem oczyszczenia DNA przemywano dwukrotnie buforami A1 oraz A2 (po 500  $\mu$ l) a następnie ponownie odwirowano (8000 rpm – 1 minuta, następnie 14000 rpm – 3 minuty). Ponownie dodawano bufor do elucji DNA (200  $\mu$ l) i tak uzyskany materiał inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Ostateczne wirowanie (8000rpm - 1 minuta) spowodowało przejście DNA do przesączu. Tak przygotowany materiał był gotowy do dalszych badań.

#### 4.2.2. Ocena jakości otrzymanego DNA

Elektroforezę otrzymanego DNA przeprowadzono w 0,8% żelu agarozowym, używając przyłożonego napięcia do elektrod 120V, przez okres 3 godzin. DNA genomowy był widoczny jako pojedynczy prążek.

#### 4.2.3. Amplifikacja otrzymanego DNA

Amplifikację DNA po jego uprzedniej izolacji opisanej powyżej, wykonano za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR), którą przeprowadzano używając termocyklera PTC 100 Programmable Thermal Controller (MJ Research INC.) Celem uzyskania powielonego odcinka DNA do roztworu reakcyjnego dodano następujące składniki: próbkę DNA (2 $\mu$ l), wodę sterylną, bufor zawierający  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ , trifosforany czterech deoksyrybonuklozydów (dNTPs), odcinki starterowe (primery) oraz enzym polimerazę Taq DNA, dzięki której następuje synteza nowej komplementarnej nici DNA. Skład mieszaniny reakcyjnej optymalizowano (bufory, Taq,  $\text{MgCl}_2$ , dNTPs) celem uzyskania jak najlepszego produktu reakcji PCR. Jeden cykl reakcji PCR składa się z 3 etapów: 1. denaturacji DNA w wysokiej temperaturze (rozpad dwuniciowego DNA na pojedyncze nici); 2. przyłączania odcinków starterowych po uprzednim ochłodzeniu mieszaniny reakcyjnej; 3. właściwej replikacji przez polimerazę DNA. Do powielenia materiału genetycznego stosowano 35 cykli reakcji PCR, co

spowodowało narastanie ilości kopii w sposób wykładniczy ( $2^n$ - gdzie n liczba cykli). Po 35 cyklach reakcji PCR, DNA jest powielony  $3,435874 \times 10^{10}$  razy.

W Tabelach XII, XIII oraz XIV przedstawiono skład mieszaniny reakcyjnej PCR, warunki przeprowadzonej reakcji oraz sekwencje starterów zastosowanych w reakcji.

*Tabela XII. Skład mieszaniny reakcji PCR.*

Składnik reakcji	Producent	Stężenie wyjściowe	Ilość	Objętość na 1 próbkę (μl)
Genomowy DNA		50 ng/μl	0,1 μg	2
Woda sterylna	-	-	-	16,4
Bufor do PCR	Fermentas, Litwa	10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	Fermentas, Litwa	25 mM	1,5mM	1,5
DTP	GeneCraft, Niemcy	2,5 nM	0,2mM	2
Polimeraza DNA	Fermentas, Litwa	5 U/μl	1U	0,2
Starter F	TIB MOLBIOL, Polska	50pmol/ μl	10pmol	0,2
Starter R	TIB MOLBIOL, Polska	50pmol/ μl	10pmol	0,2
Suma				25 μl

*Tabela XIII. Warunki przeprowadzonej reakcji PCR.*

Polimorfizm	Etap	Temperatura (°C)	Czas (min.)	Ilość cykli
Polimorfizm genu leptyny (LEP -2548 G/A)	Denaturacja wstępna	94	3	35
	Denaturacja właściwa	94	1	
	Wiązanie starterów	65	1	
	Synteza	72	1,5	
	Synteza końcowa	72	7	
Polimorfizm genu receptora leptyny (LEPR 668 A/G)	Denaturacja wstępna	94	3	35
	Denaturacja właściwa	94	1	
	Wiązanie starterów	65	1	
	Synteza	72	1,5	
	Synteza końcowa	72	7	

Tabela XIV. Sekwencje starterów zastosowanych podczas reakcji PCR.

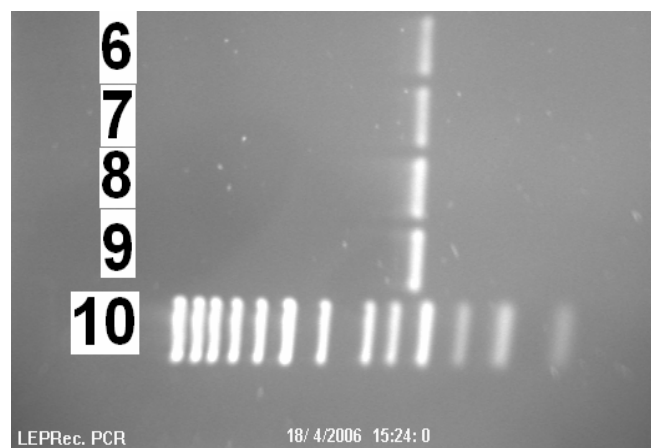
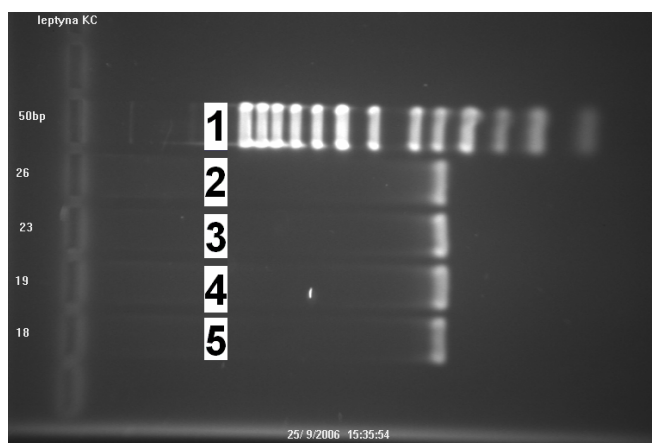
Polimorfizm	Sekwencje starterów		Wielkość produktu (pz)	Literatura
LEP -2548 G/A	Forward	5'-TTT CCT GTA AAT TTC CCG TGA G-3'	242	[106, 107]
	Reverse	5'-AAA GCA AAG ACA GGC ATA AAA A-3'		
LEPR 668 A/G	Forward	5'-AAA CTC AAC GAC ACT CTC CTT- 3'	216	[39, 107]
	Reverse	5'-TGA ACT GAC ATT AGA GGT GAC- 3'		

Na Rycinie 4 przedstawiono produkt reakcji PCR dla genu leptyny (A) i genu receptora leptyny (B).

Rycina 4. Produkt reakcji PCR w zakresie DNA genu leptyny (A) oraz genu receptora leptyny (B), rozdzielone na żelu agarozowym. Tory 1 i 10 – markery wielkości, tory 2-9 – produkty PCR.

(A)

(B)



#### 4.2.4. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP)

Celem identyfikacji genotypu w zakresie genu leptyny oraz genu receptora leptyny uzyskany produkt reakcji PCR hydrolizowano enzymami restrykcyjnymi: w przypadku genu leptyny do identyfikacji polimorfizmu regionu promotorowego LEP -2548 G/A wykorzystano enzym Hin6I (Fermentas, Litwa) natomiast w

przypadku genu receptora leptyny, do identyfikacji polimorfizmu LEPR 668 A/G wykorzystano enzym MspI (Eurx, Polska). Wszystkie reakcje przeprowadzono wg procedur zalecanych przez producentów: temperatura trawienia 37°C przez 16 godzin, temperatura inaktywacji enzymu 65°C przez 20 min.

W Tabeli XV przedstawiono skład mieszaniny reakcyjnej RFLP, natomiast w Tabeli XVI charakterystykę enzymów użytych w reakcji oraz wynik ich działania w postaci produktów uzyskanych po hydrolizie.

*Tabela XV. Skład mieszaniny reakcyjnej po trawieniu RFLP.*

Składnik reakcji	Stężenie wyjściowe	Objętość na 1 próbkę (μl)
Woda sterylna	-	2,5
Bufor do hydrolizy	10x	2,5
Enzym restrykcyjny	10 u/μl	1
Produkt PCR		19
Suma:		25

*Tabela XVI. Charakterystyka enzymów użytych w reakcji oraz produktu ich działania.*

Enzym restrykcyjny	Producent	Rozpoznawana sekwencja	Wielkość produktu PCR	Wielkość produktu po trawieniu
Hin6I	Fermentas, Litwa	5'..G/CGC..3' 3'..CGC/G..5'	242 pz	GA 242 pz, 181 pz, 61 pz
				GG 181 pz, 61 pz
				AA 242 pz
Msp1	Eurx, Polska	5'...C/CGG...3' 3'...GGC/C...5'	216 pz	AG 216 pz, 134 pz, 82 pz
				AA 216 pz
				GG 134 pz, 82pz

Bufor dla LEP -2548 G/A – 10mM Tris-HCl (pH 7,5 w 22°C), 10mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 100μl BSA. Bufor dla LEPR 668 A/G – 10mM Tris-HCl (pH 7,4 w 25°C), 100mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,2 mg/ml BSA, 50% Glicerol)

#### 4.2.5. Analiza polimorfizmów po hydrolizie enzymami restrykcyjnymi

Zarówno produkt reakcji PCR jak i fragmenty tego produktu po reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi poddano rozdzielaniu na 2% żelu agarozowym, w buforze TBE (Sigma Aldrich, 10xTBE, 0,89M Tris, 0,89M kwas borowy, 0,02 EDTA, pH 8,0), w komorze elektroforetycznej poziomej (Sigma-Aldrich, Polska), pod napięciem 120V przyłożonym do elektrod, przez 2 godziny. Żele z rozdzielonym materiałem genetycznym barwiono bromkiem etydydy a następnie wizualizowano w świetle ultrafioletowym. Uzyskane obrazy zapisywano elektronicznie do plików graficznych (UVI-KS4000i/Image PC, UVItec Limited, Cambridge, UK)

Skład mieszaniny do elektroforezy na żelu:

- 24 µl produktu po hydrolizie + 4µl buforu obciążającego (10mM Tris-HCl, pH 7,6), 0,15% orange G, 0,03% ksylenocyjanol FF, 60% glicerol, 60mM EDTA (Fermentas, Litwa) oraz dodatkowo nakładano
- 5 µl markera wielkości 50pz (Fermentas, Litwa)

Po zakończeniu procesu elektroforezy uzyskano następujące wyniki:

Polimorfizm regionu promotorowego genu leptyny -2548 G/A

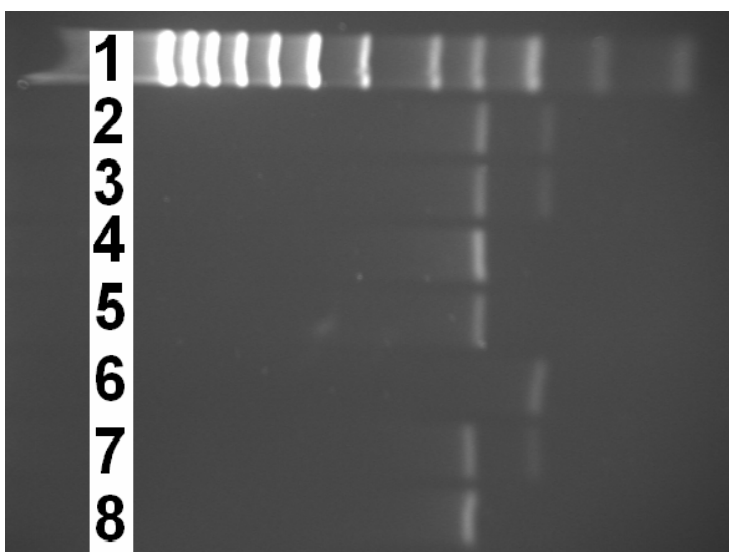
- Heterozygota GA 242pz, 181pz, 61pz,
- Homozygota GG 181pz, 61pz,
- Homozygota zmutowana AA - brak miejsca cięcia dla enzymu - 242pz.

Polimorfizm genu receptora leptyny LEPR 668 A/G

- Heterozygota AG 216pz, 134pz, 82pz,
- Homozygota AA- 216pz,
- Homozygota zmutowana GG 134pz, 82pz.

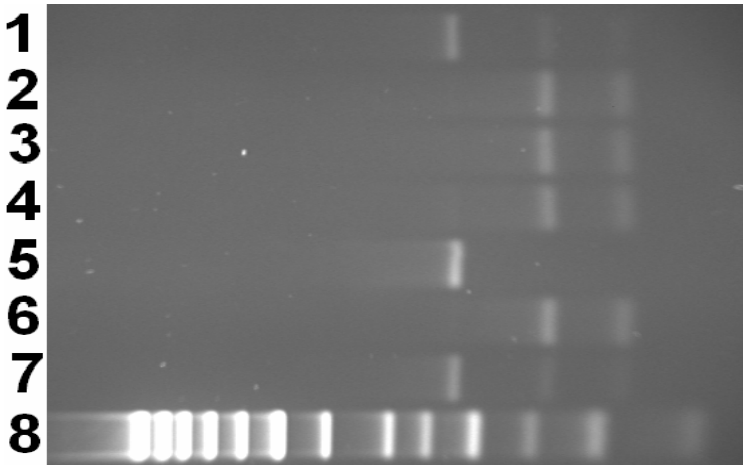
Na Rycinach 5 i 6 przedstawiono wyniki reakcji RFLP po rozdzieleniu na żelu agarozowym, przedstawiające warianty genetyczne genu leptyny oraz genu receptora leptyny.

*Rycina 5. Analiza polimorfizmów genu leptyny LEP -2548 G/A. Trawienie enzymem Hin6I. Produkty rozdzielone na żelu agarozowym. Tor 1 – marker wielkości. Tory 2,3,7 – homozygoty GG, tory 4,5,8- homozygoty AA.*





Rycina 6. Analiza polimorfizmów genu receptora leptyny LEPR 668 A/G. Trawienie enzymem MspI. Produkty rozdzielone na żelu agarozowym. Tor 8 – marker wielkości. Tory 1,7 – heterozygoty AG, tory 2,3,4,6 - homozygoty GG, tor 5- homozygota AA.



#### 4.2.6. Metody statystyczne

Analizę statystyczną rozkładu występowania poszczególnych polimorfizmów oraz frekwencji występowania poszczególnych alleli, celem konfrontacji frekwencji obserwowanych i oczekiwanych, przeprowadzono w oparciu o prawo rozkładu Hardy'ego-Weinberga opisywane następującym równaniem:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1, \text{ gdzie}$$

p i q – częstość występowania poszczególnych alleli badanego genu.

Prawo Hardy'ego-Weinberga określa częstość występowania genotypów w całej populacji. Każda populacja, w której rozkład genotypów potwierdza zależność  $p^2 + 2pq + q^2$ , niezależnie od absolutnych wartości p i q, znajduje się w stanie genetycznej równowagi. Niezbędnym warunkiem do zaistnienia równowagi Hardy'ego-Weinberga jest odpowiednia duża liczebność populacji.

Po zastosowaniu RFLP wytypowano genotypy w zakresie polimorfizmu genu leptyny LEP -2548 G/A oraz polimorfizmu genu receptora leptyny LEPR 668 A/G. Wyznaczono wartości procentowe poszczególnych genotypów w badanych podgrupach, a także wyliczono bezwzględną ilość alleli dla każdego polimorfizmu oraz odpowiadające im wartości procentowe. Używając kalkulatorów statystycznych dostępnych na stronach internetowych:

<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>,

<http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml>

[http://cmccabe.freeshell.org/ant1/hw\\_equilibrium.html](http://cmccabe.freeshell.org/ant1/hw_equilibrium.html)

wyznaczono wartości (liczebności) oczekiwane poszczególnych genotypów oraz odpowiadające im rozkłady procentowe we wszystkich podgrupach pacjentek. Następnie porównano różnice pomiędzy wartościami obserwowanymi a wyznaczonymi wartościami oczekiwanymi, co miało na celu określenie zgodności ich rozkładu z prawem Hardy'ego-Weinberga. Brak różnic istotnych statystycznie w rozkładzie pomiędzy wartościami obserwowanymi a wartościami oczekiwanymi (test dokładny Fishera,  $\chi^2$ -test Chi-kwadrat) poszczególnych genotypów oznacza, że rozkład taki spełnia prawo Hardy'ego-Weinberga. Natomiast stwierdzenie różnicy istotnej statystycznie w rozkładzie genotypów obserwowanych i oczekiwanych oznacza brak równowagi Hardy'ego-Weinberga. Taki brak równowagi może mieć istotny wpływ na dalsze analizy statystyczne, w szczególności, gdy grupa, której test dotyczy nie jest zbyt liczna. Warunkiem zaistnienia równowagi Hardy'ego-Weinberga jest odpowiednia liczebność populacji, losowe kojarzenie osobników, brak dryfu genetycznego, brak selekcji, brak istotnych mutacji [73, 121].

#### 4.3. Badania ultrasonograficzne

Badania ultrasonograficzne płodu przeprowadzono zgodnie z Rekomendacjami Sekcji Ultrasonografii Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego [111]. Badania wykonywane były Aparatem ALOKA Alpha 10 w Pracowni Ultrasonografii Ginekologicznego-Położniczego Szpitala Klinicznego w Poznaniu. U każdej ciężarnej wykonano badanie przynajmniej 3-krotnie w trakcie trwania całej ciąży. Pierwsze badanie przed 10 t.c. obejmowało potwierdzenie ciąży, drugie badanie pomiędzy 11-13<sup>+6</sup> t.c. stanowiło przesiewową analizę w kierunku aberracji chromosomalnych, trzecie pomiędzy 18-22 t.c. biometrię płodu ze szczegółową oceną anatomii, kolejne badanie po 32t.c. biometrię z oceną masy płodu i wydolności jednostki płodowo-łożyskowej (badania dopplerowskie). Masę noworodka oceniano jako nadmierną w przypadku przekroczenia 95 percentyla dla danego tygodnia ciąży (LGA-Large for Gestational Age) a w razie masy powyżej 4000g rozpoznawano makrosomię płodu. Masę równą lub niższą 10-percentylowi uznawano za zbyt niską dla danego tygodnia ciąży (SGA-Small for Gestational Age). Masę pomiędzy 10 a 95 percentylem uznawano za prawidłową (AGA-Aproprate for Gestational Age).

#### 4.4. **Badania genetyczne łożyska**

Materiałem do oznaczenia ekspresji genu leptyny oraz genu receptora leptyny była próbka łożyska pobrana bezpośrednio po porodzie drogami naturalnymi bądź po porodzie operacyjnym. Próbki o objętości około 30 ml zostały zamrożone w ciekłym azocie, a następnie przechowywane w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu wykonania oznaczeń. Badania genetyczne łożyska zostały wykonane w Zakładzie Biotechnologii i Genetyki Instytutu Roślin i Przetworów Zielarskich w Poznaniu.

##### 4.4.1. Izolacja RNA z tkanki łożyska

W celu izolacji RNA wykorzystano 80mg tkanki przechowywanej w  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pobrany materiał zalano 1ml odczynnika TriPure Isolation Reagent (Invitrogen) i homogenizowano. Po maceracji, do próbek dodano 200 $\mu\text{l}$  chloroformu i intensywnie wytrząsano, po czym wirowano 12 000xg,  $4^{\circ}\text{C}$  przez 15 min. Następnie zebrano górną fazę, w której znajdował się RNA, przeniesiono do świeżej próbki i dodano izopropanol w stosunku objętościowym 1:1. Zawartość próbek mieszano i umieszczono na 30 min. w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Po rozmrożeniu próbki z zawartością poddano wirowaniu w warunkach  $4^{\circ}\text{C}$ , 12 000 x g przez 10 min. Następnie usunięto nadsącz, a osad RNA jednokrotnie płukano w 1 ml 75% etanolu przygotowanego z użyciem wody dejonizowanej i autoklawowanej w obecności DEPC, mieszano i pozostawiano na lodzie w celu kilku minut inkubacji. Tak przygotowane próby wirowano przez okres 5 min., w warunkach 7500 x g,  $4^{\circ}\text{C}$ , po czym usunięto etanol pod komorą laminarną, gdzie pozostawiono próby RNA w celu ich wysuszenia na okres 15 min. Po tym czasie do próbek podano 15  $\mu\text{l}$  wody wolnej od rybonukleaz i w celu pełnego rozpuszczenia RNA próbki umieszczono w termobloku w temperaturze  $65^{\circ}\text{C}$  na czas 5 min. Po upływie czasu inkubacji próbki z zawartością zworteksowano i zwirowano. Próby przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$ .

##### 4.4.2. Analiza jakościowa kwasów nukleinowych

Dla oceny jakościowej preparatów posłużono się pomiarem spektrofotometrycznym. Preparaty RNA rozcieńczono  $\text{H}_2\text{O}$  w proporcji 2  $\mu\text{l}$  RNA:

98  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , zworteksowano i zwirowano. Do kalibracji spektrofotometru wykorzystano 100  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ . Odczyt przeprowadzano przy trzech długościach fali:

260nm – maksimum absorpcji dla RNA

280nm – maksimum absorpcji dla białek

320nm – absorpcja dla drobin komórkowych (tzw. tło)

Do obliczeń posłużono się wartościami  $\text{OD}_{260}$  i  $\text{OD}_{280}$  po odjęciu wartości tła ( $\text{OD}_{320}$ ).

Przyjmuje się, że wartość  $\text{OD}_{260}$  (gęstość optyczna) równa jest 1 dla dsDNA o stężeniu 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ssDNA o stężeniu 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$  oraz dla RNA o stężeniu 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

W związku z tym stężenie kwasów nukleinowych obliczano według podanego poniżej wzoru:

$$\text{Stężenie RNA } [\mu\text{g}/\text{ml}] = \text{OD}_{260} \cdot 40 \cdot R$$

gdzie:

R – krotność rozcieńczenia.

#### 4.4.3. Odwrotna transkrypcja

Odwrotną transkrypcję dla pozyskania cDNA przeprowadzano przy użyciu zestawu SuperScript First Strand Synthesis System (Invitrogen). Całą procedurę wykonywano pod komorą laminarną, na lodzie. Do 2  $\mu\text{g}$  RNA rozpuszczonego w wodzie wolnej od RNaz dodawano 1  $\mu\text{l}$  mieszaniny deoksyrybonukleotydów (dNTP) (stężenie wyjściowe 10mM), 1  $\mu\text{l}$  oligo(dT)<sub>20</sub> (stężenie wyjściowe 50 $\mu\text{M}$ ) i uzupełniano wodą wolną od RNaz do objętości 10 $\mu\text{l}$ . Zawartość próbówki mieszano i wirowano przez 30s, po czym umieszczano w termobloku na 5 min. w temperaturze 65°C w celu denaturacji RNA. Następnie próbówkę przenoszono do lodu na 1min., wirowano, ponownie umieszczano w lodzie i dodawano następujące składniki: 2 $\mu\text{l}$  10x stężonego buforu, 2  $\mu\text{l}$  DTT (stężenie wyjściowe 0,1M), 4 $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (stężenie wyjściowe 25mM), 1  $\mu\text{l}$  inhibitora rybonukleaz (40U/ $\mu\text{l}$ ) oraz 1  $\mu\text{l}$  odwrotnej transkryptazy SuperScript III RT (200U/ $\mu\text{l}$ ). Probówkę wstrząsano, krótko wirowano i umieszczano w termobloku. Syntezę cDNA prowadzono w czasie 50 min. w temperaturze 50°C. Po zakończeniu syntezy próbówki poddawano działaniu temperatury 85°C przez 5 min. w celu zatrzymania reakcji. Następnie podawano 1 $\mu\text{l}$  rybonukleazy H i inkubowano 20min w temperaturze 37°C. Po zakończeniu procedury próbówki z cDNA

przechowywano w temperaturze 4°C. W ten sposób uzyskany cDNA posłużył jako matryca do reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym.

#### 4.4.4. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR)

Dla oszacowania zmian w poziomie ekspresji badanych genów OB-R<sub>L</sub> (LEPR) i LEP wykorzystano reakcję łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-PCR). Reakcję przeprowadzano w szklanych kapilarach, w końcowej objętości 10 µl, z wykorzystaniem cDNA pozyskanego w reakcji odwrotnej transkrypcji, specyficznych par starterów oraz zestawu Fast Start DNA Master Sybr Green I (Roche Diagnostic). Do amplifikacji posłużył aparat LightCycler realtime PCR detection system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) natomiast oprogramowanie LightCycler3 Run Version 5.32 i LightCycler Data Analysis Version 3.5.28 pozwoliło na analizowanie uzyskanych wyników oraz porównanie względnych różnic ilości początkowej matrycy. Poziom analizowanych transkryptów standaryzowano względem genu referencyjnego – GAPDH.

Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby w celu amplifikacji transkryptów GAPDH oraz OB-R<sub>L</sub> (LEPR):

- a. 6,9 µl wody wolnej od RNaz
- b. 0,6 µl MgCl<sub>2</sub> (stężenie końcowe 2mM)
- c. 0,25 µl starter pierwszy ( stężenie końcowe 0,5µM)
- d. 0,25 µl starter drugi ( stężenie końcowe 0,5µM)
- e. 1µl LightCycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I, 10 x stężony
- f. 1 µl cDNA

Skład mieszaniny reakcyjnej dla pojedynczej próby w celu amplifikacji transkryptów LEP:

- a. 7,1 µl wody wolnej od RNaz
- b. 0,4 µl MgCl<sub>2</sub> (stężenie końcowe 2mM)
- c. 0,25 µl starter pierwszy ( stężenie końcowe 0,5µM)
- d. 0,25 µl. starter drugi ( stężenie końcowe 0,5µM)
- e. 1µl LightCycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I, 10 x stężony
- f. 1 µl cDNA

Dla wszystkich genów reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym obejmowała kilka następujących po sobie etapów i przebiegała w określonych poniżej warunkach. Tabela XVII przedstawia warunki przeprowadzonej reakcji RT-PCR

*Tabela XVII. Warunki przeprowadzania reakcji RT-PCR.*

Polimorfizm	Etap	Temperatura (°C)	Czas (s)	Ilość cykli
Gen GAPDH	Denaturacja wstępna	95	600	40
	Denaturacja właściwa	95	8	
	Wiązanie starterów	54	6	
	Synteza	72	8	
	Synteza końcowa	70	20	
Gen LEP	Denaturacja wstępna	95	600	60
	Denaturacja właściwa	95	10	
	Wiązanie starterów	54	6	
	Synteza	72	8	
	Synteza końcowa	70	20	
Gen OB-R <sub>L</sub> (LEPR)	Denaturacja wstępna	95	600	60
	Denaturacja właściwa	95	10	
	Wiązanie starterów	58	8	
	Synteza	72	8	
	Synteza końcowa	70	20	

Reakcję przeprowadzano w cyklach obejmujących etapy 2, 3 i 4 po czym nastąpiło topienie produktów reakcji w wyniku wzrostu temperatury do wartości 95°C. Sekwencje starterów GAPDH i OB-R<sub>L</sub> pochodziły z pracy Lima-Couy i wsp. [110], natomiast LEP z pracy Liu i wsp. [111]. Startery rozpuszczano w wodzie do stężenia 50µM. Dla celów roboczych przygotowywano także pożądane objętości starterów o stężeniu 10µM.

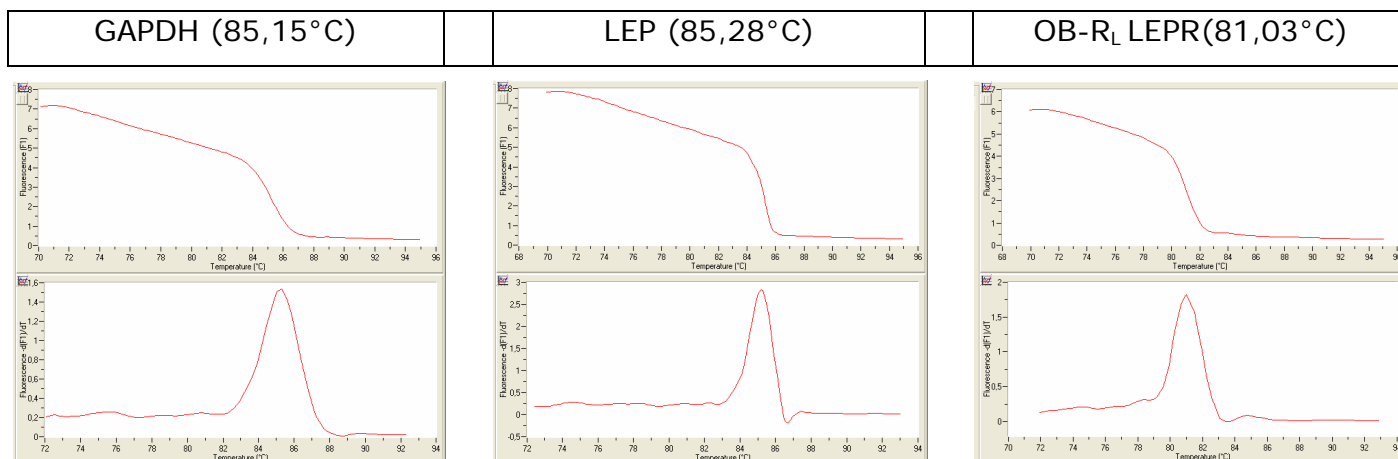
Tabela XVIII. Sekwencje starterów zastosowanych podczas reakcji RT-PCR.

Gen	Sekwencje starterów (5'–3')	Autor metody
GADPH	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	Lima-Couy i wsp. [86]
OB-R <sub>L</sub> (LEPR)	CAA GAA TTG TTC CTG GGC ACA TCA GGC TCC AAA AGA AGA GGA	Lima-Couy i wsp. [86]
LEP	TTG GCC CTA TCT TTT CTA TG GCA TAC TGG TGA GGA TCT GT	Li i wsp. [96]

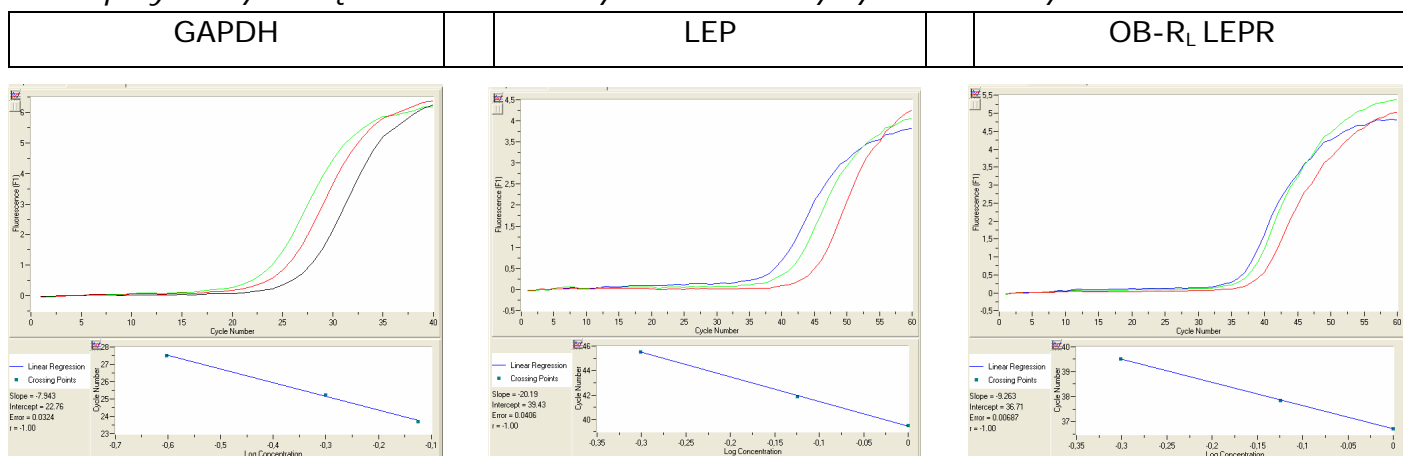
#### 4.4.5. Zestawienie wyników analizy RT-PCR w czasie rzeczywistym

Poziom ekspresji badanych genów oznaczano za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym z użyciem starterów specyficznych dla oznaczanego genu i komplementarnych do fragmentu kodującego. Ilość transkryptu wyznaczano z krzywej wzorcowej, którą sporządzono poprzez wykorzystanie rozcieńczeń cDNA uzyskanego po odwrotnej transkrypcji mRNA oraz użycie starterów oligo(dT), w reakcji amplifikacji cDNA analizowanych genów. Wyniki standaryzowano wobec genu referencyjnego GAPDH, po czym przedstawiono w postaci wykresów jako wartość względną w odniesieniu do grupy kontrolnej. Ilość transkryptu w próbach kontrolnych uznano za poziom ekspresji równy 1. Przykładowe wykresy przedstawiające wyznaczanie temperatury topnienia produktu, przebieg reakcji amplifikacji i krzywą wzorcową dla genów zamieszczono na Rycinie 7 i 8.

Rycina 7. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu reakcji RT-PCR dla poszczególnych genów.



Rycina 8. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla poszczególnych genów przy różnych stężeniach cDNA. Wyznaczanie krzywych wzorcowych.



## V. WYNIKI

W poniższych podpunktach podano parametry wyrównania metabolicznego w poszczególnych podgrupach ciężarnych.

5.1. Wyrównanie metaboliczne, wynik położniczy, stężenie leptyny, rozkład genotypów oraz łożyskowa ekspresja genów w badanych grupach

5.1.1. Ocena wyrównania metabolicznego w grupie ciężarnych z cukrzycą w poszczególnych trymestrach ciąży

W Tabeli XIX przedstawiono charakterystykę wyrównania metabolicznego w pierwszym trymestrze ciąży w grupie ciężarnych z cukrzycą.

Najwyższe średnie wartości glikemii zaobserwowano u ciężarnych należących do klasy C wg White, najwyższy odsetek hemoglobiny glikowanej w grupie ciężarnych z klasą R/F oraz u pacjentki z klasą H wg White. Dobowa utrata białka była najwyższa u ciężarnych z cukrzycą powikłaną nefropatią i retinopatią proliferacyjną (klasy F oraz R/F) i u ciężarnej z klasą H. U ciężarnej z nefropatią oraz u ciężarnej po przeszczepie nerki (klasa T) stwierdzono obniżenie klirensu kreatyniny. Podwyższony poziom kreatyniny zaobserwowano u ciężarnych w klasie R/F. W badaniach profilu lipidowego zaobserwowano najwyższe stężenia



całkowitego cholesterolu u ciężarnych z grup H i T, cholesterolu LDL – u ciężarnych z klasy R/F, triglicerydów – u ciężarnych z grupy B wg White.

W Tabeli XX przedstawiono parametry wyrównania metabolicznego w drugim trymestrze ciąży w grupie ciężarnych z cukrzycą.

Najwyższe średnie wartości glikemii stwierdzono u ciężarnych należących do klasy R/F wg White oraz u ciężarnej z grupy H, najwyższy odsetek hemoglobiny glikowanej natomiast w grupie ciężarnych z klasą B. Dobowa utrata białka była najwyższa u ciężarnych z nefropatią (klasy F oraz R/F) i u ciężarnej z klasą H. Klirens kreatyniny był obniżony u pacjentek z nefropatią oraz u ciężarnej po przeszczepie nerki (klasa T). Podwyższony poziom kreatyniny zaobserwowano u ciężarnych należących do klasy R/F oraz u ciężarnej z klasy H. W badaniach profilu lipidowego zaobserwowano najwyższe stężenia całkowitego cholesterolu u ciężarnych z grup F i H, cholesterolu LDL – u ciężarnych z klasy F i H, triglicerydów – u ciężarnych z grupy F i H wg White.

Tabela XIX. Wyrównanie metaboliczne w grupie badanej – ciężarne z cukrzycą w I trymestrze ciąży.

White	B N=25		C N=39		D N=16		F N=4		R N=9		R/F N=5		H N=1 <sup>3</sup>	T N=1 <sup>3</sup>
	Średnia	Min-Max	Średnia	Min-Max	Średnia	Min-Max	Średnia	Min-Max	Średnia	Min-Max	Średnia	Min-Max		
Glikemia (mg/dl) <sup>4</sup>	100	80-190	190	60-260	110	80-130	100	100-120	120	80-180	110	100-140	130	160
HbA <sub>1c</sub> (%)	7,5	5,3-12,6	7,6	4,8-12,0	80	5,4-9,9	7,9	5,8-8,9	7,7	5,1-12,3	8,5	7,3-8,9	9,7	8,4
Cholesterol LDL (mg/dl)	95	50-230	80	4-120	90	50-130	60	60-90	100	50-110	120	80-180	120	120
Cholesterol HDL (mg/dl)	60	20-110	70	50-110	80	50-100	90	60-90	80	40-120	70	40-110	90	60
Cholesterol całkowity (mg/dl)	168	110-230	160	100-220	170	130-250	160	150-190	200	120-240	180	160-300	230	200
Triglicerydy (mg/dl)	71	40-410	70	20-150	60	30-150	60	60-80	70	50-140	80	50-110	120	100
Klirens kreatyniny (ml/min)	147	90-210	130	60-220	120	60-230	80	70-150	110	90-170	50	40-80	110	40
Kreatynina (mg/dl)	0,53	0,42-0,74	0,50	0,43-0,74	0,55	0,43-0,68	0,97	0,44-1,0	0,59	0,5-0,54	1,60	0,65-2,2	0,8	1,2
Dobowa utrata białka (g/24h)	0	0-0	0,07 <sup>2</sup>	0-0,1	0,07 <sup>2</sup>	0-0,07	2,17	0,8-2,7	0	0-0	1,1	0,8-5,6	5,9	0
RR (mmHg) <sup>1</sup>	100/60	80/50-150/90	100/60	80/50-120/80	110/50	90/50-120/80	100/60	100/60-120/80	110/70	90/60-130/80	130/80	120/70-140/80	140/80	120/70

<sup>1</sup> - podano wartości średnie z 3 pomiarów/dzień w trakcie pobytu ciężarnej na oddziale. <sup>2</sup> - podano wartości średnie. <sup>3</sup> - podano wartości u pacjentki. <sup>4</sup> - wynik z 12 pomiarów w ciągu doby.

Tabela XX. Wyrównanie metaboliczne w grupie badanej – ciężarne z cukrzycą w II trymestrze ciąży.

White	B N=25		C N=39		D N=16		F N=4		R N=9		R/F N=5		H N=1 <sup>2</sup>	T N=1 <sup>2</sup>
	Średnia	Min-Max	Średnia	Min-Max	Średnia	Min-Max	Średnia	Min-Max	Średnia	Min-Max	Średnia	Min-Max		
Glikemia (mg/dl) <sup>3</sup>	100	70-160	90	70-150	100	60-120	90	93-94	93	60-100	100	90-110	160	80
HbA <sub>1c</sub> (%)	6,8	5,2-11,9	6,5	3,9-9,8	6,8	4,2-7,9	5,9	5,7-6,2	6,1	5,1-7,7	5,5	4,7-6,9	6,1	6,1
Cholesterol LDL (mg/dl)	80	60-130	90	60-130	150	90-190	180	-	102	70-200	150	90-280	350	100
Cholesterol HDL (mg/dl)	70	30-120	90	60-110	90	60-110	70	-	82	60-90	90	50-130	90	60
Cholesterol całkowity (mg/dl)	210	130-270	210	140-270	260	190-320	290	-	206	170-340	340	200-490	530	180
Triglicerydy (mg/dl)	110	60-320	130	80-190	180	95-230	220	-	170	80-260	240	140-470	440	130
Klirens kreatyniny (ml/min)	120	90-200	130	40-190	120	80-160	100	74-135	114	70-150	50	20-90	110	50
Kreatynina (mg/dl)	0,44	0,36-0,58	0,51	0,33-0,79	0,55	0,48-0,67	0,70	0,46-0,87	0,6	0,5-0,9	1,9	0,6-3,5	1,60	1,40
Dobowa utrata białka (g/24h)	0	0-0	0,7	0,7	0	0-0	1,8	0,3-3,3	0,20	0-0,4	3,3	0,7-6,8	13,7	0
RR (mmHg) <sup>1</sup>	100/70	80/60-120/90	110/70	80/60-120/80	110/60	90/50-120/80	100/65	80/60-120/70	100/60	80/50-120/70	110/70	100/60-140/80	130/70	110/70

<sup>1</sup> - podano wartości średnie z 3 pomiarów/dzień w trakcie pobytu ciężarnej na oddziale. <sup>2</sup> - podano wartości u ciężarnych (po jednej ciężarnej w każdej podgrupie). <sup>3</sup> - wynik z 12 pomiarów w ciągu doby.

