

**UNIWERSYTET MEDYCZNY W POZNANIU
WYDZIAŁ LEKARSKI II**

**LEK. MED. ELŻBIETA DREWS-PIASECKA
SZPITAL WOJEWÓDZKI W POZNANIU
ODDZIAŁ GINEKOLOGICZNO-POŁOŻNICZY Z PODODDZIAŁAMI**

**ZNACZENIE WYBRANYCH WARIANTÓW POLIMORFICZNYCH
GENÓW UKŁADU CYTOKIN W ETIOLOGII PORODU
PRZEDWCZESNEGO**

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

POZNAŃ 2011

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

1. WSTĘP

- 1.1. Poród przedwczesny jako ważny problem w położnictwie
- 1.2. Definicja porodu przedwczesnego
- 1.3. Epidemiologia porodu przedwczesnego
- 1.4. Etiopatogeneza i czynniki ryzyka porodu przedwczesnego
- 1.5. Mechanizm inicjacji porodu – hormonalne i parakrynne uwarunkowania porodu przedwczesnego
- 1.6. Genetyczne uwarunkowania porodu przedwczesnego
 - 1.6.1. Znaczenie polimorfizmów genów cytokin w porodzie przedwczesnym
- 1.7. Wybrane cytokiny i ich polimorfizmy w porodzie przedwczesnym
 - 1.7.1. Interleukina-1
 - 1.7.2. Antagonista receptora interleukiny-1
 - 1.7.3. Interleukina 6
 - 1.7.4. Czynniki martwicy nowotworów
 - 1.7.5. Receptory Toll-like
 - 1.7.6. Receptor TLR2
 - 1.7.7. Receptor TLR4

2. CEL PRACY

3. MATERIAŁ I METODYKA

- 3.1. Charakterystyka badanych grup
 - 3.1.1. Grupa badana
 - 3.1.2. Grupa kontrolna
- 3.2. Metodyka
 - 3.2.1. Reakcja łańcuchowa polimerazy
 - 3.2.2. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych
- 3.3. Analiza genetyczna
 - 3.3.1. Izolacja DNA
 - 3.3.2. Oznaczanie jakości i ilości preparatów DNA
 - 3.3.3. Polimorfizm +3953C>T genu *IL-1 β*
 - 3.3.4. Polimorfizm 86 pż VNTR genu *IL-1RN*
 - 3.3.5. Polimorfizmy -174G>C oraz -596G>A genu *IL-6*
 - 3.3.6. Polimorfizmy -163G>A, -238G>A, -308G>A, -376G>A genu *TNF- α*
 - 3.3.7. Polimorfizm Arg753Gln genu *TLR2* oraz Thr399Ile genu *TLR4*
- 3.4. Analiza statystyczna

4. WYNIKI

- 4.1. Analiza danych demograficznych, klinicznych i biochemicznych w badanych grupach kobiet
- 4.2. Analiza wyników badań genetycznych
 - 4.2.1. Polimorfizm genu *IL-1 β*
 - 4.2.2. Polimorfizm genu *IL-1RN*
 - 4.2.2. Polimorfizm genu *IL-6*
 - 4.2.2.1. Polimorfizm -596G>C genu *IL-6*

- 4.2.2.2. Polimorfizm -174G>C genu *IL-6*
- 4.2.2. Polimorfizm genu *TNF-α*
- 4.2.2.1. Polimorfizm -163G>A genu *TNF-α*
- 4.2.2.2. Polimorfizm -238G>A genu *TNF-α*
- 4.2.2.3. Polimorfizm -308G>A genu *TNF-α*
- 4.2.2.4. Polimorfizm -376G>A genu *TNF-α*
- 4.2.3. Polimorfizm genów receptorów Toll-like
- 4.2.3.1. Polimorfizm genu *TLR2*
- 4.2.3.2. Polimorfizm genu *TLR4*
- 4.2. Polimorfizm badanych genów w zależności od tygodnia zakończenia ciąży w grupie kobiet z PTD
- 4.3. Analiza korelacji badanych polimorfizmów genetycznych z parametrami klinicznymi i biochemicznymi
- 4.5. Porównanie częstości haplotypów badanych polimorfizmów genu *TNF-α* oraz *IL-6*
- 4.5.1. Porównanie częstości haplotypów badanych polimorfizmów genu *TNF-α*
- 4.5.2. Porównanie częstości haplotypów badanych polimorfizmów genu *IL-6*
- 4.5.3. Analiza nierównowagi sprzężeń badanych polimorfizmów *IL-6* oraz *TNF-α*
- 5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA**
- 5.1. Udział polimorfizmów genów kodujących cytokiny w porodzie przedwczesnym
- 5.1.1. Udział polimorfizmów genów układu interleukin w porodzie przedwczesnym
- 5.2.2.1. Polimorfizm +3953C>T genu *IL-1β*
- 5.2.2.2. Polimorfizm genu *IL-1RN*
- 5.2.2.3. Polimorfizm -174G>C genu *IL-6*
- 5.2.2.4. Polimorfizmu -596G>A genu *IL-6*
- 5.2.3. Udział polimorfizmów genu kodującego *TNF-α* w porodzie przedwczesnym
- 5.2.3.2. Polimorfizm -238G>A genu *TNF-α*
- 5.2.3.1. Polimorfizm -308G>A genu *TNF-α*
- 5.2.3.3. Inne analizowane polimorfizmy genu *TNF-α*
- 5.2.2.4. Znaczenie badań obejmujących polimorfizmy genetyczne kilku cytokin w etiologii porodu przedwczesnego
- 5.2.2.5. Polimorfizm genów interleukin, obecność waginozy bakteryjnej a występowanie PTD
- 5.2.4. Udział polimorfizmów genów kodujących receptory TLR w porodzie przedwczesnym
- 5.3. Polimorfizmy innych genów kandydujących w etiologii porodu przedwczesnego
- 5.4. Wpływ analizowanych czynników środowiskowych na wystąpienie porodu przedwczesnego
- 5.5. Implikacje kliniczne oznaczania polimorfizmów genetycznych w porodzie przedwczesnym
- 5.6. Podsumowanie
- 6. WNIOSKI**
- 7. PIŚMIENNICTWO**
- 8. STRESZCZENIE W J. POLSKIM**
- 9. STRESZCZENIE W J. ANGIELSKIM**
- 10. SPIS TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII**

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACTH	adrenokortykotropina (ang. <i>adrenocorticotropic hormone</i>)
ADAM 17	domena metaloproteinazy ADAM 17 (ang. <i>ADAM metalloproteinase domain 17; TNF converting enzyme</i>)
Ap	skala Agar (ang. <i>Apgar score</i>)
AP	fosfataza alkaliczna (ang. <i>alkaline phosphatase</i>)
AP-1	kompleks białkowy, zbudowany z dimerów białek z rodzin Fos, Jun, ATF i Maf, który działa jako czynnik transkrypcyjny (ang. <i>activator on protein 1</i>)
BMI	wskaźnik masy ciała (ang. <i>body mass index</i>)
BV	waginoza bakteryjna (ang. <i>bacterial vaginosis</i>)
C/EBP	(CBF)- czynniki transkrypcyjne C/EBP lub białka wiążące się z sekwencją CCAAT (ang. <i>CCAAT enhancer binding proteins, CCAAT binding factor</i>)
C/EBP	czynnik transkrypcyjny C/EBP lub białka wiążące się z sekwencją CCATT (ang. <i>CCAAT-enhancer-binding proteins</i>)
CD receptory	receptory różnicowania (ang. <i>CD receptors</i>)
cDNA	komplementarny DNA (ang. <i>complementary DNA</i>)
CNTF	rzęskowy czynnik neurotrofowy (ang. <i>ciliary neurotrophic factor</i>)
ConA	lektyna Con A, konkanawalina A (ang. <i>lectin Con A</i>)
COX	cykloooxygenaza (ang. <i>cyclo-oxygenase</i>)
CREB	białko wiążące się z elementami odpowiedzi na camp (ang. <i>cyclic AMP response element binding protein</i>)
CRF	czynnik uwalniający kortykotropinę (ang. <i>corticotropin releasing factor</i>)
CRH	kortykoliberyna (ang. <i>corticotropin releasing hormone</i>)
CRP	białko C reaktywne (ang. <i>C reactive protein</i>)
CT-1	kardiotrofina 1 (ang. <i>cardiotrophin 1</i>)
DHEA-S	siarczan dehydroepiandrosteronu (ang. <i>dehydroepiandrosterone sulphate</i>)
DMPK	gen dystrofii myotonicznej (ang. <i>dystrophia myotonica protein kinase</i>)
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dsDNA	dwuniciowy kwas desoksyrybonukleinowy (ang. <i>double-stranded DNA</i>)
EDTA	kwasy etylenodiaminotetraoctowe (ang. <i>ethylenediaminetetraacetate</i>)
Eg r-1 (Krox-24)	wczesne białko odpowiedzi wzrostu 1 (ang. <i>early growth response protein 1</i>)
G-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. <i>granulocyte colony-stimulating factor</i>)
GM-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. <i>granulocyte macrophage - colony stimulating factor</i>)
GRE	element odpowiedzi glikokortykosteroidów (ang. <i>glucocorticoid response element</i>)
GTP	guanozyna-5'-trifosforan (ang. <i>guanosinetriphosphate</i>)
HLA	antygeny zgodności tkankowej (ang. <i>human leucocyte antigens</i>)

HPA	oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (ang. <i>hypothalamus–pituitary–adrenal</i>)
IAI	zakażenie wewnątrzmaciczne (ang. <i>intraamniotic infection</i>)
ICZMP	Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi (ang. <i>Institute of Polish Mother`s Health Center of Lodz</i>)
IFN	interferon (ang. <i>interferon</i>)
Ig	immunoglobulina (ang. <i>immunoglobulin</i>)
IL	interleukina (ang. <i>interleukin</i>)
IL-1RA	antagonista receptora interleukiny 1 (ang. <i>interleukin-1 receptor antagonist</i>)
IL-6R	receptor dla interleukiny 6 (ang. <i>receptor for interleukin 6</i>)
IUGR	wewnątrzmaciczne zahamowanie wzrostu płodu (ang. <i>intrauterine growth restriction</i>)
JAK	kinazy Janusowe, kinazy tyrozynowe (ang. <i>Janus kinases</i>)
LAK	limfocyty LAK (ang. <i>lymphokine-activated killer cells</i>)
LBW	niska waga urodzeniowa (ang. <i>low birth weight</i>)
LD	nierównowaga sprzężeń (ang. <i>linkage disequilibrium</i>)
LIF	czynnik hamujący białaczkę (ang. <i>leukemia inhibitory factor</i>)
LOD	współczynnik załamania (ang. <i>index of refraction</i>)
LPR	domena bogata w leucynę (ang. <i>leucine rich repeats</i>)
LPS	lipopolisacharyd (ang. <i>lipopolysaccharid</i>)
LRR	leucyna (ang. <i>leucine rich repeat</i>)
M-CSF	czynnik stymulujący wzrost kolonii makrofagów (ang. <i>macrophage colony stimulating factor</i>)
MAF	allele o niskiej częstości występowania (ang. <i>minor allele frequency</i>)
MAP	kinaza aktywowana przez mitogeny (ang. <i>mitogen-activated protein kinases</i>)
MDP	muramyldipeptyd (ang. <i>muramyl dipeptide</i>)
MHC	główny układ zgodności tkankowej (ang. <i>major histocompatibility complex</i>)
MMP	metaloproteinaza (ang. <i>metalloproteinase</i>)
MMPs	metaloproteiny macierzowe (ang. <i>matrix metalloproteinases</i>)
MRE	wielokrotny element odpowiedzi (ang. <i>multiple response element</i>)
mRNA	matrycowy kwas rybonukleinowy (ang. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
NFkappa B	jądrowy czynnik kappa- wzmacniacz z aktywowanych limfocytów B (ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>)
NICU	Oddział Intensywnej Opieki Neonatologicznej (ang. <i>Neonatal Intensive Care Unit</i>)
OCT-1	czynnik transkrypcyjny (ang. <i>octamer binding transcription factor</i>)
OD	gęstość optyczna (ang. <i>optical density</i>)
OSM	onkostatyna M (ang. <i>oncostatin M</i>)
PU	przedział ufności (ang. <i>confidence interval</i>)
PAMP	wzorce molekularne związane z patogenami (ang. <i>pathogen associated molecular patterns</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazowa (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PGE	prostaglandyny E (ang. <i>prostaglandin E</i>)
PHA	fitohemaglutynina (ang. <i>phytohaemagglutinin</i>)
PI-3K	kinaza tyrozynowa fosfatydyloinozytolu kinazy-3 (ang. <i>kinases as protein kinases</i>)
PR	receptor progesteronowy (ang. <i>progesterone receptor</i>)

PROM	przedwczesne pęknięcie błon płodowych (ang. <i>premature rupture of membranes</i>)
PTD	poród przedwczesny (ang. <i>preterm delivery</i>)
pz	par zasad (ang. <i>base pairs</i>)
RFLP	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. <i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RNA	kwas rybonukleinowy(ang. <i>ribonucleic acid</i>)
RSV	syncytialny wirus oddechowy (ang. <i>respiratory syncytial virus</i>)
SD	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>)
sIL-6R	rozpuszczalna postać receptora interleukiny 6 (ang. <i>soluble interleukin-6 receptor</i>)
SNPs	polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
STAT	białka STAT (ang. <i>signal transducers and activators of transcription</i>)
tc.	tydzień ciąży (ang. <i>week weigh down</i>)
TACE	czynnik martwicy nowotworu enzymu konwertującego (ang. <i>tumor necrosis factor-α-converting enzyme</i>)
TLR	receptor Toll-like (ang. <i>Toll-like receptor</i>)
TNF R	receptor dla czynnika martwicy nowotworu (ang. <i>tumor necrosis factor receptor</i>)
TNF-α	czynnik martwicy nowotworu alfa, kachektyna (ang. <i>tumor necrosis factor, cachectin</i>)
TNF-β	czynnik martwicy nowotworu beta, limfotoksyna (ang. <i>tumor necrosis factor, lymphotoxine</i>)
TRIAL	ligand czynnika martwicy nowotworu indukujący apoptozę (ang. <i>tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand</i>)
tRNA	transportujący RNA (ang. <i>transfer RNA</i>)
UV	promieniowanie ultrafioletowe (ang. <i>Ultraviolet; electromagnetic radiation</i>)
VNTR	miejsce w genomie zawierające powtarzający się motyw nukleotydów (ang. <i>variable number of tandem repeats</i>)
WO	wartość oczekiwana (ang. <i>expected value</i>)
WR	współczynnik ryzyka, iloraz szans (ang. <i>odds ratio</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)

1. WSTĘP

1.1. PORÓD PRZEDWCZESNY JAKO WAŻNY PROBLEM W POŁOŻNICTWIE

Poród przedwczesny (PTD – *preterm delivery*) stanowi jedno z największych wyzwań dla współczesnej medycyny perinatalnej nadal będąc aktualnym problemem, przede wszystkim ze względu na związane z nim zjawisko wcześniactwa. Pomimo poszerzania wiedzy położniczej na temat etiopatogenezy PTD jego częstość nie ulega istotnym zmianom i w niektórych krajach sięga nawet kilkunastu procent. Poród przedwczesny jest jedną z głównych przyczyn umieralności okołoporodowej oraz odległych powikłań dotyczących rozwoju psychicznego i fizycznego wcześniaków. Konsekwencje przedwczesnego porodu są niezwykle istotne, gdyż z jednej strony jest on główną przyczyną zgonów płodów i noworodków, a z drugiej bardzo często wpływa na nieprawidłowy rozwój dziecka, które niejednokrotnie wymaga długotrwałej opieki i rehabilitacji. W ogólnej umieralności okołoporodowej 70% stanowią zgony wcześniaków. Skutki wcześniactwa dotyczą wielu dziedzin życia społecznego. Stanowią ogromne obciążenie dla każdego publicznego systemu opieki zdrowotnej, nie tylko w wymiarze ekonomicznym, lecz także społeczno-socjologicznym i psychologicznym. Odległe i trwałe konsekwencje wcześniactwa są jednoznacznie określone, zarówno w wymiarze demograficznym, jak i populacyjnym. Znajomość tego zagadnienia i ciągłe poszerzanie wiedzy na temat czynników warunkujących wystąpienie porodu przedwczesnego pozwala na istotne podniesienie jakości opieki i nadzoru perinatalnego [Urban, 2007, Marianowski i wsp., 2002].

Rozwój neonatologii, i coraz lepsze poznawanie mechanizmów inicjujących poród przedwczesny mogą przyczynić się do zmniejszenia częstości występowania porodu przedwczesnego i zwiększenia szans noworodków na prawidłowy rozwój psychomotoryczny. Zapobieganie występowaniu PTD powinno być jednym z podstawowych kierunków w dążeniu do dalszej poprawy wyników pracy oddziałów położniczych i neonatologicznych [Bręborowicz i wsp., 2006].

1.2. DEFINICJA PORODU PRZEDWCZESNEGO

Poród przedwczesny to poród, w którym rodzi się noworodek niedojrzały do samodzielnego życia pozamacicznego, a czas potrzebny do osiągnięcia dojrzałości jest indywidualnie zróżnicowany. Dojrzałość płodu a także rokowanie co do przeżycia wśród wcześniaków najlepiej koreluje z masą ciała noworodka i czasem trwania ciąży.

Zgodnie z przyjętą definicją WHO (*World Health Organization*) przyjmuje się, że poród przedwczesny jest to urodzenie dziecka po ukończeniu 22 tc. a przed upływem 36+6 tc. licząc od pierwszego dnia ostatniej miesiączki. W celu określenia terminu porodu, przy regularnych miesiączkach co 28 dni, korzysta się z reguły Negelego, tzn. od pierwszego dnia ostatniej miesiączki odejmuje się trzy miesiące i dodaje siedem dni [Pisarski, 2002].

Schemat obliczenia:

1 dzień ostatniego krwawienia miesiączkowego - 3 miesiące + 7 dni = termin porodu

Definicja porodu przedwczesnego i wynikające z niej statystyczne określenie częstości tego zdarzenia opiera się na rozmaitych parametrach. Ponieważ dokładne ustalenie czasu trwania ciąży w poszczególnych przypadkach napotyka się na duże trudności, w analizach częstości występowania PTD przyjęto, że ich kryterium jest masa ciała noworodka nie przekraczającą 2500 g. W związku z tym, poród przedwczesny to poród w wyniku którego rodzi się noworodek o masie między 500 g a 2500 g. W grupie porodów przedwczesnych z masą 2500 g i mniejszą znajdują się również dzieci z niedowagą, tzw. *small for date babies*, dzieci z małą masą urodzeniową poniżej 10. percentyla oraz dzieci z ciąż powikłanych opóźnionym rozwojem wewnątrzmacicznym płodu [Martius, 1996, Czajka, 2006].

1.3. EPIDEMIOLOGIA PORODU PRZEDWCZESNEGO

Mimo ciągłej poprawy opieki położniczej i rozwoju medycyny perinatalnej liczba porodów przedwczesnych w ostatnich latach nadal wzrasta. Wiąże się to oczywiście ze wzrostem liczby wcześniaków i powikłań utrzymujących się niekiedy przez całe życie. Poród przedwczesny dotyczy 6-10% wszystkich ciężarnych na całym świecie. Częstość występowania porodu przedwczesnego określa się w Europie na 5-7%, a w Stanach Zjednoczonych częstość tego powikłania szacowana jest nawet na 11-12%. Liczba porodów

ukończonych przed 36+6 tc. wzrasta głównie w krajach o wysokim stopniu uprzemysłowienia. Sześćdziesiąt do osiemdziesięciu procent zgonów noworodków urodzonych z porodów przedwczesnych dotyczy dzieci, u których w okresie perinatalnym nie stwierdzono wad rozwojowych. Największy procent trwałych powikłań wcześniactwa dotyczy noworodków urodzonych przed 32 tc. i sięga on 50%. W grupie noworodków urodzonych przed 32 tc. odnotowuje się również największy procent umieralności, bo aż do 60%.