W Tabeli XXI przedstawiono charakterystykę wyrównania metabolicznego w trzecim trymestrze ciąży w grupie ciężarnych z cukrzycą.

Najwyższe średnie wartości glikemii stwierdzono u ciężarnych z klasy B wg White oraz u ciężarnej z klasy H, natomiast najwyższy odsetek hemoglobiny glikowanej w grupie ciężarnych z klas C i D, oraz u pacjentki z klasy H. Dobowa utrata białka była najwyższa u ciężarnych z nefropatią (klasy F oraz R/F) i u 1 ciężarnej z klasą H. Klirens kreatyniny był obniżony u pacjentek z nefropatią (klasa F) oraz u ciężarnej po przebytych zawale serca (klasa H). Podwyższony poziom kreatyniny zaobserwowano u ciężarnych w klasach R/F i F oraz u ciężarnej z klas H i T. W badaniach profilu lipidowego zaobserwowano najwyższe stężenia całkowitego cholesterolu u ciężarnych z klas R/F i F oraz H, cholesterolu LDL – u ciężarnych z klasy R/F i H, triglicerydów – u ciężarnych z klasą F wg White.

W Tabeli XXII przedstawiono zbiorczo wyrównanie metaboliczne w grupie ciężarnych z cukrzycą w poszczególnych trymestrach ciąży. Zaobserwowano tendencję do poprawy wyrównania glikemii opisywanej średnią dobową glikemią oraz odsetkiem hemoglobiny glikowanej, w miarę rozwoju ciąży. W zakresie parametrów lipidowych stwierdzono wzrost stężenia wszystkich frakcji lipidowych. Parametry nerkowe uległy pogorszeniu w trakcie trwania ciąży, ale wydaje się, że miała na to wpływ niejednorodność całej grupy ciężarnych z cukrzycą, obejmująca pacjentki z różnego stopnia uszkodzeniem nerek.

Tabela XXI. Wyrównanie metaboliczne w grupie badanej – ciężarne z cukrzycą w III trymestrze ciąży.

White	B N=24		C N=37		D N=13		F N=10		R N=8		R/F N=6		H N=1 <sup>2</sup>	T N=1 <sup>2</sup>
	Średnia	Min-Max	Średnia	Min-Max	Średnia	Min-Max	Średnia	Min-Max	Średnia	Min-Max	Średnia	Min-Max		
Glikemia (mg/dl) <sup>3</sup>	100	70-170	90	7-140	90	70-100	90	70-180	90	70-110	90	80-160	110	90
HbA <sub>1c</sub> (%)	6,4	5,1-12,1	6,5	4,9-9,2	6,5	5,2-9,4	6	5,7-7,1	6,2	5,4-9,3	6	5,7-6,8	6,1	7
Cholesterol LDL (mg/dl)	110	50-250	130	80-180	170	97-265	150	110-210	103	40-200	180	60-210	250	17
Cholesterol HDL (mg/dl)	70	50-210	80	60-180	70	40-80	80	40-100	79	40-100	80	40-110	40	60
Cholesterol całkowity (mg/dl)	220	140-370	260	190-340	280	210-410	310	200-360	233	110-350	340	260-390	360	260
Triglicerydy (mg/dl)	270	110-580	190	40-630	300	110-510	370	180-560	145	110-350	280	160-560	340	190
Klirens kreatyniny (ml/min)	150	50-170	130	70-200	120	60-140	80	60-170	111	90-140	60	20-100	30	50
Kreatynina (mg/dl)	0,6	0,42-0,94	0,63	0,44-0,86	0,73	0,54-0,96	1,0	0,53-1,22	0,74	0,55-0,93	1,82	2,62-4,63	2,62	1,30
Dobowa utrata białka (g/24h)	0	0-0	0	0-0	0	0-0	4,1	0,4-7,7	0	0-0	3,4	0,9-18,3	22,2	0,9
RR (mmHg) <sup>1</sup>	110/70	100/60-140/90	110/70	80/60-140/90	110/70	100/60-135/90	120/70	110/60-130/90	120/70	100/60-130/90	120/80	100/60-160/90	100/60	110/70

<sup>1</sup> - podano wartości średnie z 3 pomiarów/dzień w trakcie pobytu ciężarnej na oddziale. <sup>2</sup> - podano wartości u ciężarnych (po jednej ciężarnej w każdej podgrupie). <sup>3</sup> - wynik z 12 pomiarów w ciągu doby.

Tabela XXII. Wyrównanie metaboliczne w grupie ciężarnych z cukrzycą w poszczególnych trymestrach ciąży.

PARAMETR	I TRYMESTR		II TRYMESTR		III TRYMESTR	
	Średnia	Min-Max	Średnia	Min-Max	Średnia	Min-Max
Glikemia dobowa (mg/dl) <sup>1</sup>	110	60-260	100	60-160	90	70-180
HbA <sub>1c</sub> (%)	7,9	4,8-12,6	6,6	3,9-11,9	6,6	4,9-12,5
Cholesterol LDL (mg/dl)	90	20-180	110	20-350	140	40-260
Cholesterol HDL (mg/dl)	70	20-1120	80	30-130	80	40-210
Cholesterol całkowity (mg/dl)	170	100-300	240	140-530	270	110-410
Triglicerydy (mg/dl)	80	20-410	170	65-470	260	40-630
Klirens kreatyniny (ml/min)	130	50-220	120	20-200	110	20-200
Kreatynina (mg/dl)	0,61	0,38-2,18	0,64	0,33-3,54	0,79	0,39-4,59
Dobowa utrata białka (g/24h)	0,31	0-5,98	0,57	0-13,7	1,27	0-22,1

<sup>1</sup> - wynik z 12 pomiarów w ciągu doby.

### 5.1.2. Ocena wyrównania metabolicznego w grupie ciężarnych nadciśnieniem tętniczym

W Tabeli XXIII przedstawiono parametry metaboliczne w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym. W grupie ciężarnych z przewlekłym nadciśnieniem tętniczym (PNT) zaobserwowano znamienne wyższe średnie wartości klirensu kreatyniny oraz triglicerydów w porównaniu do grupy ciężarnych z nadciśnieniem indukowanym ciążą (NIC). W grupie pacjentek z NIC najwyższą była dobową utratę białka (12,4g/24h) stwierdzono u pacjentki z ciężkim stanem przedrzucawkowym. Nie zaobserwowano istotnych różnic w profilu lipidowym pomiędzy ciężarnymi z obu grup. Ponadto zaobserwowano istotnie wyższą masę ciała oraz niezamiennie wyższy wskaźnik BMI u ciężarnych z przewlekłym nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do grupy z nadciśnieniem indukowanym ciążą.

*Tabela XXIII. Parametry metaboliczne w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym w okresie okołoporodowym.*

Parametr opisujący	Grupa z PNT N=21			Grupa z NIC N=39			p <sup>1</sup>
	Średnia	Min.	Max	Średnia	Min.	Max.	
Klirens kreatyniny (ml/min)	160	90	250	110	30	220	<0,05
Kreatynina (mg/dl)	0,5	0,4	0,9	0,4	0,4	3,3	NS
Dobowa utrata białka (g/24h)	0,4	0	0,6	0,4	0	12,4	NS
Cholesterol całkowity (mg/dl)	280	200	400	280	50	850	NS
Cholesterol HDL (mg/dl)	70	50	110	70	50	380	NS
Cholesterol LDL (mg/dl)	150	70	220	130	60	510	NS
Triglicerydy (mg/dl)	360	120	430	310	140	810	<0,05
Masa ciała (kg)	93	58	138	78	48	103	<0,001
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	33,3	20,5	48,8	29,2	17,8	37,1	NS

<sup>1</sup> - test t-studenta.

### 5.1.3. Wynik położniczy w grupie ciężarnych z cukrzycą

U 89 ciężarnych z cukrzycą ciąża zakończyła się powodzeniem, u 11 ciężarnych doszło do obumarcia ciąży. Wynik położniczy w tej grupie ciężarnych, z uwzględnieniem klasy cukrzycy wg White przedstawiono w Tabeli XXIV.

Największą liczbę niepowodzeń w ciąży zanotowano w grupie pacjentek z cukrzycą klasy B i R/F. Najwyższą średnią masę urodzeniową noworodka zaobserwowano u ciężarnych klasy D wg White, ale największe dziecko w całej podgrupie urodziła ciężarna z cukrzycą klasy B (5200g). Zwracają uwagę niskie masy urodzeniowe noworodków ciężarnych klas H i T – ciążę rozwiązane przedwcześnie ze wskazań zagrożenia życia ciężarnej. Jedynie u ciężarnych należących do klas B, C i D ciążę ukończono na drodze porodu naturalnego. U ciężarnych z powikłaniami naczyniowymi (klasy R, F, R/F, H, T) wykonywano cięcie cesarskie. U 5 ciężarnych poród ukończono operacyjnie drogą pochwową za pomocą wyciągacza próżniowego lub kleszczy położniczych, z powodu objawów zagrożenia życia płodu w II okresie porodu. Nie zaobserwowano wyraźnych różnic w pourodzeniowym stanie noworodka opisywanym gazometrią krwi pępowinowej.



Tabela XXIV. Wynik położniczy w grupie ciężarnych z cukrzycą z uwzględnieniem klas cukrzycy wg White.

Parametr	Cała grupa N=100	Klasy cukrzycy wg White							
		B N=25	C N=39	D N=16	R N=9	F N=4	R/F N=5	H N=1	T N=1
Liczba ciąż zakończonych powodem N(%)	89 (89)	20 (80)	36(92)	14(87)	9(100)	4(100)	4(80)	1(100)	1(100)
Liczba ciąż zakończonych niepowodzeniem N(%)	11	5 (20)	3 (8)	2(13)	0(0)	0(0)	1(20)	0(0)	0(0)
Średni tydzień ciąży w przypadku porodu (t.c.) <sup>1</sup>	37 (30-42)	37 (31-42)	38 (33-41)	37 (33-40)	37 (30-39)	37 (36-38)	34 (32-37)	-	32
Średni tydzień ciąży w przypadku obumarcia ciąży (t.c.) <sup>1</sup>	15 (6-37)	17 (9-35)	20 (6-37)	9 (8-10)	-	-	7	-	-
Masa noworodka (g) <sup>1</sup>	3400 (1020-5200)	3550 (1020-5200)	3490 (2490-5030)	3560 (2110-4690)	3130 (1310-4410)	3170 (2080-4010)	2140 (1490-3490)	1550	1130
PSN N(%)	26 (29)	10 (50)	13 (36)	3 (21)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
CC N(%)	58 (65)	9 (45)	19 (52)	11 (81)	9 (100)	4 (100)	4 (100)	1 (100)	1 (100)
VAC/FOR N(%)	5 (6)	1 (5)	4 (12)	0 (79)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ap. 1 <sup>1</sup>	8 (1-10)	8 (1-10)	8 (2-10)	8 (5-10)	8(5-10)	8(6-10)	9 (6-10)	6	8
Ap. 5 <sup>1</sup>	9 (1-10)	9 (1-10)	9 (6-10)	9 (8-10)	9 (7-10)	9 (9-10)	9 (8-10)	7	8
pH_żyła_pępowinowa <sup>1</sup>	7,27 (6,93-7,49)	7,26 (7,02-7,41)	7,28 (7,04-7,49)	7,25 (7,09-7,38)	7,25 (6,93-7,38)	7,23 (7,17-7,35)	7,30 (7,22-7,35)	7,35	7,25
BE_żyła_pępowinowa <sup>1</sup>	-3,76 (6,0; -16,6)	-5,84 (1,6; -16,6)	-3,85 (1,4; -13,1)	-3,15 (6,0; -9,7)	-1,5 (4,6; -9,3)	-2,8 (1,3; -7,4)	-2,73 (1,8; -8,2)	0,7	-1,4
pH_tętnica_pępowinowa <sup>1</sup>	7,22 (6,97-7,38)	7,20 (7,03-7,36)	7,23 (6,98-7,38)	7,19 (7,03-7,31)	7,23 (6,97-7,34)	7,19 (7,02-7,34)	7,26 (7,20-7,31)	7,27	7,22
BE_tętnica_pępowinowa <sup>1</sup>	-3,48 (6,0; -17,0)	-4,17 (0,7; -12,6)	-3,98 (2; -17,0)	-3,37 (0; -10)	-1,81 (6; -12)	-2,90 (0; -6)	-2,20 (2; -8)	0,7	-2,5

<sup>1</sup>- podano wartość średnią oraz wartości minimalne i maksymalne.

W Tabeli XXV przedstawiono charakterystykę oraz wyrównanie metaboliczne w I trymestrze ciąży w grupie pacjentek z cukrzycą w zależności od wyniku położniczego – ciążę zakończoną powodzeniem lub niepowodzeniem oraz wystąpieniem wady u płodu. Ciężarne, u których doszło do niepowodzenia ciąży były gorzej wyrównane metabolicznie w I trymestrze ciąży (HbA<sub>1c</sub>) w porównaniu do pozostałych podgrup. Ciężarne, które urodziły dziecko z wadą, miały najniższy poziom leptyny w I trymestrze, najwyższą masę ciała przed ciążą oraz najwyższy poziom triglicerydów. Nie zaobserwowano różnic w średniej dobowej glikemii, stężeniu LDL, HDL i cholesterolu oraz wywiadzie cukrzycowym w opisywanych podgrupach ciężarnych.

*Tabela XXV. Charakterystyka oraz wyrównanie metaboliczne w I trymestrze ciąży w grupie ciężarnych z cukrzycą w zależności od wyniku położniczego.*

Parametr	Ciąża zakończona powodzeniem (N=89)	Ciąża zakończona niepowodzeniem (N=11)	Wada u płodu (N=4)	p <sup>1</sup>
Czas trwania DM	12 (2-29)	12 (2-23)	10 (3-19)	NS
Wiek wystąpienia cukrzycy	27 (18-42)	30 (22-38)	30 (26-38)	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,6 <sup>A</sup> (17,9-42,5)	25,1 (18,2-38,9)	30 <sup>B</sup> (20-40)	<0,05 <sup>2</sup>
Hba <sub>1c</sub> (%)	7,9 (4,8-12,6)	8,6 <sup>C</sup> (6,7-10,8)	7,1 <sup>D</sup> (5,8-9,2)	<0,05 <sup>3</sup>
MBG (mg/dl)	110 (60-260)	120 (80-160)	130 (100-180)	NS
Leptyna (ng/ml)	28,04 (1,16-97,72)	28,34 <sup>E</sup> (11,51-40,70)	16,92 <sup>F</sup> (4,54-26,98)	<0,05 <sup>4</sup>
LDL (mg/dl)	90 (20-180)	80 (60-100)	80 (60-90)	NS
HDL (mg/dl)	70 (20-120)	60 (30-90)	60 (30-80)	NS
T-Chol (mg/dl)	170 (100-300)	160 (130-210)	170 (160-180)	NS
Triglicerydy (mg/dl)	80 <sup>G</sup> (20-270)	100 <sup>H</sup> (40-410)	160 <sup>I</sup> (50-320)	<0,05 <sup>5</sup>

<sup>1</sup> – ANOVA oraz test post-hoc (Scheffe). <sup>2</sup> –A vs. B <sup>3</sup> –C vs. D <sup>4</sup> –E vs. F <sup>5</sup> –G,H vs. I

#### 5.1.4. Wynik położniczy w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym oraz w grupie kontrolnej

W grupie pacjentek z nadciśnieniem tętniczym tylko w jednym przypadku doszło do obumarcia ciąży w 26 tygodniu. Średni wiek ciąży w momencie porodu w obu podgrupach wynosił 37 tygodni. Wyniki przedstawiono w Tabeli XXVI.

Znamiennie wyższą masę urodzeniową zaobserwowano u ciężarnych z przewlekłym nadciśnieniem tętniczym. Odsetek cięć cesarskich i porodów drogami naturalnymi był porównywany w obu podgrupach. U jednej ciężarnej zakończono poród za pomocą wyciągacza próżniowego. Nie stwierdzono istotnych różnic w pourodzeniowym stanie zdrowia noworodków opisywanym medianą skali Apgar oraz gazometrii krwi pępowinowej.

W analizowanej grupie ciężarnych zdrowych nie zaobserwowano niepowodzeń ciąży. Poród odbył się średnio w 38 tygodniu ciąży. U ponad połowy pacjentek poród odbył się drogami naturalnymi, u jednej poród ukończono za pomocą wyciągacza próżniowego. Stan pourodzeniowy noworodków opisywany za pomocą skali Apgar i gazometrii krwi pępowinowej był prawidłowy (Tabela XXVII).

*Tabela XXVI. Wynik położniczy w grupie badanej z przewlekłym nadciśnieniem tętniczym (PNT) oraz nadciśnieniem indukowanym ciążą (NIC).*

Parametr	PNT N=21	NIC N=39	p <sup>2</sup>
Liczba ciąż zakończonych powrodzeniem N(%)	21 (100)	38 (99)	-
Liczba ciąż zakończonych niepowodzeniem N(%)	0	1	-
Średni tydzień ciąży w przypadku porodu (t.c.) <sup>1</sup>	37 (32-40)	37 (29-41)	NS
Średni tydzień ciąży w przypadku obumarcia ciąży (t.c.) <sup>1</sup>	-	26	-
Masa noworodka (g) <sup>1</sup>	3250 (1680-5070)	2760 (760-4020)	<0,05
PSN N(%)	11 (52)	18 (48)	NS
CC N(%)	10 (48)	19 (50)	NS
VAC N(%)	0	1 (2)	NS
FOR N(%)	0	0	NS
Ap. 1 <sup>1</sup>	9 (8-10)	9 (1-10)	NS
Ap. 5 <sup>1</sup>	9 (8-10)	9 (5-10)	NS
pH_żyła_pępowinowa <sup>1</sup>	7,32 (7,23-7,41)	7,29 (7,08-7,40)	NS
BE_żyła_pępowinowa <sup>1</sup>	-1,06 (2,8;-4,3)	-2,29 (2,5;-11,0)	NS
pH_tętnica_pępowinowa <sup>1</sup>	7,27 (7,17-7,46)	7,24 (7,02-7,34)	NS
BE_tętnica_pępowinowa <sup>1</sup>	-1,74(3,0;-7,4)	-2,54 (1,6;-10,1)	NS

<sup>1</sup> - podano wartość średnią oraz wartości minimalne i maksymalne, <sup>2</sup> - test t-studenta

*Tabela XXVII. Wynik położniczy w grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych.*

Parametr	Grupa kontrolna N=60
Liczba ciąż zakończonych powodzeniem (N)	60
Liczba ciąż zakończonych niepowodzeniem (N)	0
Tydzień ciąży w przypadku porodu (t.c.) <sup>1</sup>	38(34-41)
Masa noworodka (g) <sup>1</sup>	3520 (2350-4460)
PSN N(%)	34 (57)
CC N(%)	25 (42)
VAC N(%)	1 (2)
Ap. 1 <sup>1</sup>	9 (3-10)
Ap. 5 <sup>1</sup>	9(8-10)
pH_ żyła_pępowinowa <sup>1</sup>	7,31 (7,11-7,45)
BE_ żyła_pępowinowa <sup>1</sup>	-2,63 (3,10;-950)
pH_ tętnica_pępowinowa <sup>1</sup>	7,25 (7,13-7,38)
BE_ tętnica_pępowinowa <sup>1</sup>	-3,21(1,90; -10,20)

<sup>1</sup> - podano wartość średnią oraz wartości minimalne i maksymalne.

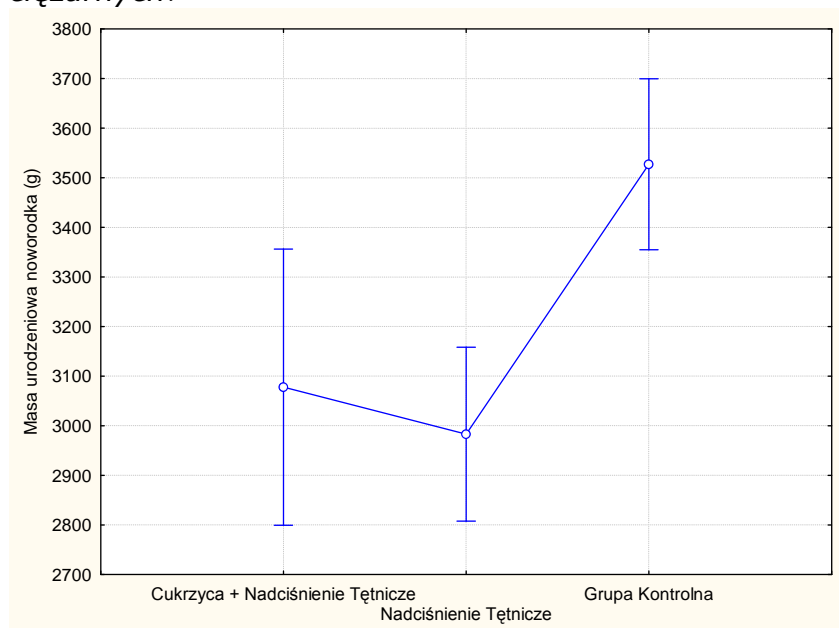
W Tabeli XXVIII przedstawiono porównanie wyników położniczych pomiędzy podgrupą ciężarnych z cukrzycą oraz współistniejącym nadciśnieniem tętniczym, grupą ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym oraz z grupą kontrolną.

*Tabela XXVIII. Porównanie wyników położniczych pomiędzy badanymi grupami ciężarnych.*

Parametr	Cukrzyca z nadciśnieniem /N=22/	NIC + PNT /N=60/	Grupa kontrolna /N=60/	P
Liczba ciąż zakończonych powodzeniem N(%)	22(100)	59(98)	60(100)	NS <sup>3</sup>
Liczba ciąż zakończonych niepowodzeniem N(%)	0	1	0	-
Średni tydzień ciąży w przypadku porodu (t.c.) <sup>1</sup>	37 (32-42)	37 (29-41)	39(34-41)	NS
Średni tydzień ciąży w przypadku obumarcia ciąży (t.c.) <sup>1</sup>	-	26	-	-
Masa noworodka (g) <sup>1</sup>	2980 <sup>A</sup> (1490-4410)	3060 <sup>B</sup> (790-5070)	3520 <sup>C</sup> (2350-4460)	<0,05 <sup>2</sup>
PSN N(%)	3 (13)	29 (48)	29	NS
CC N(%)	17 (77)	29 (48)	25	NS
VAC/FOR N(%)	2(10)	2 (4)	3	NS
Ap. 1 <sup>1</sup>	8 (2-10)	9 (1-10)	9 (3-10)	NS
Ap. 5 <sup>1</sup>	9 (6-10)	10 (5-10)	10 (8-10)	NS
pH_ żyła_pępowinowa <sup>1</sup>	7,28 (7,10-7,41)	7,30 (7,08-7,41)	7,31 (7,11-7,45)	NS
BE_ żyła_pępowinowa <sup>1</sup>	-3,53 (-9,70;1,80)	-2 (-11;2,8)	-3 (-9,5;3,1)	NS
pH_ tętnica_pępowinowa <sup>1</sup>	7,22 (7,02-7,36)	7,26 (7,02-7,46)	7,25(7,13-7,38)	NS
BE_ tętnica_pępowinowa <sup>1</sup>	-3,31 (-9,90;1,70)	-2 (-10,1;3)	-4 (-10,2;0,9)	NS

<sup>1</sup> - podano wartość średnią oraz wartości minimalne i maksymalne, <sup>2</sup>- A,B vs. C, test Anova oraz post-hoc NIR. <sup>3</sup>- test Chi<sup>2</sup>

Wykres 2. Średnia masa urodzeniowa noworodka w poszczególnych podgrupach ciężarnych.



Test NIR; zmienna Masy_neonatus Prawdopodobieństwa dla testów post-hoc Błąd: MS międzygrupowe = 4346E2, df = 121,00				
Nr podkl.	DMHT_HT_C	Cukrzyca i Nadciśnienie 2981,0	Nadciśnienie 3059,6	Grupa kontrolna 3523,6
1	Cukrzyca i Nadciśnienie		0,649470	0,002328
2	Nadciśnienie	0,649470		0,000486
3	Grupa kontrolna	0,002328	0,000486	

Zaobserwowano znamienne wyższą masę urodzeniową noworodków z grupy kontrolnej w porównaniu z noworodkami matek, które w trakcie ciąży chorowały na nadciśnienie tętnicze, zarówno z, jak i bez cukrzycy. W zakresie parametrów opisujących stan urodzeniowy noworodków nie zanotowano istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami.

5.1.5. Stężenie leptyny (ng/ml) w grupie ciężarnych z cukrzycą w poszczególnych trymestrach ciąży, z uwzględnieniem klasy cukrzycy wg White

W Tabeli XXIX przedstawiono zmienność stężenia leptyny w poszczególnych trymestrach ciąży, z uwzględnieniem klasy cukrzycy wg White.

Tabela XXIX. Stężenie leptyny w grupie badanej ciężarnych z cukrzycą w zależności od czasu trwania cukrzycy i obecności powikłań naczyniowych.

Parametr/klasa cukrzycy wg White	I trymestr [12 tydzień]	II trymestr [23 tydzień]	Okoloporodowo [36 tydzień]	p <sup>1</sup>
Klasa B	23,65 (4,2-45,5)	15,95 <sup>A</sup> (2,3-87,4)	28,45 <sup>B</sup> (8,0-56,2)	<0,05 <sup>2</sup>
Klasa C	27,76 (1,20-85,0)	32,15 (3,2-95,9)	28,32 (3,6-57,6)	NS
Klasa D	16,05 (5,8-97,7)	30,51 (2,4-93,8)	25,56 (5,3-54,5)	NS
Klasa F	29,71 <sup>C</sup> (9,9-30,3)	30,53 <sup>D</sup> (18,2-42,9)	48,35 <sup>E</sup> (8,2-70,8)	<0,05 <sup>3</sup>
Klasa R/F	10,38 (4,2-41,2)	15,65 (4,8-19,26)	20,33 (8,9-38,9)	NS
Klasa R	17,79 <sup>F</sup> (4,5-70,5)	28,35 <sup>G</sup> (10,3-59,2)	25,53 (5,5-43,6)	<0,05 <sup>4</sup>
Klasa H	44,61	44,39	26,81	-
Klasa T	18,08	8,56	14,82	-
Cała grupa ciężarnych z cukrzycą	27,69 (1,2-97,7)	31,14 (2,3-95,9)	27,66 (3,6-70,8)	NS

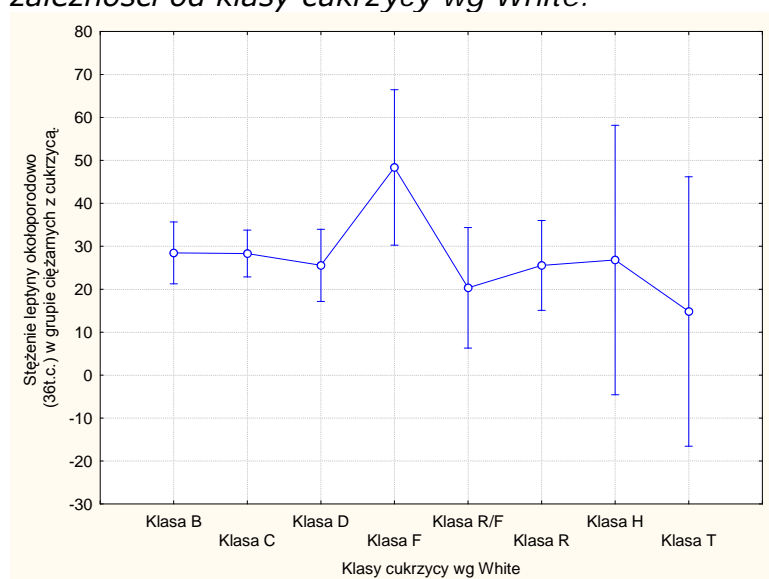
<sup>1</sup>- Test ANOVA i post-hoc NIR

<sup>2</sup>- A vs. B

<sup>3</sup>- C, D vs. E

<sup>4</sup>- F vs. G

Wykres 3. Okoloporodowe stężenie leptyny w grupie ciężarnych z cukrzycą w zależności od klasy cukrzycy wg White.



Test NIR; Stężenie leptyny w III trymestrze ciąży.								
	White	Klasa B 28,454	Klasa C 28,320	Klasa D 25,560	Klasa F 48,357	Klasa R/F 20,333	Klasa R 25,535	Klasa H 26,813
1	Klasa B		0,976494	0,603412	0,045396	0,308203	0,648282	0,919388
2	Klasa C	0,976494		0,584343	0,038139	0,293986	0,639587	0,925160
3	Klasa D	0,603412	0,584343		0,025688	0,526038	0,997074	0,938932
4	Klasa F	0,045396	0,038139	0,025688		0,017148	0,032822	0,239833
5	Klasa R/F	0,308203	0,293986	0,526038	0,017148		0,555493	0,708272
6	Klasa R	0,648282	0,639587	0,997074	0,032822	0,555493		0,938848
7	Klasa H	0,919388	0,925160	0,938932	0,239833	0,708272	0,938848	

W całej grupie ciężarnych z cukrzycą stężenie leptyny nie różniło się istotnie statystycznie w poszczególnych trymestrach ciąży, natomiast analizując stężenie tego związku z podziałem na klasy cukrzycy wg White, zaobserwowano następujące różnice: stężenie leptyny w III trymestrze ciąży było najwyższe w grupie ciężarnych z cukrzycą klasy F i różniło się istotnie od stężenia leptyny u pacjentek z pozostałych klas, z wyjątkiem H i T (wykres 3).

#### 5.1.6. Stężenie leptyny w surowicy krwi u ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym

W Tabeli XXX przedstawiono stężenie leptyny (ng/ml) w grupie badanej z nadciśnieniem tętniczym.

W tej grupie ciężarnych zaobserwowano nieco wyższe stężenie leptyny w momencie objęcia opieką i okołoporodowo w grupie ciężarnych z PNT w porównaniu do grupy z NIC. Różnice te nie osiągnęły jednak istotności statystycznej. Wyższe stężenie leptyny w okresie okołoporodowym stwierdzono u ciężarnych z nadciśnieniem przewlekłym.

Tabela XXX. Stężenie leptyny w poszczególnych trymestrach ciąży w grupie badanej z nadciśnieniem tętniczym.

Parametr opisujący	Grupa z PNT N=21		Grupa z NIC N=39		P
	Objęcie opieką (25 t.c.)	Okołoporodowo (36 t.c.)	Wystąpienie NIC (30 t.c.)	Okołoporodowo (36 t.c.)	
Leptyna <sup>1</sup> (ng/dl)	20,60 <sup>A</sup> (2,8-55,4)	26,49 <sup>C</sup> (5,7-77,9)	18,33 <sup>B</sup> (3,5-87,6)	23,83 <sup>D</sup> (4,1-93,7)	NS <sup>2</sup>

<sup>1</sup> - wartość średnia oraz min. i max. <sup>2</sup> – A vs. B oraz C vs. D, test t-studenta, A vs. C – p<0,05

### 5.1.7. Stężenie leptyny u ciężarnych z i bez stanu przedrzucawkowego

W Tabeli XXXI przedstawiono stężenie leptyny w momencie rozpoznania stanu przedrzucawkowego i okołoporodowo oraz odpowiadające im stężenia leptyny u ciężarnych bez tego powikłania

*Tabela XXXI. Stężenie leptyny u ciężarnych z i bez stanu przedrzucawkowego.*

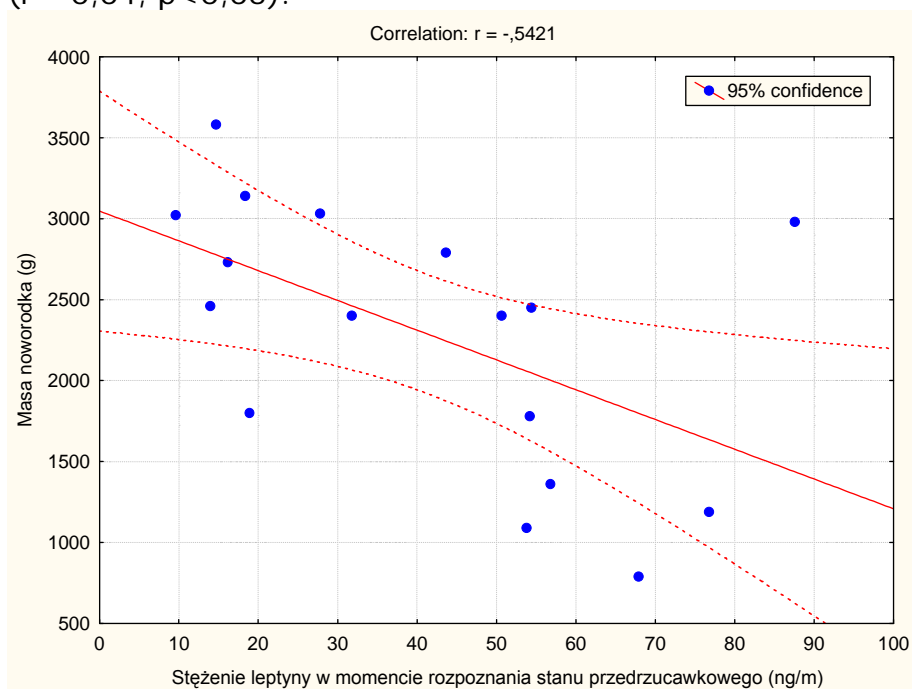
Parametr	Stan przedrzucawkowy		Bez stanu przedrzucawkowego	
	rozpoznanie	okołoporodowo	rozpoznanie	okołoporodowo
Leptyna (ng/ml)	39,786 <sup>A</sup> (9,62-87,55)	34,322 <sup>B</sup> (7,38-77,88)	24,98 <sup>C</sup> (2,75-65,96)	31,31 <sup>D</sup> (4,12-93,74)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,0 (19,7-32,1)	30,2 (22,1-37,1)	25,0 (16,7-42,5)	30,7 (17,8-48,9)
Masa noworodka (g)	2290 <sup>E</sup> (790-3580)		3270 <sup>F</sup> (1680-5070)	
Poród (t.c.)	35 <sup>G</sup> (26-41)		38 <sup>H</sup> (32-41)	

A vs. C –  $p < 0,05$ , B vs. D – NS, E vs. F,  $p < 0,05$ , test Manna-Whitneya, G vs. H –  $p < 0,05$ , test Chi<sup>2</sup>

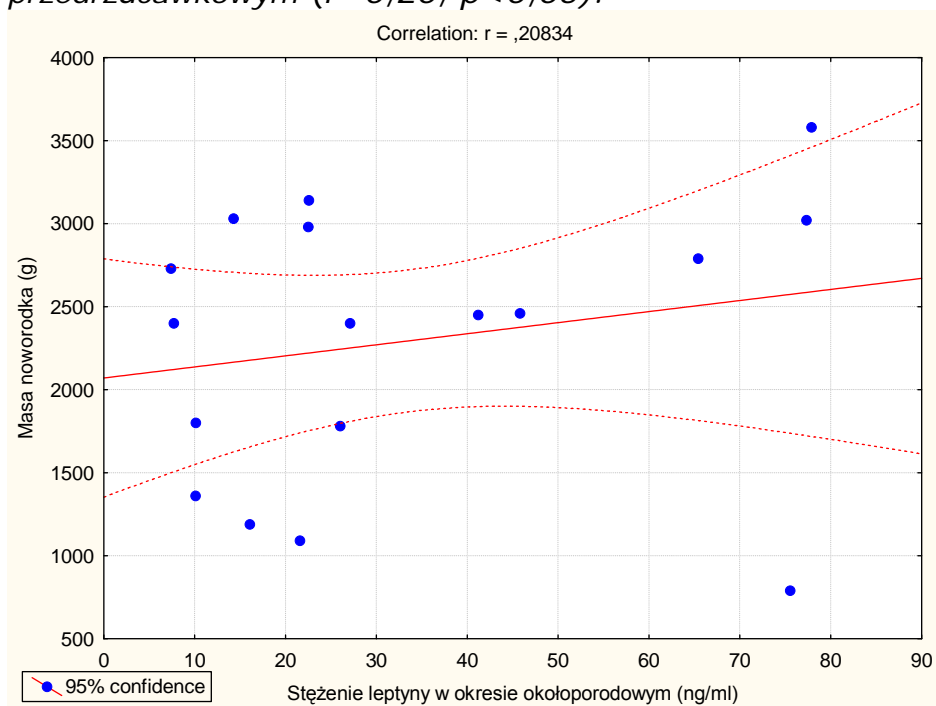
U ciężarnych, u których rozwinął się stan przedrzucawkowy stwierdzono istotnie wyższe stężenie leptyny w momencie jego wystąpienia w porównaniu do odpowiadającego mu stężenia leptyny u ciężarnych bez tego powikłania. Natomiast w okresie okołoporodowym stwierdzono także wyższe stężenie leptyny w porównaniu do ciężarnych bez tego powikłania, ale różnica ta nie była znamienna statystycznie. Ciężarne ze stanem przedrzucawkowym urodziły wcześniej i noworodki charakteryzowały się niższą masą urodzeniową. Warto podkreślić wysokie stężenia leptyny w momencie rozpoznania PE u ciężarnych z najcięższym przebiegiem tej choroby – noworodki urodzone najwcześniej i o najniższej masie ciała. Natomiast w okresie okołoporodowym stężenie leptyny było wyższe u ciężarnych, które urodziły dzieci o wyższej masie ciała. Podobnie łożyskowa ekspresja genu leptyny i jej receptora była pozytywnie skorelowana z masą ciała. Powyższe zależności przedstawiono na Rycinach 9, 10 i 11.



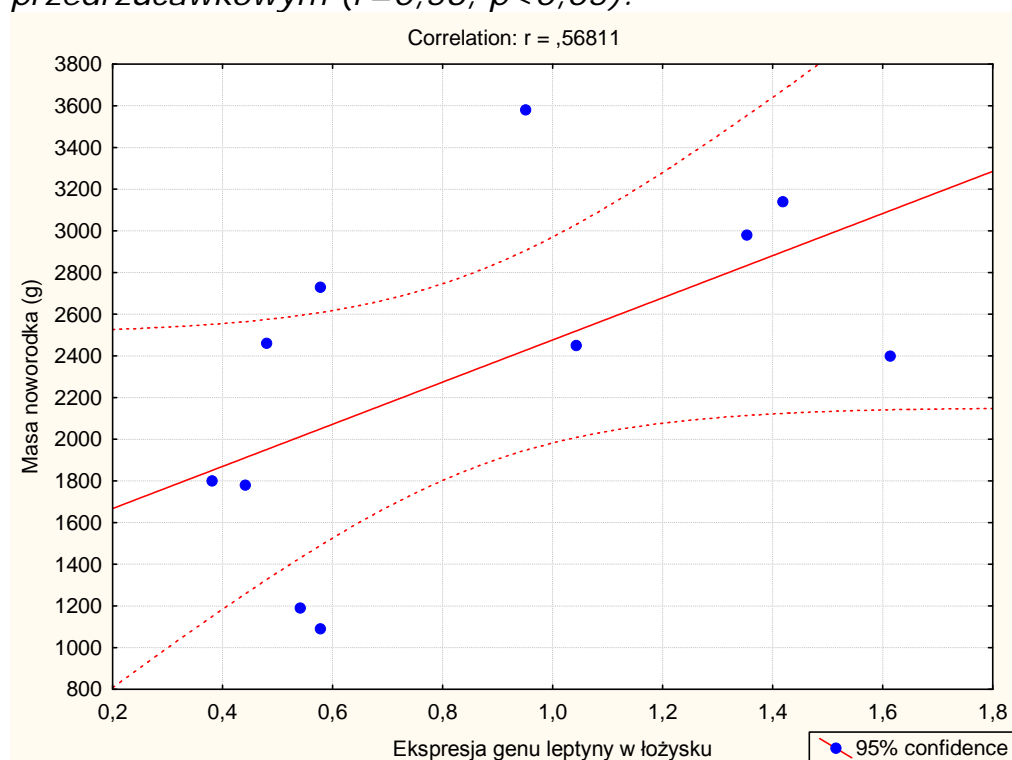
Rycina 9. Stężenie leptyny w momencie rozpoznania stanu przedrzucawkowego ( $r=-0,04$ ,  $p<0,05$ ).



Rycina 10. Stężenie leptyny w okresie okołoporodowym u ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym ( $r=0,20$ ,  $p<0,05$ ).



Rycina 11. Ekspresja genu leptyny w łożysku u ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym ( $r=0,56$ ,  $p<0,05$ ).



#### 5.1.8. Stężenie leptyny (ng/ml) w surowicy krwi u ciężarnych z grupy kontrolnej.

W Tabeli XXXII podano wartości stężenia leptyny w grupie zdrowych ciężarnych.

Tabela XXXII. Stężenie leptyny w poszczególnych trymestrach ciąży w grupie kontrolnej.

Parametr opisujący	Zdrowe ciężarne (N=60)		P
	Objęcie opieką (12 t.c.)	Okoloporodowo (36 t.c.)	
Leptyna <sup>1</sup> (ng/dl)	20,69 (2,1-93,1)	19,57 (1,94-90,1)	NS <sup>2</sup>

<sup>1</sup> - podano wartość średnią oraz wartości maksymalne i minimalne, <sup>2</sup>- test t-studenta

W tej podgrupie ciężarnych także nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w stężeniu leptyny w kolejnych badanych okresach ciąży.

5.1.9. Porównanie stężeń leptyny pomiędzy badanymi podgrupami w poszczególnych trymestrach ciąży

*Tabela XXXIII. Stężenie leptyny w poszczególnych trymestrach ciąży we wszystkich podgrupach ciężarnych.*

Parametr/grupa	I pobranie (12 t.c.)	II pobranie (23 t.c.)	III pobranie (36 t.c.)
Ciężarne z cukrzycą	27,69 (1,2-97,7)	31,14 (2,3-95,9)	27,66 <sup>A</sup> (3,6-70,8)
Ciężarne z nadciśnieniem	brak oznaczeń w I trymestrze ciąży	25,13 (2,75-87,55)	30,77 <sup>B</sup> (4,12-93,74)
Zdrowe ciężarne	20,69 (2,1-93,1)		19,57 <sup>C</sup> (1,94-90,1)
P	<0,001 <sup>1</sup>	<0,001 <sup>1</sup>	<0,01 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>- test t-studenta <sup>2</sup> – test Anova, testy post-hoc, A vs. C, B vs. C

Zaobserwowano istotnie wyższe stężenie leptyny w I trymestrze ciąży w grupie ciężarnych z cukrzycą w porównaniu do grupy zdrowych ciężarnych. Ponadto grupa ciężarnych z cukrzycą charakteryzowała się wyższym stężeniem leptyny w II trymestrze ciąży w porównaniu do grupy ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym. Natomiast w trzecim trymestrze ciąży (średnio 36 tydzień ciąży we wszystkich podgrupach) najwyższe wartości stwierdzono w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym i cukrzycą, które były znamienne wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej.

5.1.10. Ocena rozkładu genotypów i alleli polimorfizmów LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G w grupie ciężarnych z cukrzycą

Zbadano zgodność rozkładu genotypów LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G z prawem Hardego-Weinberga poprzez ocenę różnicy pomiędzy wartościami obserwowanymi a oczekiwanymi.

Tabela XXXIV. Analiza rozkładu genotypów LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G w grupie pacjentek z cukrzycą.

Polimorfizm	Genotyp	Wartość obserwowana N(%)		Wartość oczekiwana N(%)		Istotność
LEP -2548 G/A	GG	25	25	23,6	23,6	p>0,05 (test Chi <sup>2</sup> oraz dokładny Fishera)
	GA	47	47	49,9	49,9	
	AA	28	28	26,5	26,5	
Suma		100	100	100	100	
Allel G		97	48,5	-	-	
Allel A		103	51,5	-	-	
Suma		200	100	-	-	
LEPR 668 A/G	AA	27	27	26,1	26,1	P>0,05 (test Chi <sup>2</sup> oraz dokładny Fishera)
	AG	48	48	49,9	49,9	
	GG	25	25	24,0	24,0	
Suma		100	100	100	100	
Allel A		102	51	-	-	
Allel G		98	49	-	-	
Suma		200	100	-	-	

Na podstawie obliczeń dokonanych za pomocą kalkulatorów internetowych stwierdzono, że rozkład genotypów polimorfizmów LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G nie odbiega od rozkładu opisywanego prawem Hardego-Weinberga. Nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w rozkładzie genotypów obserwowanych z oczekiwanymi. Dotyczyło to zarówno liczebności jak i procentowego rozkładu danej cechy zarówno w zakresie LEP -2548 G/A jak i LEPR 668 A/G. Zaobserwowano przewagę allelu A w obu genotypach, który wynika z przewagi liczebności heterozygot i homozygot AA. Rozkład w genotypów w grupie badanej ciężarnych z cukrzycą spełniał założenia rozkładu zgodnego z prawem Hardy'ego-Weinberga.

#### 5.1.11. Ocena rozkładu genotypów oraz alleli LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym

W Tabeli XXXV przedstawiono rozkład genotypów i alleli polimorfizmów LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym bez współistniejącej cukrzycy. Zbadano zgodność rozkładu z prawem Hardy'ego-

Weinberga poprzez oceną różnicy pomiędzy wartościami obserwowanymi a oczekiwanymi.

*Tabela XXXV. Analiza rozkładu genotypów LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G w grupie pacjentek z nadciśnieniem tętniczym.*

Polimorfizm	Genotyp	Wartość obserwowana N(%)		Wartość oczekiwana N(%)		Istotność
LEP -2548 G/A	GG	17	28,3	16,5	27,5	p>0,05 (test Chi <sup>2</sup> oraz dokładny Fishera)
	GA	29	48,3	29,9	49,8	
	AA	14	23,3	13,6	22,5	
Suma		60	100	60	100	
Allel G		63	52,5	-	-	
Allel A		57	47,5	-	-	
Suma		120	100	-	-	
LEPR 668 A/G	AA	17	28,3	17,1	28,4	p>0,05 (test Chi <sup>2</sup> oraz dokładny Fishera)
	AG	30	50,0	29,9	49,7	
	GG	13	21,7	13,0	13,1	
Suma		60	100	60	100	
Allel A		64	53,3	-	-	
Allel G		56	46,7	-	-	
Suma		120	100	-	-	

Na podstawie obliczeń dokonanych za pomocą kalkulatorów internetowych stwierdzono, że rozkład genotypów polimorfizmów LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G nie odbiega od rozkładu opisywanego prawem Hardy'ego-Weinberga. Nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w rozkładzie genotypów obserwowanych z oczekiwanymi. W tej podgrupie ciężarnych dotyczyło to także zarówno liczebności jak i procentowego rozkładu danej cechy. W zakresie LEP -2548 G/A zaobserwowano przewagę allelu G, która wynika z przewagi heterozygot i homozygot GG. Natomiast w zakresie LEPR 668 A/G dominował allel A, którego dominacja wynika z przewagi heterozygot i homozygot AA. Rozkład w genotypów w grupie kontrolnej ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym bez współistniejącej cukrzycy, również spełnia założenia rozkładu zgodnego z prawem Hardego-Weinberga.

5.1.12. Ocena rozkładu genotypów oraz alleli LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G w grupie kontrolnej

W Tabeli XXXVI przedstawiono rozkład genotypów i alleli polimorfizmów LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G w grupie ciężarnych kobiet zdrowych z ciążą niepowikłaną. Zbadano zgodność rozkładu z prawem Hardygo-Weinberga poprzez ocenę różnicy pomiędzy wartościami obserwowanymi a oczekiwanymi.

Tabela XXXVI. Analiza rozkładu genotypów LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G w grupie kontrolnej.

Polimorfizm	Genotyp	Wartość obserwowana N(%)		Wartość oczekiwana (%)		Istotność
LEP -2548 G/A	GG	14	23,3	17,1	28,3	p>0,05 (test Chi <sup>2</sup> oraz dokładny Fishera)
	GA	36	60,0	29,9	49,7	
	AA	10	16,7	13,0	13,0	
Suma		60	100	60	100	
Allel G		64	53,3	-	-	
Allel A		56	46,7	-	-	
Suma		120	100	-	-	
LEPR 668 A/G	AA	12	20	16,0	26,7	P<0,05 (test Chi <sup>2</sup> oraz dokładny Fishera)
	AG	38	63,3	29,9	49,9	
	GG	10	16,7	14,1	23,4	
Suma		60	100	60	100	
Allel A		62	51,6	-	-	
Allel G		58	48,7	-	-	
Suma		120	100	-	-	

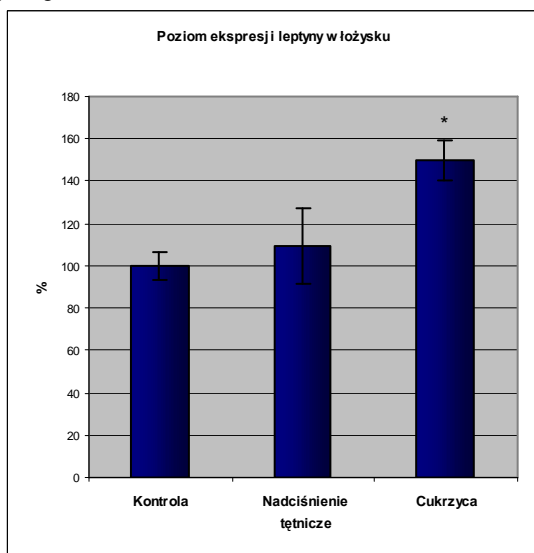
Na podstawie obliczeń dokonanych za pomocą kalkulatorów internetowych stwierdzono, że rozkład genotypów polimorfizmów LEP -2548 G/A nie odbiega od rozkładu opisywanego prawem Hardygo-Weinberga. Nie zaobserwowano istotnej statystycznie różnicy w rozkładzie genotypów obserwowanych z oczekiwanymi. W tej podgrupie ciężarnych dotyczyło to także zarówno liczebności jak i procentowego rozkładu polimorfizmu LEP -2548 G/A. Zaobserwowano przewagę

allelu G, która wynika z liczebności heterozygot i homozygot GG. Natomiast rozkład genotypów w zakresie LEPR 668 A/G nie spełniał założeń Hardy-Weinberga. Zaobserwowano istotną statystycznie różnicę pomiędzy liczebnością oraz rozkładem obserwowanym z odpowiadającymi im wartościami oczekiwanymi. Zaburzenie rozkładu polegało na zbyt licznej reprezentacji genotypu heterozygotycznego AG w tej podgrupie ciężarnych. W zakresie LEPR 668 A/G dominował allel A. Brak zgodności rozkładu z prawem H-W może wynikać z braku spełnienia jednego lub kilku warunków niezbędnych do zaistnienia tej równowagi.

#### 5.1.13. Ilościowa analiza ekspresji genu leptyny w łożysku

Na wykresie 4 przedstawiono poziom ekspresji leptyny w łożysku w poszczególnych grupach pacjentek. Za wartość referencyjną ustalono poziom ekspresji w grupie zdrowych pacjentek, z ciążą niepowikłaną (100%) i do niego odnoszono wartości obserwowane w grupach pacjentek z powikłaną ciążą (cukrzycą lub nadciśnieniem). Przedstawiono średnie wartości poziomu ekspresji oraz standardowy błąd średniej (SEM).

Wykres 4. Poziom ekspresji genu leptyny w łożysku w poszczególnych grupach pacjentek.



Poziom ekspresji genu leptyny w łożysku w poszczególnych grupach pacjentek.

Podgrupa	Poziom ekspresji leptyny w łożysku		p <sup>1</sup>	
	Średnia(%)	Standardowy błąd średniej (SEM%)		
Zdrowe pacjentki	100 <sup>A</sup>	6,4666	NS <sup>2</sup>	<0,05 <sup>3</sup>
Nadciśnienie tętnicze	109,2857 <sup>B</sup>	17,561		
Cukrzyca	150,1054 <sup>C</sup>	9,303		

<sup>1</sup> - test ANOVA oraz testy post-hoc (Scheffe i NIR) <sup>2</sup> - A vs. B, p=NS. <sup>3</sup> - A vs C, B vs. C, p<0,05

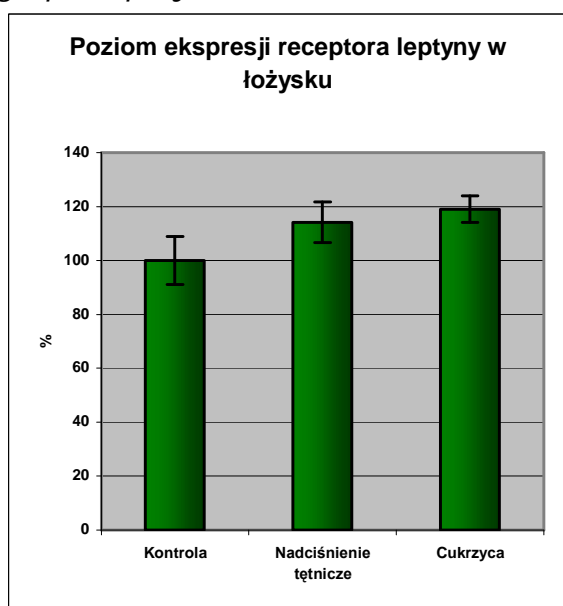
Nie zaobserwowano różnicy w ekspresji genu leptyny w łożysku pomiędzy grupą ciężarnych zdrowych a grupą z nadciśnieniem tętniczym. Natomiast poziom ekspresji leptyny w łożysku był istotnie statystycznie wyższy w grupie pacjentek z cukrzycą typu 1 w stosunku do grupy kontrolnej oraz do grupy z nadciśnieniem tętniczym.

#### 5.1.14. Ilościowa analiza ekspresji genu receptora leptyny w łożysku

Na wykresie 5 przedstawiono poziom ekspresji receptora leptyny w łożysku w poszczególnych grupach pacjentek. Podobnie za wartość referencyjną ustalono poziom ekspresji w grupie zdrowych pacjentek, z ciążą niepowikłaną (100%) i do niego odnoszono wartości obserwowane w grupach pacjentek z powikłaną ciążą (cukrzycą lub nadciśnieniem). Przedstawiono średnie wartości poziomu ekspresji oraz standardowy błąd średniej (SEM).



Wykres 5. Poziom ekspresji genu receptora leptyny w łożysku w poszczególnych grupach pacjentek.



Poziom ekspresji genu receptora leptyny w łożysku w poszczególnych grupach pacjentek.

Grupa	Poziom ekspresji receptora leptyny w łożysku		P <sup>1</sup>
	Średnia%	Standardowy błąd średniej (SEM%)	
Zdrowe pacjentki	100	8,9074	NS
Nadciśnienie tętnicze	114,1841	7,5814	
Cukrzyca typu 1	119,0107	4,8885	

<sup>1</sup> – test ANOVA, brak istotnych różnic.

Wykazano, iż w łożysku kobiet z cukrzycą i nadciśnieniem poziom ekspresji receptora leptyny był wyższy w stosunku do grupy kobiet z prawidłową ciążą, ale różnica ta nie osiągnęła istotności statystycznej.

## 5.2. Analiza łożyskowej ekspresji genu leptyny i genu receptora leptyny w zależności od wyniku położniczego

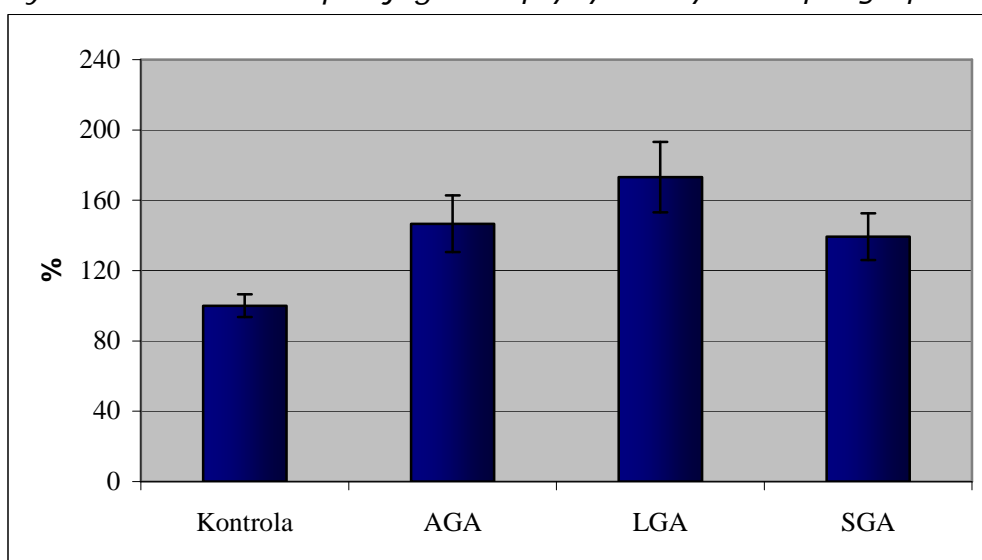
Ze względu na zróżnicowanie kliniczne pacjentek z cukrzycą wynikające z czasu trwania choroby, wyrównania metabolicznego i współistnienia powikłań naczyniowych, podzielono badane ciężarne na podane poniżej podgrupy, w których przeanalizowano poziom ekspresji LEP i LEPR w łożyskach.

W podgrupie pierwszej (I) wyodrębniono ciężarne: a) z cukrzycą typu 1 oraz z prawidłowym wzrastaniem płodu (AGA – Appropriate for Gestational Age) – w grupie tej analizie poddano 20 łożysk (N=20), b) ciężarne z nadmiernym

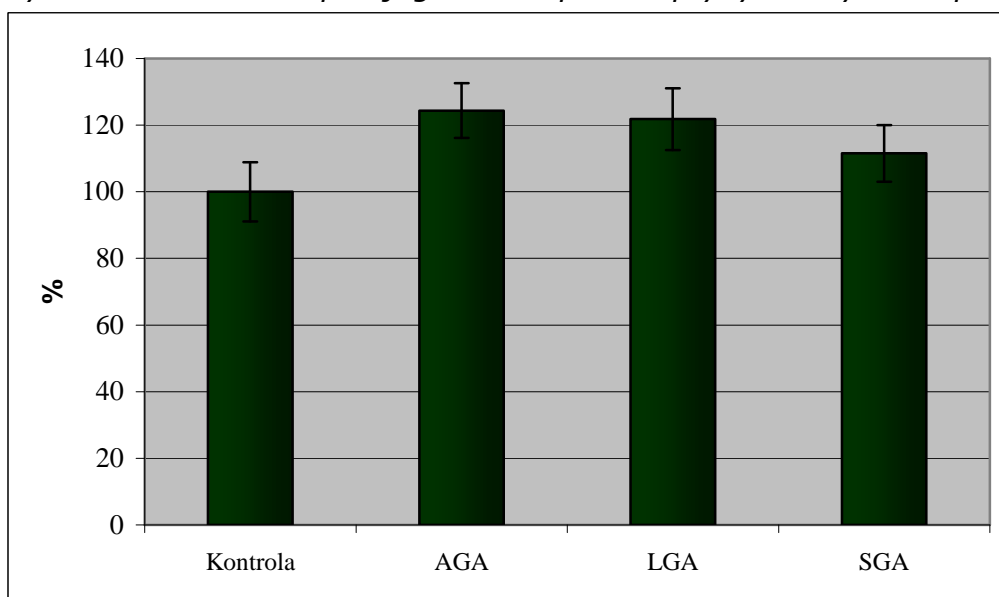
wzrastaniem płodu (LGA- Large for Gestational Age) - w grupie tej analizie poddano 12 łożysk (N=12), c) ciężarne z opóźnionym wzrastaniem płodu (SGA – Small for Gestational Age) - w grupie tej analizie poddano 16 łożysk (N=16). Wyniki porównywano z wartościami obserwowanymi w łożyskach zdrowych ciężarnych z prawidłową masą urodzeniową noworodka - w grupie tej analizie poddano 15 łożysk (N=15). Wyniki podano jako wartości bezwzględne pomnożone przez 100 celem uzyskania wartości procentowych.

Na wykresach 6 i 7 i tabeli przedstawiono ekspresję genu leptyny i jej receptora w grupie ciężarnych z cukrzycą w zależności od masy urodzeniowej noworodka.

*Wykres 6. Poziom ekspresji genu leptyny w łożysku w podgrupie I.*



*Wykres 7. Poziom ekspresji genu receptora leptyny w łożysku w podgrupie I.*



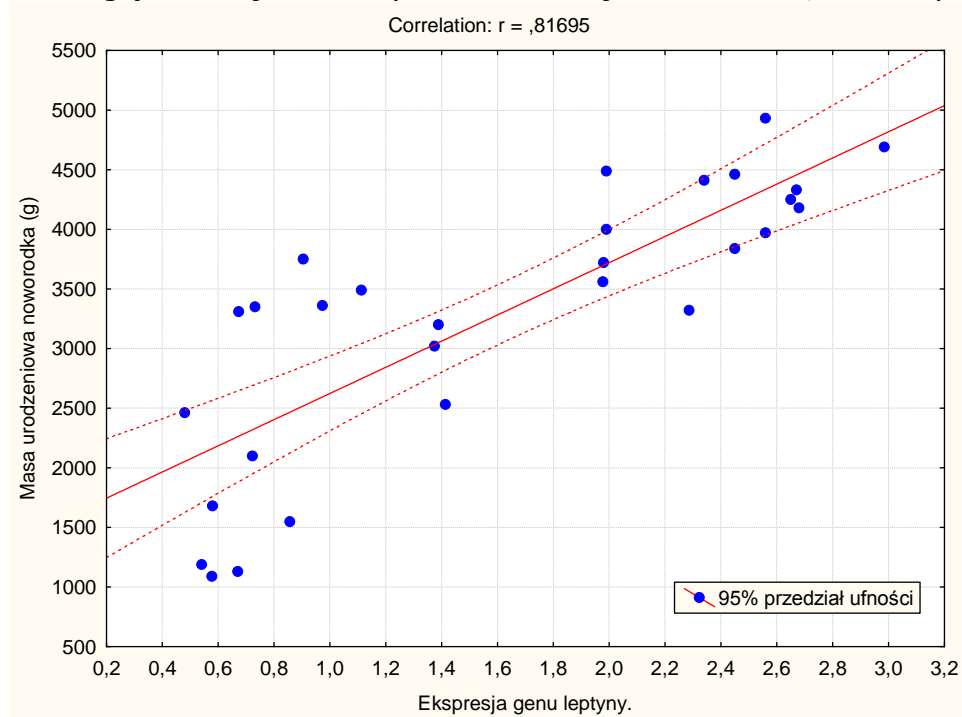
Ekspresja genu leptyny i genu receptora leptyny w grupie ciężarnych z cukrzycą z uwzględnieniem masy urodzeniowej noworodka.

Grupa	Poziom ekspresji genu leptyny w łożysku		p <sup>1</sup>		
	Średnia%	SEM%			
Grupa kontrolna (N=15)	100	6,4666	<0,001 <sup>2</sup>	<0,001 <sup>2</sup>	<0,001 <sup>2</sup>
DM + AGA (N=20)	146,6366	16,1199			
DM + LGA (N=12)	173,1692	20,044			
DM + SGA (N=16)	139,3286	13,241			
	Poziom ekspresji genu receptora leptyny w łożysku		P		
	Średnia%	SEM%			
Grupa kontrolna (N=15)	100	8,9074	<0,001	<0,001 <sup>3</sup>	NS <sup>4</sup>
DM + AGA (N=15)	124,3801	8,1859			
DM + LGA (N=20)	121,8105	9,2619			
DM + SGA (N=16)	111,5114	8,5166			

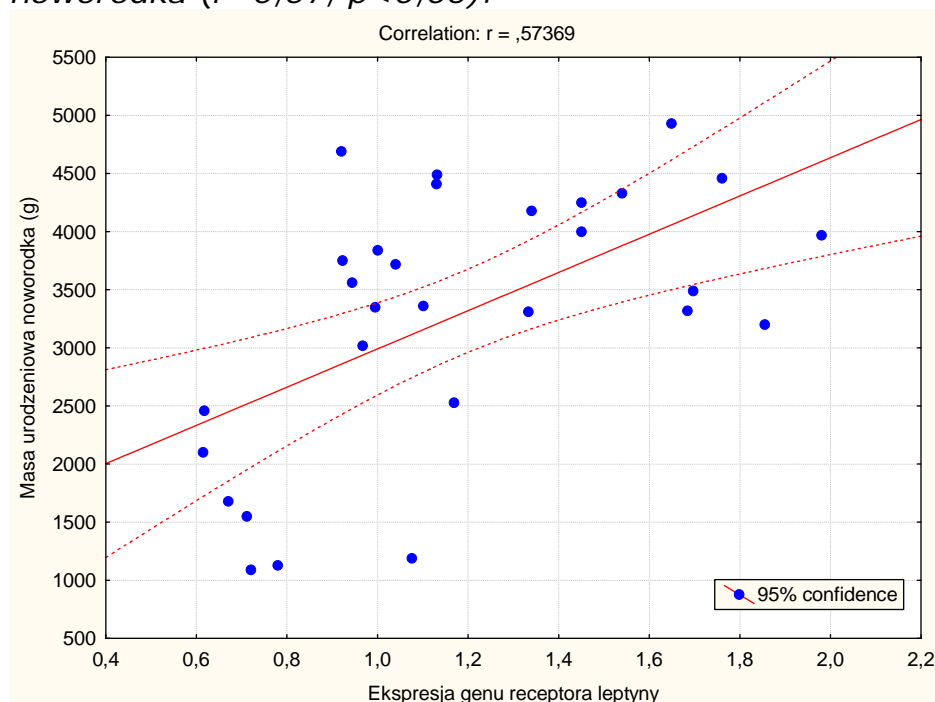
<sup>1</sup> - test ANOVA i post-hoc Scheffego, <sup>2</sup>- podgrupy z cukrzycą w stosunku do grupy kontrolnej, <sup>3</sup> - AGA i LGA w stosunku do grupy kontrolnej, <sup>4</sup> - pomiędzy grupami z cukrzycą i w stosunku do grupy kontrolnej

Poziom ekspresji genu leptyny w łożyskach ciężarnych z cukrzycą był znamienne wyższy w stosunku do grupy kontrolnej, niezależnie od obserwowanej masy noworodka, co może wskazywać na wpływ samej cukrzycy na ekspresję tego genu. Najwyższe wartości zaobserwowano w podgrupie ciężarnych z nadmierną z LGA. Natomiast w zakresie ekspresji genu receptora leptyny w łożysku w tej podgrupie, zaobserwowano istotnie wyższą ekspresję receptora leptyny w grupach z LGA i AGA w stosunku do grupy kontrolnej. Grupa z SGA nie różniła się ekspresją w stosunku do grupy kontrolnej. Pomędzy grupami z cukrzycą także nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji receptora leptyny w zależności od wzrastania płodu, co może sugerować brak jej wpływu tę ekspresję. Jednakże tendencję do wyższych wartości zaobserwowano w grupach z cukrzycą i LGA oraz AGA a najniższych z SGA. Z podgrupy I wyodrębniono ciężarne, które miały co najmniej nadwagę w okresie okołoporodowym ( $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) i u których zmiana BMI ( $\Delta BMI$ ) wynosiła co najmniej  $5 \text{ kg/m}^2$ . W tak wyodrębnionej podgrupie przeanalizowano relację masy urodzeniowej noworodka do ekspresji genu leptyny i genu receptora leptyny w łożysku. Wyniki podano na rycinach 12 i 13.

Rycina 12. Ekspresja genu leptyny w łożysku w podgrupie ciężarnych z cukrzycą i nadwagą w relacji do masy urodzeniowej noworodka ( $r=0,81$ ,  $p<0,05$ ).



Rycina 13. Ekspresja genu receptora leptyny w łożysku w podgrupie ciężarnych z cukrzycą i nadwagą w relacji do masy urodzeniowej noworodka ( $r=0,57$ ,  $p<0,05$ ).

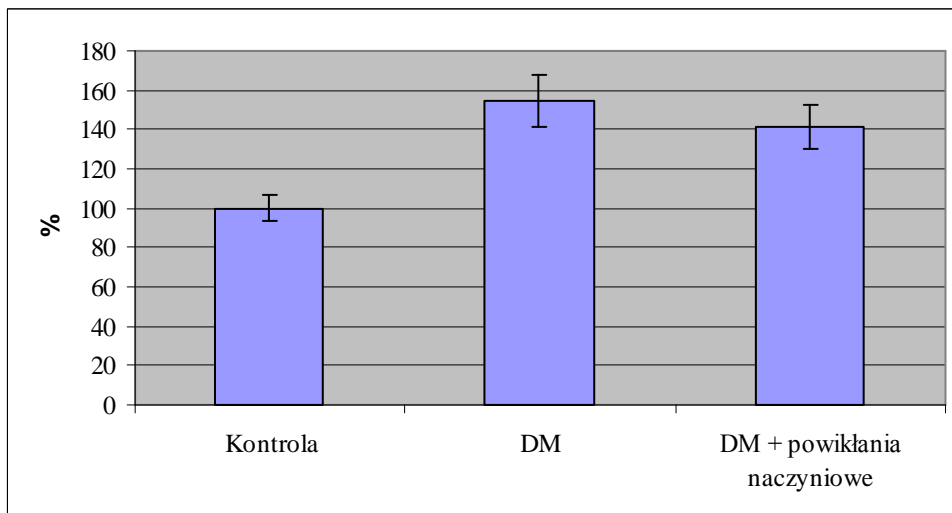


Stwierdzono wysoki stopień korelacji ekspresji genu leptyny w łożysku w relacji do masy urodzeniowej noworodka w grupie ciężarnych z cukrzycą i nadwagą. Natomiast ekspresja genu receptora leptyny w łożysku w tej grupie ciężarnych również wykazała tę samą tendencję aczkolwiek o niższym stopniu korelacji. W

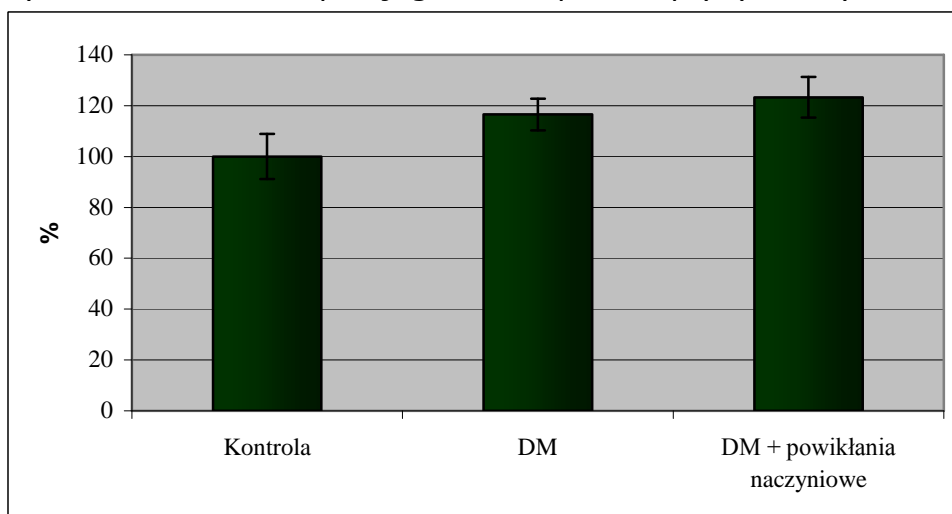
pozostałych grupach ciężarnych analizowanych korelacji nie stwierdzono. Co ciekawe, nie zaobserwowano korelacji pomiędzy stężeniem leptyny w III trymestrze ciąży a ekspresją wymienionych genów w łożysku.

W podgrupie drugiej (II) analizie poddano 31 łożysk (N=31) ciężarnych z cukrzycą bez powikłań naczyniowych oraz 18 łożysk (N=18) z współistniejącymi powikłaniami naczyniowymi pod postacią retinopatii oraz nefropatii cukrzycowej (klasy R, F, R/F) oraz nadciśnienia tętniczego. Wyniki porównywano z wartościami obserwowanymi w łożyskach pacjentek zdrowych (z grupy kontrolnej) - w grupie tej analizie poddano 15 łożysk (N=15). Wyniki podano na wykresach 8 i 9 oraz poniższej tabeli.

*Wykres 8. Poziom ekspresji genu leptyny w łożysku w podgrupie II.*



*Wykres 9. Poziom ekspresji genu receptora leptyny w łożysku w podgrupie II.*



Analiza ekspresji genu leptyny i genu receptora leptyny w grupie ciężarnych z cukrzycą z powikłaniami naczyniowymi.

Grupa	Poziom ekspresji leptyny w łożysku		p <sup>1</sup>		
	Średnia%	Standardowy błąd średniej (SEM%)			
Grupa kontrolna (N=15)	100	6,4666	<0,01 <sup>2</sup>	<0,01 <sup>3</sup>	NS <sup>4</sup>
DM (N=31)	154,9586	13,2412			
DM + powikłania naczyniowe (N=18)	141,7472	11,2188			
	Poziom ekspresji receptora leptyny w łożysku		P		
Grupa kontrolna (N=15)	100	8,9074	NS	NS	NS
DM (N=31)	116,536	6,2306			
DM + powikłania naczyniowe (N=18)	123,2727	8,0005			

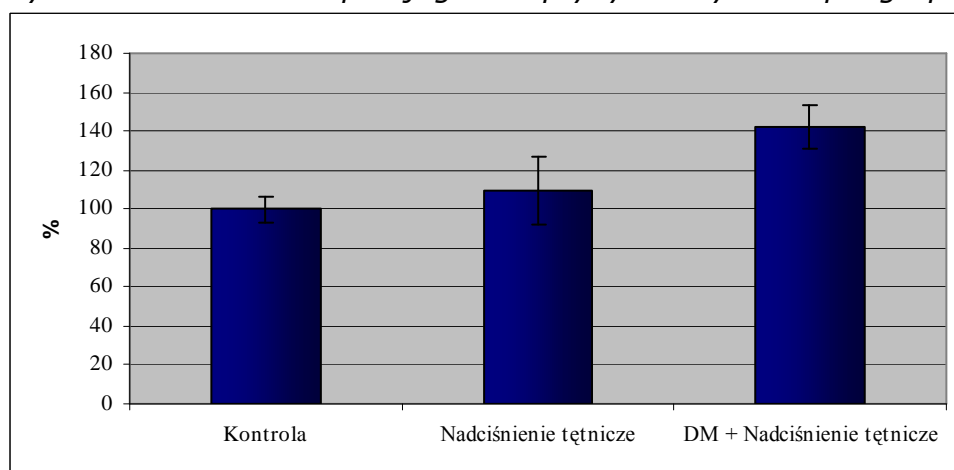
<sup>1</sup> - test ANOVA i post-hoc Scheffego, <sup>2</sup> - DM bez powikań naczyniowych w stosunku do grupy kontrolnej, <sup>3</sup> - DM oraz DM z powikłaniami naczyniowymi w stosunku do grupy kontrolnej, <sup>4</sup> - DM w stosunku do DM z powikłaniami naczyniowymi.

Stwierdzono istotnie wyższe poziomy ekspresji genu leptyny w łożysku u ciężarnych z cukrzycą z i bez powikań naczyniowych w stosunku do grupy kontrolnej. Ekspresja genu leptyny była najwyższa w grupie z cukrzycą bez powikań naczyniowych, ale nie osiągnęła istotności statystycznej w stosunku do grupy z powikłaniami naczyniowymi. Natomiast w zakresie ekspresji receptora leptyny w całej podgrupie ciężarnych nie zaobserwowano istotnych różnic.

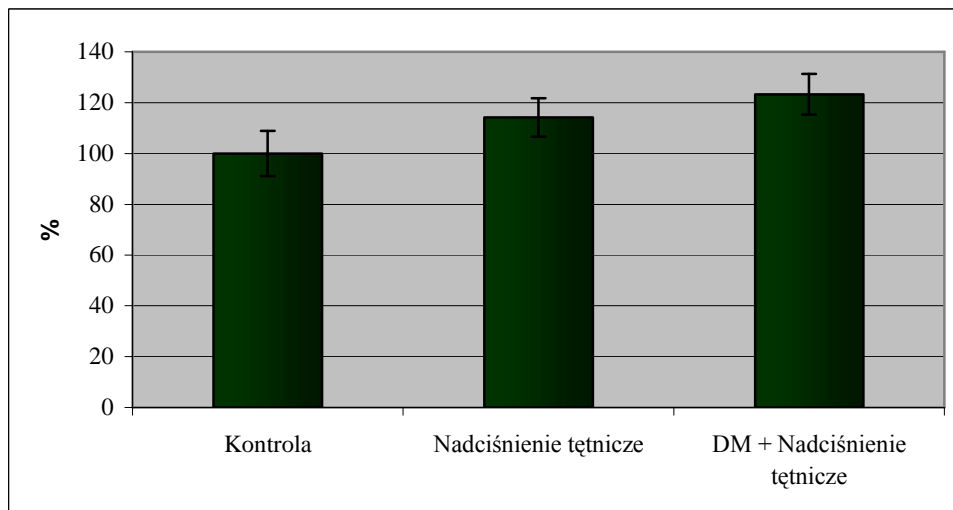
W podgrupie trzeciej (III) analizie poddano łożyska ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym (przewlekłym oraz indukowanym ciążą) bez współistniejącej cukrzycy (N=19), ciężarnych z cukrzycą typu 1 z powikłaniami naczyniowymi, owikłaną dodatkowo nadciśnieniem tętniczym (N=15). Wyniki porównywano z wartościami obserwowanymi w łożyskach pacjentek zdrowych - w grupie tej analizie poddano 15 łożysk (N=15).

Wyniki podano na wykresach 10 i 11 oraz w poniższej tabeli.

Wykres 10. Poziom ekspresji genu leptyny w łożysku w podgrupie III.



Wykres 11. Poziom ekspresji genu receptora leptyny w łożysku w podgrupie III.



Analiza ekspresji genu leptyny i genu receptora leptyny w grupie ciężarnych z cukrzycą ze współistniejącym nadciśnieniem tętniczym oraz z nadciśnieniem tętniczym bez cukrzycy.

Grupa	Poziom ekspresji leptyny w łożysku		p <sup>1</sup>		
	Średnia%	Standardowy błąd średniej (SEM%)			
Grupa kontrolna (N=15)	100	6,4666	NS <sup>2</sup>	NS <sup>3</sup>	<0,05 <sup>4</sup>
NT (N=19)	109,2857	17,561			
DM + NT (N=18)	141,7472	11,2188			
Poziom ekspresji receptora leptyny w łożysku			P		
Grupa kontrolna (N=15)	100	8,9074	NS <sup>2</sup>	NS <sup>3</sup>	<0,05 <sup>4</sup>
NT (N=19)	114,1841	7,5814			
DM + NT (N=18)	123,2727	8,0005			

<sup>1</sup> - test ANOVA i post-hoc Scheffego, <sup>2</sup> - grupa kontrolna w stosunku do grupy z nadciśnieniem tętniczym (NT), <sup>3</sup> - grupa z nadciśnieniem tętniczym (NT) w stosunku do grupy z cukrzycą i nadciśnieniem tętniczym (DM+NT), <sup>4</sup> - DM+NT w stosunku do grupy kontrolnej

W tej podgrupie ciężarnych stwierdzono najwyższy poziom ekspresji zarówno genu leptyny jak i receptora leptyny w grupach z cukrzycą ze współistniejącym nadciśnieniem tętniczym i powikłaniami naczyniowymi. Ekspresja ta była istotnie statystycznie wyższa w tej grupie w stosunku do ekspresji u ciężarnych zdrowych. Natomiast pomiędzy grupami z nadciśnieniem tętniczym bez cukrzycy i z cukrzycą nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji badanych genów.

### 5.3. Wpływ polimorfizmu genetycznego leptyny i jej receptora (LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G) na przebieg ciąży w poszczególnych podgrupach ciężarnych

Ze względu na możliwość występowania 3 różnych genotypów zarówno w obrębie genu leptyny (homozygota GG, heterozygota GA i homozygota AA), jak i w obrębie genu receptora leptyny (homozygota AA, heterozygota AG i homozygota GG), przeanalizowano wpływ występowania każdego z tych genotypów na przebieg ciąży oraz wynik położniczy.