W Polsce częstość występowania PTD wynosi 6-8%. Jak wynika z danych Głównego Urzędu Statystycznego w Polsce w 2004 roku urodziło się 357 884 dzieci. Noworodki, które osiągnęły masę ciała poniżej 2500 g stanowiły 21 777 przypadków. Odsetek wcześniactwa w naszym kraju wynosił wówczas 6,1% wśród żywo urodzonych noworodków. Po uwzględnieniu 1 234 przypadków martwych urodzeń dzieci przed terminem porodu, procent wcześniactwa w Polsce wynosił 6,4% wszystkich urodzeń. Zatem w 2004 roku każdego dnia w naszym kraju urodziło się 63 dzieci z ciąż zakończonych porodem przedwczesnym. Najwyższy odsetek (64,8%) wszystkich porodów przed terminem stanowiły noworodki o masie ciała pomiędzy 2000 a 2449 g, a najniższy – 6,1% dzieci ze skrajnie niską masą urodzeniową (od 500 g do 999 g) [Sawicki i wsp., 2003].

W ostatnich kilku latach w Stanach Zjednoczonych w ciągu roku dochodzi do około 470 000 porodów przed terminem. Każdego dnia rodzi się więc około 1 350 wcześniaków, z których 12 umiera. Na podstawie danych statystycznych stwierdzono, że dużo większa liczba dzieci urodzonych przed terminem porodu dotknięta jest powikłaniami wcześniactwa: mózgowym porażeniem dziecięcym, opóźnieniem rozwoju umysłowego i fizycznego, przewlekłą chorobą płuc, utratą wzroku czy słuchu. Ryzyko niepełnosprawności dużego stopnia wśród wcześniaków szacuje się na 20 do 50%. W Stanach Zjednoczonych w latach 1990-2001 liczba porodów ukończonych przed 32 tc. wzrosła z 10,6% do 11,9% [Martin et al., 2001]. W zakresie częstości występowania PTD istnieją wyraźne różnice rasowe. W 2000 roku aż 13% noworodków z masą urodzeniową poniżej 2500 g urodziło się w populacji Afroamerykanów. W tej grupie 3,1% przypadków stanowiły dzieci o skrajnie niskiej urodzeniowej masie ciała (<1500 g). W przypadku rasy białej, noworodki z urodzeniową masą ciała poniżej 2500 g stanowiły 6,8%, a noworodki z masą poniżej 1500 g stanowiły 1,2%. W skali całego kraju wzrastał odsetek noworodków ze skrajnie niską masą urodzeniową (od 500 g do 999 g), począwszy od wartości 1,16% w 1981 roku, poprzez 1,27% (1990 roku), aż do wartości 1,44% uzyskanych w roku 2001. Za przyczynę tego zjawiska uważa się wzrost liczby ciąż wielopłodowych, będących wynikiem coraz częstszego

stosowania technik wspomaganego rozrodu. W 2000 roku, przypadki noworodków urodzonych przedwcześnie, a pochodzących z ciąż wielopłodowych, stanowiły przyczynę 23% porodów noworodków ze skrajnie niską masą ciała.

Niestety pomimo ciągłego rozwoju medycyny perinatalnej, wprowadzaniu nowych leków hamujących przedwczesną czynność skurczową macicy, stosowania nowych antybiotyków, coraz większej wiedzy na temat etiopatogenezy i czynników sprzyjających wystąpieniu PTD odnotowuje się wzrost liczby porodów ukończonych przed 32 tc. Właściwe rozpoznanie czynników ryzyka porodu przedwczesnego, wczesne jego wykrywanie, a także odpowiednia selekcja grupy ciężarnych zagrożonych porodem przedwczesnym są podstawą prawidłowego postępowania diagnostycznego i terapeutycznego we współczesnej perinatologii [Sikora, 2006].

1.4. ETIOPATOGENEZA I CZYNNIKI RYZYKA PORODU PRZEDWCZESNEGO

Mechanizmy prowadzące do wystąpienia przedwczesnej czynności skurczowej macicy, a co za tym idzie do wystąpienia porodu przedwczesnego nie są jeszcze do końca poznane. Prawdopodobnie PTD jest zjawiskiem złożonym, wywoływanym przez wiele różnych czynników, a ich dokładne poznanie pozwoli na skuteczną profilaktykę wystąpienia PTD. Dokładna znajomość czynników ryzyka wystąpienia PTD pozwoli na wczesne wdrożenie wszystkich schematów działania w porodzie przedwczesnym mogących zmniejszyć jego konsekwencje [Czajka, 2006].

Od prawie czterdziestu lat przeprowadzane są badania dotyczące przewidywania i zapobiegania porodom przedwczesnym. Za prekursora tych badań uważa się Popiernika, który jako pierwszy opublikował w 1969 roku metodę identyfikacji czynników ryzyka porodu przedwczesnego [Popiernik-Berkhauer, 1969]. W 1984 roku Autor ten opracował i opublikował klasyfikację różnych czynników ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego, wyróżniając dwie grupy: czynniki medyczne i socjalne. Popiernik uważał, że istnieje możliwość zmniejszenia częstości PTD poprzez wpływ na czynniki medyczne. Za główną zasadę w profilaktyce PTD uznał możliwość modyfikacji przez kobiety ciężarne nadmiernego obciążenia fizycznego i psychicznego oraz eliminacji różnych czynności w życiu codziennym, które mogą być czynnikami wyzwalającymi skurcze macicy i poród przedwczesny [Bręborowicz i wsp., 2006].

W 1972 roku w Niemczech Saling opublikował program prewencji niskiej masy urodzeniowej. Wyodrębnił on grupy ryzyka PTD oraz dystrofii, a także zidentyfikował czynniki ryzyka, które najczęściej prowadzą do porodu przedwczesnego [Saling, 1972]. Pierwsze znaczące kliniczne wyniki doświadczeń z wdrożeniem programu prewencyjnego zostały opublikowane w 1974 roku przez Giffey'a i Salinga. W badaniach tych określono 36 czynników wysokiego ryzyka wcześniactwa i dystrofii [Giffey et al., 1974]. W roku 1976, wykorzystując bazę danych Brytyjskiego Przeglądu Perinatalnego, Fredrick i Anderson zidentyfikowali kilka czynników ryzyka porodu przedwczesnego. Fredrick opracował system punktowy oceny ryzyka samoistnego porodu przedwczesnego [Fredrick et al., 1976]. W Stanach Zjednoczonych Creasy *et al.* zmodyfikowali system punktowy opracowany przez Papernika, który był najbardziej przydatny w ocenie ryzyka porodu przedwczesnego. W systemie tym czynniki ryzyka były punktowane w skali od 1 do 10. Czynniki tymi były: stan socjoekonomiczny, obciążony wywiad położniczy, codzienne zwyczaje i aktualne powikłania ciąży. W ostatnich latach podejmowane są próby oznaczania wielu różnych wskaźników biochemicznych, enzymatycznych, hormonalnych, hematologicznych, mikrobiologicznych, immunologicznych i molekularnych, które miałyby istotne znaczenie w prognozowaniu wystąpienia porodu przedwczesnego. Wskaźniki te poznawane są w wyniku prowadzonych badań nad etiopatogenezą porodów przedwczesnych i różnych mechanizmów patofizjologicznych wywołujących przedwczesną czynność skurczową macicy [Leitch, 2005].

Jako pierwszą, a zarazem najważniejszą i najczęściej prowadzącą do porodu przedwczesnego, uznaje się samoistną, przedwczesną czynność skurczową mięśnia macicy – idiopatyczny poród przedwczesny. Kolejną, równie częstą przyczyną porodów przedwczesnych, jest przedwczesne pęknięcie błon płodowych (PROM - *premature rupture of membranes*). Często ciąża ukończona jest przed terminem porodu ze wskazań matczynych lub płodowych.

Celem każdego systemu oceny ryzyka wystąpienia PTD jest wyodrębnienie ciężarnych z grupy wysokiego ryzyka i objęcie ich optymalną opieką przedporodową w celu zapobiegania przedwczesnemu zakończeniu ciąży. Czynniki ryzyka porodu przedwczesnego można podzielić na kilka dużych grup: czynniki socjoekonomiczne i epidemiologiczne, czynniki zdrowotne, infekcyjne, płodowe oraz łożyskowe [Bręborowicz i wsp., 2006].

Tab. 1. Najczęstsze czynniki ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego [Bręborowicz i wsp., 2006].

<i>Czynniki socjoekonomiczne</i>	<i>Czynniki zdrowotne (położniczo-ginekologiczne)</i>	<i>Czynniki infekcyjne</i>	<i>Czynniki płodowe</i>	<i>Czynniki łożyskowe</i>
<ul style="list-style-type: none"> - niski status socjoekonomiczny - niski poziom wykształcenia i dochodów obojga rodziców - brak lub niedostateczna opieka przedporodowa - stres i przemęczenie - przemoc psychiczna i fizyczna - rasa czarna - wiek matki <18 r.ż. i >40 r.ż. - palenie tytoniu - narkomania - alkoholizm 	<ul style="list-style-type: none"> - przedwczesne ukończenie ciąży w wywiadzie - przedwczesne pęknięcie błon płodowych - ciąża mnoga - wielowodzie - stosowanie technik wspomaganego rozrodu - krwawienie z dróg rodnych w II i III trymestrze ciąży - mięśniaki macicy (podśluzówkowe lub podłożyskowe) - wady macicy: przegroda macicy, macica dwurożna, jednoróżna - przynajmniej jedna strata ciąży w II trymestrze - nadciśnienie - niedokrwistość - cukrzyca 	<ul style="list-style-type: none"> - zakażenie wewnątrzmaciczne (choriamnionitis) - nieprawidłowa flora bakteryjna pochwy (BV) - bakteriomocz bezobjawowy - zapalenie pochwy i/lub kanału szyjki macicy - infekcje układu moczowego - zapalenie nerek - zapalenie tkanek przyzębia 	<ul style="list-style-type: none"> - zgon wewnątrzmaciczny - zahamowanie wzrastania wewnątrzmacicznego - wady rozwojowe 	<ul style="list-style-type: none"> - anomalie łożyskowe - łożysko przodujące - przedwczesne oddzielenie się łożyska - zapalenie łożyska

Najbardziej istotnymi i najczęściej podkreślanymi czynnikami ryzyka porodu przedwczesnego wydają się: poród przedwczesny w wywiadzie (31-50%), niski status socjoekonomiczny (15-35%), ciąża wielopłodowa (12-28%), przedwczesne pęknięcie błon płodowych (6-40%), nadciśnienie ciążowe i stan przedzucawkowy (12%), zahamowanie wewnątrzmacicznego wzrastania płodu (2-4%), krwawienie i krwotoki przedporodowe (6-9%), niewydolność cieśniowo-szyjkowa oraz wady macicy (8-9%).

1.5. MECHANIZM INICJACJI PORODU – HORMONALNE I PARAKRYNNE UWARUNKOWANIA PORODU PRZEDWCZESNEGO

Ciąża i okres okołoporodowy charakteryzuje się znacznymi biologicznymi oraz psychospołecznymi zmianami, które uwarunkowane są przyczynami matczynymi i płodowymi, jak również wpływem czynników środowiskowych. Zaburzenia równowagi tych procesów patofizjologicznych – hormonalnych, stresu, czynników genetycznych - mogą prowadzić do niedotlenienia płodu, porodu przedwczesnego oraz powikłań związanych ze znaczną śmiertelnością i zachorowalnością krótko- i długoterminową noworodków. W związku z powyższym PTD nadal pozostaje istotnym problemem opieki zdrowotnej, również z powodu wzrastającej w ostatnich dwóch dekadach częstości jego występowania. W ostatnich latach wykazano, że rozpoczęcie porodu w ciąży o czasie oraz przed terminem jest złożonym procesem komunikacji pomiędzy matką a płodem. Bierze w nim udział wiele czynników hormonalnych, parakrynnych, psychicznych, środowiskowych.

Jednym z głównych hormonów regulujących długość czasu trwania ciąży jest kortykoliberyna (CRH – *corticotropin releasing hormone*). Uważa się, że zmiany stężenia CRH pozwalają przewidzieć początek porodu. Wyniki badania Erickson *et al.* (prospektywne badanie, 297 kobiet ciężarnych, II trym. ciąży) pokazują przydatność oznaczania stężenia CRH w przewidywaniu PTD. Autorzy wskazali, że nawet pojedyncze oznaczenie stężenia CRH w surowicy krwi ciężarnych pod koniec II trym. ciąży może pomóc w zidentyfikowaniu grupy kobiet ze zwiększonym ryzykiem PTD [Erickson *et al.*, 1986].

Innym hormonem jest relaksyna syntetyzowana u ludzi przez komórki doczesnej. Hormon ten wpływa na przebudowę tkanki łącznej, rozwieranie szyjki macicy i relaksację więzadeł macicy, stymuluje produkcję kolagenaz oraz metaloproteinaz w szyjce i błonach płodowych [Qin *et al.*, 1997]. U kobiet z wykładnikami porodu przedwczesnego i wzrostem stężenia relaksyny odnotowuje się wzrost ryzyka PTD < 34 tc. [Vogel *et al.*, 2002].

Część badań wskazała również na rolę urokortyny (neuropeptyd, 40 aa) syntetyzowanej w owodni, kosmówce, doczesnej, trofoblaście i mięśniówce macicy. Obecna jest również w krążeniu matki i płodu. Urokortyna wzmacnia skurcze macicy poprzez potęgowanie odpowiedzi włókien mięśniowych na działanie prostaglandyn. Ponieważ większość obecnej we krwi matki urokortyny jest pochodzenia płodowego wskazuje to na współdziałanie organizmu matki i organizmu płodu w mechanizmie podtrzymywania ciąży i inicjacji porodu. Wzrost stężenia urokortyny jest związany zarówno z porodem o czasie, jak i z porodem przedwczesnym. Stężenie urokortyny w surowicy krwi matki jest podwyższone w przypadku porodu przedwczesnego przed 34 tc. [Florio et al., 2004].

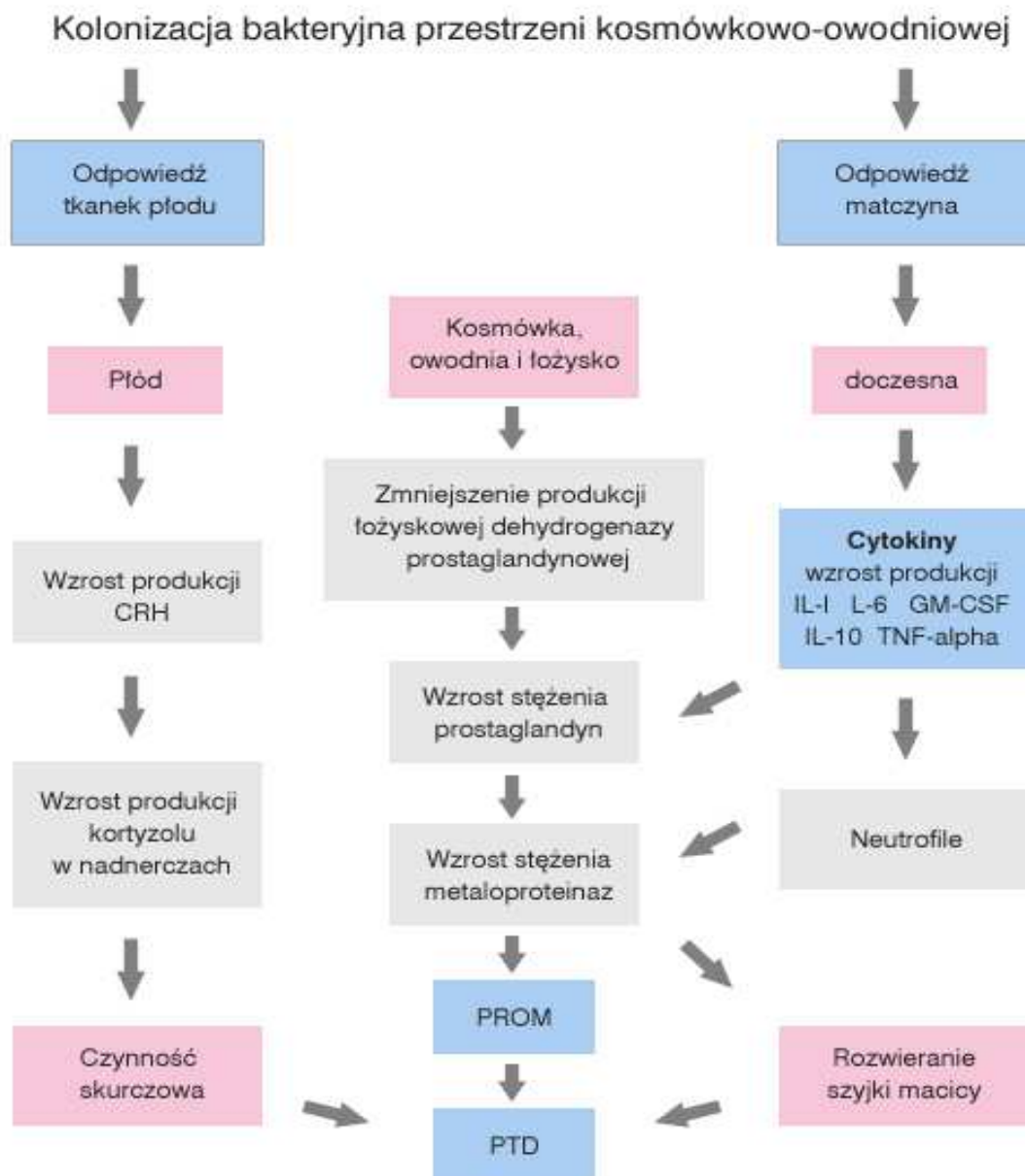
W mechanizmie prowadzącym do przedwczesnego przerwania błon płodowych, a w konsekwencji do wzrostu ryzyka zakończenia ciąży przed terminem kluczową rolę odgrywają metaloproteinazy rozkładające m.in. włókna kolagenowe oraz elastynę. Stąd poszukiwania związku pomiędzy metaloproteinazami-1, 8 i 9 (MMP-1, 8 i 9) a PTD powikłanym przedwczesnym pęknięciem błon płodowych.

Kluczowe znaczenie w inicjacji porodu wydaje się również mieć wzmożona synteza prostaglandyn w błonach płodowych pod wpływem endotoksyn bakteryjnych i stymulacji syntezy cytokin. Ta hipoteza została potwierdzona poprzez wykazanie podwyższonych wartości cytokin (IL-1, IL-6 i IL-8, TNF- α), metaloproteinaz w płynie owodniowym u pacjentek z infekcją wewnątrzmaciczną w przebiegu porodu przedwczesnego. Synteza cytokiny i prostaglandyn przyczynia się do wyzwolenia czynności skurczowej i niszczenia struktury błon płodowych. IL-1, IL-6, IL-8 czy TNF- α biorą udział w rozwoju porodu przedwczesnego, jak i porodu o czasie bez względu na ewentualną infekcję. Białka te indukują syntezę prostaglandyn, oraz naczyniowego śródbłonkowego czynnika wzrostu oraz osłabiają wrażliwość mięśnia macicy na działanie progesteronu. IL-6 stymuluje wydzielanie IL-1 oraz TNF- α przez komórki trofoblastu, co sprzyja wystąpieniu skurczów macicy. Aktywuje również wydzielanie kolagenazy przez neutrofile, wspomagając rozwieranie szyjki macicy. Ponadto wzrost stężenia IL-6 wpływa na zwiększenie ekspresji receptora oksytocyny w macicy [Christiaens et al., 2008]. Podwyższone stężenie IL-6 w płynie owodniowym i w wydzielinie szyjki macicy jest markerem zwiększonego ryzyka porodu przedwczesnego [Seremak-Mrozikiewicz i wsp., 2004; Czajka, 2010] (ryc. 1).

Mechanizm obronny matki i płodu przeciwko infekcjom dróg rodnych jest częściowo kontrolowany poprzez produkcję inhibitorów cytokin. W przypadku zaburzenia tego mechanizmu, bakterie mogą stymulować produkcję cytokin i prostaglandyn, co prowadzi do

pobudzenia czynności skurczowej mięśnia macicy w ciąży niedonoszonej. Badania wskazują, iż płyn owodniowy zawiera inhibitory aktywności interleukiny IL-1 [Popowski et al., 2011].