#### 5.3.1. Wpływ LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G na poziom leptynemii w poszczególnych trymestrach ciąży i ekspresji LEP/LEPR w łożysku w grupie ciężarnych z cukrzycą

Tabela XXXVII przedstawia zmienność stężenia leptyny w przebiegu ciąży u ciężarnych chorujących na cukrzycę typu 1 w zależności od występującego genotypu w zakresie LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G. Ponadto przeanalizowano ekspresję LEP i LEPR w łożyskach u tych ciężarnych.

Nie zaobserwowano istotnych różnic w stężeniu leptyny w I i III trymestrze ciąży w zależności od obserwowanego genotypu. Znaleziono natomiast istotne różnice w stężeniu leptyny w II trymestrze ciąży w zależności od genotypu: GG\_GG vs. GA\_AG ( $p=0,037$ ), GG\_GG vs. AA\_AA ( $p=0,034$ ), GA\_AG vs. AA\_AG ( $p=0,01$ ) oraz AA\_AA vs. AA\_AG ( $p<0,05$ )

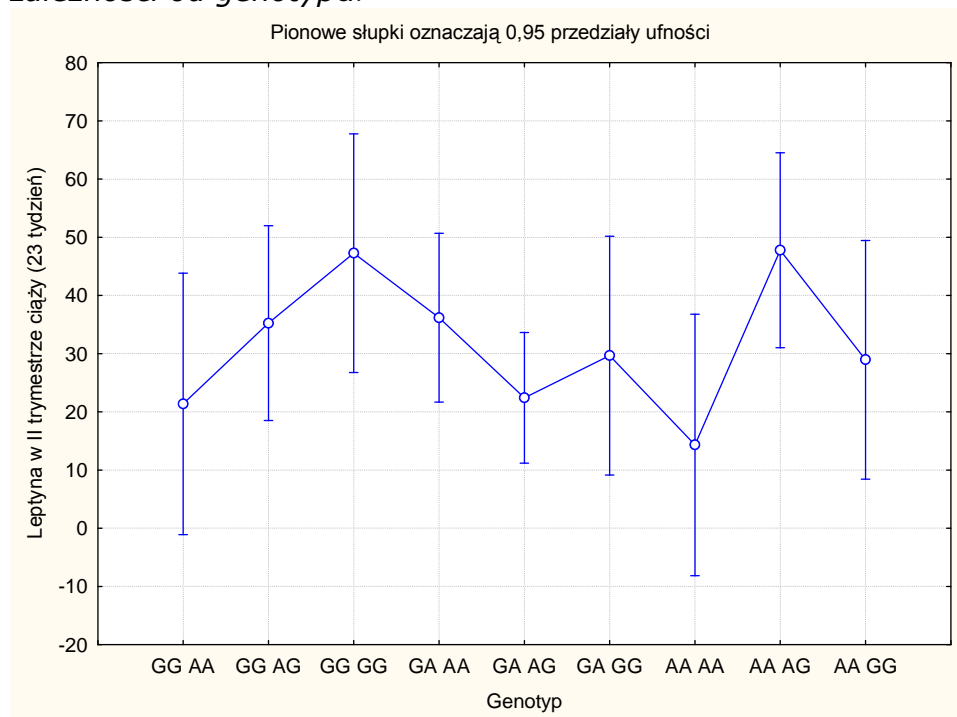


Tabela XXXVII. Leptynemia i łożyskowa ekspresja LEP/LEPR w przebiegu ciąży u ciężarnych z cukrzycą w zależności od genotypu LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G.

Genotyp		N	Leptyna I trymestr – 12 t.c. (ng/ml) <sup>1</sup>	Leptyna II trymestr – 23t.c. (ng/ml) <sup>1</sup>	Leptyna III trymestr – 36 t.c. (ng/ml) <sup>1</sup>	Ekspresja LEP w łożysku	Ekspresja LEPR w łożysku
-2548 G/A	668 A/G.	100					
GG	AA	5	25,72 ± 14,00	21,40 ± 16,70	27,24 ± 29,17	121,498 ± 48,935	156,874 ± 28,207
GG	AG	12	18,43 ± 11,60	35,20 ± 24,70	26,39 ± 9,52	128,662 ± 48,379	110,313 ± 27,782
GG	GG	8	36,73 ± 26,55	47,27 ± 31,28	37,30 ± 16,83	352,660	113, 526
GA	AA	15	26,34 ± 17,74	36,19 ± 23,54	28,14 ± 16,23	162,303 ± 68,370	124,779 ± 34,985
GA	AG	25	32,85 ± 26,15	22,42 ± 20,48	26,06 ± 15,74	138,265 ± 67,161	106,971 ± 32,759
GA	GG	7	22,36 ± 13,69	29,67 ± 22,37	22,45 ± 15,54	BD	BD
AA	AA	7	23,60 ± 13,50	14,32 ± 16,39	26,99 ± 15,15	BD	BD
AA	AG	11	30,24 ± 29,27	47,78 ± 38,15	30,95 ± 20,78	189,898 ± 41,875	137,559 ± 23,566
AA	GG	10	25,27 ± 14,17	28,95 ± 26,75	25,73 ± 7,34	145,709 ± 58,041	120,530 ± 32,306

<sup>1</sup> - podana wartość średnią oraz SD, BD – brak oznaczeń w występującym genotypie.

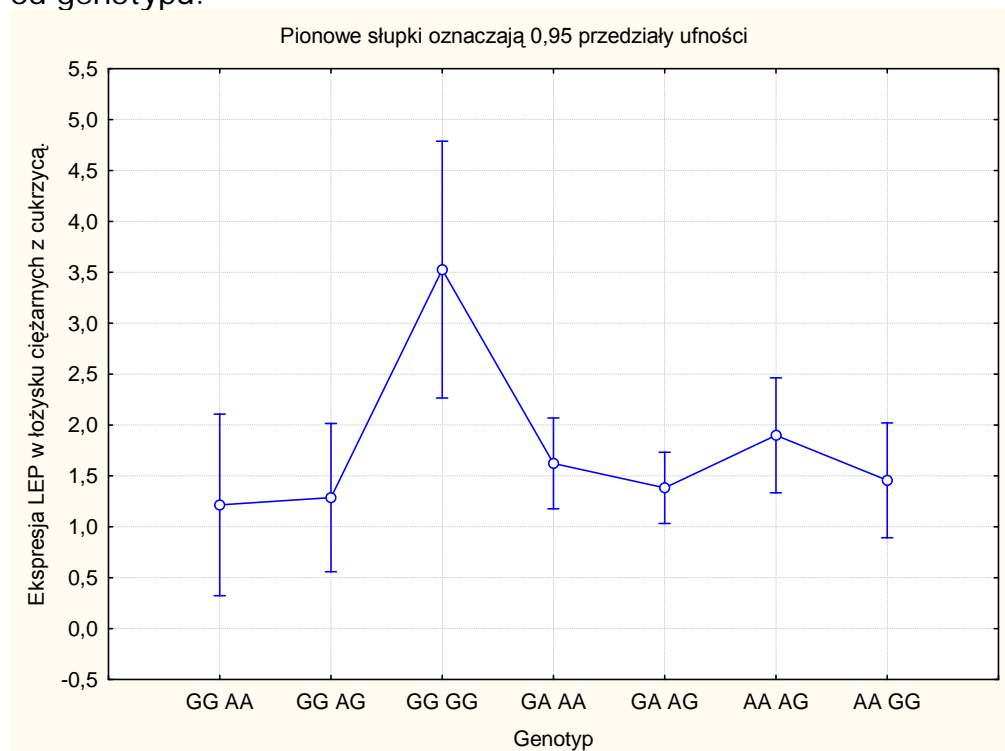
Wykres 12. Stężenie leptyny w II trymestrze ciąży ciężarnych z cukrzycą w zależności od genotypu.



		Test NIR; zmienna Leptyna_DM2 Prawdopodobieństwa dla testów post-hoc MS międzygrupowe = 634,14, df = 69,000								
Nr podkl.	Genotyp_DM	GA_AA 21,378	GG_AG 35,259	GG_GG 47,270	GA_AA 36,193	GA_AG 22,418	GA_GG 29,670	AA_AA 14,324	AA_AG 47,783	AA_GG 28,948
1	GA_AA		0,326511	0,094023	0,272907	0,934460	0,588350	0,659201	0,064351	0,621174
2	GG_AG	0,326511		0,368619	0,933181	0,208211	0,675022	0,140669	0,295093	0,635962
3	GG_GG	0,094023	0,368619		0,382058	<b>0,037589</b>	0,230213	<b>0,034203</b>	0,969279	0,211852
4	GA_AA	0,272907	0,933181	0,382058		0,138670	0,606084	0,107343	0,300257	0,566899
5	GA_AG	0,934460	0,208211	<b>0,037589</b>	0,138670		0,538132	0,522481	<b>0,014443</b>	0,579240
6	GA_GG	0,588350	0,675022	0,230213	0,606084	0,538132		0,317739	0,176781	0,960535
7	AA_AA	0,659201	0,140669	<b>0,034203</b>	0,107343	0,522481	0,317739		<b>0,019976</b>	0,340883
8	AA_AG	0,064351	0,295093	0,969279	0,300257	<b>0,014443</b>	0,176781	<b>0,019976</b>		0,160371
9	AA_GG	0,621174	0,635962	0,211852	0,566899	0,579240	0,960535	0,340883	0,160371	

Analiza ekspresji LEP w łóżysku ciężarnych z cukrzycą wykazała najwyższy poziom ekspresji u ciężarnych z genotypem GG\_GG, który różnił się istotnie statystycznie w stosunku do wszystkich pozostałych podgrup. Ponadto u ciężarnych z tym genotypem zaobserwowano najwyższy średni poziom leptyny w surowicy krwi przez cały okres trwania ciąży, w stosunku do pozostałych genotypów. Podobną tendencję zaobserwowano u ciężarnych z genotypem AA\_AG – nadekspresja genu leptyny w łóżysku korelowała w podwyższonym stężeniu leptyny w surowicy krwi przez cały okres trwania ciąży.

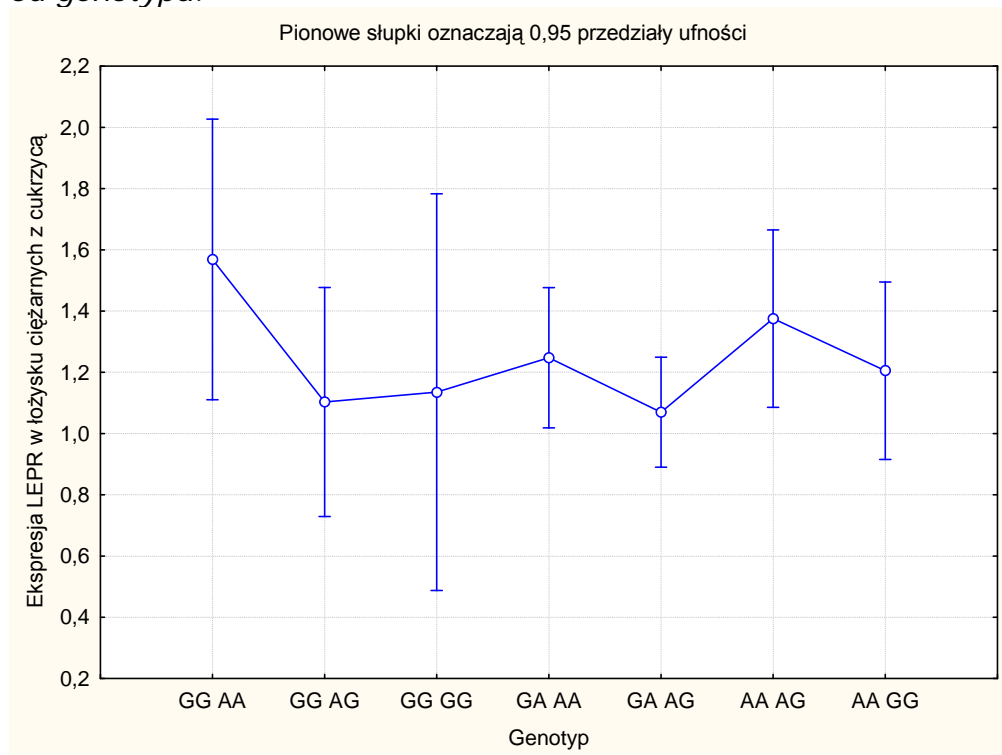
Wykres 13. Analiza ekspresji LEP w łożysku ciężarnych z cukrzycą w zależności od genotypu.



Test NIR; zmienna LEP_DM		Prawdopodobieństwa dla testów post-hoc						
MS międzygrupowe = ,38138, df = 30,000								
Nr podkl.	Genotyp_DM	GA AA	GG AG	GG GG	GA AA	GA AG	AA AG	AA AG
		1,2150	1,2866	3,5266	1,6230	1,3826	1,8990	1,4571
1	GG AA		0,899727	<b>0,004676</b>	0,409878	0,723262	0,195562	0,642754
2	GG AG	0,899727		<b>0,003767</b>	0,427355	0,809842	0,184659	0,708104
3	GG GG	<b>0,004676</b>	<b>0,003767</b>		<b>0,006816</b>	<b>0,002220</b>	<b>0,022500</b>	<b>0,004642</b>
4	GA AA	0,409878	0,427355	<b>0,006816</b>		0,393229	0,439304	0,640804
5	GA AG	0,723262	0,809842	<b>0,002220</b>	0,393229		0,122587	0,820364
6	AA AG	0,195562	0,184659	<b>0,022500</b>	0,439304	0,122587		0,266862
7	AA GG	0,642754	0,708104	<b>0,004642</b>	0,640804	0,820364	0,266862	

Po przeanalizowaniu ekspresji LEPR w łożysku ciężarnych z cukrzycą stwierdzono najwyższy poziom ekspresji w grupie ciężarnych z genotypem GA\_AA a najniższy w grupie z genotypem GA\_AG ( $p=0,04$ ). Ekspresja w pozostałych podgrupach nie różniła się między sobą istotnie. Natomiast u ciężarnych z genotypem homozygotycznym GG\_GG i heterozygotycznym AA\_AG nie stwierdzono podwyższonych wartości ekspresji receptora leptyny w łożysku, w przeciwieństwie do genu leptyny.

Wykres 14. Analiza ekspresji LEPR w łożysku ciężarnych z cukrzycą w zależności od genotypu.



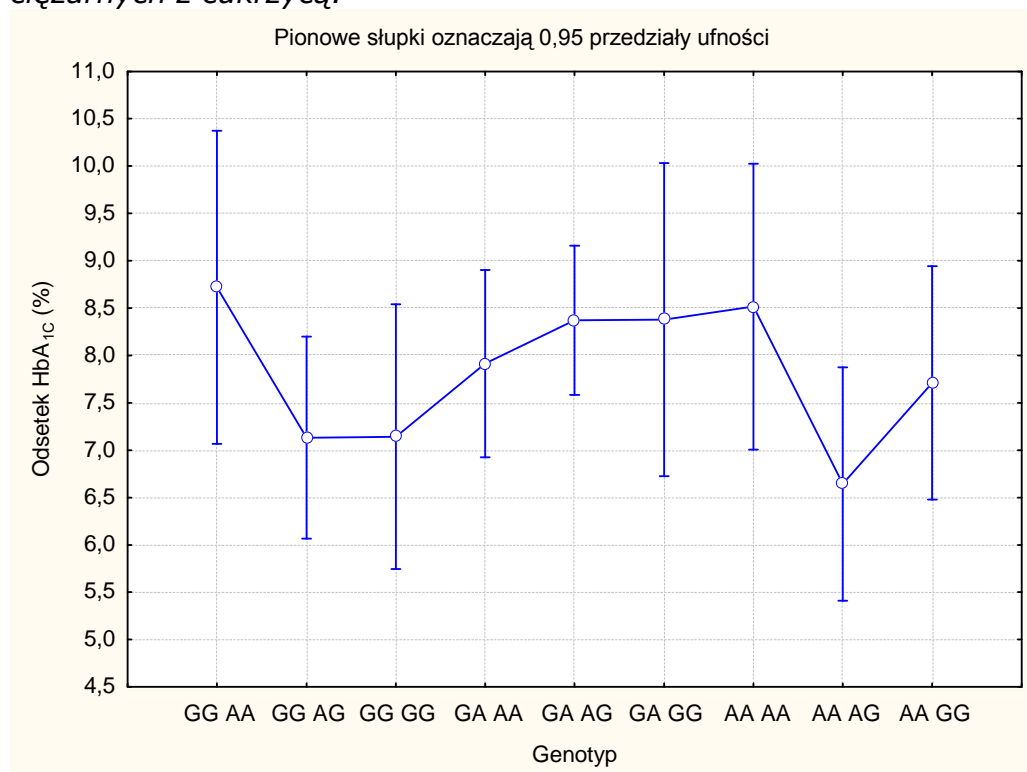
Test NIR; zmienna LEPR_DM								
Prawdopodobieństwa dla testów post-hoc								
Błąd: MS międzygrupowe = ,10060, df = 30,000								
Nr podkl.	Genotyp_DM	GG_AA	GG_AG	GG_GG	GA_AA	GA_AG	AA_AG	AA_GG
		1,5687	1,1031	1,1353	1,2478	1,0697	1,3756	1,2053
1	GG_AA		0,118295	0,273332	0,210375	<b>0,047019</b>	0,472350	0,180993
2	GG_AG	0,118295		0,930682	0,505680	0,870435	0,248752	0,662324
3	GG_GG	0,273332	0,930682		0,740334	0,843495	0,494451	0,841604
4	GA_AA	0,210375	0,505680	0,740334		0,221166	0,485161	0,815816
5	GA_AG	<b>0,047019</b>	0,870435	0,843495	0,221166		0,076808	0,422996
6	AA_AG	0,472350	0,248752	0,494451	0,485161	0,076808		0,402665
7	AA_GG	0,180993	0,662324	0,841604	0,815816	0,422996	0,402665	

### 5.3.2. Parametry metaboliczne w I trymestrze ciąży u ciężarnych z cukrzycą w zależności od genotypu LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G

W związku z możliwym wpływem polimorfizmów genetycznych na metabolizm organizmu, przeanalizowano wpływ LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G na parametry metaboliczne w poszczególnych trymestrach ciąży u ciężarnych z cukrzycą.

W I trymestrze ciąży nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi genotypami ciężarnych z cukrzycą a stężeniem cholesterolu, cholesterolu HDL i LDL, klirensiem kreatyniny, dobową utratą białka oraz BMI. Stwierdzono natomiast możliwy wpływ niektórych polimorfizmów na wyrównanie glikemii w I trymestrze ciąży opisywane odsetkiem hemoglobiny glikowanej, a także na stężenie kreatyniny oraz triglicerydów ( $p < 0,05$ ).

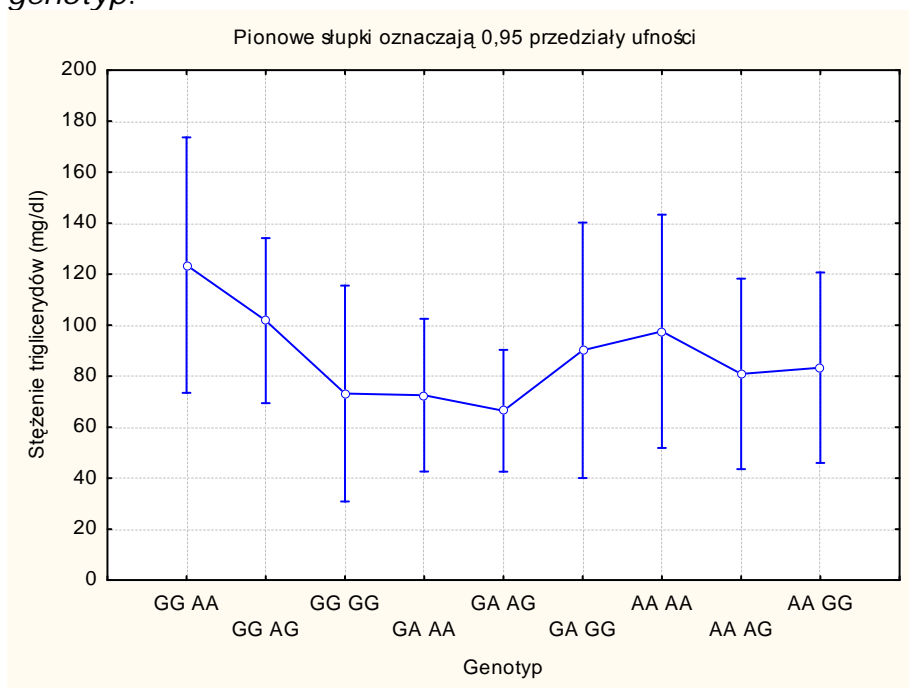
Wykres 15. Odsetek hemoglobiny glikowanej w I trymestrze ciąży a genotyp u ciężarnych z cukrzycą.



		Test NIR; zmienna Hba1C_1Prawdopodobieństwa dla testów post-hoc Błąd: MS międzygrupowe = 3,4528, df = 80,000								
Nr podkl.	Genotyp_DM	GG AA 8,7200	GG AG 7,1333	GG GG 7,1429	GA AA 7,9143	GA AG 8,3727	GA GG 8,3800	AA AA 8,5167	AA AG 6,6444	AA GG 7,7111
1	GG AA		0,112614	0,151094	0,407727	0,707004	0,773091	0,857050	0,048608	0,333276
2	GG AG	0,112614		0,991428	0,288580	0,066760	0,211178	0,140438	0,552417	0,482766
3	GG GG	0,151094	0,991428		0,372494	0,131143	0,258911	0,187654	0,596027	0,545679
4	GA AA	0,407727	0,288580	0,372494		0,472615	0,631779	0,508361	0,113648	0,798668
5	GA AG	0,707004	0,066760	0,131143	0,472615		0,993716	0,866857	0,021205	0,370895
6	GA GG	0,773091	0,211178	0,258911	0,631779	0,993716		0,903629	0,097928	0,520529
7	AA AA	0,857050	0,140438	0,187654	0,508361	0,866857	0,903629		0,059492	0,413207
8	AA AG	0,048608	0,552417	0,596027	0,113648	0,021205	0,097928	0,059492		0,226905
9	AA GG	0,333276	0,482766	0,545679	0,798668	0,370895	0,520529	0,413207	0,226905	

Wykazano istotne statystycznie różnice w odsetku HbA<sub>1c</sub> pomiędzy genotypami GG AA, GA AG oraz AA AG. Najwyższy odsetek HbA<sub>1c</sub> stwierdzono u ciężarnych z genotypem GG AA a najniższy AA AG. Ciężarne z genotypem GG AA miały także najwyższą ekspresję genu receptora leptyny w łożysku a najniższą genu leptyny. Średni czas trwania cukrzycy w tej grupie to 12 lat, u 2 ciężarnych obserwowano powikłania naczyniowe. Natomiast ciężarne z genotypem AA AG miały najwyższe stężenie leptyny w II trymestrze ciąży oraz wysoki poziom ekspresji genu leptyny w łożysku. Średni czas trwania cukrzycy w tej podgrupie to 8 lat, żadna ciężarna nie miała powikłań naczyniowych.

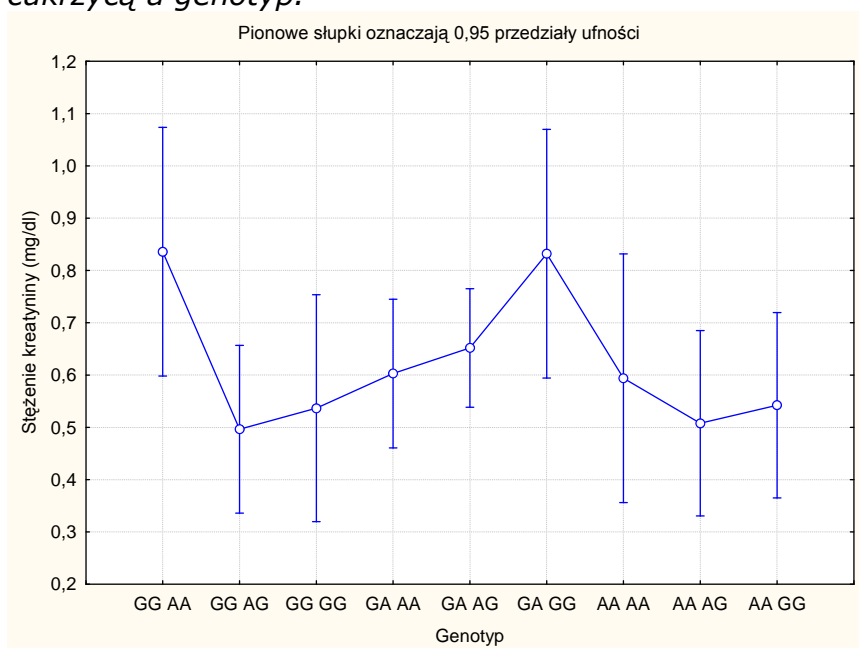
Wykres 16. Stężenie triglicerydów w I trymestrze ciąży u ciężarnych z cukrzycą a genotyp.



		Test NIR; zmienna DM_TG_1 Prawdopodobieństwa dla testów post-hoc MS międzygrupowe = 3170,9, df = 80,000								
Nr podkl.	Genotyp_DM	GG_AA 123,56	GG_AG 101,78	GG_GG 73,171	GA_AA 72,518	GA_AG 66,414	GA_GG 90,140	AA_AA 97,578	AA_AG 80,900	AA_GG 83,311
1	GG_AA		0,469637	0,130404	0,085733	<b>0,043802</b>	0,350867	0,448316	0,178210	0,203734
2	GG_AG	0,469637		0,288571	0,190238	0,083908	0,698714	0,881654	0,402839	0,459100
3	GG_GG	0,130404	0,288571		0,980059	0,782838	0,608229	0,438239	0,786059	0,721802
4	GA_AA	0,085733	0,190238	0,980059		0,752012	0,549755	0,364478	0,728451	0,654916
5	GA_AG	<b>0,043802</b>	0,083908	0,782838	0,752012		0,397607	0,233043	0,517452	0,450457
6	GA_GG	0,350867	0,698714	0,608229	0,549755	0,397607		0,827870	0,769377	0,828434
7	AA_AA	0,448316	0,881654	0,438239	0,364478	0,233043	0,827870		0,575708	0,632022
8	AA_AG	0,178210	0,402839	0,786059	0,728451	0,517452	0,769377	0,575708		0,927854
9	AA_GG	0,203734	0,459100	0,721802	0,654916	0,450457	0,828434	0,632022	0,927854	

Stężenie triglicerydów było najwyższe w grupie ciężarnych z genotypem GG AA a najniższe w grupie GA AG. Ponownie genotyp GG AA wydaje się mieć wpływ na podwyższone wartości parametrów lipidowych.

Wykres 17. Stężenie kreatyniny w I trymestrze ciąży w grupie ciężarnych z cukrzycą a genotyp.



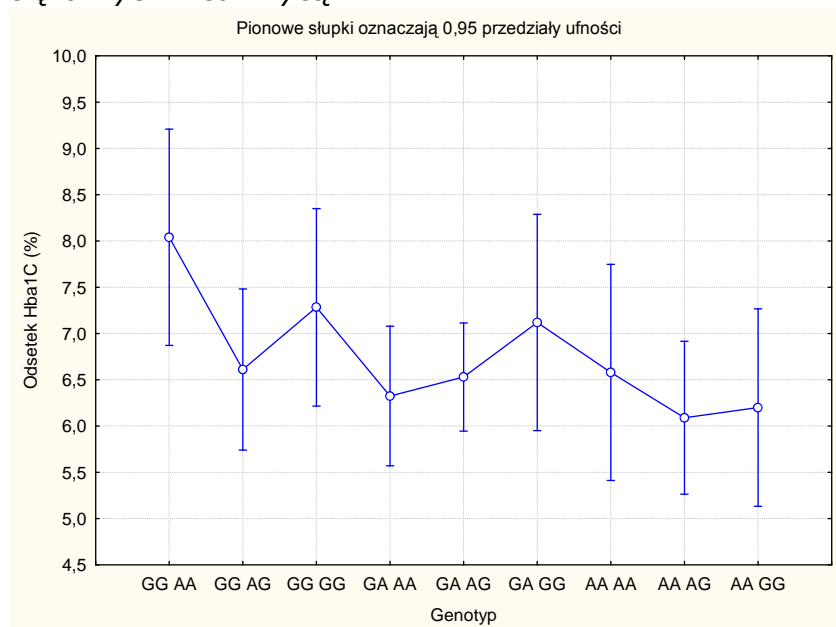
		Test NIR; zmienna DM_Krea_1 Prawdopodobieństwa dla testów post-hoc MS międzygrupowe = ,07129, df = 77,000								
Nr podkl.	Genotyp_DM	GG_AA ,83600	GG_AG ,49636	GG_GG ,53667	GA_AA ,60286	GA_AG ,65182	GA_GG ,83200	AA_AA ,59400	AA_AG ,50778	AA_GG ,54222
1	GG_AA		<b>0,020887</b>	0,067936	0,097781	0,167815	0,981163	0,155871	<b>0,030513</b>	0,052121
2	GG_AG	<b>0,020887</b>		0,766940	0,325302	0,118962	<b>0,022388</b>	0,499803	0,924472	0,703411
3	GG_GG	0,067936	0,766940		0,612862	0,351980	0,071616	0,723840	0,837883	0,968610
4	GA_AA	0,097781	0,325302	0,612862		0,593243	0,103569	0,949395	0,407141	0,596570
5	GA_AG	0,167815	0,118962	0,351980	0,593243		0,177124	0,663265	0,176720	0,302799
6	GA_GG	0,981163	<b>0,022388</b>	0,071616	0,103569	0,177124		0,162733	<b>0,032535</b>	0,055324
7	AA_AA	0,155871	0,499803	0,723840	0,949395	0,663265	0,162733		0,564297	0,729027
8	AA_AG	<b>0,030513</b>	0,924472	0,837883	0,407141	0,176720	<b>0,032535</b>	0,564297		0,785073
9	AA_GG	0,052121	0,703411	0,968610	0,596570	0,302799	0,055324	0,729027	0,785073	

Wykazano istotne różnice pomiędzy genotypami GG AA vs. GG AG oraz GG AG vs. GA GG ( $p < 0,05$ ). Najwyższe stężenie kreatyniny zaobserwowano u ciężarnych z genotypem GG AA a najniższe z GG AG. Fakt podwyższonego stężenia kreatyniny w grupie ciężarnych GG AA mógł także wynikać z faktu obecności ciężarnych z powikłaniami naczyniowymi w tej podgrupie.

### 5.3.3. Wyrównanie metaboliczne w II trymestrze ciąży u ciężarnych z cukrzycą w zależności od genotypu LEP -2548 G/A ORAZ LEPR 668 A/G

W II trymestrze ciąży nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi genotypami ciężarnych z cukrzycą w zakresie: klirensu kreatyniny, dobowej utraty białka, średniej dobowej glikemii, triglicerydów, cholesterolu całkowitego, kreatyniny oraz dobowej utraty białka. Wykazano natomiast wpływ polimorfizmów GG AA i AA AG na wyrównanie glikemii w II trymestrze ciąży opisywanej odsetkiem hemoglobiny glikowanej ( $p < 0,05$ ). Stwierdzono także istotne różnice w BMI, średnim RR skurczowym i rozkurczowym.

*Wykres 18. Odsetek hemoglobiny glikowanej w II trymestrze ciąży a genotyp u ciężarnych z cukrzycą.*

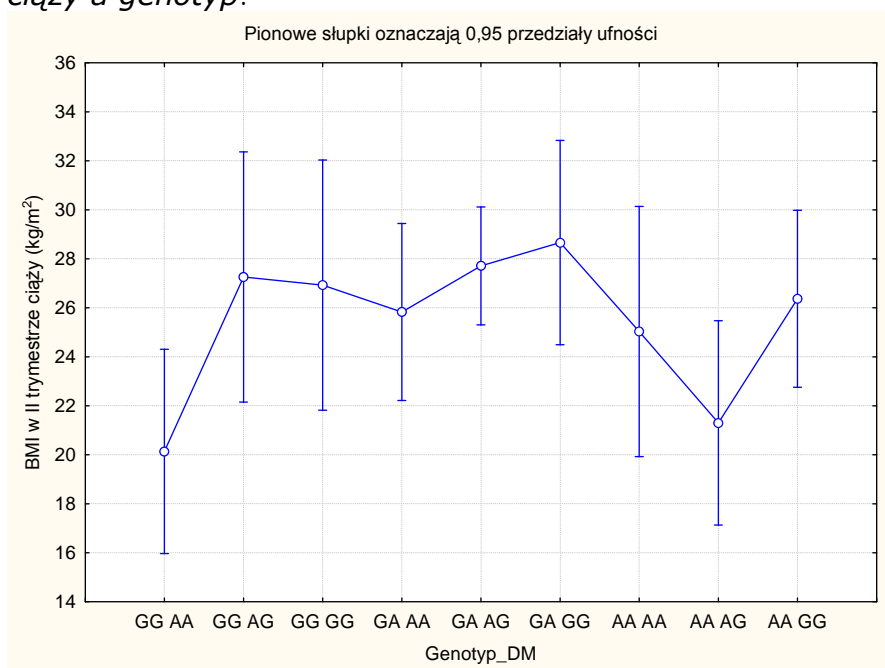




Test NIR; zmienna Hba1C_2 (dm_stat) Prawdopodobieństwa dla testów post-hoc MS międzygrupowe = 1,7142, df = 69,000										
Nr podkl.	Genotyp_DM	GG_AA 8,0400	GG_AG 6,6111	GG_GG 7,2833	GA_AA 6,3250	GA_AG 6,5300	GA_GG 7,1200	AA_AA 6,5800	AA_AG 6,0900	AA_GG 6,2000
1	GG_AA		0,054437	0,343202	0,016367	0,024083	0,270408	0,082299	0,008271	0,023255
2	GG_AG	0,054437		0,333374	0,621770	0,877789	0,488241	0,966142	0,389352	0,553275
3	GG_GG	0,343202	0,333374		0,147756	0,220604	0,837382	0,378080	0,081986	0,156328
4	GA_AA	0,016367	0,621770	0,147756		0,669404	0,257919	0,715559	0,676374	0,849128
5	GA_AG	0,024083	0,877789	0,220604	0,669404		0,370582	0,939339	0,388557	0,589915
6	GA_GG	0,270408	0,488241	0,837382	0,257919	0,370582		0,516483	0,155433	0,249868
7	AA_AA	0,082299	0,966142	0,378080	0,715559	0,939339	0,516483		0,496710	0,633232
8	AA_AG	0,008271	0,389352	0,081986	0,676374	0,388557	0,155433	0,496710		0,871233
9	AA_GG	0,023255	0,553275	0,156328	0,849128	0,589915	0,249868	0,633232	0,871233	

Podobnie jak w I trymestrze ciąży, najwyższy odsetek hemoglobiny glikowanej stwierdzono u ciężarnych z genotypem GG AA, który był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do ciężarnych z genotypami GA AA, GA AG, AA AG, oraz AA GG. Ciężarne z genotypem AA AG były najlepiej wyrównane metabolicznie w tym okresie ciąży.

Wykres 19. Wskaźnik masy ciała w grupie ciężarnych z cukrzycą w II trymestrze ciąży a genotyp.



Test NIR; zmienna DM_BMI_2 (dm_stat) Prawdopodobieństwa dla testów post-hoc										
Nr podkl.	Genotyp_DM	GG_AA 20,140	GG_AG 27,260	GG_GG 26,928	GA_AA 25,829	GA_AG 27,711	GA_GG 28,662	AA_AA 25,032	AA_AG 21,303	AA_GG 26,368
1	GG_AA		0,035537	0,044156	0,043822	0,003516	0,006563	0,138537	0,687250	0,028638
2	GG_AG	0,035537		0,925081	0,640571	0,870430	0,664259	0,529783	0,074446	0,770617
3	GG_GG	0,044156	0,925081		0,719652	0,777014	0,591781	0,592411	0,090908	0,854656
4	GA_AA	0,043822	0,640571	0,719652		0,379303	0,299245	0,794480	0,103172	0,829243
5	GA_AG	0,003516	0,870430	0,777014	0,379303		0,686563	0,336771	0,011344	0,528652
6	GA_GG	0,006563	0,664259	0,591781	0,299245	0,686563		0,266600	0,016707	0,398625
7	AA_AA	0,138537	0,529783	0,592411	0,794480	0,336771	0,266600		0,254033	0,662864
8	AA_AG	0,687250	0,074446	0,090908	0,103172	0,011344	0,016707	0,254033		0,070172
9	AA_GG	0,028638	0,770617	0,854656	0,829243	0,528652	0,398625	0,662864	0,070172	

Najniższą wartość BMI zaobserwowano w grupie ciężarnych z genotypem GG AA i wartość ta różniła się istotnie od wartości obserwowanych w podgrupach z genotypami GG AG, GG GG, GA AA, GA AG, GA GG oraz AA GG. Wartość najwyższą zaobserwowano w podgrupie ciężarnych z genotypem GA GG.

5.3.4. Wyrównanie metaboliczne w III trymestrze ciąży u ciężarnych z cukrzycą w zależności od genotypu LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G

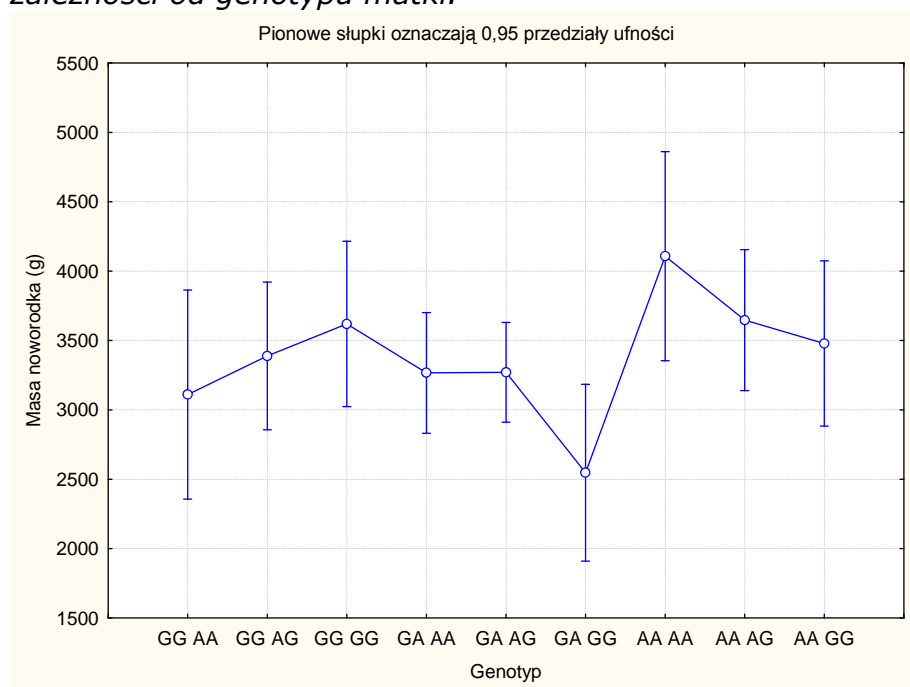
Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w wyrównaniu metabolicznym u ciężarnych z cukrzycą w zależności od istniejącego polimorfizmu leptyny i jej receptora. Jedynie średnia wartość BMI u ciężarnych z genotypem GA AA była najwyższa w całej podgrupie i wynosiła 28,9 kg/m<sup>2</sup> oraz różniła się istotnie od najniższej obserwowanej w tej podgrupie wartości (18,7 kg/m<sup>2</sup>) u ciężarnych z genotypem AA AA.

5.3.5. Wpływ matczynego polimorfizmu LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G na wynik położniczy w podgrupie ciężarnych z cukrzycą.

Wobec postulowanej roli polimorfizmu genetycznego leptyny w regulacji wzrastania płodu, przeanalizowano jego wpływ na masę urodzeniową noworodka w badanych podgrupach.

Zaobserwowano wpływ polimorfizmów leptyny i jej receptora na masę urodzeniową noworodka.

Wykres 20. Masa urodzeniowa noworodka w grupie ciężarnych z cukrzycą w zależności od genotypu matki.