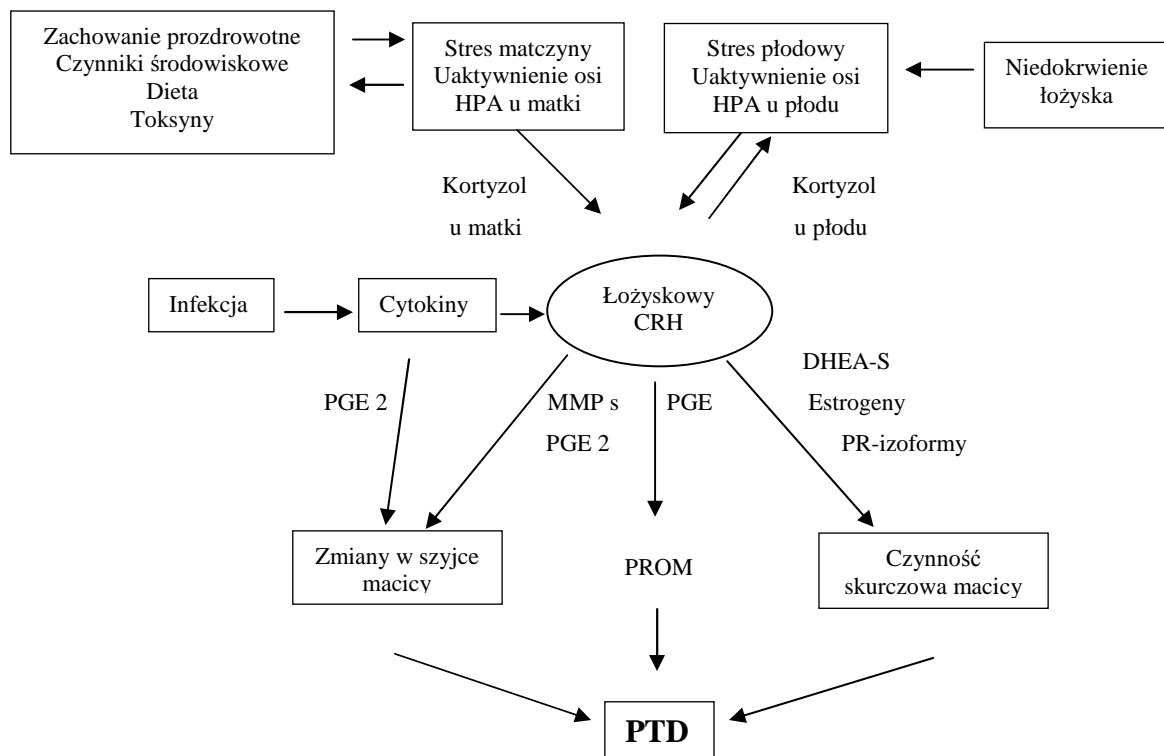
Liczne badania potwierdzają przydatność niektórych markerów w przewidywaniu możliwości przedwczesnego zakończenia ciąży. Kliniczna wartość pomiaru stężeń tych substancji w przewidywaniu ryzyka wystąpienia PTD wymaga dalszych opracowań. Wykorzystywanie ich w praktyce klinicznej jest obecnie mocno ograniczone również ze względu na wysokie koszty badań.



Ryc. 1. Schemat odpowiedzi ze strony matki i płodu w inicjacji porodu przedwczesnego [wg Czajka, 2010].

1.6. GENETYCZNE UWARUNKOWANIA PORODU PRZEDWCZESNEGO

Mechanizmy patofizjologiczne prowadzące do inicjacji porodu zarówno o czasie, jak i przedwczesnego nie są jeszcze do końca poznane. Obecnie wyróżnia się pięć głównych grup mechanizmów prowadzących do porodu przedwczesnego: infekcja wewnątrzmaciczna, przedwczesna aktywacja maczyno-płodowej osi podwzgórze-przysadka-nadnercza, maczyno-łożyskowe zaburzenia naczyniowe, nadmierne rozciągnięcie macicy oraz wpływ niektórych czynników środowiskowych [Hao et al., 2004, Esplin et al., 2005]. Najlepiej poznanym mechanizmem warunkującym wystąpienie PTD jest infekcja wewnątrzmaciczna. Abrahms *et al.* udowodnili, że lipopolisacharydy (LPS – *lipopolysaccharides*) będące jednym z elementów błony komórkowej bakterii G-ujemnych wywołujących zakażenia wewnątrzmaciczne są rozpoznawane przez receptory Toll-like (głównie przez TLR4). Pobudzenie TLR4 powoduje uwolnienie z tkanek szeregu mediatorów reakcji zapalnej w tym wielu cytokin. Cytokiny mają zdolność produkcji prostaglandyn przez kosmówkę, owodnię i doczesną, co prowadzi do wystąpienia przedwczesnej czynności skurczowej macicy [Abrahams et al., 2004]. Na rycinie poniżej przedstawiono prawdopodobne szlaki biorące udział w patomechanizmie porodu przedwczesnego (ryc. 2).



Ryc. 2. Możliwe szlaki patofizjologiczne w etiologii porodu przedwczesnego [wg Drews i Seremak-Mrozikiewicz, 2006].

Od kilku lat natomiast zaczęto wskazywać na silny udział różnic rasowych i innych molekularnych mechanizmów zapoczątkowania porodu przedwczesnego, które nie są jeszcze w pełni wyjaśnione i udokumentowane. Obecnie coraz większą rolę przypisuje się genetycznym uwarunkowaniom wystąpienia porodu przed terminem wskazując, że w wystąpieniu porodu, zarówno tego o czasie jak i przedwczesnego bierze udział około 300 genów [Ward, 2003, Ward et al., 2005]. Są to geny warunkujące wzrost i rozwój płodu, gotowość hormonalną (zegar ciąży), gotowość skurczową macicy, kaskadę przemian fizjologicznych prowadzącą do rozpoczęcia porodu, wytrzymałość błon płodowych, skłonność do rozwoju infekcji, długość i elastyczność szyjki [Ward, 2003].

Uwarunkowania genetyczne porodu przedwczesnego poparte są licznymi badaniami. Jednymi z nich są prace dotyczące częstszego występowania PTD u kobiet, u których poprzedni poród wystąpił przedwcześnie. Na podstawie badań przeprowadzonych w Norwegii, na grupie około 28 tys. kobiet stwierdzono, że ryzyko wystąpienia PTD u kobiet, które w wywiadzie mają już jeden poród przedwczesny wynosi 17,2% (RR=3,9), a u kobiet które przeżyły dwa porody przedwczesne wynosi 28,4% (RR=6,5) [Hoffman et al., 1984]. Podobne badanie przeprowadzone w Szwecji wykazały, że poród przedwczesny samoistny dotyczy 15-18% kobiet po jednym porodzie przedwczesnym i 32% kobiet po dwóch przeżytych porodach przedwczesnych [Kliegman et al., 1990]. Udowodniono również, że u kobiet, które same pochodzą z ciąż ukończonych około 36 tc. ryzyko PTD wynosi 1,18% oraz 2,38% dla kobiet urodzonych przed 30 tc. [Porter et al., 1997]. W wyniku analizy wielu dowodów wykazano również różnice w częstości występowania PTD w różnych populacjach. Udowodniono około dwukrotnie częstsze występowanie PTD u kobiet rasy czarnej w porównaniu z kobietami rasy białej. Różnice te pozostały znamienne nawet po wyeliminowaniu wpływu czynników socjoekonomicznych, mikrobiologicznych, medycznych, behawioralnych i środowiskowych [Goldenberg et al., 1996].

Rodzinną skłonność do porodów przedwczesnych udowodnił również Ward *et al.* w pracy opublikowanej w roku 2005. Badania zostały przeprowadzone w populacji kobiet ze stanu Utah w USA, uznawanej za idealną do prowadzenia tego typu badań genetycznych i molekularnych. Jest to populacja homogenna (potomkowie 10 000 pionierów, potomków populacji północnoeuropejskich), charakteryzująca się jednością religijną (brak konsumpcji alkoholu i palenia tytoniu), niskim wskaźnikiem przyjmowania leków i narkotyków, niską częstością występowania zakażenia wewnątrzodniowego oraz chorób przenoszonych drogą płciową. Rodziny te charakteryzują się ponadto wielodzietnością, dokładnym potwierdzeniem

ojcostwa i szczegółowo prowadzoną dokumentacją genealogiczną. W przeprowadzonej analizie z Utah badaniem objęto 220 kobiet, u których poród odbył się poniżej 35 tc. Ciekawą obserwacją było wskazanie aż 42% kobiet, które podało że u ich matek wystąpił jeden lub więcej PTD, natomiast 35% kobiet podało, że również u ich siostr wystąpił PTD. W przypadku, kiedy co najmniej u 5 kobiet z analizowanej rodziny odnotowano występowanie PTD w wywiadzie, rodzinę taką klasyfikowano jako „*Familial Preterm Delivery*”. W badaniach tych po raz pierwszy dzięki wielopokoleniowej analizie ściśle wykazano skłonność rodzinną do „porodu przedwczesnego idiopatycznego” [Ward, 2003, Ward et al., 2005].

Zidentyfikowano również choroby uwarunkowane jednogеноwo, w których upatruje się związek z wystąpieniem porodu przedwczesnego. Takimi chorobami są: dystrofia miotoniczna płodu uwarunkowana mutacją genu DMPK położonego w chromosomie 19, Zespół Ehlersa-Danlosa, czy neurofibromatoza. Mechanizm występowania PTD w tych chorobach często związany jest z występowaniem wielowodzicia [Rudnik-Schöneborn et al., 1998, Ciara et al., 2006, Varner et al., 2005].

Zróznicowana etiologia PTD wskazuje obecnie na jednoczesowe współdziałanie kilku genów, ich polimorfizmów oraz czynników środowiskowych. Udział wielu genów analizowany jest zarówno w procesach zapalnych prowadzących do wystąpienia PTD oraz w przedwczesnym dojrzewaniu i rozwieraniu się szyjki macicy. W ostatnich latach coraz częściej poddawane są badaniu geny odpowiedzialne za wystąpienie procesu zapalnego i udział cytokin w wystąpieniu porodu przedwczesnego. Badania molekularne przeprowadzane w ostatnich latach dotyczą głównie genów, które w etiologii PTD wpływają na procesy zmiana struktury, aktywności lub różnicy w stężeniu otrzymywanego produktu genu wpływa na procesy związane z porodem przedwczesnym [Seremak-Mrozikiewicz i wsp., 2007]. Stąd w etiologii porodu przedwczesnego bardzo intensywnie rozważany jest udział polimorfizmów genów kandydujących do udziału w tej kompleksowej chorobie [Adams et al., 2004, Ward et al., 2005, Crider et al., 2005]. Polimorfizmem genetycznym określamy jednoczesne występowanie w populacji różnych form alleli dla danego genotypu. Jeśli w populacji zmiana sekwencji nukleotydów występuje częściej niż 1%, to jest ona uważana za zmianę polimorficzną. Badania w PTD dotyczą głównie polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP – *single nucleotide polymorphism*) [Bal i wsp., 2001].

W odniesieniu do PTD najczęściej badane są warianty polimorficzne genów biorących udział w odpowiedzi immunologicznej. Badania te dotyczą najczęściej polimorfizmów genetycznych cytokin – najczęściej badane to: interleukina-1, -4, -6, -10, (IL-1, -4, -6, -10 –

interleukin-1, -4, -6, -10) oraz czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- α – *tumor necrosis factor α*). Na podstawie dotychczas przeprowadzanych badań, w grupie kobiet, które zagrożone były PTD wykazano wzrost stężenia interleukin oraz czynnika martwicy nowotworu. Różnice w stężeniu i aktywności interleukin oraz TNF- α u kobiet z zagrażającym porodem przedwczesnym można wytłumaczyć obecnością polimorfizmu genów kodujących poszczególne cytokiny i czynnik martwicy nowotworów [Seremak-Mrozikiewicz i wsp., 2001, Seremak-Mrozikiewicz i wsp., 2004].

Obecnie uważa się, że wpływ czynników genetycznych na wystąpienie porodu przedwczesnego jest niezaprzeczalny. Liczne badania wykazały, że mechanizmy immunologiczne stanowią integralną część procesów prowadzących do inicjacji porodu, nieprawidłowa odpowiedź immunologiczna może prowadzić do rozwoju PTD, a odpowiedź na zakażenie może podlegać modulacji ze strony czynników genetycznych prowadząc do wystąpienia PTD, modulacji odpowiedzi immunologicznej: stres i zmienność genetyczna. Dalsze badania i coraz lepsze poznanie wzajemnych zależności pomiędzy genami pozwoli na stworzenie testu diagnostycznego, który umożliwi identyfikację pacjentek zagrożonych PTD. Dałoby to możliwość wskazania genetycznych markerów PTD, podjęcia odpowiednio wczesnej profilaktyki i leczenia pacjentek zagrożonych porodem przedwczesnym.

1.6.1. ZNACZENIE POLIMORFIZMÓW GENÓW CYTOKIN W PORODZIE PRZEDWCZESNYM

Cytokiny są cząsteczkami regulującymi proliferację i różnicowanie komórek, a także oddziałując na wiele różnych tkanek cytokiny są mediatorami reakcji zapalnych i immunologicznych oraz biorą udział w regulacji krwiotworzenia. Nazwa ich wywodzi się z greckich słów *citos*, czyli komórka oraz *kinesis* – ruch. Za ich odkrycie w 1986 roku Rita Levi-Montalcini oraz Stanley Cohen zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny. Pomimo dużej ilości białek zaliczanych do cytokin oraz często niekonsekwentnej ze względów historycznych terminologii tej grupy wielu badaczy stara się je usystematyzować. Klasyfikacja cytokin może zostać przeprowadzona na podstawie:

- 1) aktywności biologicznej (cytoliny pro- i przeciwzapalne)
- 2) zdolności wiązania do określonych podjednostek receptorów
- 3) trójwymiarowej struktury.

Z punktu widzenia biochemicznego cytokiny mogą być sklasyfikowane jako białka, peptydy lub glikoproteiny. Cytokiny podobnie jak hormony pełnią niezmiernie istotną rolę w

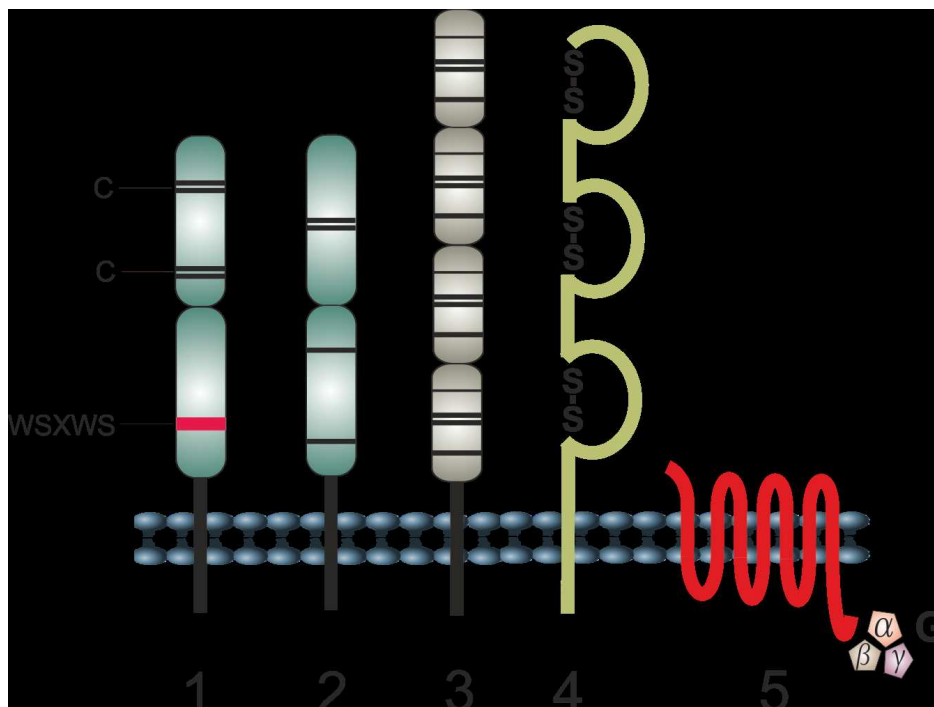
komunikacji pomiędzy komórkami w organizmie poprzez działanie autokytynne, parakynne, jak i endokrynne. Często różnice anatomiczne i strukturalne pomiędzy tymi dwoma są niewielkie. Jednak klasyczne hormony proteinowe krążą w osoczu w nanomolarnym stężeniu (10^{-9}) i może zmienić się ono zazwyczaj o mniej niż jeden rząd wielkości. W przeciwieństwie do nich cytokiny (jak np. IL-6) krążą w stężeniu wyrażanym w pikomolach (10^{-12}), które może zwiększyć się nawet 1000-krotnie podczas urazu lub infekcji. Inną cechą odróżniającą je od hormonów jest szerokie rozpowszechnienie komórkowych źródeł cytokin. Praktycznie wszystkie komórki jądrzaste są silnymi producentami IL-1, IL-6, TNF- α i w przeciwieństwie do klasycznych hormonów takich jak insulina, które są wydzielane z gruczołów dokrewnych (np. trzustki). Mimo, że znaczenie i rola cytokin wykracza poza jeden układ, ze względu na ich ważną rolę w procesach immunologicznych, określa się je często jako hormony układu odpornościowego. Charakterystycznymi cechami cytokin są plejotropia, czyli zdolność określonej cytokiny do oddziaływania na wiele różnych komórek i wywoływania wielu różnych efektów, oraz redundacja, czyli właściwość różnych cytokin do wywierania takiego samego efektu [Jakóbiśiak i wsp., 2000, Annells et al., 2004].

Cytokiny mogą wywierać swoje działanie jedynie dzięki obecności na komórkach swoistych receptorów. Znamioną cechą większości znanych obecnie receptorów dla cytokin jest to, że ich zewnątrzkomórkowe fragmenty są zbudowane z charakterystycznych domen. Najczęściej receptory dla cytokin dzieli się na pięć rodzin i trzy podrodziny:

1. rodzina receptorów cytokin typu I (receptory hemopoetyczne) – wiążą cytokiny posiadające strukturę nazywaną „pęczek czterech helis α ” (ang. *four- α -helix bundle structure*). Zewnątrzkomórkowa dalsza domena tych receptorów zawiera dwie konserwatywne kopie cystein (CC i CC) natomiast bliższa zawiera stałą sekwencję tryptofan-seryna-X-tryptofan-seryna (WSXWS, gdzie X nie jest stałym aminokwasem). Ta rodzina receptorów cytokin może zostać podzielona na trzy podrodziny, które posiadają identyczną podjednostkę sygnalizacyjną ale odmienne podjednostki wiążące cytokiny [Gelert, 2009]:
 - podrodzina receptorów IL-2 (posiadają podjednostkę γ (CD132))
 - podrodzina receptorów GM-CSF (posiadają podjednostkę β (CD131))
 - podrodzina receptorów IL-6 (posiadają podjednostkę gp130)
2. receptory typu II (rodzina receptorów interferonu) – ta grupa wykazuje podobną budowę co receptory typu I. Ich zewnątrzkomórkowe domeny zawierają także konserwatywne cysteiny lecz brak im motywu WSXWS
3. rodzina receptorów TNF

4. rodzina receptorów dla immunoglobulin
5. rodzina receptorów dla chemokin.

Związanie się cytokiny z receptorami w błonie komórkowej prowadzi do uaktywnienia się w komórce szlaków przekazywania sygnału. Sposób wewnątrzkomórkowego przenoszenia sygnału jest podobny dla większości cytokin. Uczestniczą tu między innymi szlaki GTPaz i kinaz MAP, kinazy tyrozynowe z rodziny Src- i Tec- podobnych oraz kinazy-3 fosfatydyloinozytolu (PI-3K). Szlaki te są różnie aktywowane co uzależnione jest od działającej cytokiny. Po przyłączeniu cytokiny do swoistych receptorów ulegają one agregacji, co z kolei aktywuje kinazy tyrozynowe JAK (kinaza Janusowa, ang. *Janus kinase*), fosforylujące reszty tyrozyny. W kilku kolejnych etapach uczynnione zostają białka STAT (ang. *signal transduction and activation of transcription*), cząsteczki sygnalizacyjne i transkrypcyjne, które następnie migrują do jądra komórki, a tam, wiążąc się z odpowiednimi genami, aktywują ich transkrypcję [Ptak i wsp., 2009]. Schemat rodzin receptorów dla cytokin przedstawiono na ryc. 3.



Ryc. 3. Schemat pięciu rodzin receptorów dla cytokin: 1 - receptor cytokin typu I, 2 - receptor typu II, 3 - receptor TNF, 4 - receptor dla immunoglobulin, 5 - receptor dla chemokin [wg Gelert, 2009].

1.7. WYBRANE CYTOKINY I ICH POLIMORFIZMY W PORODZIE PRZEDWCZESNYM

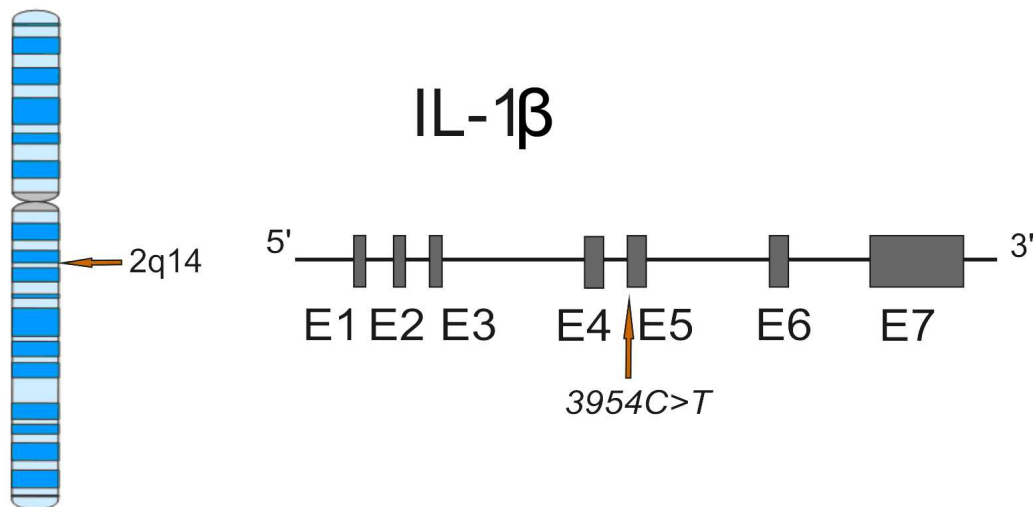
1.7.1. INTERLEUKINA-1

Interleukina-1 jest jednym z głównych regulatorów odpowiedzi immunologicznej i zapalnej oddziaływującym na prawie wszystkie typy komórek. Cytokina ta jest wydzielana głównie przez monocyty i makrofagi, a jednym z czynników najlepiej indukujących jej uwolnienie są lipopolisacharydy stanowiące główny składnik ściany bakterii Gram-ujemnych. Innymi induktorami IL-1 są: sama IL-1, IL-2, IL-3, IL-12, TNF- α , fragmenty dopełniacza C5a, lektyny (PHA, Con A), muramyłodipeptyd (MDP). Istnieją dwa podstawowe typy IL-1: IL-1 α i IL-1 β , które są produktami różnych genów. IL-1 α i IL-1 β powstają w komórce z prekursorów w wyniku działania odpowiednich proteaz. IL-1 α jest już aktywna jako prekursor [Wei et al., 2010].

Do najważniejszych procesów stymulowanych przez IL-1 zaliczamy pobudzenie syntezy IL-2 i jej receptora poprzez oddziaływanie na limfocyty T, wytwarzanie przeciwciał przez limfocyty B, wydzielanie przez różne komórki czynników kolonizacji (G-CSF, GM-CSF, M-CSF), powstawanie neutrofilów i monocytów, wydzielanie czynnika aktywującego płytki i prostaglandyny, wpływ na czynność komórek dendrytycznych, syntezę białek ostrej fazy w wątrobie, resorpcję i przebudowę kości, katabolizm w komórkach mięśniowych, wzrost temperatury ciała i wytwarzanie kortykoliberyny [Jakóbisiak, 2000].

W genomie człowieka znajdują się dwa różne geny kodujące interleukinę 1: *IL-1 α* i *IL-1 β* . Geny te wywodzące się od wspólnego genu *proIL-1* prawdopodobnie powstały w wyniku duplikacji. Obydwa geny *IL-1 α* i *IL-1 β* sklonowano w 1985 roku i zmapowano na chromosomie 2 (2q14; 2q21). Cechą charakterystyczną genu *IL-1 α* jest obecność dwóch odcinków promotorowych (bliższy -200 pz i dalszy - 4,2 kpz) oraz brak motywu TATA typowego dla genów indukowanych. Gen *IL-1 β* , w odróżnieniu od genu *IL-1 α* , posiada motyw TATA, a regiony regulatorowe tego genu znajdują się nawet do kilku tysięcy par zasad powyżej miejsca inicjacji transkrypcji [Vamvakopoulos, 2011]. Białka kodowane przez obydwie geny są syntetyzowane jako białka prekursorowe o masie 31 kDa, które w wyniku działania proteaz stają się postaciami dojrzałymi o masie 17 kDa. IL-1 α i IL-1 β mają tylko 25% homologii w sekwencji aminokwasów, jednakże ich struktura przestrzenna wykazuje znaczne podobieństwo, a dotyczy to w szczególności aminokwasów odpowiedzialnych za tworzenie struktur wiążących receptor. Białka prekursorowe są pozbawione sekwencji

liderowych, a mechanizm ich transportu na zewnątrz komórki nie jest do końca poznany [Rozwadowska i wsp., 2005]. Schemat budowy genu *IL-1 β* przedstawiono na ryc. 4.

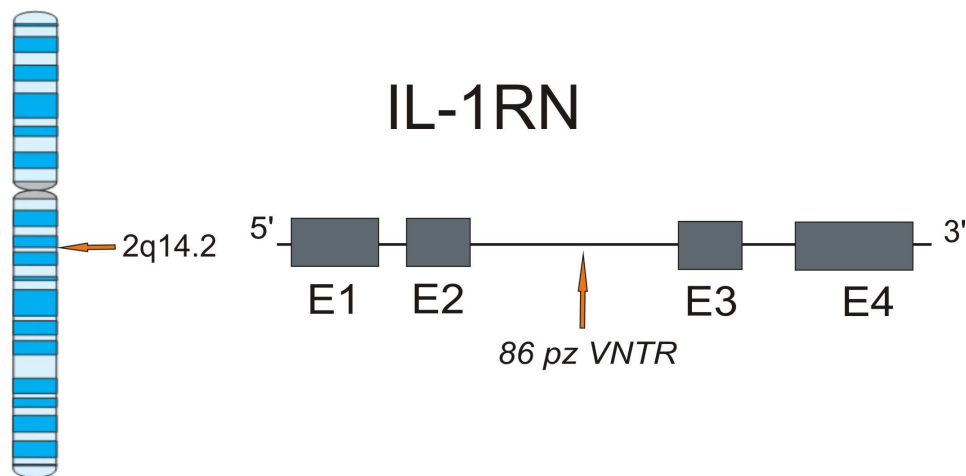


Ryc. 4. Lokalizacja na chromosomie, schemat budowy genu *IL-1 β* i umiejscowienie badanego polimorfizmu +3954C>T.

1.7.2. ANTAGONISTA RECEPTORA INTERLEUKINY-1

Antagonista receptora interleukiny-1 (IL-1RA - *interleukin-1 receptor antagonist*) jest białkiem wiążącym się z receptorami dla interleukin 1 (IL-1R1 i IL-1R2). Białko to zostało opisane przez dwie niezależne grupy badaczy w 1984 roku [Dinarello, 1994]. Białko IL-1RA kodowane przez gen *IL-1RN* zmapowano na długim ramieniu chromosomu 2q14.2 [Patterson et al., 1993]. Istnieją trzy postacie antagonisty IL-1RA – jedna wydzielana na zewnątrz komórki i dwie wewnątrzkomórkowe. Postacie te powstają w wyniku korzystania przez polimerazę RNA z dwóch alternatywnych promotorów (zewnątrz- i wewnątrzkomórkowy), a różne białka wewnątrzkomórkowe powstają w wyniku alternatywnego składania transkryptu [Rozwadowska i wsp., 2005]. Polimorfizm typu VNTR (ang. *variable number of tandem repeats*) spowodowany obecnością w intronie drugim genu *IL-1RN* różnej liczby tandemowych powtórzeń odcinka 86 pz po raz pierwszy opisany został przez Tarlowa *et al.* w 1993 r. Autorzy ci wskazali 5 wariantów allelicznych zawierających od dwóch do sześciu kopii 86 pz. Najczęściej występującym jest wariant zawierający 4 powtórzenia nazwany *IL1RN*1* ale występują także dwa (allel *IL1RN*2*), trzy (allel *IL1RN*4*), pięć (allel *IL1RN*3*) oraz sześć powtórzeń (allel *IL1RN*5*) [Tarlow et al., 1993]. W 2002 roku Vamvakopoulos odkrył nowy szósty wariant polimorfizmu IL-1RN zawierający tylko jedną kopię sekwencji 86 pz (allel *IL1RN*0*). Obecność tego allela potwierdzono u 29-letniego dawcy nerki do

transplantacji w rasie kaukaskiej (279 pacjentów badanych, częstość występowania allele *IL1RN*0* - 0,001%) [Vamvakopoulos, 2001]. Budowę genu *IL-1RN* przedstawia ryc. 5.



Ryc. 5. Lokalizacja na chromosomie, schemat budowy genu *IL-1RN* i umiejscowienie badanego polimorfizmu 86 pz VNTR.

1.7.3. INTERLEUKINA 6

Interleukina- 6 należy do większej grupy białek nazywanych cytokinami typu interleukiny- 6, do której należą również IL-11, czynnik hamujący białaczkę LIF (LIF - *leukemia inhibitory factor*), onkostatyna M (OSM - *oncostatin M*), rzęskowy czynnik neurotrofowy (CNTF - *ciliary neurotrophic factor*), kardiostrofin 1 (CT-1 - *cardiotrophin 1*). Pomimo braku podobieństw w sekwencji aminokwasowej Bazan *et al.* w 1989 roku zaproponował utworzenie rodziny cytokin charakteryzującej się strukturą nazywaną pęczek czterech helis α (*four- α -helix bundle structure*) [Bazan *et al.*, 1989]. Później wyodrębniono w niej dwie podrodziny cytokin: krótkołańcuchowe oraz długołańcuchowe pęczki czterech helis α . Do tej ostatniej podgrupy zalicza się właśnie wiele białek określanych zbiorową nazwą cytokin typu interleukiny 6. Cytokiny te oddziałują na komórki poprzez wspólny szlak transdukcji sygnału wykorzystując podjednostkę receptora gp130. Przez to mogą wywoływać podobne lub wręcz te same reakcje fizjologiczne aktywując szlak białek kinaz tyrozynowych Janusa (JAK) i czynniki transkrypcyjne z rodziny STAT [Heinrich *et al.*, 1998].

IL-6 jest wydzielana przede wszystkim przez monocyty i makrofagi, w niewielkich ilościach także przez: fibroblasty, komórki śródbłonna, limfocyty T i B, keratynocyty, osteoblasty, chondrocyty i komórki owodni. Głównym czynnikiem indukującym wytwarzanie IL-6 jest IL-1, interferony, TNF, LPS i wirusy. IL-6 natomiast hamuje zwrótnie wytwarzanie

TNF i IL-1. Indukuje ona także uwalnianie antagonisty receptora dla IL-1 (IL-1RA). IL-6 należy do grupy cytokin, których receptor składa się z różnych łańcuchów α wiążących ligand i identycznego łańcucha β nie wiążącego liganda, ale przenoszącego sygnał. Rozpuszczalny receptor dla IL-6 wzmacnia jej działanie wiążąc się z nią, a następnie obecnym w błonie komórkowej przenoszącym sygnał łańcuchem β . Interleukina 6 jest głównym stymulatorem wytwarzania białek ostrej fazy. W stanach zapalnych poziom IL-6 może wzrastać nawet 100-krotnie. Jej stężenie w surowicy uznaje się za wczesny i czuły, ale niespecyficzny, wskaźnik różnych stanów zapalnych. Będąc ważnym ogniwem w rozwoju reakcji zapalanej i odpowiedzi immunologicznej bierze udział w mechanizmach kontrolujących te reakcje [Jakóbsiak, 2000].

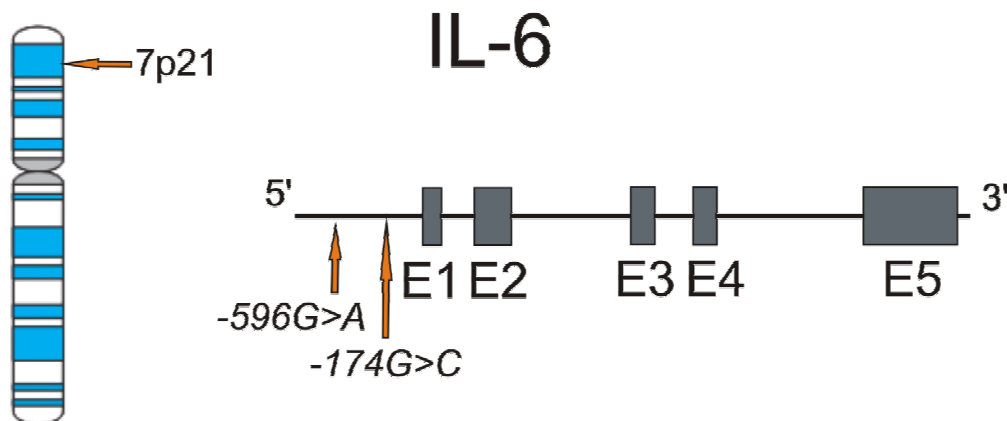
Interleukina-6 charakteryzuje się wielostronnością oddziaływań i może być uznana za jeden z głównych czynników regulujących mechanizmy obronne. Jest ona α -helikalną cytokiną o wielkości rzędu 20 kDa. W systemie immunologicznym pełni zarówno funkcję prozapalną jak i przeciwzapalną. Pełni również rolę w metabolizmie kostnym i bierze udział w resorpcji kości, w progresji nowotworowej, syntezie białek ostrej fazy w wątrobie. Pobudza przysadkę do wytwarzania kortykotropiny oraz jest jednym z głównych czynników biorących udział w podwyższaniu temperatury ciała i pełni istotną funkcję w stymulacji wzrostu keratynocytów i różnicowania komórek nerwowych. IL-6 wraz z IL-3, bierze udział w procesie krwiotworzenia, wpływając na proliferację i różnicowanie megakariocytów, powstawanie kolonii granulocytów i makrofagów oraz wytwarzanie płytek krwi. Prawidłowe stężenie IL-6 w organizmie ludzkim wynosi około 1 pg/mL i ulega niewielkim zmianom podczas cyklu menstruacyjnego, podnosi się w przebiegu procesu nowotworowego i podczas zabiegów chirurgicznych [Fishman et al., 1998, Wei et al., 2010]

IL-6 oddziałuje na komórki za pośrednictwem receptorów cytokin rodziny typu I i podrodziny receptorów IL-6 (posiadają podjednostkę gp130). Poznano dwa rodzaje receptorów dla interleukiny 6: IL-6R o małym powinowactwie, który po związaniu z IL-6 tworzy kompleks z gp130 i zapoczątkowuje aktywację kinazy tyrozynowej, oraz rozpuszczalną postać receptora (sIL-6R - *soluble interleukin-6 receptor*), wiążącą się z IL-6, a następnie z obecnym w błonie komórkowej łańcuchem β – gp130, co prowadzi do transdukcji sygnału i przeniesienia go do wnętrza komórki [Łukaszewicz i wsp., 2007, Wei et al., 2010].

Gen kodujący IL-6 położony jest na chromosomie 7p21-p14 [Seghal, 1986] pomiędzy markerami D7S135 i D7S370. Sekwencja nukleotydowa genu *IL-6* jest podobna do sekwencji genu *G-CST* co może sugerować możliwy związek ewolucyjny tych dwóch genów.

Sekwencja kodująca o wielkości około 5 kb składa się z 5 egzonów i 4 intronów [Zilberstein et al., 1986]. Białko może mieć masę molekularną od 21 do 28 kDa i 212 aminokwasów, z których 28 tworzy sekwencję sygnałową, po jej odcięciu powstaje dojrzałe białko zbudowane ze 184 aminokwasów [Brakenhoff et al., 1989]. W promotorze genu występują sekwencje wiążące takie czynniki transkrypcyjne, jak: NFκB, AP-1, C/EBP i CREB. Regulują one transkrypcję genu *IL-6* w sposób zależny od typu komórki i czynnika aktywującego, przy czym CREB jest represorem, a pozostałe czynniki są aktywatorami transkrypcji [Kontyn i wsp., 2009].

Regulacja ekspresji *IL-6* odbywa się zarówno na poziomie transkrypcji, jak i translacji. W obrębie regionu promotorowego genu *IL-6* istnieje wiele sekwencji. Poza kasetami TATA i GATA są miejsca wiązania wielu czynników transkrypcyjnych: AP-1 (ang. *activation on protein 1*), NF-κappa B (ang. *nuclear factor κB*), MRE (ang. *multiple response element*), GRE (ang. *glucocorticoid response element*). W promotorze genu *IL-6* znajduje się kilka miejsc polimorficznych. Najczęściej opisywanym w literaturze jest polimorfizm $-174G>C$, który znajduje się w obrębie sekwencji MRE [Kishimoto, 1989, Santhanam et al., 1991]. Inne z polimorfizmów promotora genu *IL-6* to $-596G>A$, $-572G>C$ oraz polimorficzny obszar A_nT_n w pozycji od -392 do -373 [Fishman et al., 1998]. Schemat budowy genu *IL-6* przedstawia ryc. 6.



Ryc. 6. Lokalizacja na chromosomie, schemat budowy genu *IL-6* i rozmieszczenie badanych polimorfizmów $-596G>A$ oraz $-174G>C$.

1.7.4. CZYNNIK MARTWICY NOWOTWORÓW

Czynnik martwicy nowotworów (TNF – *tumor necrosis factor*): TNF-α (kachektyna) oraz TNF-β (limfotoksyna) należy do dużej nadrodziny białek (TNF-α, TNF-β, LT-α, LT-β,

TRAIL, ligandy: CD27, CD30, CD40, CD95, 4-1BB i OX40). Białka te regulują proliferację, aktywację i różnicowanie wielu komórek, a także mogą indukować w nich śmierć przez apoptozę.

TNF- α jest jedną z głównych cytokin odpowiedzi zapalnej i immunologicznej. Razem z innymi cytokinami może on wzmacniać proliferację i różnicowanie limfocytów B, a razem z IL-2 i IL-6 wzmacnia proliferację limfocytów T. Łącznie z IL-2 TNF- α stymuluje proliferację i cytotoksyczność komórek NK, a także powstawanie komórek LAK i limfocytów Tc. TNF- α działa chemotaktycznie na neutrofile i monocyty. Wzmaga cytotoksyczność monocytów i makrofagów. Aktywuje neutrofile, zwiększając ich właściwości fagocytarne i przyspiesza ich uwalnianie ze szpiku. Stymuluje wytwarzanie (przez neutrofile) reaktywnych związków tlenowych i wzmacnia ich właściwości bakteriobójcze i cytotoksyczne. Swój wpływ na układ odpornościowy TNF- α wywiera nie tylko bezpośrednio lecz także poprzez indukowanie uwalniania wielu cytokin, np. IFN- γ , IL-6, IL-1. TNF- α jest ważnym elementem odporności przeciwzakaźnej. Jest on współodpowiedzialny za zmniejszenie w tkance tłuszczowej zapasów lipidowych, sprzyjając tym samym rozwojowi kacheksji (stąd nazwa kachektyna). Największym zainteresowaniem naukowców i najczęściej badanym działaniem TNF- α jest jego działanie przeciwnowotworowe. Działanie TNF- α na komórki nowotworowe wynika zarówno z bezpośredniego oddziaływania, jak i indukowania zmian w naczyniach krwionośnych nowotworu. TNF- α pobudza odpowiedź immunologiczną przeciwnowotworową. Działając bezpośrednio na komórki nowotworowe TNF- α może indukować ich apoptozę, hamować proliferację, indukować różnicowanie [Jakóbisiak, 2000, Annels et al., 2004, Liang et al., 2010].