Test NIR; zmienna DM_masa (dm_stat)										
Prawdopodobieństwa dla testów post-hoc										
MS międzygrupowe = 7175E2, df = 82,000										
Nr podkl.	Genotyp_DM	GG_AA 3110,0	GG_AG 3389,0	GG_GG 3620,0	GA_AA 3266,7	GA_AG 3270,9	GA_GG 2547,1	AA_AA 4108,0	AA_AG 3647,3	AA_GG 3478,8
1	GG_AA		0,549254	0,294002	0,721137	0,702390	0,259745	0,066052	0,242992	0,447275
2	GG_AG	0,549254		0,566911	0,724422	0,715640	<b>0,046991</b>	0,125050	0,487245	0,823797
3	GG_GG	0,294002	0,566911		0,343485	0,321104	<b>0,016529</b>	0,315186	0,944925	0,739597
4	GA_AA	0,721137	0,724422	0,343485		0,988102	0,067078	0,057894	0,260954	0,568945
5	GA_AG	0,702390	0,715640	0,321104	0,988102		0,052325	<b>0,049395</b>	0,232343	0,553932
6	GA_GG	0,259745	<b>0,046991</b>	<b>0,016529</b>	0,067078	0,052325		<b>0,002299</b>	<b>0,008745</b>	<b>0,036589</b>
7	AA_AA	0,066052	0,125050	0,315186	0,057894	<b>0,049395</b>	<b>0,002299</b>		0,316197	0,196187
8	AA_AG	0,242992	0,487245	0,944925	0,260954	0,232343	<b>0,008745</b>	0,316197		0,669647
9	AA_GG	0,447275	0,823797	0,739597	0,568945	0,553932	<b>0,036589</b>	0,196187	0,669647	

Najwyższą masę urodzeniową noworodków stwierdzono u ciężarnych z genotypem AA AA a najniższą u ciężarnych z genotypem GA GG. Masy urodzeniowe różniły się istotnie względem genotypów opisanych w powyższej tabeli. Jedynie ciężarne o genotypie GA AA oraz GG AA urodziły dzieci o masie nie odbiegającej od masy pozostałych noworodków. W badanej populacji ciężarnych zarówno z genotypami GA GG oraz AA AA nie zbadano ekspresji genu i genu receptora leptyny w łożysku. Ciężarne z genotypem AA AA miały także wysoki odsetek hemoglobiny glikowanej oraz wysoką średnią glikemię w 12-godzinnym profilu w I trymestrze ciąży.

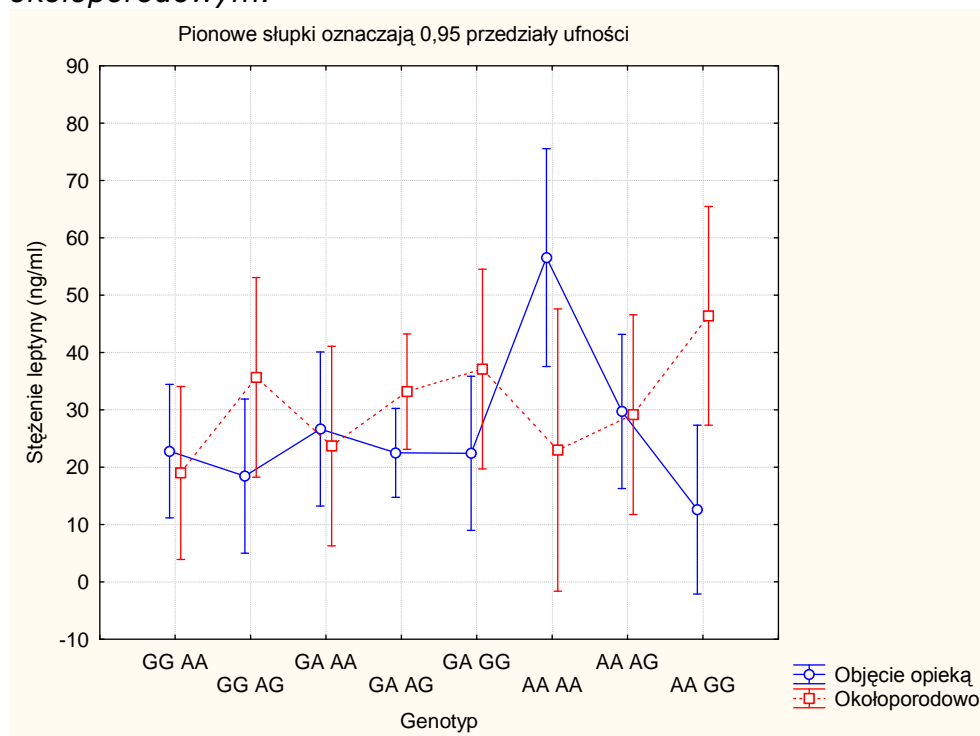
### 5.3.6 Wpływ LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G na wyrównanie metaboliczne w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym

W związku z możliwym wpływem polimorfizmów genetycznych na gospodarkę metaboliczną organizmu przeanalizowano wpływ LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G na parametry metaboliczne w poszczególnych trymestrach ciąży u ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym.

W tej podgrupie ciężarnych nie znaleziono istotnych różnic w stężeniu parametrów lipidowych (LDL, HDL, T-CHOL oraz triglicerydów) w zależności od genotypu pacjentki, zarówno w momencie rozpoznania nadciśnienia indukowanego ciążą jak i objęcia opieką w przypadku nadciśnienia przewlekłego, ani w okresie okołoporodowym (ANOVA  $p > 0,05$ , post-hoc NIR – brak istotnych różnic)

Zaobserwowano natomiast istotne różnice w stężeniu leptyny w tej podgrupie ciężarnych, zarówno w momencie rozpoznania nadciśnienia indukowanego ciążą/objęcia opieką w przypadku nadciśnienia przewlekłego, oraz w okresie okołoporodowym. Powyższe wyniki przedstawiono na wykresie oraz tabelach poniżej.

Wykres 21. Stężenie leptyny w momencie rozpoznania nadciśnienia indukowanego ciążą jak i nadciśnienia przewlekłego, oraz w okresie okołoporodowym.



W momencie rozpoznania NIC i objęcia opieką w przypadku PNT zaobserwowano istotne różnice w stężeniu leptyny w zależności od istniejącego genotypu leptyny i jej receptora. Wyniki przedstawiono w tabeli poniżej.

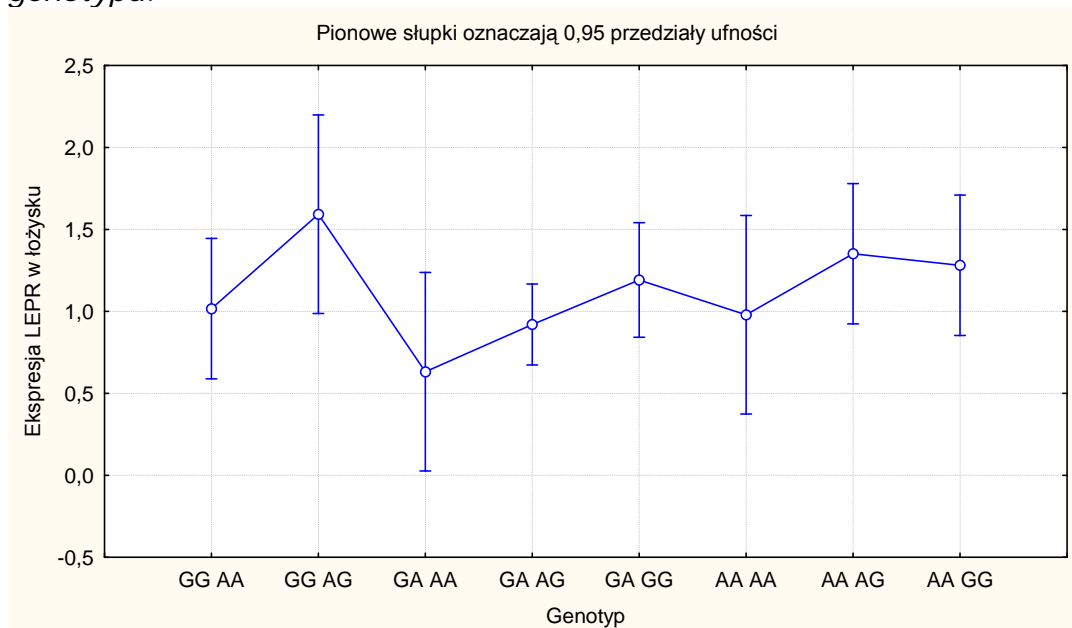
Test NIR; zmienna Leptyna_1 Prawdopodobieństwa dla testów post-hoc MS międzygrupowe = 268,69, df = 50,000									
Nr podkl.	Genotyp_HT	GG_AA	GG_AG	GA_AA	GA_AG	GA_GG	AA_AA	AA_AG	AA_GG
		22,805	18,461	26,674	22,514	22,424	56,567	29,724	12,614
1	GG_AA		0,625813	0,663928	0,966831	0,965874	0,003733	0,438146	0,280695
2	GG_AG	0,625813		0,389633	0,602282	0,677192	0,001853	0,239637	0,558436
3	GA_AA	0,663928	0,389633		0,592676	0,655314	0,012896	0,748612	0,162812
4	GA_AG	0,966831	0,602282	0,592676		0,990799	0,001631	0,355260	0,237837
5	GA_GG	0,965874	0,677192	0,655314	0,990799		0,004881	0,444145	0,327727
6	AA_AA	0,003733	0,001853	0,012896	0,001631	0,004881		0,024702	0,000586
7	AA_AG	0,438146	0,239637	0,748612	0,355260	0,444145	0,024702		0,090922
8	AA_GG	0,280695	0,558436	0,162812	0,237837	0,327727	0,000586	0,090922	

W okresie okołoporodowym istotne różnice zaobserwowano jedynie w przypadku genotypu AA\_GG vs. AA\_GG. Najwyższą wartość leptyny w okresie okołoporodowym miały ciężarne o genotypie AA\_GG.

Test NIR; zmienna Leptyna_2 Prawdopodobieństwa dla testów post-hoc Błąd: MS międzygrupowe = 450,85, df = 50,000									
Nr podkl.	Genotyp_HT	GG_AA	GG_AG	GA_AA	GA_AG	GA_GG	AA_AA	AA_AG	AA_GG
		19,003	35,668	23,700	33,190	37,125	22,997	29,176	46,415
1	GG_AA		0,152394	0,683837	0,122151	0,120342	0,782273	0,379238	0,027906
2	GG_AG	0,152394		0,333637	0,805501	0,905890	0,402724	0,598766	0,407196
3	GA_AA	0,683837	0,333637		0,347628	0,278728	0,962837	0,657017	0,083380
4	GA_AG	0,122151	0,805501	0,347628		0,695936	0,445034	0,690112	0,223682
5	GA_GG	0,120342	0,905890	0,278728	0,695936		0,351250	0,519708	0,473298
6	AA_AA	0,782273	0,402724	0,962837	0,445034	0,351250		0,682420	0,137282
7	AA_AG	0,379238	0,598766	0,657017	0,690112	0,519708	0,682420		0,186047
8	AA_GG	0,027906	0,407196	0,083380	0,223682	0,473298	0,137282	0,186047	

W zakresie ekspresji LEP i LEPR w łożysku ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym nie zaobserwowano istotnych różnic w zależności od genotypu matki. Stwierdzono natomiast istotne różnice w zakresie ekspresji LEPR w poszczególnych genotypach.

Wykres 22. Ekspresja LEPR w grupie ciężarnych z nadciśnieniem w zależności od genotypu.



Test NIR; zmienna LEPR Prawdopodobieństwa dla testów post-hoc MS międzygrupowe = ,07385, df = 10,000									
Nr podkl.	Genotyp_HT	GG_AA	GG_AG	GA_AA	GA_AG	GA_GG	AA_AA	AA_AG	AA_GG
		1,0169	1,5929	,63229	,92027	1,1918	,97961	1,3517	1,2813
1	GG_AA		0,114212	0,274679	0,672359	0,496884	0,912933	0,246130	0,353650
2	GG_AG	0,114212		<b>0,031471</b>	<b>0,044893</b>	0,230064	0,141613	0,485288	0,371148
3	GA_AA	0,274679	<b>0,031471</b>		0,349679	0,104888	0,387391	0,055958	0,079765
4	GA_AG	0,672359	<b>0,044893</b>	0,349679		0,187956	0,843852	0,080476	0,134813
5	GA_GG	0,496884	0,230064	0,104888	0,187956		0,514178	0,533716	0,725976
6	AA_AA	0,912933	0,141613	0,387391	0,843852	0,514178		0,289679	0,386077
7	AA_AG	0,246130	0,485288	0,055958	0,080476	0,533716	0,289679		0,800650
8	AA_GG	0,353650	0,371148	0,079765	0,134813	0,725976	0,386077	0,800650	

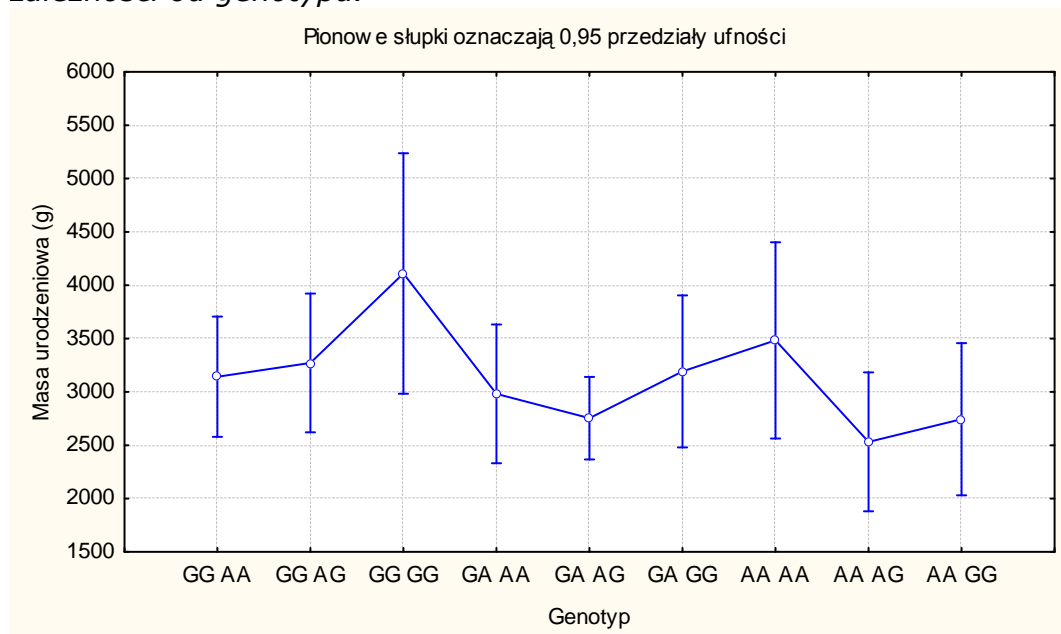
Najwyższy poziom ekspresji zaobserwowano u ciężarnych z genotypem GG AG a najniższy GA AA.

### 5.3.7. Wpływ matczynego polimorfizmu LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G na wynik położniczy w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym

Wobec postulowanej roli polimorfizmu genetycznego leptyny w regulacji wzrastania płodu, przeanalizowano jego wpływ na masę urodzeniową noworodka w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym.

Analiza masy urodzeniowej noworodków w tej grupie ciężarnych wykazała wpływ niektórych polimorfizmów leptyny i jej receptora na masę urodzeniową.

Wykres 23. Masa urodzeniowa noworodka w grupie ciężarnych z nadciśnieniem w zależności od genotypu.



Test NIR; zmienna NIC_masa Prawdopodobieństwa dla testów post-hoc MS międzygrupowe = 6291E2, df = 49,000										
Nr podkl.	Genotyp_HT	GG_AA	GG_AG	GG_GG	GA_AA	GA_AG	GA_GG	AA_AA	AA_AG	AA_GG
		3142,5	3271,7	4110,0	2981,7	2753,5	3192,0	3483,3	2531,7	2744,0
1	GG_AA		0,764281	0,129284	0,708937	0,258264	0,913276	0,528561	0,160215	0,382462
2	GG_AG	0,764281		0,201567	0,529499	0,175180	0,868940	0,707507	0,112528	0,277292
3	GG_GG	0,129284	0,201567		0,087734	<b>0,026507</b>	0,172833	0,390989	<b>0,018482</b>	<b>0,044887</b>
4	GA_AA	0,708937	0,529499	0,087734		0,547502	0,663361	0,375445	0,330598	0,622924
5	GA_AG	0,258264	0,175180	<b>0,026507</b>	0,547502		0,282528	0,148144	0,558532	0,981255
6	GA_GG	0,913276	0,868940	0,172833	0,663361	0,282528		0,617253	0,175427	0,376189
7	AA_AA	0,528561	0,707507	0,390989	0,375445	0,148144	0,617253		0,096077	0,207844
8	AA_AG	0,160215	0,112528	<b>0,018482</b>	0,330598	0,558532	0,175427	0,096077		0,660365
9	AA_GG	0,382462	0,277292	<b>0,044887</b>	0,622924	0,981255	0,376189	0,207844	0,660365	

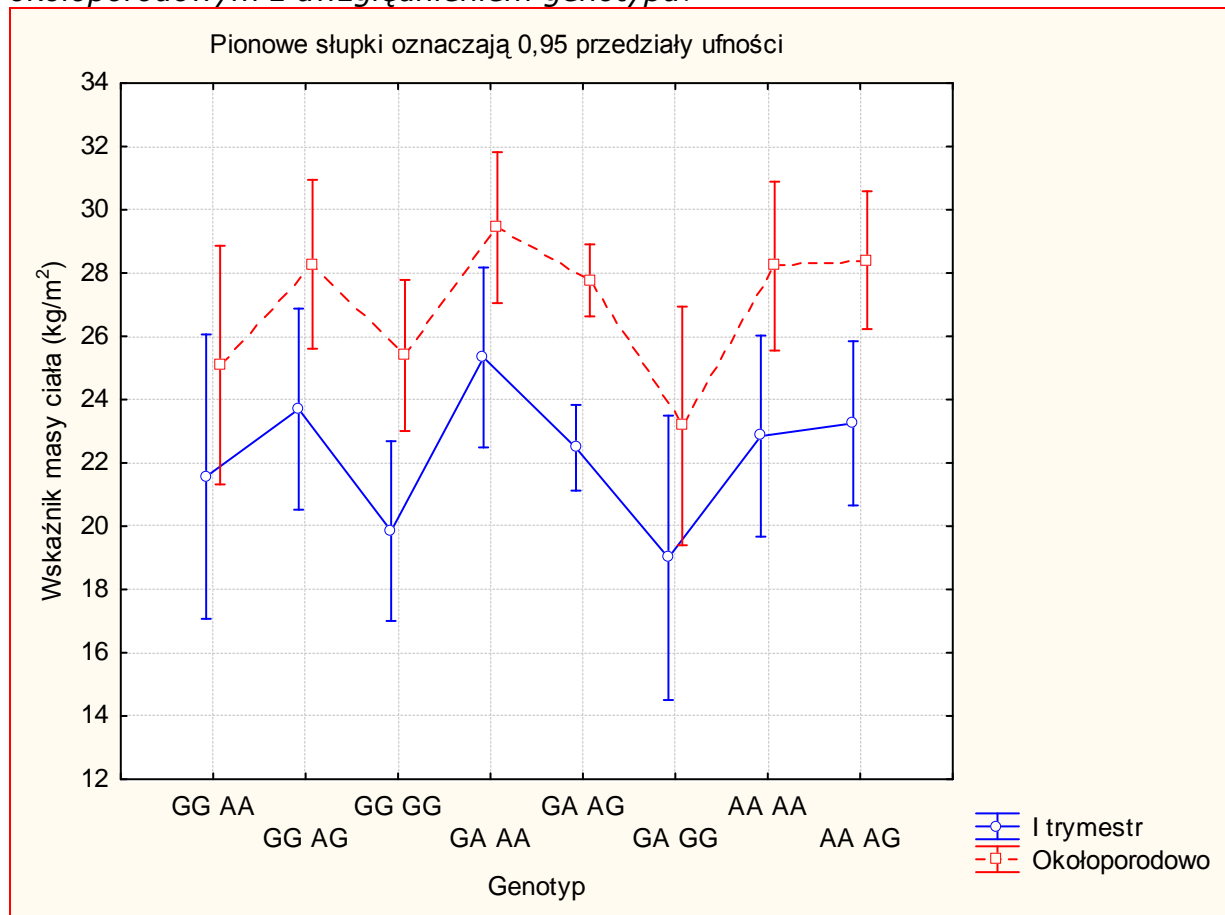
Najwyższą masę urodzeniową noworodka zaobserwowano u ciężarnych z genotypem GG GG a najniższe z genotypem AA AG oraz AA GG.

### 5.3.8. Wpływ matczynego polimorfizmu LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G na przebieg ciąży i wynik położniczy w grupie kontrolnej

Wobec postulowanego wpływu polimorfizmu genetycznego na przebieg ciąży, przeanalizowano jego wpływ na przebieg ciąży w grupie kontrolnej.

Polimorfizm genetyczny leptyny i jej receptora miał wpływ na BMI zarówno w I trymestrze ciąży, jak i w okresie okołoporodowym. Najwyższy wskaźnik masy ciała w I trymestrze ciąży cechował ciężarne z genotypem GA\_AA a najniższy z genotypami GG\_GG oraz GA\_GG. Tendencje te utrzymywały się aż do okresu okołoporodowego.

Wykres 24. Wskaźnik masy ciała w grupie kontrolnej w I trymestrze i w okresie okołoporodowym z uwzględnieniem genotypu.



Wpływ polimorfizmu leptyny i jej receptora na wartość BMI w grupie kontrolnej w miarę rozwoju ciąży przedstawiono na poniższych tabelach. W I trymestrze ciąży istotne różnice w BMI stwierdzono jedynie pomiędzy ciężarnymi z genotypem GG GG, GA AA, GA GG a w okresie okołoporodowym wpływ ten był bardziej widoczny.

Test NIR; zmienna C_BMI_1									
Prawdopodobieństwa dla testów post-hoc									
MS międzygrupowe = 9,9160, df = 42,000									
Nr podkl.	Genotyp_kontr	GG_AA	GG_AG	GG_GG	GA_AA	GA_AG	GA_GG	AA_AA	AA_AG
		21,564	23,697	19,846	25,332	22,478	19,000	22,845	23,250
1	GG_AA		0,438668	0,517694	0,160065	0,696520	0,420110	0,641004	0,515647
2	GG_AG	0,438668		0,075411	0,443073	0,480306	0,092415	0,704125	0,827159
3	GG_GG	0,517694	0,075411		<b>0,008641</b>	0,098987	0,749970	0,162970	0,081409
4	GA_AA	0,160065	0,443073	<b>0,008641</b>		0,074387	<b>0,020739</b>	0,245677	0,281042
5	GA_AG	0,696520	0,480306	0,098987	0,074387		0,142346	0,830999	0,597154
6	GA_GG	0,420110	0,092415	0,749970	<b>0,020739</b>	0,142346		0,165939	0,105822
7	AA_AA	0,641004	0,704125	0,162970	0,245677	0,830999	0,165939		0,843116
8	AA_AG	0,515647	0,827159	0,081409	0,281042	0,597154	0,105822	0,843116	



Test NIR; zmienna C_BMI_2 Prawdopodobieństwa dla testów post-hoc MS międzygrupowe = 6,9871, df = 42,000									
Nr podkl.	Genotyp_kontr	GG_AA 25,091	GG_AG 28,276	GG_GG 25,394	GA_AA 29,434	GA_AG 27,768	GA_GG 23,168	AA_AA 28,218	AA_AG 28,405
1	GG_AA		0,171407	0,891539	0,056195	0,177524	0,470844	0,179157	0,132117
2	GG_AG	0,171407		0,111582	0,517377	0,725425	0,031024	0,975417	0,940070
3	GG_GG	0,891539	0,111582		0,020100	0,077025	0,319732	0,118746	0,066894
4	GA_AA	0,056195	0,517377	0,020100		0,210387	0,007045	0,496746	0,523927
5	GA_AG	0,177524	0,725425	0,077025	0,210387		0,023176	0,755641	0,603522
6	GA_GG	0,470844	0,031024	0,319732	0,007045	0,023176		0,032876	0,019598
7	AA_AA	0,179157	0,975417	0,118746	0,496746	0,755641	0,032876		0,913256
8	AA_AG	0,132117	0,940070	0,066894	0,523927	0,603522	0,019598	0,913256	

Nie zanotowano natomiast istotnych różnic w stężeniu leptyny oraz ekspresji jej genu i receptora w łożysku w zależności od występującego genotypu matczynego. Podobnie nie zaobserwowano istotnych różnic w masie urodzeniowej noworodka oraz w jego stanie po porodzie opisywanym gazometrią krwi pępowinowej.

#### 5.4. Modele regresji wielorakiej i krzywe ROC w przewidywaniu masy urodzeniowej noworodka w poszczególnych grupach ciężarnych

W grupie ciężarnych z cukrzycą wyszczególniono 2 podgrupy ciężarnych: pierwszą z homozygotycznym genotypem zarówno -2548 G/A oraz 668 A/G i drugą, w której co najmniej w jednym z badanych polimorfizmów występował wariant heterozygotyczny.

##### 5.4.1. Analiza wpływu czynników metabolicznych na masę noworodka w grupie ciężarnych z cukrzycą z wariantem homozygotycznym -2548 G/A oraz 668 A/G.

Przeanalizowano wpływ wyrównania metabolicznego podczas całej ciąży, opisywanego za pomocą stężenia leptyny w poszczególnych trymestrach ciąży, średniej dobowej glikemii w 24-godzinnym profilu oraz odsetka hemoglobiny glikowanej na punkt końcowy, jakim była masa urodzeniowa noworodka w tej podgrupie ciężarnych. Średnia masa urodzeniowa noworodków w tej podgrupie wynosiła 3600g.

Tabela XXXVIII. Wpływ czynników metabolicznych na masę urodzeniową noworodka w grupie ciężarnych z wariantem homozygotycznym -2548 G/A oraz 668 A/G.

Regresja zmiennej zależnej – parametr masa noworodka (homozygoty)			
Parametr	skoryg. R <sup>2</sup>	B	p
Leptyna I trymestr	0,80741288	-12,450	<0,05
Leptyna II trymestr		-9,174	NS
Leptyna III trymestr		-5,725	NS
Glikemia I trymestr		-47,189	<0,05
Glikemia II trymestr		27,123	NS
Glikemia III trymestr		-39,168	<0,05
HbA <sub>1c</sub> I trymestr		333,569	<0,05
HbA <sub>1c</sub> II trymestr		-421,578	NS
HbA <sub>1c</sub> III trymestr		290,301	NS

W modelu analizującym wpływ wyrównania metabolicznego opisywanego stężeniem leptyny, poziomem glikemii i odsetkiem hemoglobiny glikowanej w poszczególnych trymestrach ciąży na masę noworodka, wykazano istotny wpływ stężenia leptyny i glikemii w I trymestrze ciąży oraz odsetka hemoglobiny glikowanej w I trymestrze ciąży. Ponadto istotnym czynnikiem była także glikemia w III trymestrze ciąży.

Model analizujący wpływ stężeń leptyny i profilu lipidowego w poszczególnych trymestrach ciąży wykazał istotną zależność masy ciała noworodka od stężenia LDL w III trymestrze ciąży ( $R^2=0,63192254$ ,  $B=57,289$ ,  $p<0,05$ ).

Natomiast model uwzględniający wartości czynników metabolicznych (glikemia, odsetek HbA<sub>1c</sub>, profil lipidowy) oraz wartości BMI ciężarnej z wszystkich trymestrów ciąży, bez uwzględniania stężenia leptyny w surowicy krwi, wykazał istotny wpływ BMI z II trymestru ciąży ( $p<0,05$ ) oraz LDL z II trymestru ciąży ( $p<0,05$ ) na masę urodzeniową noworodka.

Tabela XXXIX. Wpływ czynników metabolicznych na masę urodzeniową noworodka.

Regresja zmiennej zależnej – parametr masa noworodka (homozygoty)			
Parametr	skoryg. R <sup>2</sup>	B	p
BMI II trymestr	0,81869348	42,29	<0,05
LDL III trymestr		46,31	<0,05

W tej grupie homozygotycznych ciężarnych, model uwzględniający wpływ ekspresji LEP i LEPR w łożysku na masę urodzeniową noworodka wykazał słaby wpływ tych czynników.

5.4.2. Analiza wpływu czynników metabolicznych na masę noworodka w grupie ciężarnych z cukrzycą i z co najmniej jednym wariantem heterozygotycznym - 2548 G/A oraz 668 A/G

Przeanalizowano wpływ wyrównania metabolicznego podczas całej ciąży, opisywanego za pomocą stężenia leptyny w poszczególnych trymestrach ciąży, średniej dobowej glikemii w 24-godzinny profilu oraz odsetka hemoglobiny glikowanej na punkt końcowy, jakim była masa urodzeniowa noworodka w tej podgrupie ciężarnych. Średnia masa urodzeniowa noworodków w tej podgrupie wynosiła 3270g.

*Tabela XL. Wpływ czynników metabolicznych na masę urodzeniową noworodka w grupie ciężarnych z co najmniej jednym wariantem heterozygotycznym -2548 G/A oraz 668 A/G.*

Regresja zmiennej zależnej – parametr masa noworodka (heterozygoty)			
Parametr	skoryg. R <sup>2</sup>	B	P
Leptyna I trymestr	0,89648882	10,81	<0,05
Leptyna II trymestr		0,125	NS
Leptyna III trymestr		15,586	<0,05
Glikemia I trymestr		3,987	NS
Glikemia II trymestr		-20,408	<0,05
Glikemia III trymestr		0,547	NS
HbA <sub>1c</sub> I trymestr		-95,660	NS
HbA <sub>1c</sub> II trymestr		196,952	NS
HbA <sub>1c</sub> III trymestr		-1,391	NS

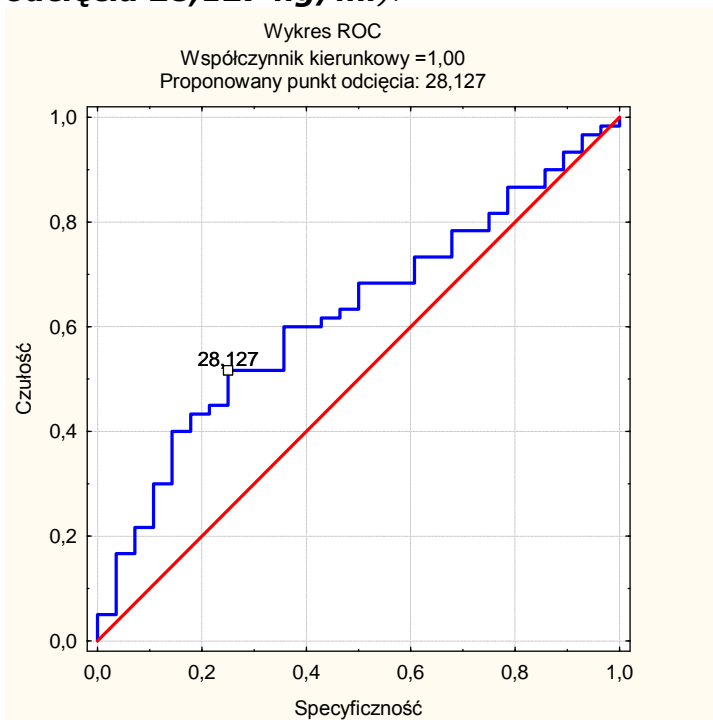
W tym modelu stwierdzono istotny wpływ stężenia leptyny zarówno w I jak i w III trymestrze ciąży, oraz glikemii w II trymestrze ciąży na masę noworodka.

Analiza wpływu stężenia leptyny w poszczególnych trymestrach ciąży w połączeniu z profilem lipidowym w poszczególnych trymestrach ciąży nie wykazała istotnego wpływu tych parametrów na masę urodzeniową noworodka w tej podgrupie ciężarnych. Podobnie poziom ekspresji LEP i LEPR w łożysku nie wykazał wpływu na masę urodzeniową noworodka w tej podgrupie.

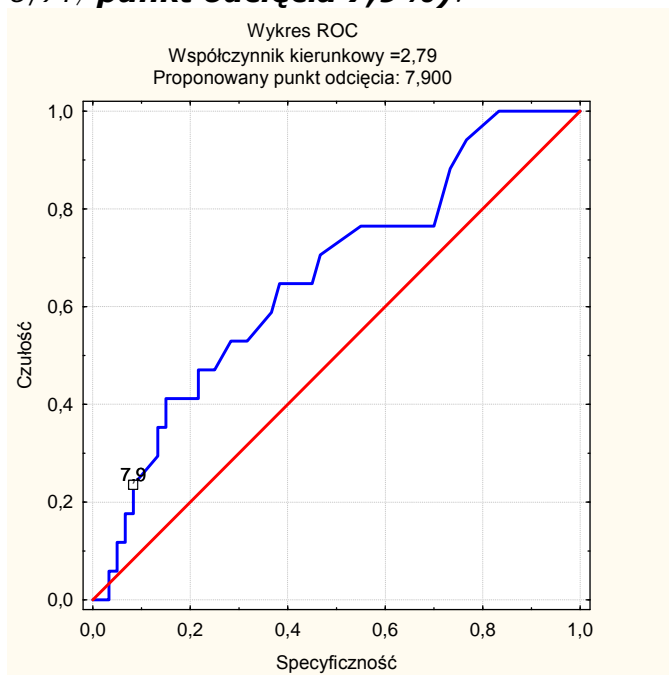
5.4.3. Przydatność poszczególnych parametrów opisujących wyrównanie metaboliczne w predykcji masy urodzeniowej noworodka w grupie ciężarnych z cukrzycą z wariantem homozygotycznym w zakresie -2548 G/A oraz 668 A/G

Analizy przeprowadzono dla wszystkich parametrów metabolicznych w każdym z trzech trymestrów ciąży. Wyniki przedstawiono jako wykresy krzywych ROC, proponując optymalny punkt odcięcia dla poszczególnych wartości, wartość pola pod krzywą (AUC) oraz opisując dany test za pomocą parametrów takich jak czułość i specyficzność. Wartość znamioną prognostycznie wykazano dla: stężenia leptyny w I trymestrze ciąży, hemoglobiny glikowanej w III trymestrze ciąży oraz masy ciała ciężarnej w III trymestrze ciąży.

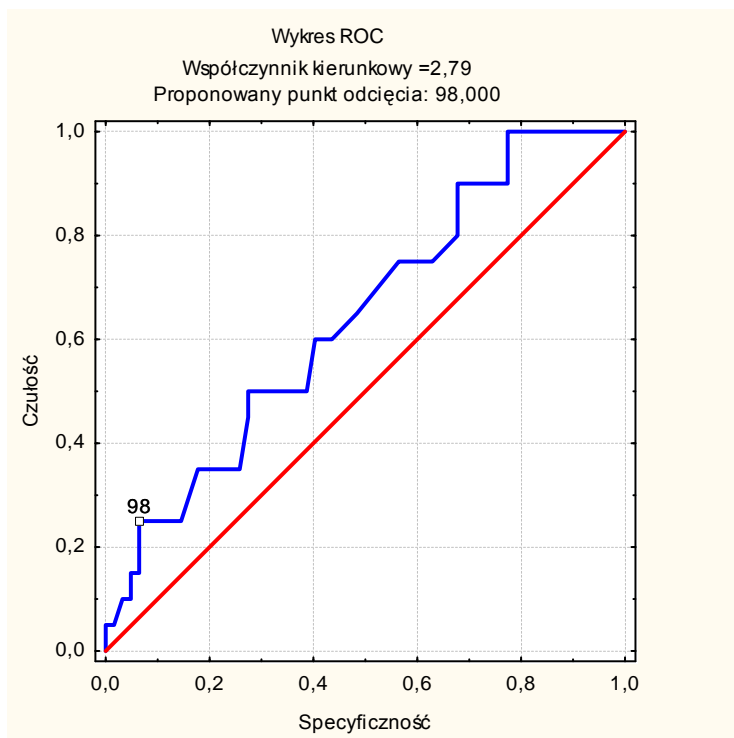
*Wykres 25. Przydatność stężenia leptyny w I trymestrze ciąży w predykcji masy urodzeniowej noworodka (AUC 0,62; czułość 0,75; specyficzność 0,5; punkt odcięcia 28,127 ng/ml).*



Wykres 26. Przydatność hemoglobiny glikowanej w III trymestrze ciąży w predykcji masy urodzeniowej noworodka (AUC 0,66; czułość 0,23; specyficzność 0,91; **punkt odcięcia 7,9%**).



Wykres 27. Przydatność masy ciała ciężarnej w III trymestrze ciąży w predykcji masy urodzeniowej noworodka (AUC 0,63; czułość 0,25; specyficzność 0,93; **punkt odcięcia 98kg**).

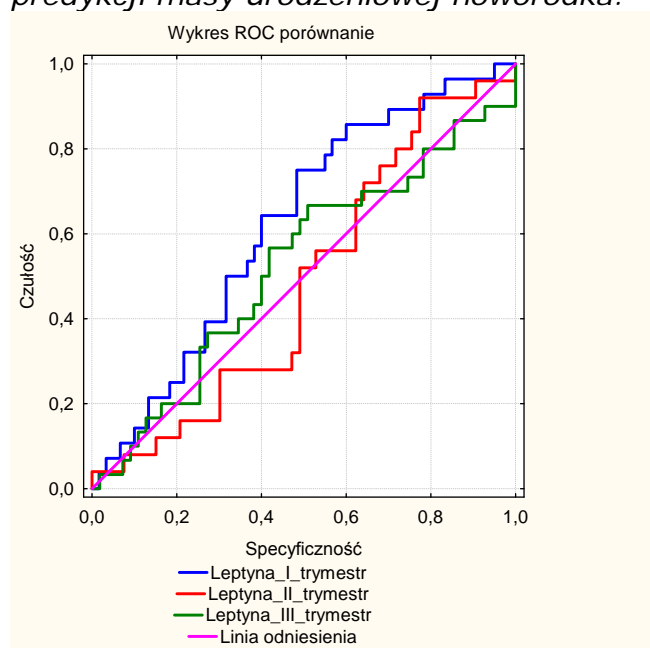


Pozostałe parametry opisujące wyrównanie metaboliczne w tej podgrupie ciężarnych w każdym z trzech trymestrów ciąży cechowały się niską czułością i specyficzością i nie wykazały przydatności w prognozowaniu masy ciała noworodka.

#### 5.4.4. Przydatność poszczególnych parametrów opisujących wyrównanie metaboliczne w predykcji masy urodzeniowej noworodka w grupie ciężarnych z cukrzycą i z co najmniej jednym wariantem heterozygotycznym w zakresie -2548 G/A oraz 668 A/G

Analizy przeprowadzono dla wszystkich parametrów metabolicznych w każdym z trzech trymestrów ciąży. Wyniki przedstawiono jako wykresy krzywych ROC, proponując optymalny punkt odcięcia dla poszczególnych wartości, wartość pola pod krzywą (AUC) oraz opisując dany test za pomocą parametrów takich jak czułość i specyficzość.