TNF- α jest wytwarzany głównie przez makrofagi, monocyty, w niewielkich ilościach wytwarzają go neutrofile, keratynocyty, fibroblasty i komórki tuczne. Najsilniejszym bodźcem do wytwarzania TNF- α przez makrofagi są lipopolisacharydy (LPS) ścian bakteryjnych, które wzmagają produkcję TNF- α na poziomie transkrypcji i translacji. Lipopolisacharydy są odpowiedzialne za wzmożone wytwarzanie TNF- α w zakażeniach bakteryjnych. Wytwarzanie i uwalnianie TNF- α jest stymulowane przez INF- γ , IL-1 a także autokrynowo przez sam TNF- α . Inhibitorami wydzielania TNF- α są glikokortykosteroidy, TGF- β , IL-4, IL-10, IL-13 i prostaglandyna E2 [Holmgren et al., 2008].

Na komórkach istnieją dwa typy receptorów dla TNF: TNFR1 (CD120a) i TNFR2 (CD120b). Różnią się one masą, stopniem glikozylacji oraz powinowactwem i mogą przekazywać komórce nieco odmienne sygnały. Receptory dla TNF- α występują prawie we wszystkich komórkach jądrzastych, a niektóre komórki, np. fibroblasty, limfocyty i komórki

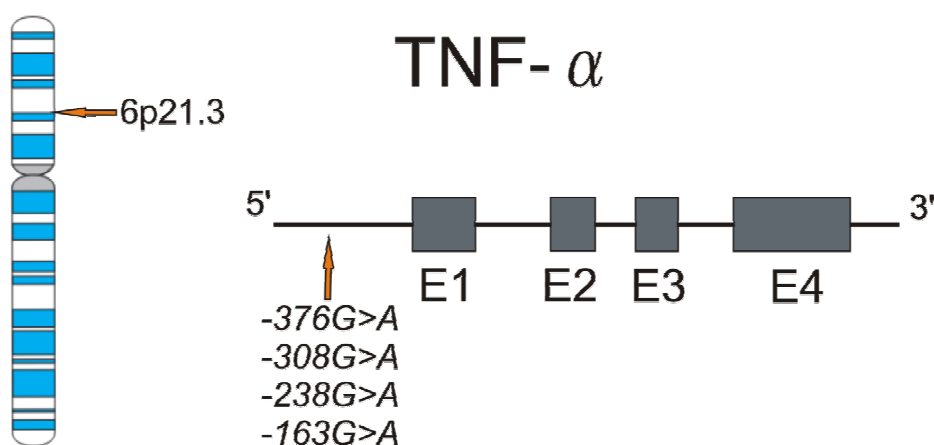
śródbłonna mają obydwa typy receptorów (większość działań TNF- α odbywa się poprzez receptory TNFR1). Nie wykazano powinowactwa pomiędzy liczbą receptorów obecnych na komórce i jej odpowiedzią na TNF- α . Ekspresję tych receptorów na komórkach zwiększają IL-1, IFN- γ , IL-2 i sam TNF- α [Korbowicz, 2006].

Geny kodujące TNF- α oraz TNF- β należą, jako jedyne geny cytokin, do genów głównego układu zdolności tkankowej. Gen kodujący TNF jest zlokalizowany w segmencie 6p23-6q12 na chromosomie 6. Jest to specyficzna lokalizacja, gdyż znajduje się on między HLA-B i HLA-DR. W obrębie *locus* MHC klasy III oprócz TNF od strony 3' łańcucha DNA znajdują się również geny kodujące białka dopełniacza i limfotoksynę β (LT- β). Po stronie 5' gen *TNF* sąsiaduje z genem limfotoksyny α (LT- α). W porównaniu z genami kodującymi inne cytokiny, jak również enzymy jest on niewielki (3 kb) i zawiera tylko 4 egzony, z czego egzon 4 koduje aż 80% ostatecznego białka [Korbowicz, 2006, Nedwin et al., 1985].

U ludzi gen *TNF- α* koduje 26kDa pro-polipeptyd typu II - stabilny homotrimer wytwarzany początkowo jako integralne białko błonowe. Może występować w formie związanej z błoną jak również w formie rozpuszczalnej. Pro-TNF- α na powierzchni komórki jest biologicznie aktywny i jest zdolny do wywołania odpowiedzi immunologicznej sygnalizując poprzez szlak okołokrynowy (juktakrynowy). Może ona ulec także proteolitycznemu przecięciu przez metaloproteinazę TACE (ADAM17) (ang. *TNF α converting enzyme*) pomiędzy Ala76-Val77 łańcucha aminokwasowego. Uwolniony zostaje wówczas rozpuszczalne białko wielkości 17 kDa. Gen *TNF- α* na końcu 3' obszaru nieulegającego translacji (3'UTR) zawiera element bogaty w AU wpływający na stabilność mRNA – ARE (ang. *AU-rich element*). Natomiast koniec 5' genu zawiera sekwencje TATA czy GC pozwalające na wiązanie czynników transkrypcyjnych [Korbowicz, 2006]. Ekspresja genu TNF- α jest głównie regulowana na poziomie transkrypcji i niezmiernie istotne mogą być zmiany sekwencji nukleotydowej genu w jego części regulacyjnej, którą jest promotor [Goldfeld i Maniatis, 1989, Goldfeld et al., 1990, Goldfeld et al., 1993]. Promotor genu *TNF- α* sklonowany i zsekwencjonowany przez Takashiba *et al.* w 1993 roku zawiera kilka miejsc polimorficznych m.in. w pozycjach -1031, -863, -857, -851, -419, -376, -308, -238, -163. Najczęściej badanymi polimorfizmami genu *TNF- α* są tranzycje guaniny na adeninę w pozycjach -308 i -238. Znaczenie polimorfizmu -308G>A opisanego po raz pierwszy przez Wilsona w 1993 roku nie jest dokładnie poznane, chociaż niektórzy badacze sugerują, że może on powodować utratę miejsca wiążącego czynnik transkrypcyjny AP-2 [Kroeger et al., 1996, Kroeger et al., 1997].

Polimorfizm $-238G>A$ zlokalizowany jest w liczącym 108 pz obszarze represorowym promotora genu $TNF-\alpha$ (od -208 do -172 pz) [Juszczynski i Warzocha, 2002]. D'Alfonso (1994) zaobserwowali natomiast, że pozycja -238 promotora genu $TNF-\alpha$ jest zlokalizowana w obrębie sekwencji podobnej do sekwencji nazywanej Y-box. Jest to motyw regulatorowy jeden z dwóch typowych dla regionów paromotorowych genów klasy II MHC [D'Alfonso, 1994].

Polimorfizm $-376G>A$ powoduje zmianę w wiązaniu czynnika transkrypcyjnego OCT-1 (ang. *octamer binding transcription factor*). Substytucja G na A w tej pozycji w badaniu Knight *et al.* (1999) zwiększyła o 35% podstawową aktywność transkrypcyjną promotora genu TNF , ale nie wpływała na aktywność transkrypcyjną indukowaną przez LPS [Knight *et al.*, 1999, Juszczynski i Warzocha, 2002]. Miejsce w promotorze genu $TNF-\alpha$, w którym znajduje się polimorfizm $-163G>A$ znajduje się w obrębie sekwencji bogatej w zasady GC wiążącej czynniki transkrypcyjne Egr-1 (Krox-24) (ang. *early growth response protein 1*) i Sp-1 [Krämer *et al.*, 1994, Juszczynski i Warzocha, 2002]. Częstość występowania zmutowanego allele A w omawianych polimorfizmach genu $TNF-\alpha$ w grupie 96 zdrowych mieszkańców Wielkiej Brytanii populacji kaukaskiej szacuje się następująco: $-376G>A$ - 2,2%; $-308G>A$ - 26,5%; $-238G>A$ - 6,8% oraz -163 - 0% [Simmonds *et al.*, 2004]. Schemat budowy genu $TNF-\alpha$ wraz z omawianymi w pracy polimorfizmami promotora genu przedstawia ryc. 7.

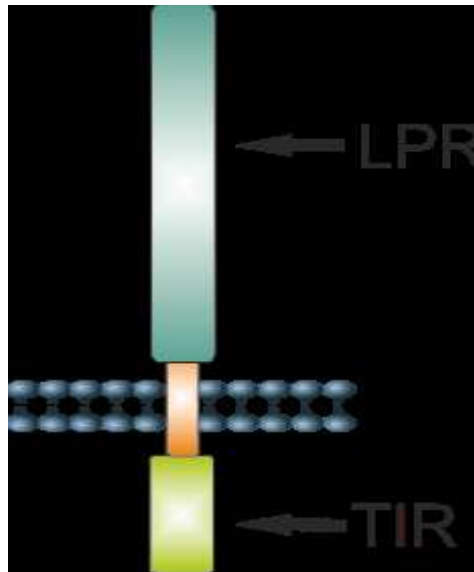


Ryc. 7. Lokalizacja na chromosomie, schemat budowy genu $TNF-\alpha$ i rozmieszczenie w promotorze badanych polimorfizmów $-376G>A$, $-308G>A$, $-238G>A$ oraz $-163G>A$.

1.7.5. RECEPTORY TOLL-LIKE

Receptory Toll-like (TLR – *Toll-like receptors*) są jedną z rodzin receptorów, które biorą udział w reakcji pomiędzy układem odpornościowym stymulowanym przez mikroorganizmy a reakcją obronną organizmu gospodarza. Aktywacja receptorów Toll-like powoduje uwalnianie peptydów antybakteryjnych oraz cytokin zapalnych [Szczepański i wsp., 2004]. Receptory Toll-like są ważnym elementem aktywującym i pobudzającym odporność wrodzoną i nabytą. Po raz pierwszy opisano je u embrionów muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*), u których sterują wykształceniem się grzbietowo-brzuszej polaryzacji ciała w okresie embrionalnym a w życiu dorosłym warunkują odporność przeciwwzakaźną. Obecnie opisano 15 rodzajów receptorów TLR (TLR1 – TLR15). Stwierdzono, że receptory TLR po połączeniu z różnymi ligandami zwanymi PAMP (ang. *pathogen-associated molecular patterns*) aktywują układ odpornościowy poprzez indukcję i syntezę wielu cytokin prozapalnych oraz zwiększają ekspresję antygenów zgodności tkankowej [Jansen et al., 2003]. Receptory TLR charakteryzują się występowaniem tych samych elementów strukturalnych i występują na powierzchniach komórek układu odpornościowego, na komórkach odpornościowych układu pokarmowego i oddechowego, śródbłonku naczyń, adipocytach, kardiomiocytach, fibroblastach, komórkach śledziony, nerkach, grasicy, płucach i mikrogleju [Larski, 2002]. TLR stanowią jeden z najważniejszych naturalnych elementów obrony, który stymuluje aktywację układu odpornościowego. Tę funkcję osiągnęły dzięki kontaktom z wieloma dostającymi się do organizmu mikroorganizmami.

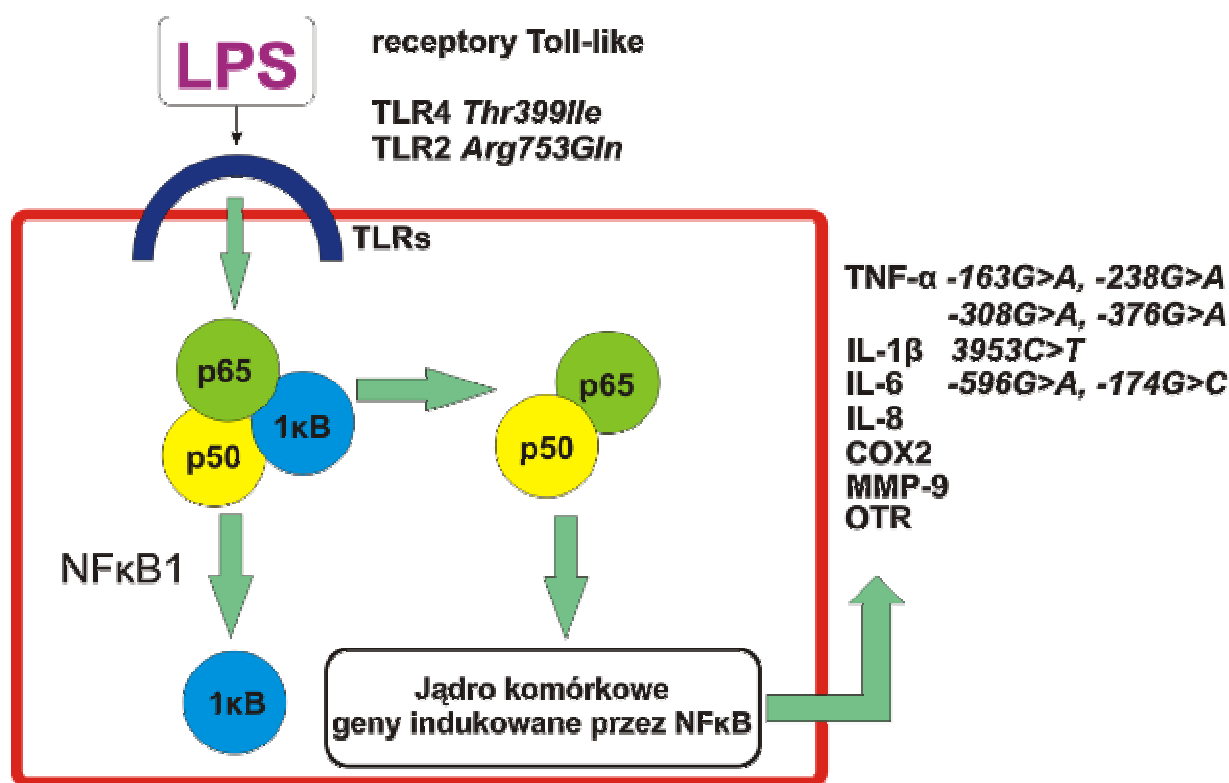
Budowa wszystkich receptorów TLR jest bardzo podobna. Są one zbudowane z glikoprotein o masie molekularnej od 90 do 115 kDa i składają się z części zewnątrzkomórkowej utworzonej przez domeny z powtórzeniami bogatymi w leucynę – LPR (ang. *leucine reach repeats*), które rozpoznają ligandy PAMP oraz części przezbłonowej i wewnątrzcytoplazmatycznej wykazującej homologię z receptorem IL-1R1 nazywaną domeną TIR (od Toll-IL-1R). Na C-terminalnym końcu receptory TLR ułożone są jednostki do regulacji przekazywania sygnału i transdukcji. Na N-terminalnym końcu występuje długi, składający się z 31 aminokwasów tzw. region flankujący [Tokarz-Deptuła i wsp., 2005] (ryc. 8).



Ryc. 8. Ogólny schemat budowy receptorów Toll-like [wg Ptak i wsp., 2009].

W ostatnich latach w doniesieniach naukowych wskazano na korelację aktywności receptorów TLR z występowaniem niektórych patologii położniczych, jak stanu przedrzucawkowego, bakteryjnej waginozy u kobiet ciężarnych, zakażenia wewnątrzrodniowego, przedwczesnego pęknięcia błon płodowych oraz porodu przedwczesnego [Genc et al., 2004, Kim et al., 2004].

Najlepiej poznany mechanizm prowadzącym do wystąpienia PTD, ze ścisłym wskazaniem na rolę receptorów TLR, jest mechanizm bazujący na modelu przedstawionym przez Romero *et al.* Na podstawie tego modelu uważa się że LPS bakterii Gram-ujemnych rozpoznawane są przez receptory z rodziny TLR, głównie receptory TLR-4. Pobudzenie tego receptora, poprzez aktywację szeregu białek powoduje indukcję syntezy szeregu cytokin, metaloproteinaz, enzymów. Czynnikiem bezpośrednio pobudzającym syntezę tych substancji jest czynnik jądrowy NF- κ B. Prowokuje to uwolnienie przez makrofagi tkanek macicznych, płodowych i łożyskowych mediatorów reakcji zapalnych, w tym wielu cytokin. Cytokiny te mają zdolność stymulacji produkcji prostaglandyn przez owodnię, kosmówkę i doczesną, co prowadzi do wystąpienia przedwczesnej czynności skurczowej macicy [Romero et al., 2010]. Stąd tak dużo badań obecnie podkreśla rolę polimorfizmu genów receptorów TLR w inicjacji porodu przedwczesnego (ryc. 9).



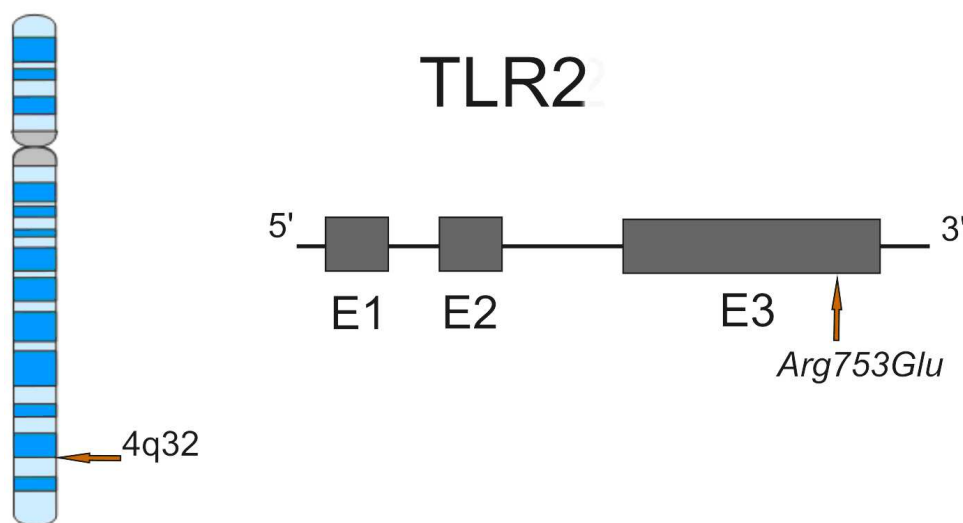
Ryc. 9. Udział receptorów Toll-like w etiologii porodu przedwczesnego [wg Kim et al., 2004].

1.7.6. RECEPTOR TLR2

TLR2 łącząc się z ligandami PAMP wielu drobnoustrojów, a także z receptorami CD (receptory różnicowania) występującymi między innymi na komórkach układu immunologicznego powoduje powstanie wobec nich odporność. Wykazano, że u ludzi TLR2 przy współdziałaniu z TLR4 i cząsteczek CD 80 i CD 86 wzmaga syntezę TNF-α, IL-10, IL-12, chemokin oraz oddziałuje na czynnik jądrowy NF-*kappa* B w komórkach układu odpornościowego. Uważa się, że TLR2 jest głównym receptorem wśród TLR. Bierze on udział wraz z TLR3 i TLR4 w stymulacji kinaz białkowych komórek mikroorganizmów zainfekowanych bakteriami Gram-dodatnimi [Zhang et al., 2004] (ryc. 9).

Gen kodujący TLR2 u ludzi zlokalizowany jest na chromosomie 4q32 i składa się z czterech eksonów, które kodują 784 aminokwasy. Omawiany w prezentowanej pracy polimorfizm genu *TLR2* znajduje się w trzecim eksonie i spowodowany jest substytucją adeniny w miejsce guaniny w pozycji nukleotydowej 20877. Powoduje to zmianę sekwencji aminokwasowej białka w miejsce argininy w pozycji 753 wbudowana zostaje glutamina

(*Arg753Gln*). W sekwencji białka polimorfizm ten znajduje się w domenie wewnątrzkomórkowej (ryc. 10).



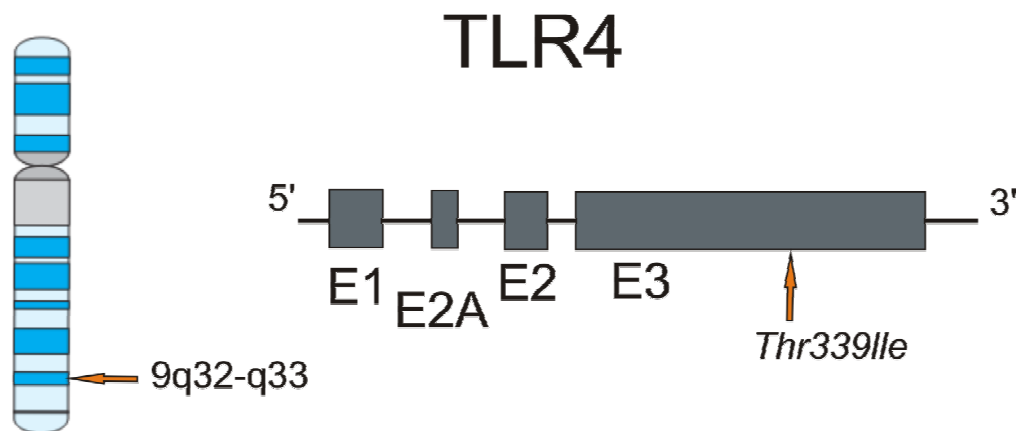
Ryc. 10. Lokalizacja na chromosomie, schemat budowy genu *TLR2* i umiejscowienie badanego polimorfizmu *Arg753Glu*.

1.7.7. RECEPTOR TLR4

TLR4 po połączeniu się z ligandami PAMP zwiększa odporność organizmu poprzez podwyższenie syntezy TNF- α , IL-1 oraz IL-12. Udowodniono, że receptor TLR4 poprzez oddziaływanie na mechanizm białek Fas-FasL bierze udział w patogenezie przewlekłego zapalenia stawów u ludzi. Znacznik ten wpływa także na procesy starzenia się komórek somatycznych oraz rozwój kości. Wzmaga on też odporność skóry. Receptor ten ma również zdolność łączenia się z taksolem u roślin, który stosowany jest jako lek przeciwnowotworowy między innymi u ludzi. Doświadczalnie wykazano, że w organizmach ssaków pozbawionych TLR4, wskutek obniżonej syntezy cytokin i chemokin dochodzi do osłabionej odpowiedzi immunologicznej wobec wielu mikroorganizmów [Tokarz-Deptuła i wsp., 2005, Kim et al., 2005].

TLR4 jest transbłonową glikoproteiną o wielkości 100 kDa. Ludzkie cDNA kodowane jest przez prekursor złożony z 839 aminokwasów, który zawiera 23 aminokwasową sekwencję sygnałową a następnie domenę zewnątrzkomórkową (608 aa), część przezbłonową (21 aa) oraz domenę cytoplazmatyczną (187 aa). Gen kodujący receptor TLR4 u ludzi został zmapowany w pozycji 9q32-q33 i składa się z czterech eksonów. Najczęściej badanymi polimorfizmami są *Asp299Gly* i *Thr399Ile*. W pracy analizowano polimorfizm *Thr399Ile*

spowodowany zamianą cytozyny na tyminę w pozycji nukleotydowej 8993 ($8993C>T$) (ryc. 11).



Ryc. 11. Lokalizacja na chromosomie, schemat budowy genu *TLR4* i umiejscowienie badanego polimorfizmu *Thr339Ile*.

Ponieważ proces zapalny w PTD jest regulowany przez siatkę cytokin wydaje się, że właśnie badanie polimorfizmów genów cytokin jest najbardziej trafne. W etiologii PTD wywołanym czynnikiem zakaźnym, jakim jest aktywacja osi TNF- α poprzez działanie LPS błon komórkowych i aktywację receptorów TLR coraz szerzej rozważa się zmienioną odpowiedź niektórych cytokin, których synteza uwarunkowana jest pobudzeniem ich genów poprzez działanie czynnika jądrowego NF-*kappa* B. W pracy zwrócono uwagę na polimorfizm genów kilku cytokin włączonych w odpowiedź zapalną osi TNF- α . IL-1 β jest kluczową cytokiną prozapalną. IL-1 β stymuluje produkcję TNF- α . Wspólnie z pozostałymi cytokinami IL-6 oraz TNF- α , IL-1 β stymuluje produkcję prostaglandyn przez kosmówkę, owoodnię i doczesną indukując tym samym czynność skurczową macicy [Jansen et al., 2003]. Dodatkowo TNF- α stymuluje produkcję białek ostrej fazy w wątrobie, w tym CRP. Antagonista receptora IL-1 RA, jest cytokiną o działaniu przeciwzapalnym i blokuje aktywność IL-1 β wpływając jednocześnie na zahamowanie produkcji prostaglandyn przez owoodnię i kosmówkę i zakończenie procesów zapalnych które indukuje IL-1 β . Stąd badania dotyczące polimorfizmów genetycznych cytokin w regulacji odpowiedzi zapalnej w przebiegu porodu przedwczesnego mogą być pomocne w wyjaśnieniu podstaw tego powikłania. Receptory Toll-like są kluczowymi receptorami w odpowiedzi na działanie czynnika zapalnego indukującego poród przedwczesny. Zmiany ich aktywności spowodowane obecnością polimorfizmów genetycznych są prawdopodobnie jednym z ważniejszych czynników wpływających na rozwój PTD [Kim et al., 2004, Kim et al., 2005].

2. CEL PRACY

Celem pracy była ocena znaczenia wybranych polimorfizmów genów układu cytokin oraz receptorów Toll-like w etiologii porodu przedwczesnego w populacji kobiet polskich.

Cel ten realizowano poprzez:

1. Analizę częstości występowania genotypów i alleli w grupie kobiet, u których ciąża zakończyła się w terminie 22+0 do 36+6 tc. oraz zdrowych kobiet, u których ciąża zakończyła się o czasie (>37+0 tc.). Analizie poddano kolejno:
 - a. polimorfizm +3953C>T genu *IL-1β*
 - b. polimorfizm 86 pz VNTR genu *IL-1RN*
 - c. polimorfizmy -174G>C i -596G>A genu *IL-6*
 - d. polimorfizmy -163G>A, -238G>A, -308G>A, -376G>A genu *TNF-α*
 - e. polimorfizm *Arg753Gln* (20877G>A) genu *TLR2*
 - f. polimorfizm *Thr399Ile* (8993C>T) genu *TLR4*.
2. Ocena wybranych parametrów demograficznych, klinicznych i laboratoryjnych w obydwu badanych grupach ciężarnych.
3. Ocena parametrów urodzeniowych noworodków w badanych grupach ciężarnych.
4. Analizę częstości współwystępowania genotypów i frekwencji haplotypów wybranych polimorfizmów w badanych grupach ciężarnych.
5. Analizę korelacji parametrów klinicznych i laboratoryjnych z występowaniem badanych polimorfizmów genetycznych.

3. MATERIAŁ I METODYKA

3.1. CHARAKTERYSTYKA BADANYCH GRUP

Badania przeprowadzono w 2 grupach kobiet: 150 ciężarnych, u których ciąża zakończyła się porodem przedwczesnym oraz 150 zdrowych ciężarnych, u których ciąża zakończyła się w terminie. Ciężarne kwalifikowane były do badań w Klinice Perinatologii i Chorób Kobietych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz w Oddziale Ginekologiczno-Położniczym Szpitala Wojewódzkiego w Poznaniu w okresie od stycznia 2010 roku do czerwca 2011 roku.

Kwalifikowanie kobiet ciężarnych do grup następowało po zebraniu danych klinicznych oraz spełnieniu kryteriów włączenia i wyłączenia z badań przedstawionych poniżej. Wszystkie pacjentki zostały poinformowane o celu i zakresie przeprowadzanych badań i wyraziły na nie świadomą, pisemną zgodę. Na przeprowadzenie badań została udzielona zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu nr 103/10.

3.1.1. GRUPA BADANA

Grupę badaną stanowiło 150 kobiet, u których ciąża zakończyła się porodem przedwczesnym (średnia wieku $29,2 \pm 5,6$, zakres 15-45 lat, mediana 29 lat; średni tydzień zakończenia ciąży $33,7 \pm 2,8$ tc., zakres 22-36 tc., mediana 35 tc.).

Kryteria włączenia do grupy badanej:

1. Zakończenie ciąży w przedziale czasowym od 22+0 do 36+6 tygodniem trwania ciąży.
2. Obecność klinicznych wykładników porodu przedwczesnego (regularna czynność skurczowa, bóle podbrzusza, oddzielenie czopa śluzowego, rozwieranie szyjki macicy) i/lub przedwczesne pęknięcie błon płodowych.
3. Ciąża pojedyncza.
4. Przynależność do rasy kaukaskiej, narodowość polska.

Poród przedwczesny rozpoznawano jako występowanie regularnej czynności skurczowej macicy >6 skurczów/godzinę potwierdzonej w zapisie kardiograficznym

połączonych ze skracaniem i rozwieraniem szyjki macicy potwierdzonej badaniem ginekologicznym wewnętrznym. Poród przedwczesny rozpoznawano w momencie wystąpienia powyższych objawów w zakresie 22+0 do 36+6 tygodnia czasu trwania ciąży.

W celu dokładnej analizy wpływu badanych polimorfizmów genetycznych na występowanie PTD całą grupę kobiet badanych podzielono na trzy podgrupy w zależności od tygodnia zakończenia ciąży: a/ 22-28 tc., b/ 28-32 tc., c/ 32-36 tc.

3.1.2. GRUPA KONTROLNA

Grupę kontrolną stanowiło 150 zdrowych kobiet ciężarnych, u których ciąża zakończyła się porodem o czasie (średnia wieku 29,0±3,7 lat, zakres 16-41 lat, mediana 28 lat; średni tydzień zakończenia ciąży 39,3±1,2 tc., zakres 37-41 tc., mediana 39 tc.). U wszystkich tych kobiet ciąża zakończyła się urodzeniem zdrowego, donoszonego noworodka (średnia masa urodzeniowa 3497,13±399,46, zakres 2520-4610g, mediana 3505g).

Kryteria włączenia do grupy kontrolnej:

1. Zakończenie ciąży > 37+0 tygodnia trwania ciąży.
2. Ciąża pojedyncza.
3. Prawidłowy przebieg ciąży.
4. Przynależność do rasy kaukaskiej, narodowość polska.

Charakterystyka pacjentek z obydwu grup - badanej i kontrolnej - przedstawiona została w tabeli 2.

Tab. 2. Dane kliniczne pacjentek z grupy badanej (150 osób) i kontrolnej (150 osób).

<i>Analizowane zmienne</i>	<i>Grupa badana PTD (n=150)</i>	<i>Grupa kontrolna (n=150)</i>	<i>p</i>
<i>wiek (lata)</i> <i>średnia (± SD)</i> <i>mediana</i> <i>minimum/maksimum</i>	29,2 ± 5,6 29 15 / 45	29,0 ± 3,7 28 16 / 41	ns
<i>tydz. zakończenia ciąży (tc.)</i> <i>średnia (± SD)</i> <i>mediana</i> <i>minimum/maksimum</i>	33,7 ± 2,8 35 22 / 36	39,3 ± 1,2 39 37 / 41	<0,000

Kryteriami wyłączenia pacjentek zarówno z grupy badanej i kontrolnej była obecność ciąży wielopłodowej, nadciśnienie ciążowe/stan przedrzucawkowy, wady macicy, niewydolność cieśniowo-szyjkowa, obecność wad płodu, cukrzyca ciążowa, wielowodzie i małowodzie, obecność infekcji uogólnionej oraz jatrogeny poród przedwczesny, obumarcie wewnątrzmaciczne oraz obecność chorób internistycznych matki.

U wszystkich kobiet na podstawie dokumentacji medycznej analizowane były:

-dane kliniczne matki: wiek, tydzień zakończenia ciąży, rodność, wzrost, masa ciała matki przed i po ciąży,

-dokonywano również pomiaru ciśnienia tętniczego (skurczowego i rozkurczowego) metodą rutynową za pomocą sfigomanometru, po półgodzinnym wypoczynku,

-dodatkowo analizowano również wskaźnik masy ciała (BMI – *body mass index*) (przed - z wywiadu - i po ciąży w odstępie 3 dni po porodzie), wskaźnik BMI zdefiniowano (wg WHO) jako iloraz masy ciała wyrażonej w kilogramach (kg) do kwadratu wzrostu badanej osoby wyrażonego w metrach kwadratowych (m^2). Przyjęto następujące przedziały kwalifikacji osób wg wskaźnika BMI (wg WHO): prawidłowa masa ciała (18,9–24,9 kg/m^2), nadwaga (25,0–29,9 kg/m^2), otyłość (30,0–34,9 kg/m^2), nadmierna otyłość ($\geq 35,0$ kg/m^2),

-dane demograficzne: wykształcenie (wyższe, średnie, podstawowe), rodzaj wykonywanej pracy (praca w domu, umysłowa, fizyczna), używki (palenie papierosów, picie alkoholu), przyjmowanie kwasu foliowego (przed i w trakcie ciąży),

-dane biochemiczne: obecność ewentualnych wykładników zakażenia (leukocytoza),

-w obydwu grupach pacjentek analizie poddano również rodzaj ukończenia ciąży (poród samoistny drogami natury, cięcie cesarskie, inny rodzaj porodu operacyjnego),

-wiek ciążowy u każdej z kobiet w obydwu badanych grupach ustalony został na podstawie daty ostatniej miesiączki, oceny regularności cykli miesięczkowych. Dodatkowo wiek ciążowy weryfikowano na podstawie analizy badania ultrasonograficznego w I trymestrze oraz analizy biometrycznej płodu w kolejnych trymestrach ciąży,

-parametry urodzeniowe noworodka: masa ciała, ocena w skali Apgar w 1 oraz 5 minucie życia, masa łożyska, wartość pH z żyły i tętnicy popowinowej.

Wszystkie dane kliniczne, demograficzne i laboratoryjne zostały zebrane w utworzoną bazę danych. Dane demograficzne zostały zakodowane celem dalszej analizy statystycznej. Zebrane dane kliniczne, laboratoryjne i socjo-ekonomiczne zostały przedstawione w tabeli 7 w rozdziale Wyniki.

3.2. METODYKA

Analiza genetyczna przeprowadzona była w Pracowni Biologii Molekularnej w Klinice Perinatologii i Chorób Kobietych UM w Poznaniu. Od każdej z badanych kobiet zakwalifikowanych do badań zarówno do grupy badawczej, jak i grupy kontrolnej, pobrano około 5-6 ml krwi żyłnej w czasie rutynowych badań laboratoryjnych.

Izolację DNA z leukocytów przeprowadzono za pomocą komercyjnego zestawu do izolacji QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Inc., Niemcy). Ocena występowania polimorfizmów genetycznych układu cytokin i receptorów Toll-like przeprowadzana była metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR - *polymerase chain reaction*) oraz polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP - *restriction fragment length polymorphism*). U każdej ciężarnej analizie poddano częstość występowania 10 polimorfizmów genów kandydujących do udziału w etiologii PTD:

polimorfizm +3953C>T genu IL-1 β

polimorfizm 86 pz VNTR genu IL-1RN

polimorfizmy -174G>C i -596G>A genu IL-6

polimorfizmy -163G>A, -238G>A, -308G>A, -376G>A genu TNF- α

polimorfizm Arg753Gln (20877G>A) genu TLR2

polimorfizm Thr399Ile (8993C>T) genu TLR4.

3.2.1. REAKCJA ŁAŃCUCHOWA POLIMERAZY

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR - *polymerase chain reaction*) jest metodą powielania łańcuchów DNA w warunkach laboratoryjnych, polegającą na wielokrotnym podgrzewaniu i oziębianiu próbki. Technika ta została opracowana w 1983 roku przez Kary`ego Mulliusa z Kalifornijskiej firmy Cetus, za co otrzymał on w roku 1993 Nagrodę Nobla. Do reakcji wprowadza się odpowiednie składniki mieszaniny restrykcyjnej, do których należą: matrycowy DNA, bufor, Mg, trifosforany deoksyrybonukleotydów, termostabilną polimerazę DNA, primery - krótkie (najczęściej ok. 20 nukleotydów) fragmenty komplementarne do matrycy okalające interesujący nas fragment genu. Wyróżniamy dwa typy starterów: starter przedni (*forward*) oraz starter wsteczny (*reverse*). W praktyce najczęściej stosowana jest polimeraza Taq wyizolowana z bakterii *Thermus aquaticus* lub polimeraza Pfu z archeowców *Pyrococcus furiosus*. Polimeraza Pfu charakteryzuje się

większą progresywnością niż Taq, jednakże działa ona wolniej. Dostępne są także inne polimerazy, będące z reguły modyfikacjami wyżej wymienionych.

Reakcja PCR składa się z wielokrotnie powtarzanego cyklu trzech etapów, które zachodzą w różnych temperaturach. Cykle te można wymuszać bez ingerencji w skład mieszaniny, a jedynie przez zmianę temperatury mieszaniny reakcyjnej.

1. Denaturacja. Pierwszym etapem jest rozplecenie podwójnej helisy matrycowego DNA (lub mRNA, jeśli on stanowi matrycę). W wysokiej temperaturze (zwykle około 95°C) pękają wiązania wodorowe i podwójna helisa DNA rozdziela się na dwa pojedyncze łańcuchy. W celu uzyskania tego efektu podnosi się temperaturę mieszaniny reakcyjnej do wymaganych 95°C na 15 sekund.
2. Annealing - hybrydyzacja odcinków starterowych. Polega na tworzeniu odcinków dwuniciowych, składających się z przygotowanych starterów - cząsteczek DNA komplementarnych do sekwencji DNA oskrzydlających gen mający ulec namnożeniu - z matrycową cząsteczką DNA. Etap ten zachodzi w temperaturze niższej, ściśle określonej dla danej pary starterów (pomiędzy 45-60°C), przyłączają się one do matrycy. Ponieważ roztwory primerów są dodawane w dużym nadmiarze w stosunku do matrycy, jest bardzo mało prawdopodobne, żeby na tym etapie, zamiast hybryd starter - matryca utworzyły się hybrydy połączonych ze sobą dwóch nici matrycy.
3. Elongacja - na tym etapie zachodzi właściwa synteza DNA i tym samym amplifikacja pożądanego fragmentu genu. Podwyższenie temperatury do około 72°C powoduje utworzenie się na matrycy, z przyłączonymi do niej starterami, kompleksu z polimerazą DNA, wskutek czego rozpoczyna się synteza nici komplementarnej do matrycy. Reakcja ta trwa zwykle 30 sekund.

Następnie cykl powtarza się i w kolejnym etapie annealingu i elongacji jako matryca mogą służyć wszystkie zsyntetyzowane dotychczas cząsteczki genu. W ten sposób reakcja, dopóki substraty i enzym są w wystarczającej ilości, zachodzi coraz szybciej, powodując coraz większy przyrost kopii fragmentu genu na etapie elongacji [Brylski, 2009].

Reakcja PCR znajduje wiele zastosowań, między innymi w badaniach nad genomem, charakterystyce ekspresji genów, klonowaniu genów, diagnostyce klinicznej. PCR jest również bardzo użytecznym narzędziem w różnego typu badaniach genetycznych ponieważ nie wymaga znajomości sekwencji badanego genu - wystarczy znajomość sekwencji nukleotydów w odcinkach oskrzydlających gen. Ponadto stosowane startery nie muszą być

komplementarne do matrycy w 100%. Pozwala to na amplifikację wariantów tego samego genu, które różnią się od siebie niewielkimi zmianami w sekwencji. Jednocześnie jest to metoda specyficzna - przy doborze odpowiednich starterów, powielaniu ulega tylko jeden odcinek DNA. Jest to metoda bardzo czuła - pozwala na wykrycie nawet pojedynczej cząsteczki DNA [Stryer i wsp., 2003, Słomski, 2008].

W prezentowanej pracy wszystkie reakcje PCR przeprowadzono używając termocyklera Dyad DNA Engine (BioRad, Stany Zjednoczone).

3.2.2. POLIMORFIZM DŁUGOŚCI FRAGMENTÓW RESTRYKCYJNYCH

Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP – *restriction fragment length polymorphism*) jest uważany za najprostszą i najszybszą metodę wykrywania SNPs. Metoda ta wykorzystuje istnienie wielu endonukleaz restrykcyjnych izolowanych z bakterii oraz ich duże powinowactwo do rozpoznawania szczególnych miejsc restrykcyjnych. Endonukleazy restrykcyjne mają właściwość rozpoznawania sekwencji palindromicznych o stosunkowo dużej długości nawet do kilku nukleotydów. Endonukleazy przecinają DNA wzdłuż osi symetrii z pozostawieniem końców niesparowanych, „lepkich” lub końców „tępych”. Hydroliza amplifikowanego produktu PCR i określenie długości fragmentów poprzez elektroforezę umożliwia określenie genotypów badanych osób. Metoda ta jest bardzo precyzyjna [Bal, 2001].