*Wykres 28. Przydatność stężenia leptyny w poszczególnych trymestrach ciąży w predykcji masy urodzeniowej noworodka.*

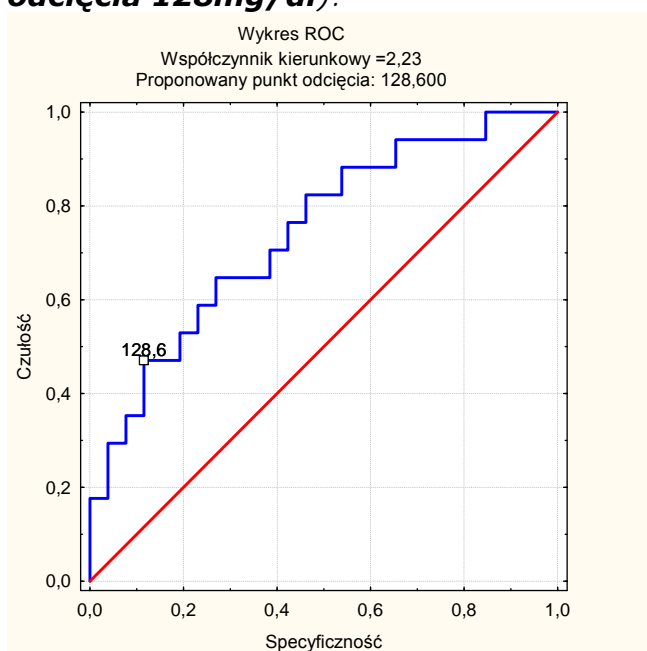


Jedynie poziom leptyny w I trymestrze ciąży wykazywał ograniczoną przydatność w prognozowaniu masy urodzeniowej noworodka (AUC 0,61), jednakże proponowany punkt odcięcia (23,8 ng/ml) cechował się niższą czułością i specyficzością niż analogiczny punkt w grupie ciężarnych z wariantami homozygotycznymi -2548 G/A i 668 A/G. Stężenie leptyny w pozostałych

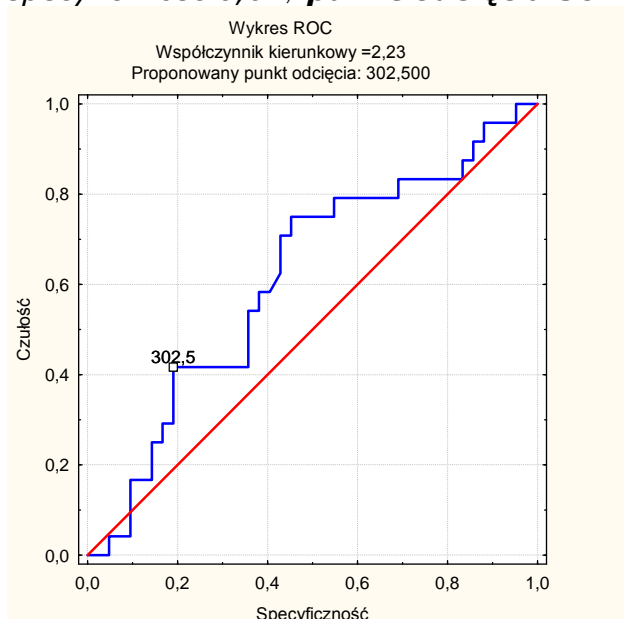
trymestrach ciąży nie wykazywało istotnej przydatności w predykcji masy urodzeniowej u noworodka – Leptyna w II trymestrze ciąży AUC 0,52, leptyna w III trymestrze ciąży AUC 0,51.

Na poniższych wykresach przedstawiono przydatność LDL w II trymestrze ciąży, cholesterolu całkowitego w III trymestrze ciąży w predykcji masy urodzeniowej noworodka w tej podgrupie ciężarnych.

**Wykres 29. Przydatność stężenia LDL w II trymestrze ciąży w predykcji masy urodzeniowej noworodka (AUC 0,64; czułość 0,56; specyficzność 0,67; punkt odcięcia 128mg/dl).**



**Wykres 30. Przydatność stężenia cholesterolu całkowitego w III trymestrze ciąży w predykcji masy urodzeniowej noworodka (AUC 0,63; czułość 0,62; specyficzność 0,67; punkt odcięcia 302mg/dl).**



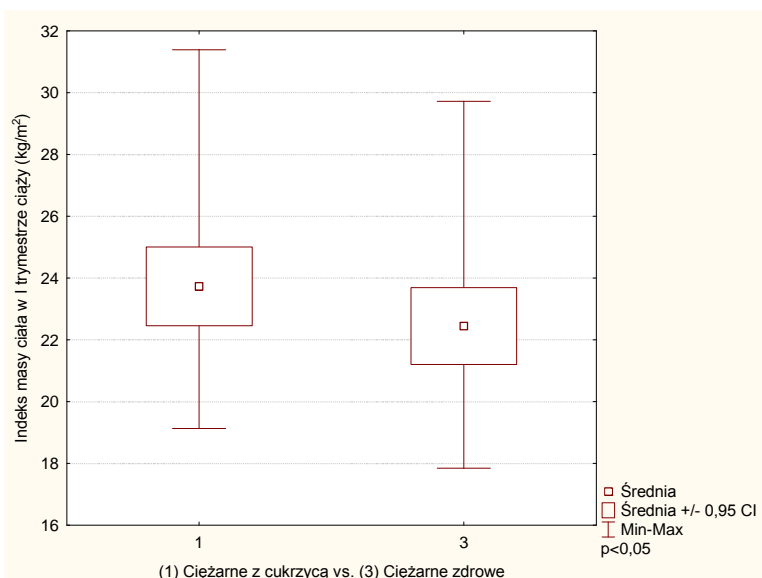
#### 5.4.5. Ocena wpływu najczęściej występującego polimorfizmu -2548 G/A i 668 A/G na przebieg ciąży w poszczególnych grupach

W kolejnym etapie pracy przeanalizowano wpływ najczęściej występującego polimorfizmu w całej badanej populacji na przebieg ciąży we wszystkich grupach.

Najczęściej występującym genotypem w całej badanej grupie ciężarnych był genotyp GA AG. Przeanalizowano przebieg ciąży we wszystkich podgrupach ciężarnych z tym genotypem.

Ciężarne z cukrzycą charakteryzowały się znacząco wyższym wskaźnikiem masy ciała w I trymestrze ciąży w porównaniu do ciężarnych zdrowych ( $p < 0,05$ ). W zakresie pozostałych parametrów metabolicznych i antropometrycznych w tych grupach ciężarnych, istotnych różnic nie stwierdzono. Ponadto nie stwierdzono wpływu genotypu GA AG na parametry metaboliczne i antropometryczne w II trymestrze ciąży w żadnej z badanych w tym okresie grup ciężarnych.

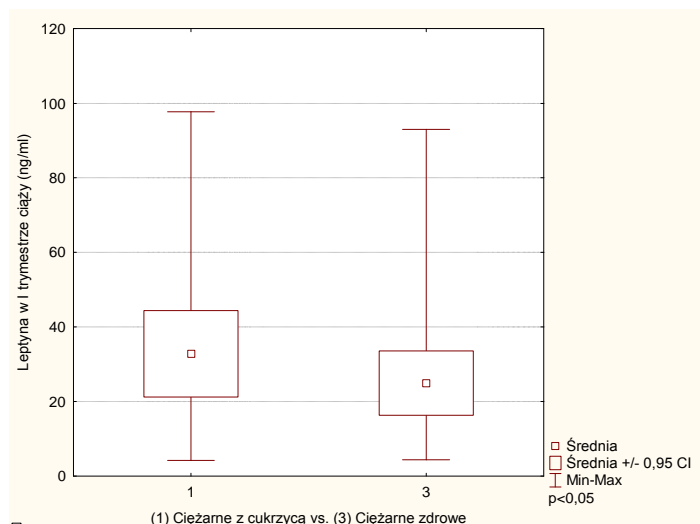
*Wykres 31. Indeks masy ciała w I trymestrze ciąży w grupie ciężarnych z cukrzycą typu 1 i zdrowych z genotypem GA AG.*



Zaobserwowano istotnie wyższe stężenie leptyny w I trymestrze ciąży w grupie ciężarnych z cukrzycą w porównaniu do grupy zdrowych ciężarnych o tym samym genotypie.



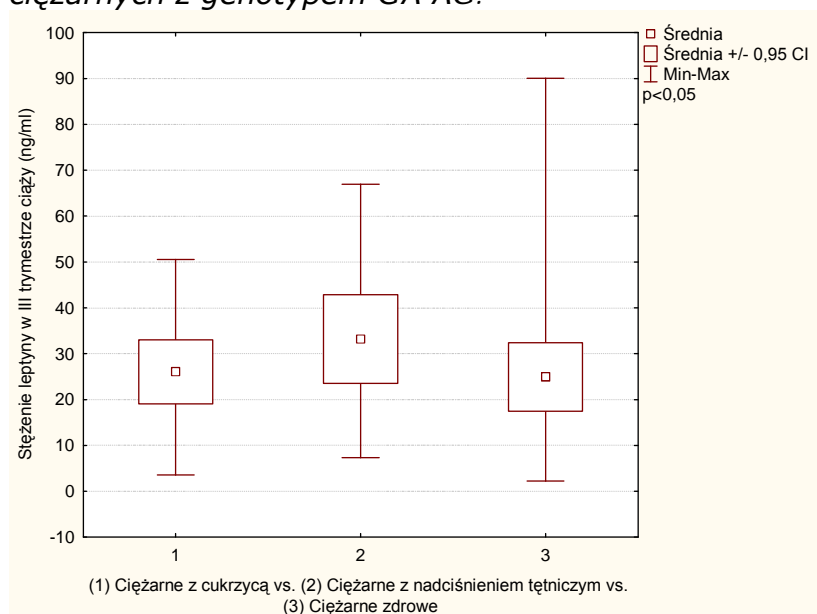
Wykres 32. Stężenie leptyny w I trymestrze ciąży w grupie ciężarnych z cukrzycą typu 1 i zdrowych z genotypem GA AG.



Przeanalizowano także wpływ genotypu GA AG na parametry w III trymestrze ciąży i okołoporodowo we wszystkich grupach ciężarnych.

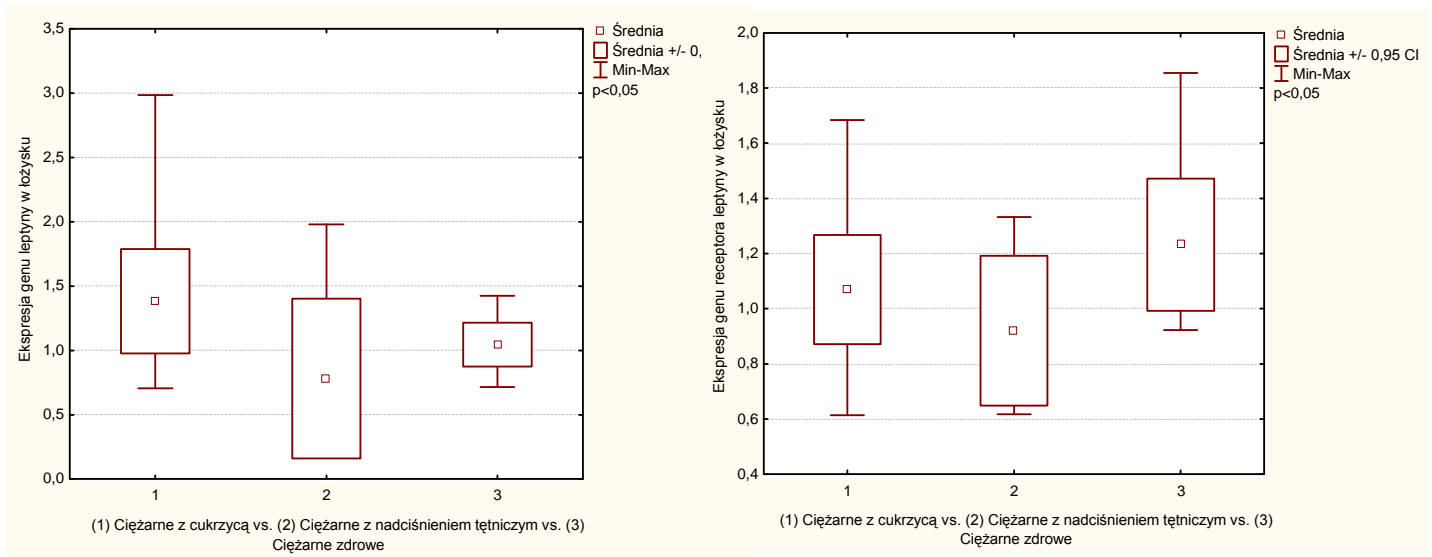
Najwyższe stężenie leptyny w III trymestrze ciąży zaobserwowano w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym, które różniło się znamienne od grupy ciężarnych z cukrzycą i zdrowych.

Wykres 33. Stężenie leptyny w III trymestrze ciąży we wszystkich grupach ciężarnych z genotypem GA AG.

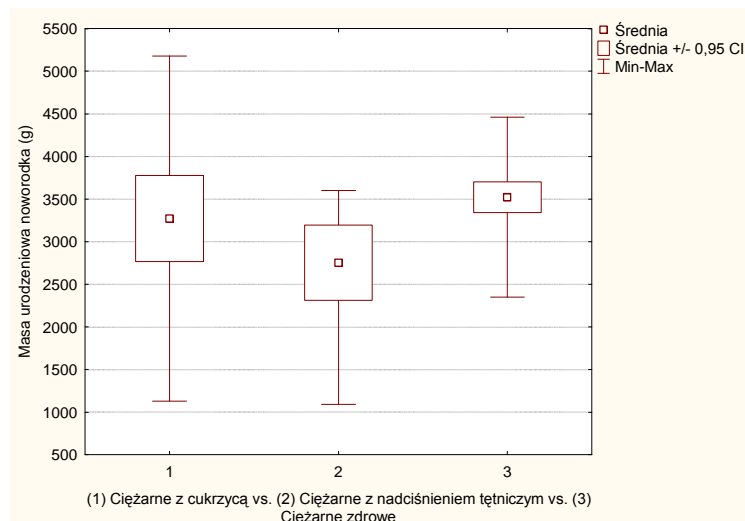


Ciężarne z omawianym genotypem, z nadciśnieniem tętniczym miały jednocześnie najniższy poziom ekspresji genu leptyny i genu receptora leptyny w łożysku, który różnił się znacząco od ich ekspresji w grupie ciężarnych z cukrzycą i zdrowych. Ponadto ciężarne te urodziły dzieci z najniższą masą ciała w porównaniu do ciężarnych z pozostałych grup.

Wykres 34. Ekspresja genu leptyny (LEP) i genu receptora leptyny (LEPR) w łożysku w poszczególnych grupach ciężarnych z genotypem GA AG.



Wykres 35. Masa urodzeniowa noworodka w poszczególnych grupach ciężarnych z genotypem GA AG.



## VI. DYSKUSJA

### 6.1. Wzrastanie płodu w ciąży powikłanej cukrzycą i nadciśnieniem tętniczym

Jak dotąd nie do końca poznane mechanizmy zaburzeń wzrastania płodu w ciąży powikłanej cukrzycą i nadciśnieniem tętniczym. Rozwój płodu w tych jednostkach chorobowych może być powikłany w sposób dwojaki – zarówno w postaci nadmiernego, jak i opóźnionego wzrastania płodu. Pomimo zgodności wielu autorów, co do faktu, że płodowa hiperinsulinemia spowodowana matczyną hiperglikemią jest głównym czynnikiem indukującym nadmierne wzrastanie płodu, nie zostały jak dotychczas poznane jasne mechanizmy wzrastania płodu [82]. Pionierskie prace nad występowaniem zaburzeń we wzrastaniu płodu w ciąży powikłanej cukrzycą prowadził Pedersen oceniając długość i masę ciała noworodków matek z cukrzycą po porodzie [110]. Badania dotyczące wyrównania metabolicznego w trakcie trwania ciąży i jego wpływu na masę płodu dały wyniki sprzeczne. Wg niektórych autorów, wpływ na wystąpienie makrosomii w tej grupie ciężarnych ma podwyższony odsetek hemoglobiny glikowanej zarówno w I jak i w III trymestrze ciąży, a także okołoporodowo [109, 60, 135]. Z kolei badania innych autorów wykazały, że glikemia oraz odsetek hemoglobiny glikowanej były w niewielkim stopniu skorelowane z podwyższoną masą urodzeniową noworodka, natomiast czynnikiem silnie wpływającym na jej wystąpienie była poposiłkowa glikemia [25]. W pracy tej podano potencjalne ograniczenia roli odsetka hemoglobiny glikowanej jako parametru użytecznego w predykcji masy ciała noworodka, podkreślając, że nie odzwierciedla on przejściowych i krótkotrwałych wzrostów glikemii, są także silnie skorelowane z nadmiernego wzrastania płodu [25]. Warto podkreślić, że u ciężarnych z typem 1 cukrzycy, leczonych za pomocą intensywnej insulinoterapii, nawet nieznaczna hiperglikemia zwiększa ryzyko wystąpienia makrosomii płodu. Podobne zjawisko zaobserwowano także u ciężarnych z cukrzycą ciążową [76].

W ostatnich latach pojawiły się prace dowodzące, że nie tylko hiperglikemia matczyna prowadzi do nadmiernego wzrastania płodu. Sugeruje się, że nadmierny transport przezłożyskowy innych substancji takich jak lipidy i aminokwasy, może mieć również znaczący udział w regulacji wzrastania płodu [40]. W pracach oceniających wpływ stężenia triglicerydów w II trymestrze ciąży na masę urodzeniową noworodka zaobserwowano, że ich podwyższone stężenie było także dodatnio skorelowane z odsetkiem makrosomii [66]. Dlatego też

prawdopodobnie pomimo ciągłej poprawy wyrównania gospodarki węglowodanowej i zbliżenia glikemii do poziomu ciężarnych zdrowych, odsetek makrosomii u ciężarnych chorujących na cukrzycę typu 1 jest ciągle wyższy niż u ciężarnych zdrowych.

W ciążach powikłanych nadciśnieniem tętniczym, a w szczególności jego najcięższą postacią, czyli stanem przedzucawkowym, zaburzenia wzrastania płodu mają charakter opóźnionego wzrastania płodu [94]. Nie do końca poznany jest mechanizm, w wyniku którego dochodzi do rozwoju nadciśnienia indukowanego ciążą oraz stanu przedzucawkowego. W badaniach dotyczących wpływu związków aktywnych metabolicznie, które mogą być związane z rozwojem tego powikłania znajduje się także leptyna. W licznych badaniach potwierdzono wpływ podwyższonego stężenia leptyny w I trymestrze ciąży na wystąpienie tego powikłania [97, 113, 129, 160]. Niektóre warianty polimorfizmu genu leptyny i jej receptora mogą mieć także wpływ na jego wystąpienie [34, 53].

## 6.2. Liczebność badanych grup ciężarnych i ich dobór

W genetycznych badaniach asocjacyjnych dobór i liczebność grupy stanowią zasadnicze czynniki mogące mieć wpływ na wyniki przedstawianych analiz. W niniejszej pracy, wszystkie ciężarne zarówno z grup badanych (z cukrzycą typu 1 oraz nadciśnieniem tętniczym), jak z grupy kontrolnej należały do rasy białej kaukaskiej, a więc spodziewano się przynajmniej jednorodności występowania badanych polimorfizmów. Pacjentki z grupy z cukrzycą były rekrutowane do badania podczas rutynowych okresowych pobytów w Klinice, co najmniej trzy razy w trakcie ciąży, przy czym dołożono starań, aby oznaczenia leptyny były wykonane co najmniej trzy razy w trakcie całej ciąży, w porównywalnych warunkach. Warto podkreślić brak jednorodności badanej grupy ciężarnych, obejmującej ciężarne zarówno z zaawansowanymi postaciami cukrzycy, włącznie z współistniejącymi powikłaniami naczyniowymi jak i bez tych powikłań. Ciężarne te były leczone lekami mogącymi mieć wpływ na stężenie leptyny, aczkolwiek krew do badań pobierano na czczo, w tym przed podaniem bazowej dawki insuliny, starając się zminimalizować jej wpływ na stężenie badanego hormonu. Przedstawione informacje dotyczące tej populacji mogą świadczyć o tym, że na wyniki oceniane w trakcie ciąży, tzn. związku przebiegu ciąży z dziedzicznym profilem genetycznym może mieć wpływ szereg innych czynników

środowiskowych, niemożliwych do wyeliminowania ze względów medycznych. Według niektórych badaczy profil genetyczny może tylko w nieznacznym stopniu wpływać na niektóre osobniczo stwierdzone cechy czy występowanie niektórych chorób w małych grupach badanych [9, 151]. W grupie z nadciśnieniem tętniczym znajdowały się ciężarne z nadciśnieniem indukowanym ciążą oraz z nadciśnieniem przewlekłym. Ciężarne, w szczególności z nadciśnieniem przewlekłym, były od samego początku ciąży leczone lekami także o potencjalnym wpływie na stężenie leptyny, lecz krew pobierano także na czczo, przed podaniem leków. Jednakże potencjalnego wpływu stosowanych przewlekłe leków na stężenie badanego hormonu i jego ekspresji w łożysku wykluczyć nie można. Dobór grup badanych oraz ich liczebność mogą stanowić kluczowe zadanie w planowaniu genetycznych badań asocjacyjnych.

### 6.3. Ocena częstości występowania polimorfizmów i alleli oraz testowanie równowagi Hardy'ego-Weinberga w badanych populacjach

Wstępnym etapem badań genetycznych o charakterze asocjacyjnym jest sprawdzenie istnienia lub braku zgodności rozkładu badanych cech z odpowiadającymi im rozkładami oczekiwanymi opisywanymi prawem Hardy'ego-Weinberga (HW). Analizę taką przeprowadzono dla badanych polimorfizmów genu leptyny LEP -2548 G/A oraz genu receptora leptyny LEPR 668 A/G. Zgodnie z tym prawem, jeżeli nie występują czynniki zakłócające, takie jak np. mutacje, to stosunek występowania poszczególnych genotypów w populacji rozmnażającej się w sposób płciowy jest stały we wszystkich pokoleniach i zależy tylko od stosunków występowania alleli oraz nie podlega zmianie w przypadku braku zmiany częstości występowania alleli. Spodziewaną równowagę częstości genotypów przewiduje prawo Hardy'ego-Weinberga opisywane równaniem  $p^2+2pq+q^2=1$ , gdzie w przypadku badania dwóch alleli np. alleli G i A, odpowiednio o częstości występowania p i q, częstość homozygoty GG wynosi  $p^2$ , heterozygoty GA  $2pq$  natomiast homozygoty AA -  $q^2$ .

W niniejszym badaniu, analizując rozkład cech w badanych populacjach, wobec braku istotnej statystycznie różnicy w wartościach obserwowanych i oczekiwanych, stwierdzono zgodność rozkładu badanych polimorfizmów, zarówno genu leptyny, jak i genu receptora leptyny w grupach badanych. W grupie kontrolnej zaobserwowano natomiast wspomnianą zgodność jedynie w zakresie

genu leptyny. Natomiast rozkład genotypów polimorfizmu genu receptora leptyny w tej podgrupie nie spełniał warunków opisywanych równaniem H-W. Zaburzenie rozkładu zgodności H-W mogło być spowodowane zaistnieniem naturalnych mechanizmów zakłócających tę równowagę tj. wystąpieniem dryfu genetycznego, nielosowym kojarzeniem osobników, który może powodować nadmiar występowania homo – lub heterozygot, obniżeniem przeżywalności niektórych genotypów, występowaniem lokalnych subpopulacji, ruchami migracyjnymi. Mało prawdopodobne jest, aby przyczyną zakłócenia równowagi H-W w tej podgrupie był błąd laboratoryjny, ponieważ prawdopodobieństwo jego wystąpienia jest znikome w przypadku zastosowania jako metody identyfikacyjnej polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych. Warto podkreślić, że omawianą podgrupę charakteryzował nadmiar heterozygoty AG, której częstość występowania wynosiła aż 63%, podczas gdy wartość oczekiwana przewidywana prawem H-W jedynie 50%, co może odpowiadać za wspomnianą niezgodność rozkładu. Według badań Popko i wsp. częstość występowania genotypu heterozygotycznego AG w populacji polskiej wynosi około 52% [112]. Częstość występowania pozostałych polimorfizmów nie odbiegała od częstości obserwowanej w pozostałych populacjach europejskich [28, 62].

#### 6.4. Analiza występowania poszczególnych polimorfizmów i rekonstrukcja genotypów

Jak wspomniano w poprzednich częściach pracy przebieg ciąży i wyrównanie metaboliczne w badanych podgrupach analizowano łącznie w oparciu w występujący genotyp z zakresie LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G. Typowym sposobem badania zależności występowania danej cechy od genotypu jest tzw. rekonstrukcja haplotypowa. Niezbędnym warunkiem do wykonania rekonstrukcji haplotypowej jest położenie danych genów na tym samym chromosomie. Ze względu na lokalizację badanych polimorfizmów na odmiennych chromosomach, odstąpiono od klasycznej rekonstrukcji haplotypowej a podjęto próbę rekonstrukcji genotypów, starając się analizować jednoczesny wpływ obu polimorfizmów na nasilenie danej cechy. Naturalną konsekwencją tak podjętej próby analizy wpływu polimorfizmów badanych genów, jest zmniejszenie się liczebności osobników w obrębie nowo powstałych podgrup, a nawet brak niektórych kombinacji genowych w przypadku mniejszej liczby analizowanych

danych. Jednakże analiza taka, pełniej oddaje łączny wpływ analizowanych genów na badany parametr.

#### 6.5. Regulacja stężenia leptyny w ciąży

Profil wydzielania leptyny w ciąży był przedmiotem licznych badań zarówno na modelu zwierzęcym, jak i ludzkim. Różnice w wydzielaniu tego hormonu są widoczne pomiędzy gatunkami. U myszy obserwuje się około 25-krotny wzrost stężenia leptyny od połowy ciąży, podczas gdy u szczura wzrost ten jest około 2-3-krotny i zauważalny jest już od samego początku ciąży [120]. Badania u ludzi wykazały podobny profil wydzielania tego hormonu w trakcie ciąży. Znamienny wzrost stężenia obserwowany jest w I trymestrze ciąży i jest to wzrost dwukrotny. Następnie stężenie leptyny utrzymuje się na stabilnym poziomie w II i III trymestrze, aby po porodzie gwałtownie spaść do wartości obserwowanych przed ciążą [15].

Nie ma pewności, jaka jest przyczyna wzrostu stężenia leptyny w ciąży. Postulowano, że wiarygodną przyczyną może być istotny wzrost masy tkanki tłuszczowej w ciąży, która jako główne źródło wydzielania leptyny, może stanowić istotny rezerwuar tego hormonu [164]. Poźniejsze badania wysunęły hipotezę, że tkanka tłuszczowa ciężarnej tylko w niewielkim stopniu może wpływać na wzrost stężenia leptyny surowicy krwi. Dowiedziono natomiast, że wzrost ten wynika z łożyskowej produkcji leptyny. Wykazano bowiem, po pierwsze, że wzrost stężenia leptyny w ciąży u ludzi wyprzedza istotny wzrost wskaźnika masy ciała, a po drugie, gwałtowny spadek stężenia leptyny po porodzie nie idzie w parze ze spadkiem masy tkanki tłuszczowej, do którego oczywiście tak szybko nie dochodzi [49]. Po trzecie, nie stwierdzono istotnie wyższej ekspresji mRNA leptyny w tkance tłuszczowej u kobiet ciężarnych w I trymestrze oraz w porównaniu z okresem poza ciążą [17]. Wykazano natomiast syntezę leptyny w syncytiotrofoblaście i dowiedziono, 95% tej syntezy obecne jest w krążeniu matczynym a 5% w krążeniu płodowym [80].

Postulowana jest rola zwiększonego stężenia leptyny w ciąży jako czynnika zapewniającego mobilizację kwasów tłuszczowych z tkanki tłuszczowej matki, celem przezłożyskowego transferu substratów lipidowych dla rozwijającego się płodu. Wykazano, że zarówno u ludzi jak i u gryzoni leptyna aktywuje ekspresję szlaku enzymatycznego odpowiedzialnego za oksydację lipidów, co ma zapewnić transfer przezłożyskowy, substancji budulcowych, a przed wszystkim lipidów, do

płodu [128]. Innym mechanizmem wyjaśniającym podwyższone stężenie leptyny w ciąży miałyby być wiązanie tego hormonu do rozpuszczalnej izoformy krótkiej receptora, która obecna w krążeniu matki, może w znacznym sposób opóźnić klirens leptyny z surowicy krwi. Konsekwencją wyższego stężenia leptyny, w szczególności u kobiet z otyłością, jest leptynooporność, która upośledza funkcje biologiczne tego hormonu. W sytuacji nasilonej leptynooporności dochodzi do opóźnienia transdukcji sygnału przez długie izoformy przezbłonowe receptora, obecne nie tylko w tkance tłuszczowej, ale w wielu tkankach obwodowych, w tym także w łożysku [26]. Nadekspresja leptyny w łożysku ciężarnych z cukrzycą może być wyrazem tej oporności, prowadzącą do większej jej produkcji [80].

W realizowanej pracy, biorąc pod uwagę stężenie leptyny w całej grupie ciężarnych z cukrzycą, nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi trymestrami. Różnice te były widoczne natomiast po uwzględnieniu podziału ciężarnych na grupy w zależności od czasu trwania cukrzycy i obecności powikłań naczyniowych. Ciężarne z wieloletnią cukrzycą i współistniejącymi zaburzeniami naczyniowymi pod postacią nefro- i retinopatii cukrzycowej, a także ze współistniejącym nadciśnieniem tętniczym, charakteryzowały się najwyższą dynamiką wzrostu oraz najwyższym okołoporodowym stężeniem leptyny. Najwyższe stężenia leptyny w okresie okołoporodowym zaobserwowano u ciężarnych z klasy F wg White. Ciężarne z tej grupy charakteryzowały się powikłanym przebiegiem ciąży, wymagającym stosowania leków o potencjalnym działaniu podwyższającym stężenie leptyny. U części z tych pacjentek (N=33), stosowano leki stymulujące dojrzewanie płuc u płodu – glikokortykosteroidów, które mogłyby wpływać również na utrzymujące się podwyższone stężenie leptyny [141, 107]. Ponadto ciężarne z powikłaniami naczyniowymi i aterogennym profilem lipidowym, mogą znajdować się w grupie zwiększonego ryzyka wystąpienia tzw. przewlekłego niedotlenienia tkanek. W piśmiennictwie postuluje się wpływ tego zjawiska, czyli przewlekłej hipoksji tkankowej na wzrost stężenia leptyny, co mogłoby również tłumaczyć zaistniałą sytuację [35]. Również upośledzenie przepływu przez naczynia maciczne, które jest charakterystyczne dla tej podgrupy ciężarnych, mogło mieć istotny wpływ na podwyższone stężenie leptyny w okresie okołoporodowym [14]. Dodatkowym czynnikiem dowodzącym wpływu zaburzeń lipidowych na wyższe stężenie leptyny w przebiegu ciąży jest bardzo wysoki jej poziom u 1 ciężarnej z cukrzycą klasy H. Była to ciężarna z uogólnioną chorobą miażdżycową naczyń w przebiegu



wieloletniej cukrzycy, po zawale ściany przedniej mięśnia sercowego oraz zaawansowaną nefropatią. U chorej tej obserwowano bardzo wysokie stężenia leptyny w surowicy krwi przez cały okres ciąży. Natomiast, co ciekawe, u ciężarnych z najbardziej zaawansowanymi zmianami naczyniowymi (klasy R/F i T) stężenie leptyny było niższe niż w pozostałych podgrupach.

W grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym, zarówno przewlekłym jak i indukowanym ciążą, nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu leptyny w momencie wystąpienia nadciśnienia tętniczego oraz w momencie objęcia opieką w przypadku nadciśnienia przewlekłego w tym samym okresie ciąży, jak i w okresie okołoporodowym. W grupie ciężarnych z przewlekłym nadciśnieniem tętniczym zaobserwowano znamiennej wzrost stężenia leptyny w przebiegu ciąży. U części tych ciężarnych pojawiał się białkomocz, wobec czego rozpoznano u nich stan przedzucawkowy nałożony na przewlekłe nadciśnienie tętnicze. W pracy Laivuori i wsp. postulowano wyższe stężenie leptyny u ciężarnych ze stanem przedzucawkowym oraz zahamowaniem wzrostu płodu w porównaniu do ciężarnych bez tych powikłań ciąży [74]. W przedstawionej rozprawie stężenie leptyny w momencie wystąpienia nadciśnienia u ciężarnych, które rozwinęły stan przedzucawkowy, było istotnie wyższe od stężenia leptyny w momencie jego rozpoznania, niż w grupie ciężarnych bez tego powikłania. W podgrupie ciężarnych, które rozwinęły stan przedzucawkowy, stwierdzono istotnie niższą masę urodzeniową noworodka w porównaniu do ciężarnych z nadciśnieniem indukowanym ciążą bez białkomoczu i ciężarnych zdrowych. Wydaje się, że podobnie jak w grupie ciężarnych z cukrzycą z powikłaniami naczyniowymi, tak w grupie z wieloletnim nadciśnieniem tętniczym, przewlekły proces hipoksji tkankowej indukuje z jednej strony zmiany zapalne w łożysku charakterystyczne dla preeklampsji, a z drugiej strony może wpływać na stymulację produkcji leptyny.

W grupie ciężarnych zdrowych, stężenie leptyny było najniższe w porównaniu do dwóch pozostałych grup. Zaobserwowano nieznaczne zwiększenie stężenia leptyny począwszy od I trymestru do okresu okołoporodowego, co opisywane jest także przez innych autorów i wiąże się z jednej strony ze wzrostem łożyska, jak i wzrostem masy ciała ciężarnej w przebiegu ciąży [83].

## 6.6. Funkcja i ekspresja leptyny w łożysku

W 1997 roku a więc 3 lata po odkryciu leptyny przez Zhanga, Masuzaki i wsp. wyizolował leptynę z tkanki łożyskowej [95]. Odkrycie obecności przezbłonowych izoform długich receptora leptyny w łożysku wskazuje, że leptyna może pełnić swoją funkcję zarówno w miejscu bezpośredniej syntezy, jak i w miejscach odległych od syntezy pierwotnej [36]. Po związaniu z receptorem przezbłonowym leptyna aktywuje wiele lokalnych szlaków, wykazując działanie plejotropowe w zakresie metabolizmu lipidów, wychwytu zwrotnego aminokwasów, syntezy macierzy zewnątrzkomórkowej. Wykazane jest także działanie mitogenne [57, 16]. Nadekspresja leptyny w łożysku może prowadzić do jego przerostu [30]. W przedstawionej pracy przeanalizowano wpływ różnych czynników na poziom ekspresji zarówno genu, jak i genu receptora leptyny w łożysku, którymi były obecność cukrzycy i nadciśnienia tętniczego, współistnienie powikłań naczyniowych pod postacią nefro- i retinopatii cukrzycowej. Zbadano także wpływ przyrostu masy ciała ciężarnej na poziom ekspresji wymienionych genów w łożysku i ewentualny ich udział w regulacji masy urodzeniowej noworodka.

Biorąc pod uwagę wpływ istnienia samych powikłań u ciężarnej – cukrzycy i nadciśnienia tętniczego, stwierdzono, że zarówno u ciężarnych z cukrzycą typu 1, jak i z nadciśnieniem tętniczym, poziom ekspresji genu leptyny był istotnie wyższy niż w grupie ciężarnych zdrowych. Obserwacje te są zgodne z innymi pracami badającymi wpływ tych jednostek na ekspresję łożyskową leptyny. W pracach Lepercq'a i wsp. dowiedziono 3-5 krotnego wzrostu syntezy łożyskowej leptyny w porównaniu do grupy ciężarnych zdrowych. Autorzy ci podkreślają istotną rolę egzogennej insuliny w regulacji łożyskowej syntezy leptyny. Co ciekawe, w badaniach cytowanego autora potwierdzono pozytywną korelację łożyskowej leptyny z podwyższonym stężeniem tego hormonu w krwi pępowinowej, po raz kolejny udowadniając, że leptyna jest syntetyzowana po stronie płodowej łożyska i wpływa tą drogą na rozwój płodu [80]. Natomiast stężenie leptyny w krwi matki w pracach Lepercq'a nie było istotnie wyższe w porównaniu do jej stężenia u ciężarnych zdrowych w okresie okołoporodowym [155]. W przedstawionej rozprawie stężenie leptyny w grupie ciężarnych z cukrzycą w porównaniu do grupy kontrolnej było wyższe zarówno w I trymestrze ciąży jak i w okresie okołoporodowym. Wydaje się, że wpływ miało na to wiele czynników – pacjentki ze złym wyrównaniem metabolicznym oraz z powikłaniami naczyniowymi.

W grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym wykazano ekspresję genu leptyny wyższą, lecz nieznamienne, w porównaniu do grupy ciężarnych zdrowych. Natomiast poziom tej ekspresji był istotnie niższy w porównaniu do grupy ciężarnych z cukrzycą, potwierdzając istotny udział tej choroby indukowaniu ekspresji tego genu. Obserwacja ta jest także zgodna z innymi wynikami wskazującymi znaczący wpływ podwyższający nadciśnienia tętniczego i stanu przedrzucawkowego na poziom łożyskowej i pępowinowej leptynemii w stosunku do grupy zdrowych ciężarnych [100, 97]. Co ciekawe, w okresie okołoporodowym, stężenie leptyny było tylko nieznamienne (niezamiennie) wyższe w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym a najniższe w grupie kontrolnej. Wyniki te korelują z odpowiadającymi im wartościami ekspresji genu leptyny w łożysku. Brak istotności statystycznej w badanej ekspresji mógł wynikać z mniejszej liczebności zbadanych łożysk u ciężarnych z grupy kontrolnej lub innych wspomnianych na początku dyskusji czynników zaburzających rozkładu Hardy'ego-Weinberga.

Celem dokładnego przeanalizowania roli łożyskowej leptyny w ciąży powikłanej cukrzycą i nadciśnieniem tętniczym zbadano także poziom ekspresji genu receptora leptyny w łożysku w wymienionych podgrupach. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji tego genu w łożyskach w zależności od współistnienia wymienionych powikłań. Wprawdzie tendencja do najwyższej ekspresji genu receptora leptyny została stwierdzona w łożyskach z ciążą cukrzycowych, ale znamienności statystycznej nie wykazano. Ciekawą obserwacją jest widoczne w tym przypadku zjawisko „*down-regulation*” receptora leptyny w łożyskach z cukrzycą. Zostało to potwierdzone dużą dysproporcją pomiędzy wysokim poziomem ekspresji genu leptyny a nieznamienne tylko podwyższonym poziomem ekspresji genu jej receptora. Natomiast w pozostałych grupach ciężarnych zjawiska tego nie zaobserwowano – jak uwidoczniono na wykresach poziom ekspresji zarówno genu, jak i genu receptora leptyny jest dużo bardziej proporcjonalny niż w grupie ciężarnych z cukrzycą. Zjawisko takie, dysregulacji ekspresji receptorów w odpowiedzi na podwyższone stężenie ligandu było opisywane w odniesieniu do receptorów leptyny, insuliny oraz androgenów w łożyskach ciężarnych z cukrzycą przez Uzelaca i wsp. [152].

### 6.7. Wpływ łożyskowej leptyny na wynik położniczy w grupie ciężarnych z cukrzycą

W pracach Mandersona i wsp. wykazano, że noworodki matek chorujących na cukrzycę, zarówno typu 1 jak i cukrzycę ciążową, mają wyższą akumulację tkanki tłuszczowej niż noworodki zdrowe, co z kolei może przekładać się na wyższą ich masę urodzeniową. Autorzy ci wykazali, że stężenie leptyny w surowicy krwi pępowinowej tych noworodków było wyższe w porównaniu do noworodków matek nie chorujących na cukrzycę i korelowało z zawartością brzusznej tkanki tłuszczowej u tych dzieci. Autorzy ci sugerują również, że tkanka tłuszczowa płodu posiada nie tylko receptory leptynowe, ale jest prawdopodobnie także źródłem jej samej [93]. Fakt podwyższonego stężenia pępowinowej leptyny u noworodków matek chorujących na cukrzycę oraz jej pozytywna korelacja z masą płodu, wg niektórych badaczy, upoważniał ich do stwierdzenia, że leptyna stymuluje wzrost płodu [46, 70]. W chwili obecnej nie są znane czynniki kontrolujące akumulację tkanki tłuszczowej u płodu. Nie ma także bezpośrednich dowodów, że leptyna stymuluje tę akumulację, gdyż z oczywistych powodów, nie prowadzono badań na płodach w trakcie trwania ciąży. Jedynym pośrednim dowodem roli leptyny w regulacji wzrastania płodu jest jej akumulacja w tkance łożyskowej, gdzie jak wiadomo, stwierdzono wyższe jej stężenie w ciąży powikłanej cukrzycą typu 1 [80]. Ponadto biorąc pod uwagę plejotropowe działanie leptyny, w tym wpływ na proliferację naczyń, można pośrednio przypuszczać, że rozpoczęcie produkcji tkanki tłuszczowej u płodu jest następstwem uprzedniej proliferacji naczyń [150, 57, 30, 131].