3.3. ANALIZA GENETYCZNA

3.3.1. IZOLACJA DNA

DNA otrzymywano z leukocytów krwi za pomocą zestawu do izolacji QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Inc., Niemcy). W probówce umieszczano 20 µl enzymu - proteinazy K, do którego dodawano 200 µl krwi pobranej na EDTA oraz 200 µl buforu do lizy oznaczonego przez firmę symbolem AL. Całość inkubowano w temperaturze 56°C przez 10 minut, wirowano i przenoszono do probówki zawierającej kolumnę ze złożem krzemionkowym. Następnie probówkę wirowano 1 minutę przy obrotach 8000 rpm. Kolumnę przenoszono do nowej probówki, a przesącz odrzucano. Dwukrotnie przemywano kolumnę 500 µl buforów oznaczonych A1 (po czym wirowano przez 1 minutę 8000 rpm) oraz A2 i wirowano przez 3 minuty 14000 rpm, w celu oczyszczenia DNA. Na kolumnę nakładano

następnie 200 µl buforu do elucji i po 5 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej wirowano 1 minutę 8000 rpm. Po tym wirowaniu uzyskiwano już oczyszczone DNA, gotowe do użycia w dalszej analizie genetycznej.

3.3.2. OZNACZANIE JAKOŚCI I STĘŻENIA PREPARATÓW DNA

W celu podniesienia jakości dalszej analizy genetycznej sprawdzano spektrofotometrycznie oraz poprzez elektroforezę w żelu agarozowym stężenie, jak również czystość wyizolowanego uprzednio DNA. Miarą stężenia otrzymanego preparatu DNA jest gęstość optyczna (OD *ang. optical density*). Wartość OD obliczano z pomiaru absorpcji przy długości fali 260 nm. W pomiarach tego typu przyjęto, że stężenie dwuniciowego DNA (dsDNA) wynosi około 50 µg/ml kiedy A260 równa się 1 (wartość zaokrąglona, ponieważ wartość współczynnika ekstynkcyjnego zależy od składu zasad azotowych w DNA). Stężenie DNA obliczane jest według następującego wzoru:

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

Miarą czystości roztworu DNA jest stosunek A260/A280 (określany również jako miara zanieczyszczenia DNA białkami, maksimum absorpcji UV dla białek wynosi 280 nm). Przyjmuje się, że preparat DNA jest wymaganej czystości przy wartości stosunku A260/A280 wynoszącej 1,8-2,0 (przy zanieczyszczeniu RNA wartość ta jest bliższa 2,0, przy zanieczyszczeniu białkami - niższa niż 1,8). Jeżeli wartość zakresów absorbancji DNA wynosiła mniej niż 1,8 lub więcej niż 2,0 przystępowano do ponownej izolacji DNA. Przy elektroforezie przeprowadzanej na 0,8% żelu agarozowym uzyskiwano pojedynczy prążek genomowego DNA.

3.3.3. POLIMORFIZM +3953C>T GENU *IL-1β*

Polimorfizm +3953C>T genu *IL-1β* amplifikowano używając następujących starterów: F 5`- gTT gTC ATC Aga CTT TgA CC - 3` oraz R 5`- TTC AgT TCA TAT ggA CCA gA - 3`. Otrzymywano produkt PCR o wielkości 251 pz, który następnie poddawano hydrolizie restrykcyjnej enzymem *TaqI* (Fermentas, Litwa) i uzyskiwano trzy genotypy: homozygota typu dzikiego CC 137, 114 pz, heterozygota CT 251, 137 i 114 pz oraz homozygota zmutowana TT 251 pz, które odczytywano z 2% żeli agarozowych.

3.3.4. POLIMORFIZM 86 PZ VNTR GENU *IL-1RN*

Polimorfizm zmiennej liczby tandemowych powtórzeń 86 par zasad w intronie 2 genu antagonisty receptora interleukiny 1 analizowano metodą PCR opisaną wcześniej [Tarlow et al., 1993] przy zastosowaniu startery: F 5`- CTC AgC AAC ACT CCT AT - 3` oraz R 5`- TCC Tgg TCT gCA ggT AA - 3` (TiBMolBiol, Polska). Po reakcji PCR odczytywano genotypy z 2% żeli agarozowych. Możliwe były do uzyskania produkty długości 154 pz (*IL1RN*0*), 410 pz (*IL1RN*1*), 240 pz (*IL1RN*2*), 500 pz (*IL1RN*3*), 325 pz (*IL1RN*4*), 595 pz (*IL1RN*5*).

3.3.5. POLIMORFIZMY -174G>C ORAZ -596G>A GENU *IL-6*

Fragment zawierający miejsce polimorfizmu -174G>A w promotorze genu *IL-6* amplifikowano używając następujących starterów: F 5`- ACA TgC CAA gTg CTg AgT CA 3` oraz R 5`- AAT CTT TgT Tgg Agg gTg Ag-3. Otrzymywano produkt PCR o wielkości 214 pz, który następnie poddawano hydrolizie restrykcyjnej enzymem *LweI* (Fermentas, Litwa), który rozpoznaje specyficzną sekwencję GCATC(5/9). Genotypy odczytywano z 2% żeli agarozowych. Homozygota *GG* 114, 100 pz, heterozygota *GC* 214, 114, 100 pz oraz homozygota zmutowana *CC* 214 pz.

Polimorfizm -596G>A genu *IL-6* wykrywano używając starterów: F 5`- ggA gTC ACA CAC TCC ACC Tg- 3` oraz R 5`- AAg CAg AAC CAC TCT TCC TTT ACT T-3. Uzyskiwany po reakcji PCR produkt o wielkości 420 par zasad hydrolizowano w temperaturze 37 C° enzymem restrykcyjnym *BseGI* (*BtsCI*) [GGATG(2/0)] (Fermentas, Litwa). Dla genotypu homozygotycznego typu dzikiego *GG* nie występowało miejsce restrykcyjne dla enzymu *FokI* i uzyskiwano pojedynczy prążek o wielkości 420 pz. Dla genotypu heterozygotycznego *GA* otrzymywano trzy prążki wielkości 420, 354 oraz 66 pz oraz dwa prążki 354 oraz 66 pz w przypadku obecności genotypu homozygotycznego zmutowanego *AA*.

3.3.6. POLIMORFIZMY -163G>A, -238G>A, -308G>A, -376G>A GENU *TNF-α*

Do amplifikacji fragmentów genu *TNF-α* zawierających punktowe mutacje -163G>A i -376G>A wykorzystano startery o następujących sekwencjach: 5` - AAg AAT CAT TCA ACC AgC gg oraz 5` - CCT CAA Cgg ACT CAg CCT TC (TibMolBiol, Polska). Długość pierwotnego produktu PCR wynosiła 393 pz. Do amplifikacji odcinka genu *TNF-α*

zawierającego mutacje -238G>A, -308G>A, użyto następujących starterów 5` - AAA Tgg Agg CAA Tag gTT TTg Agg ggC TTg oraz 5` - TAC CCC TCA CAC TCC CCA TCC TCC CTg ATC (TIBMolBiol Polska), które pozwalały uzyskać fragment 131 pz. Produkty reakcji hydrolizowano enzymami restrykcyjnymi: *Bsh1236I* (BstUI) w przypadku polimorfizmu -163G>A, *TasI* (Tsp509I) dla -376G>A, *BspPI* (AlwI) dla -238G>A oraz *FaqI* (BsmFI) dla -308G>A. Wszystkie reakcje przeprowadzono według procedur zalecanych przez producenta tych enzymów firmę Fermentas z Litwy. Identyfikacji genotypu dokonywano za pomocą elektroforezy na 3% żelach agarozowych, w buforze TBE. Żele barwiono bromkiem etydyny i wizualizowano w świetle UV. W zależności od genotypu uzyskiwano następujące fragmenty: -163G>A (GG - 285, 108 pz, GA - 393, 285, 108 pz, AA 393 pz), -376G>A (GG - 393, GA - 393, 319, 74, AA - 319, 74 pz), -238G>A (GG - 110, 21, GA - 131, 110, 21, AA - 131 pz), -308G>A (GG - 82, 29, GA - 131, 82, 29, AA 131 pz).

3.3.7. POLIMORFIZM ARG753GLN GENU *TLR2* ORAZ THR399ILE GENU *TLR4*

Sekwencje starterów dla genu *TLR2* były następujące: 5` - GAG TGG TGC AA GTA TGA ACT GGA, 5` - TCC CAA CTA GAC AAA GAC TGG TCT, natomiast dla genu *TLR4*: 5` - TGG CAA CAT TTA GAA TTA GTT AAC, 5` - CTC AGA TCT AAA TAC TTT AGG CCG (TIBMolBiol, Polska). Wynik reakcji PCR sprawdzano w 2% żelu agarozowym przy napięciu 80 V. Uzyskane produkty PCR dla genu *TLR2* wielkości 262 par zasad i dla genu *TLR4* wielkości 227 par zasad poddawano hydrolizie enzymem restrykcyjnym *PstI* (dla *TLR2*) i *MspI* (dla *TLR4*). Hydrolizę prowadzono w temperaturze 37°C przez 16 godz. Wyniki analizowano w 3% żelu agarozowym w świetle UV. Po hydrolizie uzyskiwano następujące fragmenty dla poszczególnych genotypów *TLR2* (polimorfizm *Arg753Gln* (G20877A)): homozygota GG - 262 par zasad, heterozygota GA - 262 pz, 134 pz, 128 pz, homozygota AA - 134 pz, 128 pz oraz *TLR4* (polimorfizm *Thr399Ile* (C8993T)): homozygota CC - 203 pz, 24 pz, heterozygota CT 227 pz, 203 pz, 24 pz, homozygota TT - 227 pz.

Sekwencje starterów, skład mieszaniny reakcyjnej, warunki reakcji PCR oraz używane enzymy restrykcyjne przedstawione zostały zbiorczo w tabelach 3, 4, 5 i 6.

Tab. 3. Startery zastosowane do reakcji PCR.

<i>Polimorfizm</i>	<i>Sekwencja starterów</i>	<i>Produkt PCR</i>
<i>86 pz VNTR IL-1RN</i>	F 5`- CTC AgC AAC ACT CCT AT - 3` R 5`- TCC Tgg TCT gCA ggT AA - 3`	154, 240, 325, 410, 500, 595 pz
<i>+3953C>T IL-1β</i>	F 5`- gTT gTC ATC Aga CTT TgA CC - 3` R 5`- TTC AgT TCA TAT ggA CCA gA - 3`.	214 pz
<i>-596G>A IL-6</i>	F 5`- ggA gTC ACA CAC TCC ACC Tg- 3` R 5`- AAg CAg AAC CAC TCT TCC TTT ACT T-3.	420 pz
<i>-174G>C IL-6</i>	F 5`- ACA TgC CAA gTg CTg AgT CA -3` R 5`- AAT CTT TgT Tgg Agg gTg Ag-3`	214 pz
<i>-163G>A TNF-α</i>	F 5` - AAg AAT CAT TCA ACC AgC gg -3` R 5` - CCT CAA Cgg ACT CAg CCT TC -3`	393 pz
<i>-238G>A TNF-α</i>	F 5` - AAA Tgg Agg CAA Tag gTT TTg Agg ggC TTg-3` R 5` - TAC CCC TCA CAC TCC CCA TCC TCC CTg ATC-3`	131 pz
<i>-308G>A TNF-α</i>	F 5` - AAA Tgg Agg CAA Tag gTT TTg Agg ggC TTg-3` R 5` - TAC CCC TCA CAC TCC CCA TCC TCC CTg ATC-3`	131 pz
<i>-376G>A TNF-α</i>	F 5` - AAg AAT CAT TCA ACC AgC gg -3` R 5` - CCT CAA Cgg ACT CAg CCT TC -3`	393 pz
<i>Arg753Gln TLR2</i>	F 5` - gAg Tgg TgC AAg TAT gAA CTg gA-3` R 5` - TCC CAA CTA gAC AAA gAC Tgg TCT-3`	262 pz
<i>Thr399Ile TLR4</i>	F 5`- Tgg CAA CAT TTA gAA TTA gTT AAC-3` R 5` - CTC AgA TCT AAA TAC TTT Agg CCg-3`	227 pz

Tab. 4. Skład mieszaniny dla reakcji PCR (wartości podano w μl).

<i>Składnik (stężenie wyjściowe)</i>									
	<i>DNA</i>	<i>Woda</i>	<i>Bufor PCR [10x]</i>	<i>MgCl₂ [25 mM]</i>	<i>dNTP [2,5 mM]</i>	<i>Starter F [50 pmoli/ μl]</i>	<i>Starter R [50 pmoli/μl]</i>	<i>Polimeraza [5U/ μl]</i>	<i>Objętość końcowa</i>
<i>Polimorfizm</i>									
<i>86 pz VNTR IL-1RN</i>	2	16,3	2,5	1,5	2	0,25	0,25	0,2	25
<i>+3953C>T IL-1β</i>	2	16,3	2,5	1,5	2	0,25	0,25	0,2	25
<i>-596G>A IL-6</i>	2	16,0	2,5	1,5	2	0,4	0,4	0,2	25
<i>-174G>C IL-6</i>	2	16,0	2,5	1,5	2	0,4	0,4	0,2	25
<i>-163G>A TNF-α</i>	2	15,0	2,5	2,5	2	0,4	0,4	0,2	25
<i>-238G>A TNF-α</i>	2	15,0	2,5	2,5	2	0,4	0,4	0,2	25
<i>-308G>A TNF-α</i>	2	15,0	2,5	2,5	2	0,4	0,4	0,2	25
<i>-376G>A TNF-α</i>	2	15,0	2,5	2,5	2	0,4	0,4	0,2	25
<i>Arg753Gln TLR2</i>	2	11,3	2	2	2	0,25	0,25	0,2	20
<i>Thr399Ile TLR4</i>	2	11,3	2	2	2	0,25	0,25	0,2	20

Tab. 5. Warunki reakcji PCR dla badanych polimorfizmów genetycznych.

Polimorfizm	Denaturacja wstępna		Denaturacja		Wiązanie starterów		Synteza		Synteza końcowa		Ilość cykli
	temp [°C].	czas [sek.]	temp [°C].	czas [sek.]	temp [°C].	czas [sek.]	temp [°C].	czas [sek.]	temp [°C].	czas [sek.]	
86 pz VNTR IL-1RN	96	180	94	60	60	60	70	120	72	600	30
+3953C>T IL-1β	95	240	95	30	58	30	72	60	72	600	30
-596G>A IL-6	95	180	95	30	57	30	72	60	72	180	35
-174G>C IL-6	95	240	95	30	58	30	72	60	72	600	30
-163G>A TNF-α	95	240	95	30	61	30	72	60	72	600	30
-238G>A TNF-α	95	300	95	30	62,5	60	72	60	72	300	40
-308G>A TNF-α	95	300	95	30	62,5	60	72	60	72	300	40
-376G>A TNF-α	95	240	95	30	61	30	72	60	72	600	30
Arg753Gln TLR2	95	240	94	30	62	30	72	45	72	300	35
Thr399Ile TLR4	95	240	94	30	53	30	72	45	72	300	35

Tab. 6. Warunki reakcji hydrolizy restrykcyjnej produktu PCR.

<i>Polimorfizm</i>	<i>Enzym restrykcyjny</i>	<i>Temperatura [°C]</i>	<i>Rozpoznawana sekwencja</i>	<i>Uzyskane fragmenty po hydrolizie</i>
86 pz VNTR IL-1RN	-	-	-	-
+3953C>T IL-1β	<i>TaqI</i>	65	T^CGA	CC 137, 114 pz CT 251, 137, 114 pz TT 251 pz
-596G>A IL-6	<i>BseGI (BtsCI)</i>	55	GGATG (2/0)	GG 420 pz. GA 420, 354, 66 pz AA 354, 66 pz
-174G>C IL-6	<i>LweI (SfaNI)</i>	37	GCATC (5/9)	GG 114, 100 pz GC 214, 114, 100 pz CC 214 pz.
-163G>A TNF-α	<i>Bsh1236I (BstUI)</i>	37	CG^CG	GG 285, 108 pz GA 393, 285, 108 pz AA 393 pz
-238G>A TNF-α	<i>BspPI (AlwI)</i>	55	GGATC (4/5)	GG 110, 21 pz GA 131, 110, 21 pz AA 131 pz
-308G>A TNF-α	<i>FaqI (BsmFI)</i>	37	GGGAC (10/14)	GG 82, 29 pz GA 131, 82, 29 pz AA 131 pz
-376G>A TNF-α	<i>TasI (Tsp509I)</i>	65	^AATT	GG 393 pz GA 393, 319, 74 pz AA 319, 74 pz
Arg753Gln TLR2	<i>PstI</i>	37	CTGCA^G	GG 262 pz GA 262, 134, 128 pz AA 134, 128 pz
Thr399Ile TLR4	<i>MspI</i>	37	C^CGG	CC 203, 24 pz CT 227, 203, 24 pz TT – 227 pz.

3.4. ANALIZA STATYSTYCZNA

Analizę statystyczną otrzymanych w pracy wyników częstości występowania genotypów i polimorficznych alleli badanych genów przeprowadzono przy zastosowaniu programu statystycznego SPSS 14. PL dla Windows. W celu przeprowadzenia analizy statystycznej w Edytorze Danych SPSS 14.PL utworzono bazę danych zawierającą dane kliniczne pacjentek oraz częstość pojawiania się poszczególnych rodzajów genotypów.

Otrzymane rezultaty podawano z 95% przedziałem ufności (PU) zarówno dla otrzymanych alleli, jaki i genotypów. 95% przedział ufności obliczano przy użyciu programu Clinical Trials Design Program wersja 1.0. przy wszystkich otrzymanych częstościach występowania genotypów i alleli obliczano współczynnik ryzyka (WR- współczynnik ryzyka, iloraz szans, ang. *odds ratio*). Wartość $p < 0,05$ przyjęto za statystycznie istotną.

Rozkład genotypów w badanych grupach i podgrupach porównano testem *chi*-kwadrat z poprawką Fishera (istotność asymptotyczna dwustronna). Po oznaczeniu wszystkich badanych polimorfizmów genetycznych wyznaczono ich wzajemne korelacje, które porównano za pomocą współczynnika korelacji Personna oraz testem *chi*-kwadrat.

Wartości obserwowane dotyczące częstości występowania genotypów porównano z wartościami oczekiwanymi (WO), które obliczano na podstawie częstości występowania alleli danego genu na podstawie prawa Hardy-Weinberga, opisywanego następującym równaniem:

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

gdzie p i q to częstość występowania poszczególnych alleli danego genu.

$$p = n_A/2N = 2n_{AA} + n_{Aa}/2N$$

$$q = n_a/2N = 2n_{aa} + n_{Aa}/2N$$

gdzie A i a oznaczają allele danego genu [Winter et al, 2001].

W czasie analizy danych klinicznych i parametrów laboratoryjnych w grupach badanych pacjentek obliczano wartości średnie arytmetyczne. Dla każdej wartości średniej

arytmetycznej podawano odchylenie standardowe (\pm SD, ang. *standard deviation*). Dla pełnej analizy statystycznej odnotowywano zakres wartości obserwowanych z podaniem wartości minimalnej i maksymalnej. Każdorazowo podawano również wartość mediany. Normalność rozkładu analizowano z zastosowaniem testu nieparametrycznego Kołmogorowa-Smirnowa z poprawką Lilleforsa. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem analizy wariancji testu Kruskala-Wallisa (dane podlegające rozkładowi normalnemu). Porównanie rozkładu średnich w grupach badanych dokonano za pomocą testu U-Manna-Whitney'a oraz testu ANOVA. Za statystycznie istotne przyjmowano wartość $p < 0,05$.

W celu oceny częstości występowania haplotypów dla badanych polimorfizmów genów *TNF- α* oraz *IL-6* stosowano programy PHASE (wersja 2.1) oraz Haploview (wersja 4.2).

4. WYNIKI

4.1. ANALIZA DANYCH DEMOGRAFICZNYCH, KLINICZNYCH I BIOCHEMICZNYCH W BADANYCH GRUPACH KOBIET

W pierwszym etapie pracy w obydwu grupach kobiet z PTD oraz w grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych analizowano dane demograficzne, kliniczne oraz badane parametry laboratoryjne.

Średni wiek pacjentek w grupie PTD oraz w grupie kontrolnej wynosił odpowiednio $29,2 \pm 5,6$ oraz $29,0 \pm 3,7$ lat (brak różnicy statystycznie istotnej, $p > 0,05$). Różnic statystycznie istotnych nie odnotowano również przy analizie porównawczej wartości ciśnienia skurczowego w grupie badanej ($112,7 \pm 14,6$ mmHg) oraz kontrolnej ($109,5 \pm 11,6$ mmHg) ($p > 0,05$), jak również ciśnienia rozkurczowego w grupie badanej ($70,7 \pm 11,2$ mmHg) oraz kontrolnej ($68,1 \pm 8,9$ mmHg) ($p > 0,05$). Natomiast zauważono różnice statystycznie istotne porównując średni tydzień zakończenia ciąży w obydwu grupach badanych ($33,7 \pm 2,8$ vs. $39,3 \pm 1,2$ tc., $p < 0,000$).