Wobec postulowanej przez innych autorów podwyższonej ekspresji łożyskowej leptyny w ciąży powikłanej cukrzycą typu 1, przeanalizowano ekspresję poszczególnych genów w łożysku we wszystkich grupach badanych, w odniesieniu do masy urodzeniowej noworodka, biorąc także pod uwagę przyrost masy ciała ciężarnej oraz uprzednio stwierdzone podwyższone stężenie leptyny w III trymestrze ciąży [80]. Kryterium doboru był wzrost wskaźnika masy ciała, o co najmniej  $5 \text{ kg/m}^2$ , jako graniczną dopuszczalną wartość przyrostu masy ciała w ciąży.

Uzyskano wyniki zbieżne do wyników innych autorów [81]. Najwyższy poziom ekspresji genu leptyny stwierdzono w łożyskach z cukrzycą, co potwierdza poprzednie obserwacje. W całej grupie cukrzycowej, najwyższy poziom ekspresji genu leptyny wykazano w łożyskach noworodków z LGA i AGA,

istotnie wyższy niż w łożyskach noworodków z SGA i zdrowych. Ponadto w tak podzielonej grupie zaobserwowano ponownie „*down regulation*” genu receptora leptyny, największą dysproporcję uwidoczniono w łożyskach ciężarnych z LGA. Powstaje pytanie, czy hyperleptynemia łożyskowa jest wynikiem jedynie nadmiernej produkcji leptyny przez płód, czy też poziom matczynej leptynemii, w korelacji z wzrostem BMI może mieć w niej udział. W niniejszej rozprawie wykazano, że u ciężarnych z cukrzycą i towarzyszącą jeszcze nadwagą bądź otyłością, występuje silna korelacja pomiędzy poziomem ekspresji genu leptyny w łożysku a masą urodzeniową noworodka. Noworodki z masą urodzeniową powyżej 4000g miały bardzo wysoki poziom ekspresji genu leptyny w łożysku (współczynnik korelacji Spearmana wynosił  $r=0,81$ ). Natomiast „*down-regulation*” genu receptora leptyny w tej samej grupie noworodków wyrażał się przesunięciem w kierunku niższych wartości ekspresji, co potwierdzono niższym współczynnikiem korelacji pomiędzy masą noworodka a poziomem ekspresji receptora leptyny ( $r=0,51$ ). Można wysunąć hipotezę na podstawie dokonanych obserwacji, iż zarówno w całej grupie cukrzycowej, jak i w grupie podzielonej ze względu na masę noworodka, że niższa ekspresja genu receptora leptyny może stanowić mechanizm obronny przed nadmiernym wzrastaniem płodu [37]. Należy dodać, że na niskie wartości ekspresji wymienionych genów w łożysku u noworodków z najniższą masą ciała mógł mieć wpływ także termin porodu, część z nich została bowiem urodzona przedwcześnie.

#### 6.8. Wpływ chorób ciężarnej na łożyskową ekspresję leptyny

Choroby matki, w tym liczne czynniki zapalne, mogą mieć modulujący wpływ na łożyskową ekspresję leptyny w łożysku. Uszkodzenie śródbłonna naczyń towarzyszące cukrzycy, które ma miejsce także w przypadku miażdżycy, bądź nadciśnienia tętniczego, powoduje zaburzenia w wydzielaniu takich cytokin zapalnych jak Interleukina 1 i 6 i TNF-alfa [12]. Wykazano, że podwyższone stężenie leptyny może mieć wpływ na wytworzenie uogólnionego stanu zapalnego manifestującego się zwiększeniem stężenia tych cytokin m.in. w krążeniu ciężarnej i łożysku, i odwrotnie, reakcje zapalne towarzyszące cukrzycy, nadciśnieniu tętniczemu i stanowi przedrzucawkowemu, mają wpływ stymulujący na produkcję leptyny [65]. W analizie ekspresji badanych genów w łożysku podjęto próbę jej oceny w zależności od chorób matki wikłających ciążę.

W analizie porównującej wpływ obecności cukrzycowych powikłań naczyniowych na ekspresję genu leptyny i jej receptora w łożysku, nie wykazano istotnych różnic w ekspresji genu leptyny u ciężarnych bez powikłań naczyniowych w porównaniu do grupy z tymi powikłaniami. Wyjątek stanowiły jedynie ciężarne z klasą F (tylko nefropatia cukrzycowa, bez nadciśnienia tętniczego), które miały wyższy poziom leptyny w III trymestrze ciąży. Podobnie, jak w pozostałych podgrupach ciężarnych, ekspresja genu leptyny była wyższa niż w grupie ciężarnych zdrowych. Ciekawą obserwacją jest współistnienie wymienionego wcześniej subklinicznego stanu zapalnego z najwyższą w tej grupie ekspresją genu receptora leptyny, co pozwala sądzić, że wraz ze spadkiem stężenia ligandu dochodzi do zjawiska „*up-regulation*” receptora. Zjawisko to nie występuje w przypadku porównywania tej grupy ciężarnych z grupą z nadciśnieniem tętniczym, ale bez współistniejącej cukrzycy. W tym przypadku najwyższe poziomy ekspresji zarówno w zakresie genu jak i receptora leptyny zaobserwowano u ciężarnych z cukrzycą i powikłaniami naczyniowymi w przebiegu cukrzycy oraz nadciśnieniem, które były istotnie wyższe w porównaniu do pozostałych grup. Potwierdza to hipotezę, że w przebiegu stanów przebiegających ze stanem zapalnym (w tym przypadku cukrzyca i nadciśnienie tętnicze) poziom badanych genów w łożysku jest najwyższy [74, 54, 106].

#### 6.9. Polimorfizm genetyczny LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G a przebieg ciąży powikłanej cukrzycą i nadciśnieniem tętniczym

Polimorfizm genetyczny związków aktywnych biologicznie jest powszechnym zjawiskiem występującym w przyrodzie. Z definicji polimorfizmem nazywa się stosunkowo często występujące zmiany, których częstość określa się na min. 1%. W przeciwnym razie, gdy częstość ta jest mniejsza, zmiana taka nazywana jest mutacją [29]. Większość genów kodujących związki aktywne biologicznie jest polimorficzna, przy czym wyróżnia się dwa rodzaje polimorfizmów: polimorfizm pojedynczego nukleotydu oraz polimorfizm sekwencji mikro- i makrosatelitarnych. W badaniach populacyjnych najczęściej badanymi polimorfizmami są polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP), które stanowią około 90% ogólnej ilości zmian i występują co około 300 nukleotydów w DNA, w ogólnej ich liczbie 3 miliardów [56]. SNP mogą dotyczyć sekwencji kodujących, niekodujących oraz regionów międzygenowych. Konsekwencją położenia danego

polimorfizmu w obrębie genu jest zmiana w łańcuchu aminokwasowym lub jej brak [92, 112, 62]. Nawet polimorfizmy leżące w obrębie regionów kodujących niekoniecznie muszą prowadzić do zmiany aminokwasu – jest to konsekwencją jednej z cech kodu genetycznego, mianowicie jego degeneracji [29]. W razie położenia badanych genów na tych samych chromosomach, typowym postępowaniem w analizie ich wpływów na wystąpienie danej cechy jest analiza haplotypowa, po ich wcześniejszej rekonstrukcji i obliczeniu współczynnika Levontin'a.

Warto podkreślić fakt zróżnicowania występowania polimorfizmu genetycznego w obrębie różnych populacji i grup etnicznych [116]. Ponadto znanym jest fakt, że polimorfizm pojedynczego nukleotydu rzadko prowadzi do znaczących i widocznych klinicznie zmian w funkcjonowaniu organizmu. Przykładem takiego działania jest większa podatność rasy azjatyckiej na działanie alkoholu etylowego, związana z polimorfizmem enzymu dehydrogenazy alkoholowej [3].

W niniejszej pracy przyjęto zasadę analizy poszczególnych parametrów wpływających na przebieg ciąży w odniesieniu do obu badanych polimorfizmów jednocześnie, podejmując próbę określenia ich łącznego wpływu na przebieg ciąży w danej grupie. W związku z rekonstrukcją genotypową, otrzymano 9 możliwych kombinacji we wszystkich podgrupach. Warto podkreślić fakt, że rodzaj badanego polimorfizmu w obrębie genu leptyny, ze względu na swoje położenie (-2548), czyli w regionie promotorowym i nie kodującym, nie mógł bezpośrednio wpływać na sekwencję aminokwasową leptyny, a więc nie należało spodziewać się większych zaburzeń w działaniu leptyny, oczywiście biorąc jedynie pod uwagę badany polimorfizm. W genie tym, jak wspomniano wcześniej, występuje wiele innych polimorfizmów, w tym także w regionach kodujących, które mogą mieć znaczenie w biologicznej funkcji leptyny, powodujących zmiany w sekwencji białka - jednakże nie były one przedmiotem badania w niniejszej rozprawie, a więc ich rola jest niemożliwa do sprawdzenia [157, 92, 136]. W związku z położeniem badanego polimorfizmu – w regionie promotorowym zawierającym czynniki wzmacniające lub osłabiające transkrypcję, można było się spodziewać różnic w nasileniu ekspresji tego związku w surowicy ciężarnych bądź także w innych tkankach. Wobec powyższego podjęto próbę analizy stężenia leptyny z zależności od występującego genotypu.

W badaniu wpływu polimorfizmu genetycznego receptora leptyny na przebieg ciąży istotnym elementem było rozważenie jego położenia w obrębie genu.

Położenie 668 oznacza, że badany polimorfizm znajduje się w obrębie eksonu. Konsekwencją tego położenia jest zmiana w translacji łańcucha białkowego – zamiast Glutaminy w pozycji 223 występuje Arginina. Co ciekawe, nawet pojedyncza zamiana aminokwasu w łańcuchu białkowym, będąca konsekwencją polimorfizmu SNP lub sztucznie wykonanej zamiany, może prowadzić do głębokich zmian w aktywności danego związku. Dobrym przykładem jest zastosowanie Insulin LisPro i AspArt – dzięki zamianie pojedynczych aminokwasów w łańcuchu białkowym uzyskano zwiększenie hydrofilności i znaczące przyspieszenie wchłaniania z tkanki podskórnej. Sugeruje się związek badanego polimorfizmu genu receptora leptyny w indukowaniu niektórych zaburzeń w metabolizmie [154, 63].

W badanych grupach ciężarnych wykazano, że genotyp heterozygotyczny GA w zakresie genu leptyny i heterozygotyczny AG w zakresie genu receptora leptyny był najliczniej reprezentowanym genotypem, bez względu na współistnienie cukrzycy i nadciśnienia, zatem badanie jego wpływu na wystąpienie tych powikłań wydaje się nie mieć znaczenia. Jedynym zastrzeżeniem może być brak zgodności rozkładu z prawem Hardy'ego-Weinberga polimorfizmu genu receptora leptyny w grupie kontrolnej. Przyczyną braku zgodności tego rozkładu była prawdopodobnie zbyt mała liczebność populacyjna w tej grupie, gdyż inne przyczyny takie jak nielosowe kojarzenie osobników czy obecność lokalnej subpopulacji są mało prawdopodobne biorąc pod uwagę charakter etniczny badanej grupy. Kolejnym krokiem w zweryfikowaniu tej hipotezy powinno być zwiększenie liczebności grupy kontrolnej, zgodnie z zasadą dążenia się do rozkładu zgodności H-W w miarę zwiększania się liczebności populacji. Warto także zauważyć, iż założenia prawa równowagi Hardy'ego-Weinberga mają charakter czysto teoretyczny, gdyż w prawdziwych populacjach może dochodzić np. do mutacji, dryfu genetycznego, czy nielosowego kojarzenia osobników. Są to czynniki charakterystyczne dla procesu ewolucji, ale jednocześnie zaburzają równowagę prawa H-W.

Na podstawie przeprowadzonych badań można wnioskować, że różne kombinacje genotypów całkowicie lub częściowo homozygotycznych mogą mieć wpływ na wystąpienie zaburzeń w przebiegu ciąży. Obserwacja ta jest zgodna z innymi badaniami uwzględniającymi wpływ genotypów homozygotycznych np. na wystąpienie stanu przedrzucawkowego [105]. Warto zaznaczyć, że prace te były



prowadzone na populacji o liczebności zbliżonej do przedstawianej w tej pracy i także spełniały prawo rozkładu Hardy'ego-Weinberga.

W kolejnym etapie pracy zbadano wpływ obu wymienionych polimorfizmów na przebieg ciąży, opisany za pomocą parametrów wyrównania gospodarki węglowodanowej, lipidowej oraz stężenia leptyny.

W analizie obejmującej stężenie leptyny w surowicy krwi w grupie ciężarnych z cukrzycą oraz jej ekspresję w łożysku wykazano istotnie wyższe jej stężenie u pacjentek z genotypem homozygotycznym: w II trymestrze ciąży w surowicy krwi wykazano podwyższone stężenie leptyny w obecności genotypów GG i AA, dodatkowo wzmocnionym przez homozygotę w zakresie receptora leptyny.

W analizie wpływu polimorfizmu genetycznego badanych genów na wyrównanie metaboliczne w przebiegu ciąży wykazano potencjalny wpływ genotypów homozygotycznych, czyli mniej powszechnych w badanej populacji ciężarnych z cukrzycą, na wyższy odsetek hemoglobiny glikowanej w I i II trymestrze ciąży, wyższe stężenie triglicerydów w I trymestrze ciąży.

Natomiast wynik położniczy w tej grupie ciężarnych był zależny od genotypu homozygotycznego zarówno w zakresie genu jak i receptora leptyny: najwyższą masę urodzeniową zaobserwowano ciężarnych z genotypem AA AA. W dostępnym piśmiennictwie są dwie prace podejmujące próbę oceny wpływu SNP genu i genu receptora leptyny na wyrównanie metaboliczne w ciąży i masę noworodka [137, 2]. Wyniki Sourena i wsp. są zbieżne z obserwacjami stwierdzonymi w niniejszej pracy – w której wykazano, że na wyrównanie metaboliczne miały wpływ homozygotyczne genotypy w zakresie genu leptyny. Natomiast homozygotyczny wariant GG polimorfizmu receptora leptyny był związany z wyższym stężeniem cholesterolu HDL [137]. Natomiast w pracy Adkinsa i wsp. podjęto próbę oceny masy urodzeniowej w zależności od genotypu, co było również przedmiotem badania w przedstawionej rozprawie. Autorzy ci wykazali, że obecność allelu A wpływa na wzrost masy urodzeniowej noworodka płci żeńskiej oraz na niższą masę urodzeniową noworodka płci męskiej [2]. Z kolei badania Randa i wsp. nie potwierdziły wpływu polimorfizmu genetycznego receptora leptyny na masę urodzeniową noworodka [117]. Te badania potwierdzają więc znany fakt, że regulacja wzrastania płodu w ciąży powikłanej cukrzycą jest uzależniona nie tylko od czynników genetycznych, ale wpływa na nią również szereg innych czynników metabolicznych.

Podobnie, jak w grupie ciężarnych z cukrzycą, w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym wykazano wpływ niektórych genotypów na przebieg ciąży i na masę noworodka. Drews i wsp. w swoich badaniach donoszą o potencjalnym związku polimorfizmów genu leptyny z przebiegiem ciąży powikłanej nadciśnieniem oraz o związku pomiędzy wyższą ekspresją genotypów AA i GG w indukowaniu tego zaburzenia [34]. Natomiast jedyną pracą opisującą związek polimorfizmu – 2548 G/A w regulacji wzrastania płodu jest praca przeprowadzona na populacji czeskiej. Jej wyniki nie potwierdzają wpływu tego polimorfizmu na regulację wzrastania płodu i przebiegu ciąży [10].

W przedstawionej rozprawie obejmującej wpływ badanych polimorfizmów na przebieg ciąży i wynik położniczy w ciąży powikłanej nadciśnieniem tętniczym, nie zaobserwowano istotnego udziału któregośkolwiek genotypu na badane czynniki. Jedynie przyrost masy ciała ciężarnej różnił się znamiennej pomiędzy genotypami, prezentując najwyższą wyjściową wartość u ciężarnych z genotypem heterozygotycznym GA i AG w zakresie obu genów. Warto przypomnieć, że rozkład polimorfizmów LEPR 668 A/G nie spełniał zgodności rozkładu H-W, więc możemy mieć w tym przypadku do czynienia z zafałszowaniem wyniku z tego powodu.

#### 6.10. Przydatność kliniczna wykonanych badań

Jednym z istotnych celów opieki położniczej nad kobietą ciężarną jest monitorowanie wzrastania płodu. W niniejszej rozprawie podjęto próbę oceny, czy którykolwiek parametr wyrównania metabolicznego w trakcie całej ciąży może mieć istotny wpływ na przewidywanie masy urodzeniowej noworodka. Dodatkowo podjęto próbę oceny czy badane polimorfizmy genu leptyny i jej receptora mogą mieć udział w regulowaniu tego procesu. W badaniach asocjacyjnych spotyka się dwie metody oceny wpływu SNP na dany efekt końcowy. Pierwsza z nich mogłaby polegać na podziale grupy badanej na dwie podgrupy ze względu na arbitralnie ustaloną wartość odcięcia np. masy urodzeniowej noworodka a następnie przeanalizowanie rozkładu polimorfizmów/genotypów w tych podgrupach. Tak podjęta próba analizy mogłaby dodatkowo obniżyć liczebność grup, stąd też wykazanie wpływu poszczególnych genotypów na masę płodu byłoby utrudnione i mniej wiarygodne. W niniejszej pracy, jak wykazano w poprzednich rozdziałach, wpływ kombinacji homozygotycznych był widoczny w wyrównaniu metabolicznym w przebiegu ciąży

w grupie ciężarnych z cukrzycą. Tym też podyktowany był podział ciężarnych na podgrupę ściśle homozygotyczną oraz podgrupę, w której co najmniej jeden genotyp był heterozygotyczny. Taki podział miał na celu ograniczenie dalszego zmniejszania liczebności populacji (9 kombinacji genotypowych). Następnym krokiem było oszacowanie średnich mas płodów w tych podgrupach i po stwierdzeniu różnicy istotnej statystycznie (3600g vs. 3200g,  $p < 0,05$ , test Manna-Whitney'a), postanowiono dokonać analizy przydatności badania poszczególnych parametrów metabolicznych w predykcji masy płodu.

Oceną przydatności wymienionych parametrów przeprowadzono dwuetapowo. W etapie pierwszym skonstruowano modele regresji z wieloma zmiennymi objaśniającymi, w których wykazano potencjalny ich wpływ na masę płodu (zmienną objaśnianą) [72]. Drugim etapem było oszacowanie granicznych wartości dla tych zmiennych, które wykazały wpływ w modelu regresji. Analizy te przeprowadzono jedynie dla grupy ciężarnych z cukrzycą, gdyż w pozostałych podgrupach modele regresji nie wykazały związku badanych parametrów z masą urodzeniową noworodka.

W grupie ciężarnych z genotypami homozygotycznymi wykazano wpływ stężenia leptyny leptyny w I trymestrze ciąży na masę urodzeniową noworodka. Powszechnie znanym jest fakt niezwykle istotnego prawidłowego wyrównania metabolicznego w ciąży powikłanej cukrzycą w zapobieganiu nadmiernego wzrastania płodu [50]. W niniejszej pracy z uwagi na podobne wyrównanie w I i II trymestrze ciąży, jedynie glikemia w III trymestrze ciąży wydawało się, że mogła mieć wpływ na masę urodzeniową noworodka. Analiza przeprowadzona za pomocą krzywej ROC dla predykcji LGA wykazała jednak że, glikemia w III trymestrze ciąży charakteryzowała się niską czułością i swoistością. Natomiast wykazano, że wpływ na rozwój LGA mogło mieć stężenie leptyny w I trymestrze ciąży powyżej 28 ng/ml, hemoglobina glikowana w III trymestrze ciąży powyżej 7,9% oraz masa ciała ciężarnej w III trymestrze ciąży powyżej 98 kg. Warto podkreślić, że wszystkie punkty odcięcia opisywanych wartości w tej podgrupie charakteryzowały się wyższymi wartościami niż wartości średnie stwierdzone w odpowiadającym im okresach ciąży.

Analiza przydatności badania poszczególnych parametrów w grupie ciężarnych z co najmniej jednym wariantem heterozygotycznym w zakresie LEP i LEPR w modelu regresji, wykazała związek stężenia leptyny w I i II trymestrze ciąży oraz glikemii w II trymestrze ciąży z masą urodzeniową noworodka. W przypadku

stężenia leptyny można mówić o braku przydatności klinicznej, gdyż analiza za pomocą krzywej ROC nie wykazała istotności tego parametru ujawniając zarówno niskie wartości pola pod krzywą, jak i czułość i swoistość. W tej grupie ciężarnych wykazano wpływ na masę płodu parametrów z II i III trymestru ciąży, takich jak stężenie cholesterolu całkowitego oraz triglicerydów. I w tym przypadku istotne punkty odcięcia były wyższe niż odpowiadające im wartości średnie z poszczególnych trymestrów ciąży. Pomimo stwierdzenia powyższych faktów można domniemywać, że obecność wariantu heterozygotycznego może pełnić funkcję ochronną przed nadmiernym wzrastaniem płodu [2, 117].

Drugim sposobem oceny wpływu polimorfizmów leptyny na przebieg ciąży była próba oszacowania wpływu najczęściej występującego wariantu, jakim był genotyp podwójnie heterozygotyczny GA AG. W tym przypadku większość parametrów opisujących wyrównanie metaboliczne i masę urodzeniową noworodka były wyższe u ciężarnych z cukrzycą i nadciśnieniem tętniczym. Ciekawą obserwacją u ciężarnych z tym genotypem była istotnie wyższa ekspresja genu receptora leptyny w łożysku ciężarnych zdrowych w porównaniu do chorujących na cukrzycę i nadciśnienie.

#### 6.11. Granice badań asocjacyjnych oraz cele dalszych badań

Istotne ograniczenia w badaniach asocjacyjnych, których nie uniknięto również w niniejszej rozprawie, dotyczą problematyki wielogenowego uwarunkowania występowania pewnych chorób. Cukrzyca typu 1 oraz nadciśnienie tętnicze są dobrym przykładem takich chorób. Dostępne w piśmiennictwie niejednoznaczne wyniki badań obejmujących wpływ polimorfizmów genetycznych na wystąpienie tych powikłań, są w większości przypadków podyktowane zbyt małą liczebnością populacyjną [2, 117, 10]. Wykrycie asocjacji danego polimorfizmu bądź genotypu z wystąpieniem schorzenia uwarunkowanego wielogenowo, wymagałoby przebadania niezwykle licznej populacji oraz równie licznej zdrowej grupy kontrolnej celem jej potwierdzenia. Pewnym ryzykiem tak podjętej próby mogłoby być zakwalifikowanie do badań osobników z różnych etnicznie populacji, co z kolei mogłoby doprowadzić do zafałszowania uzyskanych wyników z powodu tzw. stratyfikacji populacji oraz wynikających z niej odmiennych interakcji pomiędzy polimorfizmami. Wreszcie nie ma pewności czy dany SNP rzeczywiście pozostaje w ścisłej asocjacji z wystąpieniem choroby, czy też jest to efekt epistatyczny tj. współdziałania danego genu z innymi, jednym lub wieloma,

oddalonymi SNP, które mogłyby maskować lub wzmacniać działanie badanego polimorfizmu [5].

Zjawiskiem mogącym stanowić istotną pomoc dla badacza w określeniu wpływu niektórych loci na wystąpienie choroby dziedzicznej wielogenowo, jest nierównowaga sprzężeń (LD - Linkage Disequilibrium). Nierównowaga sprzężeń zachodzi, kiedy allele znajdujące się w dwóch odrębnych miejscach (loci) są obecne w badanej populacji częściej lub rzadziej, niż mogłoby to wynikać z oddzielnego ich oszacowania [114].

Istotnym problemem w badaniach tego rodzaju jest niewiadoma, czy SNP w rzeczywistości pozostaje w relacji z daną jednostką chorobową czy też, z powodu LD, pozostaje w silnym związku z innymi SNP [84].

Rozwiązaniem tego problemu była inicjatywa rozpoczęta w 2002 – projekt HapMap mający na celu wytypowanie powszechnie występujących sekwencji DNA w ludzkim genomie i udostępnienie ich do publicznej wiadomości i użycia. Sekwencjonowanie DNA obejmuje próbki pochodzące z populacji afrykańskich, azjatyckich i europejskich, co ma pozwolić na odkrycie wariantów, które wpływają na wystąpienie wielu powszechnych chorób i wskazać potencjalne cele do dalszych badań. Nietrudno zauważyć, że HapMap może w znacznym stopniu obniżyć koszty badań – znalezienie sekwencji pozostających w ścisłym związku z daną chorobą pozwoli na uniknięcie typowania wszystkich znanych SNP i ich analizy [56].

Warto podkreślić, że rozważania te dotyczą SNP położonych na jednym chromosomie. W przedstawionej rozprawie, wobec badania genów położonych na odmiennych chromosomach i braku możliwości rekonstrukcji haplotypowej i oceny współczynnika LD, podjęta próba łącznego oszacowania związku LEP -2548 G/A i LEP 668 A/G z przebiegiem ciąży wydaje się być właściwym rozwiązaniem.

## VII. WNIOSKI

1. W przebiegu ciąży niezależnie od występujących powikłań obserwuje się wzrost stężenia leptyny w surowicy ciężarnej.
2. W przebiegu ciąży powikłanej cukrzycą typu 1, stężenie leptyny jest wyższe w porównaniu do ciężarnych zdrowych. Czas trwania cukrzycy oraz obecność powikłań naczyniowych wydają się mieć wpływ na wzrastające stężenie tego związku w surowicy krwi w przebiegu ciąży w tej grupie ciężarnych.
3. W przebiegu ciąży powikłanej nadciśnieniem tętniczym stężenie leptyny jest wyższe aniżeli w grupie zdrowych ciężarnych.
4. W momencie rozpoznania stanu przedrzucawkowego stężenie leptyny jest znamienne wyższe aniżeli w pozostałych grupach ciężarnych i koreluje pozytywnie z ciężkością jego przebiegu.
5. Polimorfizm genetyczny LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G wiąże się z zaburzeniami w kontroli metabolicznej w przebiegu ciąży powikłanej cukrzycą typu 1.
6. Najwyższą znamienne ekspresję genu leptyny i jej receptora stwierdzono w łożyskach ciężarnych z cukrzycą typu 1.
7. U ciężarnych z cukrzycą typu 1, współistniejącą z nadwagą i otyłością nadekspresja genu leptyny i jej receptora w łożysku koreluje z podwyższoną masę urodzeniową noworodka.
8. U ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym podwyższona ekspresja genu leptyny i jej receptora w łożysku koreluje również z masą urodzeniową noworodka i podwyższonym stężeniem leptyny w okresie okołoporodowym.
9. Parametry metaboliczne w I trymestrze ciąży u ciężarnych z cukrzycą typu 1 z wariantem homozygotycznym w zakresie LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G mogą mieć wartość predykcyjną w prognozowaniu masy urodzeniowej noworodka.

## VIII. STRESZCZENIE

### STRESZCZENIE:

Cel badania: Celem niniejszej rozprawy było zbadanie wpływu polimorfizmu genetycznego leptyny i jej receptora na przebieg ciąży powikłanej cukrzycą i nadciśnieniem tętniczym. Cel ten realizowano poprzez oznaczenie występujących polimorfizmów w badanych grupach, ocenę stężenia leptyny w surowicy krwi w przebiegu ciąży oraz ekspresję jej genów w łożysku.

**Materiał i metody:** Badaniem objęto łącznie 220 ciężarnych hospitalizowanych w Klinice Położnictwa i Chorób Kobięcych Katedry Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego im Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w latach 2005-2010 w tym 100 ciężarnych z cukrzycą, 60 ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym oraz 60 ciężarnych zdrowych. Ciężarne z grup badanych zostały dodatkowo podzielone na podgrupy ze względu na występujący genotyp, obecność innych powikłań ciąży. Oznaczenie stężenia leptyny wykonano za pomocą ELISA. Oznaczenia polimorfizmów wykonano za pomocą PCR-RFLP. Oznaczenia ekspresji badanych genów w łożysku wykonano za pomocą RT-PCR.

Wyniki: Poniżej przedstawiono średnie stężenie leptyny w poszczególnych trymestrach ciąży w badanych grupach ciężarnych. Ciężarne z cukrzycą (średnia, min-max): I trymestr 27,69 (1,2-97,7), II trymestr 31,14 (2,3-95,9), III trymestr 27,66A (3,6-70,8), Ciężarne z nadciśnieniem tętniczym przewlekłym (średnia, min-max): II trymestr ciąży 20,60 (2,8-55,4), III trymestr ciąży 26,49 (5,7-77,9), ciężarne z nadciśnieniem indukowanym ciążą (średnia, min-max): II trymestr ciąży 18,33 (3,5-87,6), III trymestr ciąży 23,83 (4,1-93,7), ciężarne ze stanem przedzręczawkowym (średnia, min-max): II trymestr 39,786 (9,62-87,55), III trymestr 34,322 (7,38-77,88). Ciężarne zdrowe (średnia, min-max): I trymestr ciąży 20,69 (2,1-93,1), III trymestr ciąży 19,57 (1,94-90,1) – test t-studenta, ANOVA, testy post-hoc,  $p < 0,05$ . Zaobserwowano istotnie wyższe stężenie leptyny w I trymestrze ciąży w grupie ciężarnych z cukrzycą w porównaniu do grupy zdrowych ciężarnych. Ponadto grupa ciężarnych z cukrzycą charakteryzowała się wyższym stężeniem leptyny w II trymestrze ciąży w porównaniu do grupy ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym. Natomiast w trzecim trymestrze ciąży (średnio 36 tydzień ciąży we wszystkich podgrupach) najwyższe wartości stwierdzono w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym i cukrzycą, które były znamienne wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej. Ciężarne ze współistniejącym stanem przedzręczawkowym charakteryzowały się istotnie wyższym stężeniem leptyny w momencie jego rozpoznania i w okresie okołoporodowym w stosunku do ciężarnych bez tego powikłania. Rozkład LEP - 2548 G/A oraz LEPR 668 A/G spełniał prawo równowagi Hardy'ego-Weinberga we wszystkich grupach z wyjątkiem grupy kontrolnej, gdzie dotyczyło to braku zgodności w zakresie LEPR 668 A/G. Ekspresja mRNA leptyny była istotnie wyższa w łożysku u ciężarnych z cukrzycą w porównaniu z ekspresją w łożyskach ciężarnych z nadciśnieniem i zdrowych (średnia  $\pm$  SEM odpowiednio 150,1054  $\pm$  9,303, 109,2857  $\pm$  17,561, 100  $\pm$  6,4666,  $p < 0,05$ ). Ekspresja receptora mRNA leptyny w podanych grupach nie różniła się istotnie (średnia  $\pm$  SEM odpowiednio 119,0107  $\pm$  4,8885, 114,1841  $\pm$  7,5814, 100  $\pm$  8,9074,  $p = 0,69$ ). Ekspresja mRNA leptyny w łożyskach w zależności od masy płodu, różniła się istotnie (AGA, SGA, LGA, kontrola, średnia  $\pm$  SEM odpowiednio - 146,6366  $\pm$  16,1199, 139,3286  $\pm$  3,241, 173,1692  $\pm$  20,044, 100  $\pm$  6,4666,  $p < 0,05$ ), ekspresja mRNA receptora leptyny w podanych grupach nie różniła się istotnie (średnia  $\pm$  SEM) - 124,3801  $\pm$  8,1859, 111,5114  $\pm$  8,5166, 121,8105  $\pm$  9,2619, 100  $\pm$  8,9074,  $p > 0,05$ ). Ekspresja mRNA leptyny w zależności od obecności powikłań naczyniowych cukrzycy (retinopatii, nefropatii) różniła się istotnie (grupy bez powikłań naczyniowych, z powikłaniami, kontrolna, (średnia  $\pm$  SEM odpowiednio) - 154,9586  $\pm$  13,2412, 141,7472  $\pm$  11,2188, 100  $\pm$  6,4666,  $p < 0,05$ ), ekspresja mRNA receptora leptyny nie różniła się istotnie w podanych grupach (średnia  $\pm$  SEM) - 116,536  $\pm$  6,2306, 123,2727  $\pm$  8,0005, 100  $\pm$  8,9074,  $p > 0,05$ . Ekspresja mRNA leptyny w zależności od współistniejącego nadciśnienia tętniczego w grupach cukrzycą z nadciśnieniem, nadciśnieniem bez cukrzycy

oraz kontrolnej różniła się istotnie (średnia  $\pm$  SEM, odpowiednio) -  $141,7472 \pm 11,2188$ ,  $109,2857 \pm 17,561$ ,  $100 \pm 6,4666$ ,  $p < 0,05$ , ekspresja mRNA receptora leptyny nie różniła się istotnie (średnia  $\pm$  SEM) -  $123,2727 \pm 8,0005$ ,  $114,1841 \pm 7,5814$ ,  $100 \pm 8,9074$ ,  $p > 0,05$ ). W grupie ciężarnych z cukrzycą i genotypem homozygotycznym wykazano możliwy wpływ leptyny w I trymestrze ciąży w regulacji masy urodzeniowej noworodka ( $R^2 - 0,8$ , AUC 0,62; czułość 0,75; specyficzność 0,5; punkt odcięcia 28,127 ng/ml), hemoglobiny glikowanej w III trymestrze ciąży (AUC 0,66; czułość 0,23; specyficzność 0,91; punkt odcięcia 7,9%) oraz masy ciała ciężarnej w III trymestrze ciąży (AUC 0,63; czułość 0,25; specyficzność 0,93; punkt odcięcia 98kg). W grupie ciężarnych z co najmniej 1 genotypem heterozygotycznym wykazano wpływ parametrów lipidowych w predykcji masy urodzeniowej noworodka: stężenia LDL w II trymestrze ciąży (AUC 0,64; czułość 0,56; specyficzność 0,67; punkt odcięcia 128mg/dl), cholesterolu całkowitego w III trymestrze ciąży (AUC 0,63; czułość 0,62; specyficzność 0,67; punkt odcięcia 302mg/dl). Najczęściej występujący w całej populacji badanej genotyp heterozygotyczny GA AG był związany z podwyższonymi parametrami wyrównania metabolicznego w grupach badanych z wyjątkiem ekspresji genu receptora leptyny w łożysku oraz masy urodzeniowej noworodka.

Wnioski: W przebiegu ciąży niezależnie od występujących powikłań obserwuje się wzrost stężenia leptyny w surowicy ciężarnej. W przebiegu ciąży powikłanej cukrzycą typu 1, stężenie leptyny jest wyższe w porównaniu do ciężarnych zdrowych. Czas trwania cukrzycy oraz obecność powikłań naczyniowych wydają się mieć wpływ na wzrastające stężenie tego związku w surowicy krwi w przebiegu ciąży w tej grupie ciężarnych. W przebiegu ciąży powikłanej nadciśnieniem tętniczym stężenie leptyny jest wyższe aniżeli w grupie zdrowych ciężarnych. W momencie rozpoznania stanu przedrzucawkowego stężenie leptyny jest znamienne wyższe aniżeli w pozostałych grupach ciężarnych i koreluje pozytywnie z ciężkością jego przebiegu. Polimorfizm genetyczny LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G wiąże się z zaburzeniami w kontroli metabolicznej w przebiegu ciąży powikłanej cukrzycą typu 1. Najwyższą znamienne ekspresję genu leptyny i jej receptora stwierdzono w łożyskach ciężarnych z cukrzycą typu 1. U ciężarnych z cukrzycą typu 1, współistniejącą z nadwagą i otyłością nadekspresja genu leptyny i jej receptora w łożysku koreluje z podwyższoną masą urodzeniową noworodka. U ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym podwyższona ekspresja genu leptyny i jej receptora w łożysku koreluje również z masą urodzeniową noworodka i podwyższonym stężeniem leptyny w okresie okołoporodowym. Parametry metaboliczne w I trymestrze ciąży u ciężarnych z cukrzycą typu 1 z wariantem homozygotycznym w zakresie LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G mogą mieć wartość predykcyjną w prognozowaniu masy urodzeniowej noworodka.



## SUMMARY:

**Aim of the study:** the aim of the study was to evaluate the influence of leptin, its gene and gene receptor polymorphisms on the course of pregnancy complicated by type 1 diabetes and hypertension. Moreover, the leptin gene and leptin gene receptor expression was assessed in placentas of the studied subjects.

**Material and methods:** 220 pregnant women, hospitalized in the Department of Obstetrics and Maternal Diseases of Karol Marcinkowski University of Medical Sciences in 2005-2010 were qualified to the survey. The study group consisted of 100 subjects with type 1 diabetes, 60 subjects with hypertension and 60 healthy subjects. The study groups were subdivided according to concomitant gestational disorders and coexisting genotype. Leptin was assessed by ELISA, leptin gene and receptor polymorphisms were determined by RFLP. Placental gene expression was assessed by RT-PCR.

**Results:** Below are given the mean values of leptin concentration in the studied groups. Type 1 diabetic subjects (mean, min-max): I trimester 27,69 (1,2-97,7), II trimester 31,14 (2,3-95,9), III trimester 27,66A (3,6-70,8). Chronic hypertensive subjects (mean, min-max): II trimester 20,60 (2,8-55,4), III trimester 26,49 (5,7-77,9). Pregnancy-induced hypertension (mean, min-max): II trimester 18,33 (3,5-87,6), III trimester 23,83 (4,1-93,7). Preeclamptic subjects (mean, min-max): onset, II trimester 39,786 (9,62-87,55), III trimester 34,322 (7,38-77,88). Healthy subjects (mean, min-max): I trimester 20,69 (2,1-93,1), III trimester 19,57 (1,94-90,1) – t-student test, ANOVA, testy post-hoc,  $p < 0,05$ . The type 1 diabetic group was characterized by greater first trimester leptin level in comparison to healthy subjects. Also the type 1 diabetic group was characterized by greater second trimester leptin level in comparison to hypertensive subjects. In the third trimester (mean 36 week) the greatest leptin concentration was observed in groups with hypertension and diabetes, which were significantly higher than in healthy subjects. Preeclamptic subjects were characterized by greater leptin levels either during onset of preeclampsia and closely to delivery than subjects without this complication. Both LEP -2548 G/A and LEPR 668 A/G were under Hardy-Weinberg equilibrium in studied groups except from LEPR 668 A/G in control group. mRNA expression were greater in diabetic placentas in comparison to hypertensive and controls (mean  $\pm$  SEM respectively 150,1054  $\pm$  9,303, 109,2857  $\pm$  17,561, 100  $\pm$  6,4666,  $p < 0,05$ ). Differences of mRNA of leptin receptor expression in studied groups were not significant (mean  $\pm$  SEM respectively, 119,0107  $\pm$  4,8885, 114,1841  $\pm$  7,5814, 100  $\pm$  8,9074,  $p = 0,69$ ). The expression of leptin mRNA in diabetic group was dependent on fetal weight and revealed significant differences (mean  $\pm$  SEM, AGA, SGA, LGA, controls, respectively - 146,6366  $\pm$  16,1199, 139,3286  $\pm$  3,241, 173,1692  $\pm$  20,044, 100  $\pm$  6,4666,  $p < 0,05$ ), mRNA leptin receptor expression was significantly different, respectively, mean  $\pm$  SEM - 124,3801  $\pm$  8,1859, 111,5114  $\pm$  8,5166, 121,8105  $\pm$  9,2619, 100  $\pm$  8,9074,  $p > 0,05$ . Leptin mRNA expression dependent on presence of diabetic vascular (retinopathy, nephropathy) complications – (no vascular complications, with complications, controls, mean  $\pm$  SEM, respectively - 154,9586  $\pm$  13,2412, 141,7472  $\pm$  11,2188, 100  $\pm$  6,4666,  $p < 0,05$ ). No significant differences were found in the leptin receptor mRNA expression in mentioned groups, mean  $\pm$  SEM, respectively, 116,536  $\pm$  6,2306, 123,2727  $\pm$  8,0005, 100  $\pm$  8,9074,  $p > 0,05$ . Leptin mRNA expression dependent on concomitant hypertension in diabetic group, hypertensive group without diabetes, controls was significant, mean  $\pm$  SEM, respectively, 141,7472  $\pm$  11,2188, 109,2857  $\pm$  17,561, 100  $\pm$  6,4666,  $p < 0,05$ . Leptin receptor mRNA expression in the studied groups were not significant, mean  $\pm$  SEM, respectively - 123,2727  $\pm$  8,0005, 114,1841  $\pm$  7,5814, 100  $\pm$  8,9074,  $p > 0,05$ ). In diabetic LEP -2548 G/A and LEPR 668 A/G homozygotic group the possible influence of first trimester leptin ( $R^2$  – 0,8, AUC 0,62; sensitivity 0,75; specificity 0,5; cut-off 28,127 ng/ml), third trimester glycated hemoglobin (AUC 0,66; sensitivity 0,23; specificity 0,91; cut-off 7,9%), maternal weight in third trimester (AUC 0,63; sensitivity 0,25; specificity 0,93; cut-off 98kg) on fetal weight was found. In diabetic group with at least one heterozygotic variant either in LEP -2548 G/A or LEPR 668 A/G the following lipid parameters were found in prediction of fetal weight: second trimester LDL concentration (AUC 0,64; sensitivity 0,56; specificity 0,67; cut-off

128mg/dl), third trimester total cholesterol (AUC 0,63; sensitivity 0,62; specificity 0,67; cut-off 302mg/dl). The most frequent genotype in all studied groups was related to increased concentration of metabolic parameters in studied groups except from leptin gene receptor expression in placenta and newborn weight.

Conclusions: Independently from gestation complication leptin concentration increases during pregnancy. In pregnancies complicated by type 1 diabetes and hypertension, the leptin level is augmented in comparison to uncomplicated pregnancies. The duration of diabetes and the presence of vascular complication may have an influence on increasing leptin level. The leptin level is higher during onset of preeclampsia and is positively correlated with the severity and course of this complication. The LEP -2548 G/A and LEPR 668 A/G polymorphisms is related to metabolic control in the diabetic group. The type 1 diabetic group is characterized by the greatest level of leptin gene and its receptor expression in placenta. In type 1 obese diabetic subjects, leptin and its receptor over-expression in placenta is related to increased weight of the newborn. In preeclamptic subjects the elevated placental leptin and leptin gene expression is correlated with maternal serum leptin in third trimester and newborn weight. The first trimester metabolic parameters in diabetic group with homozygotic variants of LEP -2548 G/A and LEPR 668 A/G may have predictive value of the newborn weight.

## **IX. PIŚMIENICTWO**

1. 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens.* 2007, 25, 1105-87.
2. Adkins RM, Klauser CK, Magann EF i wsp. Site -2548 of the leptin gene is associated with gender-specific trends in newborn size and cord leptin levels. *Int J Pediatr Obes.* 2007, 2, 130-7.
3. Agarwal DP. Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. *Pathol Biol (Paris).* 2001, 49, 703-9.
4. Akther A, Khan KH, Begum M i wsp. Leptin: a mysterious hormone; its physiology and pathophysiology. *Mymensingh Med J.* 2009, 18, 140-144.
5. Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2002, 3, 299-309.
6. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS i wsp. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology.* 1996, 137, 3144 –7.
7. Baskin DG, Schwartz MW, Seeley RJ i wsp. Leptin receptor long-form splice-variant protein expression in neuron cell bodies of the brain and co-localization with neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus. *J Histochem Cytochem.* 1999, 47, 353-62.
8. Baumann H, Morella KK, White DW i wsp. The fulllength leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996, 93, 8374–8.
9. Bienertova-Vasku J, Bienert P, Tomandl J i wsp. No association of defined variability in leptin, leptin receptor, adiponectin, proopiomelanocortin and ghrelin gene with food preferences in the Czech population. *Nutr Neurosci.* 2008, 11, 2-8.
10. Bienertová-Vasku J, Dostalova Z, Kankova K i wsp. Is there any link between severe pre-eclampsia and defined polymorphisms in leptin and adiponectin genes? *J Obstet Gynaecol Res.* 2008, 34, 858-64.
11. Biesenbach G, Stöger H, Zazgornik J. Influence of pregnancy on progression of diabetic nephropathy and subsequent requirement of renal replacement therapy in female type I diabetic patients with impaired renal function. *Nephrol Dial Transplant.* 1992, 7, 105-9.
12. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M i wsp. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J.* 1999, 13, 1231–1238.
13. Bręborowicz GH i wsp. Cięża wysokiego ryzyka. 2006, 899.
14. Buchbinder A, Lang U, Baker RS i wsp. Leptin in the ovine fetus correlated with fetal and placental size. *Am J Obstet Gynecol.* 2001, 185, 786–791.
15. Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: Normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr.* 2000, 71, 1256-63.
16. Castellucci M, de Matteis R, Meisser A i wsp. Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: Possible implications for trophoblast invasion. *Mol Hum Reprod.* 2000, 6, 951–958.

17. Catalano P, Nizielski S, Shao J i wsp. Down regulation of IRS-1 and PPAR $\gamma$  in obese women with gestational diabetes: Relationship to free fatty acids during pregnancy. *Am J Physiol*. 2002, 282, 522–533.
18. Challier J, Galtier M, Bintein T i wsp. Placental leptin receptor isoforms in normal and pathological pregnancies. *Placenta*. 2003, 24, 92-99.
19. Chaouat G, Ledee-bataille N, Zourbas S i wsp. Implantation: can immunological parameters of implantation failure be of interest for pre-eclampsia? *J Reprod Immunol*. 2003, 59, 205-17.
20. Chehab FF, Lim ME, Ronghua L. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet*. 1996, 12, 318-20.
21. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA i wsp. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: Identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*; 1996, 84, 491–495.
22. Clayton PE, Gill MS, Hall CM i wsp. Serum leptin through childhood and adolescence. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1997, 46, 727–33.
23. Cle´ment K, Vaisse C, Lahlou N i wsp. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*. 1998, 392, 398–401.
24. Collins S, Kuhn C, Petro A, Swick A i wsp. Role of leptin in fat regulation. *Nature*. 1996, 380, 677-85.
25. Combs CA, Gunderson E, Kitzmiller JL i wsp. Relationship of fetal macrosomia to maternal postprandial glucose control during pregnancy. *Diabetes Care*. 1992, 15, 1251-7.
26. Considine R, Sinha M, Heiman M. Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996, 334, 292–295.
27. Couce ME, Burquera B, Paresi JE i wsp. Localization of leptin receptor in the human brain. *Neuroendocrinology*. 1997, 66, 145–50.
28. Crabbe P, Goemaere S, Zmierzak H i wsp. Are serum leptin and the Gln223Arg polymorphism of the leptin receptor determinants of bone homeostasis in elderly men? *Eur J Endocrinol*. 2006, 154, 707-14.
29. Crow JF. Hardy, Weinberg and Language Impediments. *Genetics*. 1999, 152, 821-825.
30. Desoye G, Shafrir E. Placental metabolism and its regulation in health and diabetes. *Mol Aspects. Med*. 1994, 15, 505–682.
31. Diabetes care and research in Europe: the Saint Vincent declaration. *Diabet Med*. 1990, 7, 360.
32. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Effect of pregnancy on microvascular complications in the diabetes control and complications trial. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *Diabetes Care*. 2000, 23, 1084-91.

33. Domali E, Messinis IE. Leptin in pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2002, 12, 222-30.
34. Drews K, Seremak-Mrozikiewicz A, Barlik M i wsp. The (-2548G/A) polymorphism of leptin gene in women with gestational hypertension and preeclampsia. *Ginekol Pol.* 2008, 79, 358-63.
35. Ducsay CA, Hyatt K, Mlynarczyk M i wsp. Long-term hypoxia increases leptin receptors and plasma leptin concentrations in the late-gestation ovine fetus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006, 291, 1406–1413.
36. Ebenbichler CF, Kaser S, Laimer M i wsp. Polar Expression and Phosphorylation of Human Leptin Receptor Isoforms in Paired, Syncytial, Microvillous and Basal Membranes from Human Term Placenta. *Placenta.* 2002, 23, 516–521.
37. Fairbrother UL, Tankó LB, Walley AJ i wsp. Leptin receptor genotype at Gln223Arg is associated with body composition, BMD, and vertebral fracture in postmenopausal Danish women. *J Bone Miner Res.* 2007, 22, 544-50.
38. Fei H, Okano HJ, Li C i wsp. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci.* 1997, 94, 7001–5.
39. Feudtner C, Gabbe SG. Diabetes and pregnancy: four motifs of modern medical history. *Clin Obstet Gynecol.* 2000, 43, 4-16.
40. Freinkel N. Banting Lecture 1980. Of pregnancy and progeny. *Diabetes.* 1980, 29, 1023-35.
41. Fuhrmann K, Reiher H, Semmler K i wsp. The effect of intensified conventional insulin therapy before and during pregnancy on the malformation rate in offspring of diabetic mothers. *Exp Clin Endocrinol.* 1984, 83, 173-7.
42. Ghilardi N, Ziegler S, Wiestner A i wsp. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *PNAS.* 1996, 93, 6231–6235.
43. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. The DECODE study group. European Diabetes Epidemiology Group. *Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe. Lancet.* 1999, 354, 617-21.
44. Goldman-Wohl D, Yagel S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. *Mol Cell Endocrinol.* 2002, 22, 187, 233-8.
45. Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D i wsp. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol.* 1997, 47, 101-106.
46. Harigaya A, Nagashima K, Nako Y i wsp. Relationship between concentration of serum leptin and fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997, 82, 3281-4
47. Hauguel-de Mouzon S, Lepercq J, Catalano P. Leptin in the Diabetic Pregnancy. *Front Diabetes.* 2005, 17, 46–57.
48. Henson MC, Swan KF, O'neil JS. Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Nature Med.* 1998, 3, 1029-1033.

49. Highman T, Friedman J, Huston L i wsp. Longitudinal changes in maternal leptin serum concentrations, body composition and resting metabolic rate in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1998, 178, 1010–1015.
50. Hillesmaa V, Suhonen L, Teramo K. Glycaemic control is associated with pre-eclampsia but not with pregnancy-induced hypertension in women with type I diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2000, 43, 1534-9.
51. <http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=154#>
52. Hubel CA, Roberts JM, Taylor RN i wsp. Lipid peroxidation in pregnancy: new perspectives on preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1989, 161, 1025-34.
53. Hwa J, Fawzi A, Graziano M i wsp. Leptin increases energy expenditure and selectively promotes fat metabolism in ob/ob mice. *Am J Physiol Reg Integrat Comp Physiol.* 1997, 272, 1204–9.
54. Hytinantti T, Koistinen HA, Koivisto VA i wsp. Increased leptin concentration in preterm infants of pre-eclamptic mothers. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2000, 83, 13-6.
55. Iciek R, Wender-Ożegowska E, Seremak-Mrozikiewicz A i wsp. Leptin gene, leptin gene polymorphisms and body weight in pregnant women with diabetes mellitus type I. *J Physiol Pharmacol.* 2008, 59, 19-31.
56. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature.* 2003, 426, 789-96.
57. Jansson N, Greenwood S, Johansson B i wsp. Leptin stimulates the activity of the system A amino acid transporter in human placental villous fragments. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003, 88, 1205–1211.
58. Jensen DM, Damm P, Moelsted-Pedersen L i wsp. Outcomes in type 1 diabetic pregnancies: a nationwide, population-based study. *Diabetes Care.* 2004, 27, 2819-23.
59. Jéquier E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci.* 2002, 967, 379-88.
60. Johnstone FD, Mao JH, Steel JM i wsp. Factors affecting fetal weight distribution in women with type I diabetes. *BJOG.* 2000, 107, 1001-6.
61. Kaaja R, Loukovaara S. Progression of retinopathy in type 1 diabetic women during pregnancy. *Curr Diabetes Rev.* 2007, 3, 85-93.
62. Kara N, Aydin F, Senturk N i wsp. Lack of association between the G-2548A polymorphism of the leptin gene and psoriasis in a Turkish population. *Int J Dermatol.* 2007, 46, 1271-4.
63. Kim SM, Kim SH, Lee JR i wsp. Association of leptin receptor polymorphisms Lys109Arg and Gln223Arg with serum leptin profile and bone mineral density in Korean women. *Am J Obstet Gynecol.* 2008, 198, 1-8.
64. Kioko EM, Shaw KM, Clarke AD i wsp. Successful pregnancy in a diabetic patient treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Diabetes Care.* 1983, 6, 298-300.

65. Kirchgessner T, Uysal K, Wiesbrock S i wsp. Tumor necrosis factor-alpha contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. *J Clin Invest.* 1997, 100, 2777–2782.
66. Kitajima M, Oka S, Yasuhi I i wsp. Maternal serum triglyceride at 24-32 weeks' gestation and newborn weight in nondiabetic women with positive diabetic screens. *Obstet Gynecol.* 2001, 97, 776-80.
67. Kitzmiller JL, Cloherty JP, Younger MD i wsp. Diabetic pregnancy and perinatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol.* 1978, 131, 560-80.
68. Kitzmiller JL, Gavin LA, Gin GD i wsp. Preconception care of diabetes. Glycemic control prevents congenital anomalies. *JAMA.* 1991, 265, 731-6.
69. Koçyigit Y, Atamer Y, Atamer A i wsp. Changes in serum levels of leptin, cytokines and lipoprotein in pre-eclamptic and normotensive pregnant women. *Gynecol Endocrinol.* 2004, 19, 267-73.
70. Koistinen HA, Koivisto VA, Andersson S i wsp. Leptin concentration in cord blood correlates with intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997, 82, 3328-30.
71. Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV i wsp. Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: studies in vivo and in vitro. *Diabetes.* 1996, 45, 699–701.
72. Koronacki J, Ćwik J. *Statystyczne systemy uczące się.* Warszawa: Wydawnictwa Naukowo-Techniczne. 2005.
73. Kulinskaya E, Lewin A. Testing for linkage and Hardy-Weinberg disequilibrium. *Ann Hum Genet.* 2009, 73, 253-62.
74. Laivuori H, Gallaher MJ, Collura L i wsp. Relationships between maternal plasma leptin, placental leptin mRNA and protein in normal pregnancy, pre-eclampsia and intrauterine growth restriction without pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 2006, 12, 551-6.
75. Laml T, Preyer O, Hartmann BW i wsp. Decreased maternal serum leptin in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Soc Gynecol Invest.* 2001, 8, 89–93.
76. Langer O, Mazze R. The relationship between large-for-gestational-age infants and glycemic control in women with gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol.* 1988, 159, 1478-83.
77. Lea RG. Placental leptin in normal, diabetic and growth retarded pregnancies. *Mol Human Reprod.* 2000, 6, 763-769,
78. Lee GH, Proenca R, Montez JM i wsp. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature.* 1996, 379, 632-5.
79. Leeman L, Fontaine P. Hypertensive disorders of pregnancy. *Am Fam Physician.* 2008, 78, 93-100.
80. Lepercq J, Cauzac M, Lahlou N i wsp. Overexpression of placental leptin in diabetic pregnancy: a critical role of insulin. *Diabetes.* 1998, 47, 847–850.
81. Lepercq J, Lahlou N, Timsit J i wsp. Macrosomia revisited: ponderal index and leptin delineate subtypes of fetal overgrowth. *Am J Obstet Gynecol.* 1999, 181, 621-5.

82. Lepercq J, Taupin P, Dubois-Laforgue D i wsp. Heterogeneity of fetal growth in type 1 diabetic pregnancy. *Diabetes Metab.* 2001, 27, 339-44.
83. Lewandowski K, Horn R, O'Callaghan CJ i wsp. Free leptin, bound leptin, and soluble leptin receptor in normal and diabetic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999, 84, 300–6.
84. Lewontin Re. On measures of gametic disequilibrium. *Genetics*, 1988, 120, 849-52.
85. Li RH, Yu MM, Cheung AN i wsp. Expression of leptin and leptin receptors in gestational trophoblastic diseases. *Gynecol Oncol.* 2004, 95, 299-306.
86. Lima-Couy I, Cervero A, Bonilla-Musoles F i wsp. Endometrial leptin and leptin receptor expression in women with severe/moderate endometriosis. *Mol Hum Reprod.* 2004, 10, 777-82.
87. Loukovaara S, Immonen I, Koistinen R i wsp. Angiopoietic factors and retinopathy in pregnancies complicated with Type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2004, 21, 697-704.
88. Loukovaara S, Immonen I, Koistinen R i wsp. Inflammatory markers and retinopathy in pregnancies complicated with type I diabetes. *Eye.* 2005, 19, 422-30.
89. Loukovaara S, Immonen IJ, Yandle TG i wsp. Vasoactive mediators and retinopathy during type 1 diabetic pregnancy. *Acta Ophthalmol Scand.* 2005, 83, 57-62.
90. Lyall F, Bulmer JN, Duffie E i wsp. Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of PECAM-1 in normal pregnancy, preeclampsia, and fetal growth restriction. *Am J Pathol.* 2001, 158, 1713-21.
91. Lyall F, Bulmer JN, Kelly H i wsp. Human trophoblast invasion and spiral artery transformation: the role of nitric oxide. *Am J Pathol.* 1999, 154, 1105-14.
92. Mammès O, Betoulle D, Aubert R i wsp. Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight. *Ann Hum Genet.* 2000, 64, 391-4.
93. Manderson J, Patterson C, Hadden D i wsp. Leptin concentrations in maternal serum and cord blood in diabetic and nondiabetic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2003, 188, 1326–1332.
94. Martinez-Abundis E, Gonzalez-Ortiz M i wsp. Serum leptin levels and the severity of preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 2000, 264, 71– 3.
95. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature Med.* 1997, 3, 1029–1033.
96. McCance DR, Harley JM, Maguire CF i wsp. Accelerated retinopathy and nephropathy in diabetic pregnancy. *Ir J Med Sci.* 1991, 160, 137-9.
97. McCarthy JF, Misra DN i wsp. Maternal plasma leptin is increased in preeclampsia and positively correlates with fetal cord concentration. *Am J Obstet Gynecol.* 1999, 180, 731-6.
98. McElvy SS, Miodovnik M, Rosenn B i wsp. A focused preconceptional and early pregnancy program in women with type 1 diabetes reduces perinatal mortality and malformation rates to general population levels. *J Matern Fetal Med.* 2000, 9, 14-20.



99. Mestman H, Jorge H. Historical Notes on Diabetes and Pregnancy. *The Endocrinologist*. 2002, 12, 224-242.
100. Mise H, Sagawa N, Matsumoto T i wsp. Augmented placental production of leptin in preeclampsia: possible involvement of placental hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998, 83, 3225-9.
101. Moffett S, Martinson J, Shiver MD i wsp. Genetic diversity and evolution of the human leptin locus tetranucleotide repeat. *Hum Genet*. 2002, 110, 412-417.
102. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP i wsp. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 1997, 387, 903-8.
103. Mugo M, Govindarajan G, Kurukulasuriya LR i wsp. Hypertension in pregnancy. *Curr Hypertens Rep*. 2005, 7, 348-54.
104. Mukherjea R, Castonguay TW, Douglass LW i wsp. Elevated leptin concentrations in pregnancy and lactation: possible role as a modulator of substrate utilization. *Life Sci*. 1999, 65, 1183-93.
105. Muy-Rivera M, Ning Y, Frederick IO i wsp. Leptin, Soluble Leptin Receptor and Leptin Gene Polymorphism in Relation to Preeclampsia Risk. *Physiol. Res*. 2005, 54, 167-174.
106. Nezar MA, el-Baky AM, Soliman OA i wsp. Endothelin-1 and leptin as markers of intrauterine growth restriction. *Indian J Pediatr*. 2009, 76, 485-8.
107. O'Connor DM, Blache D, Hoggard N i wsp. Developmental control of plasma leptin and adipose leptin mRNA in the ovine fetus during late gestation: role of glucocorticoids and thyroid hormones. *Endocrinology*. 2007, 148, 3750-3757.
108. Papadopoulos DP, Makris TK, Poulakou M i wsp. Human soluble leptin receptor concentration in healthy offspring of hypertensive parents. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2006, 8, 797-802.
109. Peck RW, Price DE, Lang GD i wsp. Birthweight of babies born to mothers with type 1 diabetes: is it related to blood glucose control in the first trimester? *Diabet Med*. 1991, 8, 258-62.
110. Pedersen J. Weight and length at birth of infants of diabetic mothers. *Acta Endocrinol* 1954, 16, 330-342.
111. Pietryga M, Brązert J. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczące diagnostyki ultrasonograficznej w położnictwie i ginekologii. *Podstawy praktycznej ultrasonografii w ginekologii i położnictwie*. 2009, 23, 765-767.
112. Popko K, Gorska E, Wasik M i wsp. Frequency of distribution of leptin receptor gene polymorphism in obstructive sleep apnea patients. *J Physiol Pharmacol*. 2007, 58, 551-61.
113. Poston L. Leptin and preeclampsia. *Semin Reprod Med*. 2002, 20, 131-138.
114. Pritchard JK, Przeworski M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am J Hum Genet*. 2001, 69, 1-14.

115. Purdy LP, Hantsch CE, Molitch ME i wsp. Effect of pregnancy on renal function in patients with moderate-to-severe diabetic renal insufficiency. *Diabetes Care*. 1996, 19, 1067-74.
116. Ragin CC, Dallal C, Okobia M i wsp. Leptin levels and leptin receptor polymorphism frequency in healthy populations. *Infect Agent Cancer*. 2009, 10, 1-13.
117. Rand L, Winchester EC, Millwood IY i wsp. Maternal leptin receptor gene variant Gln223Arg is not associated with variation in birth weight or maternal body mass index in UK and South Asian populations. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2001, 25, 753-5.
118. Riad-Gabriel MG, Jinagouda SD, Sharma A i wsp. Changes in plasma leptin during the menstrual cycle. *Eur J Endocrinol*. 1998, 139, 528– 31.
119. Rigo J, Szendei G. Leptin receptor gene polymorphisms in severely pre-eclamptic women. *Gynecol Endocrinol*. 2006, 22, 521-5.
120. Robillard PY, Dekker GA, Hulseay TC. Revisiting the epidemiological standard of preeclampsia: primigravidity or primipaternity? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999, 84, 37-41.
121. Rohlfes RV, Weir BS. Distributions of Hardy-Weinberg equilibrium test statistics. *Genetics*. 2008, 180, 1609-16.
122. Rosenbaum M, Nicolson M, Hirsch J i wsp. Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996, 81, 3424– 7.
123. Rosmond R, Chagnon YC, Holm G i wsp. Hypertension in obesity and the leptin receptor gene locus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000, 85, 3126-31.
124. Rossing K, Jacobsen P, Hommel E i wsp. Pregnancy and progression of diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2002, 45, 36-41.
125. Saito S, Sakai M. Th1/Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol*. 2003, 59, 161-73.
126. Seremak-Mrozikiewicz A. Rozprawa habilitacyjna. 2007.
127. Sheth BP. Does pregnancy accelerate the rate of progression of diabetic retinopathy?: an update. *Curr Diab Rep*. 2008, 8, 270-3.
128. Shimabukuro M, Koyama K, Chen G i wsp. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997, 94, 4637–4641.
129. Sibai BM, Caritis S, Hauth J. What we have learned about preeclampsia. *Semin Perinatol*. 2003, 27, 239-46.
130. Sibai BM. Risk factors, pregnancy complications, and prevention of hypertensive disorders in women with pregravid diabetes mellitus. *J Matern Fetal Med*. 2000, 9, 62-5.
131. Sierra-Honigmann M, Nath A, Murakami C i wsp. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*. 1998, 11, 1683–1686.
132. Sinha MK, Caro JF. Clinical aspects of leptin. *Vitam Horm*. 1998, 54, 1-30.

133. Sinha MK. Human leptin: The hormone of adipose tissue. *Eur J Endocrinol.* 1997, 136, 461– 4.
134. Skoczylas-Pietrzyk M, Stryjecka-Zimmer M i wsp. Lipid and protein peroxidation process and catalase activity in pre-eclamptic placenta. *Ginekol Pol.* 1998, 69, 902-8.
135. Small M, Cameron A, Lunan CB i wsp. Macrosomia in pregnancy complicated by insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 1987, 10, 594-9.
136. Snoussi K, Strosberg AD, Bouaouina N i wsp. Leptin and leptin receptor polymorphisms are associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. *BMC Cancer.* 2006, 20, 38-47.
137. Souren NY, Paulussen AD, Steyls A i wsp. Common SNPs in LEP and LEPR associated with birth weight and type 2 diabetes-related metabolic risk factors in twins. *Int J Obes (Lond).* 2008, 32, 1233-9.
138. Star J, Carpenter MW. The effect of pregnancy on the natural history of diabetic retinopathy and nephropathy. *Clin Perinatol.* 1998, 25, 887-916.
139. Stenninger E, Schollin J, Aman J. Early postnatal hypoglycaemia in newborn infants of diabetic mothers. *Acta Paediatr.* 1997, 86, 1374-6.
140. Stock SM, Bremme KA. Elevation of plasma leptin levels during pregnancy in normal and diabetic women. *Metabolism.* 1998, 47, 840– 3.
141. Sugden MC, Langdown ML, Munns MJ i wsp. Maternal glucocorticoid treatment modulates placental leptin and leptin receptor expression and materno-fetal leptin physiology during late pregnancy, and elicits hypertension associated with hyperleptinaemia in the early-growth-retarded adult offspring. *Eur J Endocrinol.* 2001, 145, 529-39.
142. Takahashi M, Funahashi T, Shimomura I i wsp. Plasma leptin levels and body fat distribution. *Horm Metab Res.* 1996, 28, 751-2.
143. Tamas P, Sulyok E, Szabo I i wsp. Changes of maternal serum leptin levels during pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* 1998, 46, 169–71.
144. Tamura T, Goldenberg RL, Johnston KE i wsp. Serum leptin concentrations during pregnancy and their relationship to fetal growth. *Obstet Gynecol.* 1998, 91, 389– 95.
145. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X i wsp. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell.* 1995, 83, 1263–71.
146. Temple RC, Aldridge VA, Sampson MJ i wsp. Impact of pregnancy on the progression of diabetic retinopathy in Type 1 diabetes. *Diabet Med.* 2001, 18, 573-7.
147. Thomas L, Wallace JM, Aitken RP i wsp. Circulating leptin during ovine pregnancy in relation to maternal nutrition, body composition and pregnancy outcome. *J Endocrinol.* 2001, 169, 465–476.
148. Thompson DB, Ravussin E, Bennett PH i wsp. Structure and sequence variation at the human leptin receptor gene in lean and obese Pima Indians. *Hum Mol Genet.* 1997, 6, 675–9.

149. Trindade TC, Sapienza AD, Francisco RP i wsp. Successful pregnancy in a patient with diabetic nephropathy treated with an insulin pump and dialysis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009, 11, 1-2.
150. Tsiotra PC, Pappa V, Raptis SA i wsp. Expression of the long and short leptin receptor isoforms in peripheral blood mononuclear cells: implications for leptin's actions. *Metabolism.* 2000, 49, 1537-41.
151. Utsunomiya K, Shinkai T, Sakata S i wsp. Lack of association between the leptin receptor gene (LEPR) Gln223Arg polymorphism and late-onset Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2010, 24, 101-3.
152. Uzelac PS, Li X, Lin J i wsp. Dysregulation of leptin and testosterone production and their receptor expression in the human placenta with gestational diabetes mellitus. *Placenta.* 2010, 24, 1223-9
153. van den Brûle F, Berndt S, Simon N i wsp. Trophoblast invasion and placentation: molecular mechanisms and regulation. *Chem Immunol Allergy.* 2005, 88, 163-80.
154. van der Vleuten GM, Kluijtmans LA, Hijmans A i wsp. The Gln223Arg polymorphism in the leptin receptor is associated with familial combined hyperlipidemia. *Int J Obes (Lond).* 2006, 30, 892-8.
155. Várkonyi T, Lázár L, Molvarec A. Leptin receptor (LEPR) SNP polymorphisms in HELLP syndrome patients determined by quantitative real-time PCR and melting curve analysis. *BMC Med Genet.* 2010, 11, 11-25.
156. Vela-Huerta MM, San Vicente-Santoscoy EU i wsp. Leptin, insulin, and glucose serum levels in large-for-gestational-age infants of diabetic and non-diabetic mothers. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2008, 21, 17-22.
157. Wang TN, Huang MC, Chang WT i wsp. G-2548A polymorphism of the leptin gene is correlated with extreme obesity in Taiwanese aborigines. *Obesity (Silver Spring).* 2006, 14, 183-7.
158. Weigle DS. Leptin and other secretory products of adipocytes modulate multiple physiological functions. *Ann Endocrinol (Paris).* 1997, 58, 132– 6.
159. Wender-Ożegowska E. Czynniki wpływające na rozwój płodu w ciąży powikłanej cukrzycą. Rozprawa habilitacyjna. *Kliniczna Ginekologia i Perinatologia.* 2001.
160. Williams MA, Havel PJ, Schwartz MW i wsp. Preeclampsia disrupts the normal relationship between serum leptin concentrations and adiposity in pregnant women. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 1999, 13, 190–204.
161. Yong-Ming L, Lacorte JM, Viguerie N i wsp. Adiponectin Gene Expression in Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Women in Response to Short-Term Very Low Calorie Diet and Refeeding. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 1988, 12, 5881-5886.
162. Zacharova J, Chiasson JL and Laakso M for the STOP-NIDDM Study Group. Leptin Receptor Gene Variation Predicts Weight Change in Subjects with Impaired Glucose Tolerance. *Obes Res.* 2005, 13, 501-6.
163. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzycę 2009. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego. *Diabetologia doświadczalna i kliniczna.* 2009, 9, 1-42.

164. Zhang Y, Proenca R, Maffei M i wsp. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994, 372, 425–32.

X.	SPIS TABEL
Tabela I.	Kryteria optymalnego wyrównania metabolicznego u ciężarnej.
Tabela II.	Klasyfikacja nadciśnienia tętniczego w ciąży (ESH/ESC 2007).
Tabela III.	Uproszczony schemat klasyfikacji nadciśnienia tętniczego w ciąży, w zależności od czasu jego wystąpienia oraz obecności białkomoczu.
Tabela IV.	Protokół badań wykonywanych u ciężarnych z cukrzycą.
Tabela V.	Charakterystyka kliniczna ciężarnych z cukrzycą (N=100).
Tabela VI.	Początek opieki nad ciężarnymi w zależności od klasy cukrzycy wg White.
Tabela VII.	Protokół badań wykonywanych u ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym.
Tabela VIII.	Charakterystyka ogólna ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym.
Tabela IX.	Charakterystyka kliniczna ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym.
Tabela X.	Protokół badań wykonywanych u pacjentek z grupy kontrolnej.
Tabela XI.	Charakterystyka kliniczna ciężarnych z grupy kontrolnej (N=60).
Tabela XII.	Skład mieszaniny reakcji PCR.
Tabela XIII.	Warunki przeprowadzonej reakcji PCR.
Tabela XIV.	Sekwencje starterów zastosowanych podczas reakcji PCR.
Tabela XV.	Skład mieszaniny reakcyjnej po trawieniu RFLP.
Tabela XVI.	Charakterystyka enzymów użytych w reakcji oraz produktu ich działania.
Tabela XVII.	Warunki przeprowadzania reakcji RT-PCR.
Tabela XVIII.	Sekwencje starterów zastosowanych podczas reakcji RT-PCR.
Tabela XIX.	Wyrównanie metaboliczne w grupie badanej – ciężarne z cukrzycą w I trymestrze ciąży.
Tabela XX.	Wyrównanie metaboliczne w grupie badanej – ciężarne z cukrzycą w II trymestrze ciąży.
Tabela XXI.	Wyrównanie metaboliczne w grupie badanej – ciężarne z cukrzycą w III trymestrze ciąży.
Tabela XXII.	Wyrównanie metaboliczne w grupie ciężarnych z cukrzycą w poszczególnych trymestrach ciąży.
Tabela XXIII.	Parametry metaboliczne w grupie ciężarnych z nadciśnieniem tętniczym w okresie okołoporodowym.
Tabela XXIV.	Wynik położniczy w grupie ciężarnych z cukrzycą z uwzględnieniem klas cukrzycy wg White.
Tabela XXV.	Charakterystyka oraz wyrównanie metaboliczne w I trymestrze ciąży w grupie ciężarnych z cukrzycą w zależności od wyniku położniczego.
Tabela XXVI.	Wynik położniczy w grupie badanej z przewlekłym nadciśnieniem tętniczym (PNT) oraz nadciśnieniem indukowanym ciążą (NIC)
Tabela XXVII.	Wynik położniczy w grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych.
Tabela XXVIII.	Porównanie wyników położniczych pomiędzy badanymi grupami ciężarnych.
Tabela XXIX.	Stężenie leptyny w grupie badanej ciężarnych z cukrzycą w zależności od czasu trwania cukrzycy i obecności powikłań naczyniowych.
Tabela XXX.	Stężenie leptyny w poszczególnych trymestrach ciąży w grupie badanej z nadciśnieniem tętniczym.
Tabela XXXI.	Stężenie leptyny u ciężarnych z i bez stanu przedrzucawkowego.
Tabela XXXII.	Stężenie leptyny w poszczególnych trymestrach ciąży w grupie kontrolnej.
Tabela XXXIII.	Stężenie leptyny w poszczególnych trymestrach ciąży we wszystkich podgrupach ciężarnych.
Tabela XXXIV.	Analiza rozkładu genotypów LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G w grupie pacjentek z cukrzycą.
Tabela XXXV.	Analiza rozkładu genotypów LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G w grupie pacjentek z nadciśnieniem tętniczym.
Tabela XXXVI.	Analiza rozkładu genotypów LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G w grupie kontrolnej.
Tabela XXXVII.	Leptynemia i łożyskowa ekspresja LEP/LEPR w przebiegu ciąży u ciężarnych z cukrzycą w zależności od genotypu LEP -2548 G/A oraz LEPR 668 A/G.
Tabela XXXVIII.	Wpływ czynników metabolicznych na masę urodzeniową noworodka w grupie ciężarnych z wariantem homozygotycznym -2548 G/A oraz 668 A/G
Tabela XXXIX.	Wpływ czynników metabolicznych na masę urodzeniową noworodka.
Tabela XL.	Wpływ czynników metabolicznych na masę urodzeniową noworodka w grupie ciężarnych z co najmniej jednym wariantem heterozygotycznym - 2548 G/A oraz 668 A/G.

## XI.

## SPIIS RYCIN

- Rycina 1. Struktura przestrzenna leptyny.
- Rycina 2. Izoformy receptora leptyny (modyfikacja własna)
- Rycina 3. Polimorfizm genetyczny genu leptyny.
- Rycina 4. Produkt reakcji PCR w zakresie DNA genu leptyny (A) oraz genu receptora leptyny (B), rozdzielone na żelu agarozowym.
- Rycina 5. Analiza polimorfizmów genu leptyny LEP -2548 G/A. Trawienie enzymem Hin6I. Produkty rozdzielone na żelu agarozowym.
- Rycina 6. Analiza polimorfizmów genu receptora leptyny LEPR 668 A/G.
- Rycina 7. Wyznaczanie temperatury topnienia produktu reakcji RT-PCR dla poszczególnych genów.
- Rycina 8. Przebieg reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla poszczególnych genów przy różnych stężeniach cDNA. Wyznaczanie krzywych wzorcowych.
- Rycina 9. Stężenie leptyny w momencie rozpoznania stanu przedrzucawkowego.
- Rycina 10. Stężenie leptyny w okresie okołoporodowym u ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym
- Rycina 11. Ekspresja genu leptyny w łożysku u ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym.
- Rycina 12. Ekspresja genu leptyny w łożysku w podgrupie ciężarnych z cukrzycą i nadwagą w relacji do masy urodzeniowej noworodka.
- Rycina 13. Ekspresja genu receptora leptyny w łożysku w podgrupie ciężarnych z cukrzycą i nadwagą w relacji do masy urodzeniowej noworodka.

## XII. SPIS WYKRESÓW

- Wykres 1. Przynależność ciężarnych do klas cukrzycy wg White w momencie objęcia opieką położniczą.
- Wykres 2. Średnia masa urodzeniowa noworodka w poszczególnych grupach ciężarnych.
- Wykres 3. Okołoporodowe stężenie leptyny w grupie ciężarnych z cukrzycą w zależności od klasy cukrzycy wg White.
- Wykres 4. Poziom ekspresji genu leptyny w łożysku w poszczególnych grupach pacjentek.
- Wykres 5. Poziom ekspresji genu receptora leptyny w łożysku w poszczególnych grupach pacjentek.
- Wykres 6. Poziom ekspresji genu leptyny w łożysku w podgrupie I.
- Wykres 7. Poziom ekspresji genu receptora leptyny w łożysku w podgrupie I.
- Wykres 8. Poziom ekspresji genu leptyny w łożysku w podgrupie II.
- Wykres 9. Poziom ekspresji genu receptora leptyny w łożysku w podgrupie II.
- Wykres 10. Poziom ekspresji genu leptyny w łożysku w podgrupie III.
- Wykres 11. Poziom ekspresji genu receptora leptyny w łożysku w podgrupie III.
- Wykres 12. Stężenie leptyny w II trymestrze ciąży ciężarnych z cukrzycą w zależności od genotypu.
- Wykres 13. Analiza ekspresji LEP w łożysku ciężarnych z cukrzycą w zależności od genotypu.
- Wykres 14. Analiza ekspresji LEPR w łożysku ciężarnych z cukrzycą w zależności od genotypu.
- Wykres 15. Odsetek hemoglobiny glikowanej w I trymestrze ciąży a genotyp u ciężarnych z cukrzycą.
- Wykres 16. Stężenie triglicerydów w I trymestrze ciąży u ciężarnych z cukrzycą a genotyp.
- Wykres 17. Stężenie kreatyniny w I trymestrze ciąży w grupie ciężarnych z cukrzycą a genotyp.
- Wykres 18. Odsetek hemoglobiny glikowanej w II trymestrze ciąży a genotyp u ciężarnych z cukrzycą.
- Wykres 19. Wskaźnik masy ciała w grupie ciężarnych z cukrzycą w II trymestrze ciąży a genotyp.
- Wykres 20. Masa urodzeniowa noworodka w grupie ciężarnych z cukrzycą w zależności od genotypu matki.
- Wykres 21. Stężenie leptyny w momencie rozpoznania nadciśnienia indukowanego ciążą jak i nadciśnienia przewlekłego, oraz w okresie okołoporodowym.
- Wykres 22. Ekspresja LEPR w grupie ciężarnych z nadciśnieniem w zależności od genotypu.
- Wykres 23. Masa urodzeniowa noworodka w grupie ciężarnych z nadciśnieniem w zależności od genotypu.
- Wykres 24. Wskaźnik masy ciała w grupie kontrolnej w I trymestrze i w okresie okołoporodowym z uwzględnieniem genotypu.
- Wykres 25. Przydatność stężenia leptyny w I trymestrze ciąży w predykcji masy urodzeniowej noworodka (AUC 0,62; czułość 0,75; specyficzność 0,5; punkt odcięcia 28,127 ng/ml)
- Wykres 26. Przydatność hemoglobiny glikowanej w III trymestrze ciąży w predykcji masy urodzeniowej noworodka (AUC 0,66; czułość 0,23; specyficzność 0,91; punkt odcięcia 7,9%)
- Wykres 27. Przydatność masy ciała ciężarnej w III trymestrze ciąży w predykcji masy urodzeniowej noworodka.
- Wykres 28. Przydatność stężenia leptyny w poszczególnych trymestrach ciąży w predykcji masy urodzeniowej noworodka.
- Wykres 29. Przydatność stężenia LDL w II trymestrze ciąży w predykcji masy urodzeniowej noworodka.
- Wykres 30. Przydatność stężenia cholesterolu całkowitego w III trymestrze ciąży w predykcji masy urodzeniowej noworodka.
- Wykres 31. Indeks masy ciała w I trymestrze ciąży w grupie ciężarnych z cukrzycą typu 1 i zdrowych z genotypem GA AG.
- Wykres 32. Stężenie leptyny w I trymestrze ciąży w grupie ciężarnych z cukrzycą typu 1 i zdrowych z genotypem GA AG.
- Wykres 33. Stężenie leptyny w III trymestrze ciąży we wszystkich grupach ciężarnych z genotypem GA AG.
- Wykres 34. Ekspresja genu leptyny (LEP) i genu receptora leptyny (LEPR) w łożysku w poszczególnych grupach ciężarnych z genotypem GA AG.
- Wykres 35. Masa urodzeniowa noworodka w poszczególnych grupach ciężarnych z genotypem GA AG.