Ciężarne z grupy badanej i kontrolnej nie różniły się pod względem wartości BMI przed ciążą ($22,1 \pm 3,7$ vs. $21,6 \pm 2,8$, $p > 0,05$) oraz po ciąży ($26,8 \pm 4,2$ vs. $27,1 \pm 3,4$, $p > 0,05$). Nie zauważono również różnicy pomiędzy wartością liczby leukocytów oznaczanych u wszystkich kobiet w II dobie po porodzie ($16,4 \pm 5,8$ vs. $16,7 \pm 4,6$ G/L, $p > 0,05$).

W dalszym etapie analizowano wywiad położniczy w badanych grupach. W tym zakresie odnotowano: w grupie PTD: 40,0% pierwiastek, 52,7% wieloródek, 7,3% nieródek, natomiast w grupie kontrolnej odpowiednio 48,7% pierwiastek, 8,6% wieloródek, 42,7% nieródek. W grupie kobiet badanych obserwowano znaczną przewagę wieloródek ($52,7$ vs. $8,6\%$, $p < 0,05$).

Zakończenie ciąży poprzez cięcie cesarskie odnotowano statystycznie istotnie częściej w grupie kobiet z PTD ($35,3$ vs. $15,3\%$, $p < 0,000$). Poród samoistny drogami natury odnotowano w

większej częstości w grupie kontrolnej (82,7%) w porównaniu do grupy badanej (64,0%) ($p < 0,000$). Zakończenie ciąży poprzez zastosowanie wyciągacza próżniowego odnotowano tylko w grupie kontrolnej (2,0 vs. 0,0%). Wskazaniami do cięcia cesarskiego w grupie badanej było: objawy zagrożenia życia płodu, wcześniactwo, położenie miednicowe płodu. Wskazaniami do cięcia cesarskiego w grupie kontrolnej było objawy zagrożenia życia płodu, położenie miednicowe, wskazania ortopedyczne, okulistyczne.

W toku badań zbierano również dane socjo-ekonomiczne dotyczące wykształcenia, miejsca zamieszkania oraz rodzaju wykonywanej pracy. Wśród kobiet z grupy badanej z PTD aż 25,9% miało wykształcenie podstawowe (7,3% w grupie kontrolnej). Kobiety z wykształceniem wyższym były liczniejsze w grupie kontrolnej (64,7%) w porównaniu do badanej (40,2%) ($p < 0,000$). Różnice zauważono również w rodzaju wykonywanej pracy pomiędzy badanymi grupami. W grupie z PTD pracę fizyczną wykonywało aż 32,7% kobiet w porównaniu do grupy kontrolnej, gdzie fizyczny rodzaj pracy podało 14,5%. W grupie kontrolnej większość kobiet, bo aż 77,4% pracowała umysłowo (49,0% w grupie PTD) ($p < 0,000$).

W czasie analizy danych od ciężarnych gromadzono jednocześnie wywiad dotyczący przyjmowania kwasu foliowego, palenia papierosów lub przyjmowania innych używek. W grupie badanej PTD więcej kobiet paliło papierosy przed ciążą (31,0%) w porównaniu do grupy kontrolnej (20,0%) ($p = 0,02$). W grupie z PTD mniej kobiet przyjmowało kwas foliowy zarówno przed ciążą (45,8 vs. 57,3%, $p = 0,03$), jak i w czasie ciąży (68,0 vs. 75,8%, $p = ns$). Wszystkie powyższe dane zebrano w tabeli 7.

Tab. 7. Porównanie danych demograficznych, klinicznych i laboratoryjnych ciężarnych z grupy badanej (150 osób) i kontrolnej (150 osób).

<i>Analizowane zmienne</i>	<i>Grupa badana PTD (n=150)</i>	<i>Grupa kontrolna (n=150)</i>	<i>p</i>
wiek (lata) średnia ± SD mediana minimum/maksimum	29,2±5,6 29 15 / 45	29,0±3,7 28 16 / 41	<i>ns</i>
tydz. zakończenia ciąży (tc.) średnia ± SD mediana minimum/maksimum	33,7±2,8 35 22 / 36	39,3±1,2 39 37 / 41	<0,000
RR skurczowe (mmHg) średnia ± SD mediana minimum/maksimum	112,7±14,6 110 70 / 130	109,5±11,6 110 70 / 130	<i>ns</i>
RR rozkurczowe (mmHg) średnia ± SD mediana minimum/maksimum	70,7±11,2 70 50 / 80	68,1±8,9 70 50 / 85	<i>ns</i>
rodność pierwiastka wieloródka nieródka	60 (40,0%) 79 (52,7%) 11 (7,3%)	73 (48,7%) 13 (8,6%) 64 (42,7%)	<0,000
BMI przed ciążą średnia ± SD mediana minimum/maksimum	22,1±3,7 22,02 16,4 / 39,5	21,6±2,8 21,03 16,8 / 31,9	<i>ns</i>
BMI po ciąży średnia ± SD mediana minimum/maksimum	26,8±4,2 25,54 18,7 / 43,9	27,1±3,4 27,28 20,4 / 37,6	<i>ns</i>
leukocytoza (G/L) średnia ± SD mediana minimum/maksimum	16,4±5,8 15,7 5,2 / 34,7	16,7±4,6 16,1 7,0 / 30,0	<i>ns</i>
rodzaj porodu poród samoistny dr. natury cięcie cesarskie wyciągacz próżniowy	96 (64,0%) 54 (36,0%) 0 (0,0%)	124 (82,7%) 23 (15,3%) 3 (2,0%)	<0,000
wykształcenie podstawowe średnie wyższe	39 (26,0%) 51 (34,0%) 60 (40,0%)	11 (7,3%) 42 (28,0%) 97 (64,7%)	<0,000
rodzaj pracy praca domowa praca umysłowa praca fizyczna	27 (18,0%) 74 (49,3%) 49 (32,7%)	12 (8,0%) 116 (77,3%) 22 (14,7%)	<0,000

<i>palenie papierosów przed ciążą</i> tak nie	46 (30,7%) 104 (69,3%)	30 (20,0%) 120 (80,0%)	0,02
<i>palenie papierosów podczas ciąży</i> tak nie	15 (10,0%) 135 (90,0%)	7 (4,7%) 143 (95,3%)	ns (<i>p</i> =0,059)
<i>kw. foliowy przed ciążą</i> tak nie	69 (46,0%) 81 (54,0%)	86 (57,3%) 64 (42,7%)	0,03
<i>kw. foliowy w ciąży</i> tak nie	102 (68,0%) 48 (32,0%)	114 (76,0%) 36 (24,0%)	ns (<i>p</i> =0,07)

W obydwu grupach kobiet przeanalizowano również parametry urodzeniowe noworodków. Stwierdzono statystycznie znamienne różnice w masie urodzeniowej noworodków z grupy badanej (średnia 2391,1±551,5 g, zakres 700-3830 g, mediana 2520 g) i kontrolnej (średnia 3497,1±399,5 g, zakres 2520-4610 g, mediana 3505 g) (*p*<0,000).

Wartość oceny noworodka w skali Apgar w pierwszej i piątej minucie życia była wyższa w grupie kontrolnej zdrowych noworodków (odpowiednio 9,6 vs. 7,9 w pierwszej minucie życia oraz 9,8 vs. 8,9 w piątej minucie życia). Dane kliniczne noworodków z obydwu grup - badanej i kontrolnej- zebrano w tabeli 8.

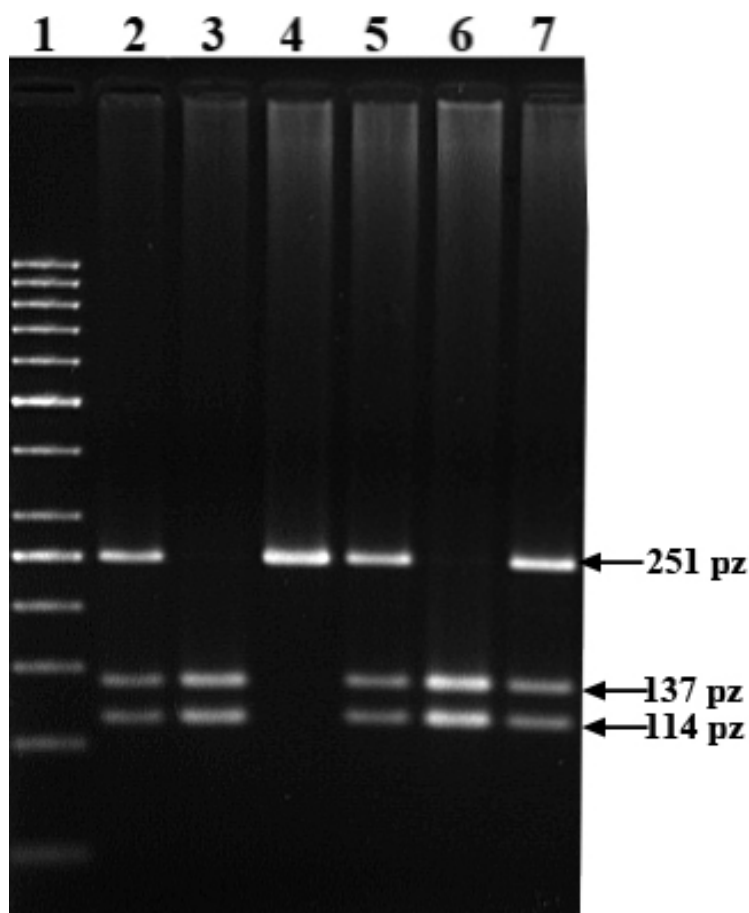
Tab. 8. Dane kliniczne noworodków z grupy badanej (150 osób) i kontrolnej (150 osób).

<i>Analizowane zmienne</i>	<i>Grupa badana PTD (n=150)</i>	<i>Grupa kontrolna (n=150)</i>	<i>p</i>
<i>masa urodzeniowa dziecka (g)</i> średnia ± SD mediana minimum / maksimum	2391,1±551,5 2520,0 700 / 3830	3497,1±399,5 3505,0 2520 / 4610	<0,000
<i>pleć</i> męska żeńska	84 (56,0%) 66 (44,0%)	76 (50,7%) 74 (49,3%)	ns
<i>Ap w 1 minucie</i> średnia ± SD mediana minimum / maksimum	7,9±2,7 9 0 / 10	9,6±1,0 10 3 / 10	<0,000
<i>Ap w 5 minucie</i> średnia ± SD mediana minimum / maksimum	8,9±1,4 9,5 5 / 10	9,8±0,8 10 5 / 10	<0,000
<i>masa łóżyska (g)</i> średnia ± SD mediana minimum / maksimum	537,8±143,3 550 200 / 950	621,4±134,6 600 390 / 1050	<0,000

4.2. ANALIZA WYNIKÓW BADAŃ GENETYCZNYCH

4.2.1. POLIMORFIZM GENU *IL-1 β*

W zakresie genu *IL-1 β* w pracy analizowano polimorfizm $+3953C>T$. Poniższa fotografia żelu agarozowego przedstawia przykładowy rozkład genotypów tego polimorfizmu po procesie hydrolizy przy zastosowaniu enzymu restrykcyjnego *TaqI*. Wyniki uwidoczniono na 2% żelu agarozowym. Dla genotypu homozygotycznego niezmutowanego *CC* uzyskiwano dwa prążki wielkości 137 i 114 pz (miejsce restrykcyjne dla enzymu *TaqI*), pojedynczy prążek 251 pz odczytywano jako obecność genotypu homozygotycznego zmutowanego *TT* (brak miejsca dla hydrolizy restrykcyjnej), natomiast w przypadku obecności genotypu heterozygotycznego *CT* po hydrolizie uwidoczniano wszystkie trzy prążki o wielkości 251, 137 oraz 114 pz (fot. 1).



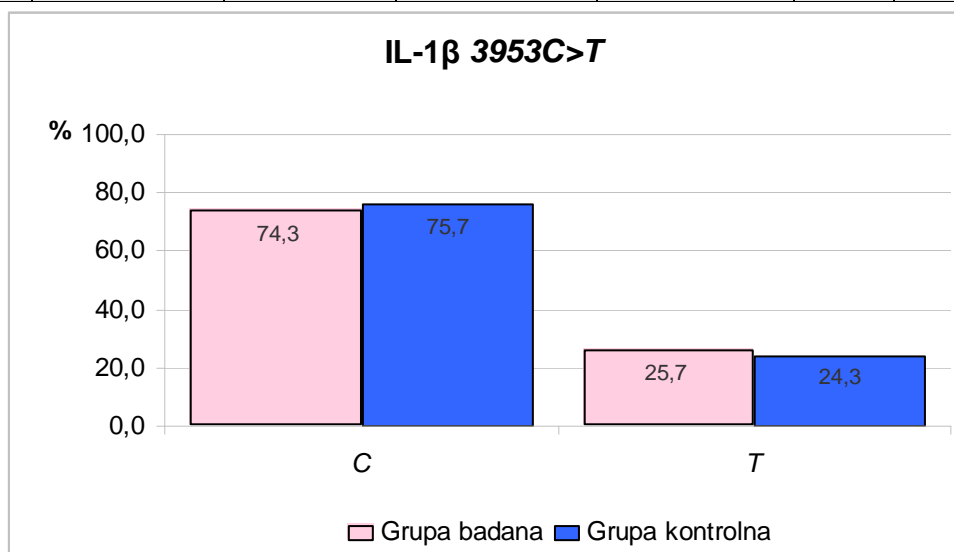
Fot. 1. Analiza genotypów polimorfizmu $+3953C>T$ genu *IL-1 β* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *TaqI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 3, 6 homozygoty niezmutowane *CC*, tory 2, 5, 7 heterozygoty *CT*, tor 4 homozygota zmutowana *TT*.

Następnym etapem była ocena znaczenia badanego polimorfizmu $+3953C>T$ genu *IL-1 β* w etiologii porodu przedwczesnego. Przy porównywaniu genotypów pomiędzy grupą kobiet z PTD a grupą kontrolną zaobserwowano taką samą częstość genotypu homozygotycznego *CC* (56,0 vs. 56,0%, $p=ns$) oraz podobną częstość występowania genotypu heterozygotycznego *CT*

(36,7 vs. 39,3%, $p=ns$). Również częstość występowania genotypu homozygotycznego zmutowanego TT była porównywalna w grupie badanej i kontrolnej (7,3 vs. 4,7% w grupie kontrolnej, $WR=1,62$, $p=ns$). Przy porównywaniu frekwencji alleli w obydwu badanych grupach zaobserwowano podobną częstość występowania allela C (74,3 vs. 75,7%, $WR=0,93$, $p=ns$) oraz allela T (25,7 vs. 24,3%, $WR=1,07$, $p=ns$). Porównując obydwie grupy przy zastosowaniu testu χ^2 Pearsona nie wskazano różnic statystycznie istotnych w frekwencji badanych genotypów pomiędzy grupami ($p=0,59$, istotność asymptotyczna dwustronna) (tab. 9, ryc. 12).

Tab. 9. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $+3953C>T$ genu $IL-1\beta$ w grupach badanej i kontrolnej.

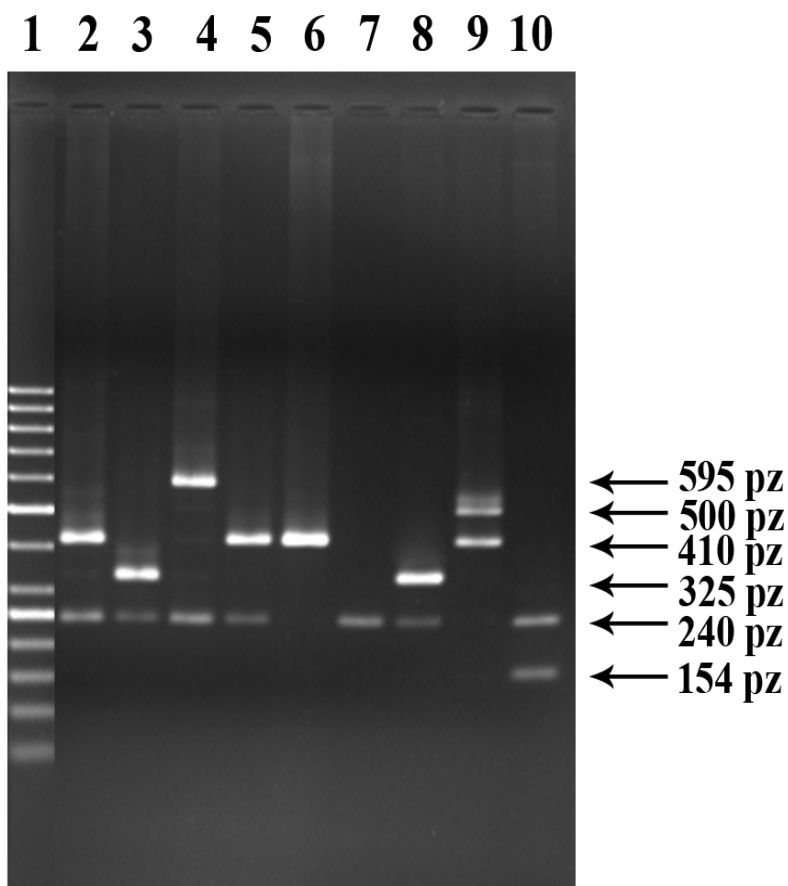
<i>IL-1β</i> <i>+3953C>T</i>	<i>Grupa badana PTD</i> <i>(n=150)</i>		<i>Grupa kontrola</i> <i>(n=150)</i>		<i>WR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>	<i>wartość obserwowana n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana (%)</i>			
<i>CC</i>	84 (56,0)	55,2	84 (56,0)	57,3	1,00	0,62-1,62	0,54
<i>CT</i>	55 (36,7)	38,2	59 (39,3)	36,8	0,89	0,55-1,46	0,36
<i>TT</i>	11 (7,3)	6,6	7 (4,7)	5,9	1,62	0,55-5,06	0,23
<i>Suma</i>	150 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0			
<i>Allele</i>							
<i>C</i>	223 (74,3)	—	227 (75,7)	—	0,93	0,63-1,37	0,39
<i>T</i>	77 (25,7)	—	73 (24,3)	—	1,07	0,73-1,58	0,39
<i>Suma</i>	300 (100,0)	—	300 (100,0)	—			



Ryc. 12. Częstość występowania alleli polimorfizmu $+3953C>T$ genu $IL-1\beta$ w grupach badanej i kontrolnej.

4.2.2. POLIMORFIZM GENU *IL-1RN*

Przedstawiona poniżej fotografia pokazuje przykładowy rozkład genotypów dla polimorfizmu 86 pz VNTR genu *IL-1RN* uwidoczniony na 2% żelu agarozowym. W badanych grupach zaobserwowano występowanie wszystkich z możliwych sześciu alleli: 154 pz (*IL1RN*0*), 240 pz (*IL1RN*2*), 325 pz (*IL1RN*4*), 410 pz (*IL1RN*1*), 500 pz (*IL1RN*3*) oraz 595 pz (*IL1RN*5*) (fot. 2).



Fot. 2. Analiza genotypów polimorfizmu 86 pz VNTR genu *IL-1RN* po reakcji PCR. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 2, 5 genotyp 1/2, tory 3, 8 genotyp 2/4, tory 4, 6, 7, 9, 10 odpowiednio genotypy 2/5, 1/1, 2/2, 1/3, 0/2.

Analizując polimorfizm 86 pz VNTR genu *IL-1RN* w badanych grupach PTD oraz kontrolnej zdrowych ciężarnych obserwowano występowanie 10 genotypów. W obydwu grupach badanych najczęściej wykazano obecność genotypu 1/1 (obecność 4 powtórzeń VNTR w obydwu allelach 1), drugim co do częstości był genotyp 1/2 (tab. 10).

Tab. 10. Częstość występowania wszystkich genotypów i alleli polimorfizmu 86 pz VNTR genu *IL-1RN* w grupach badanej i kontrolnej.

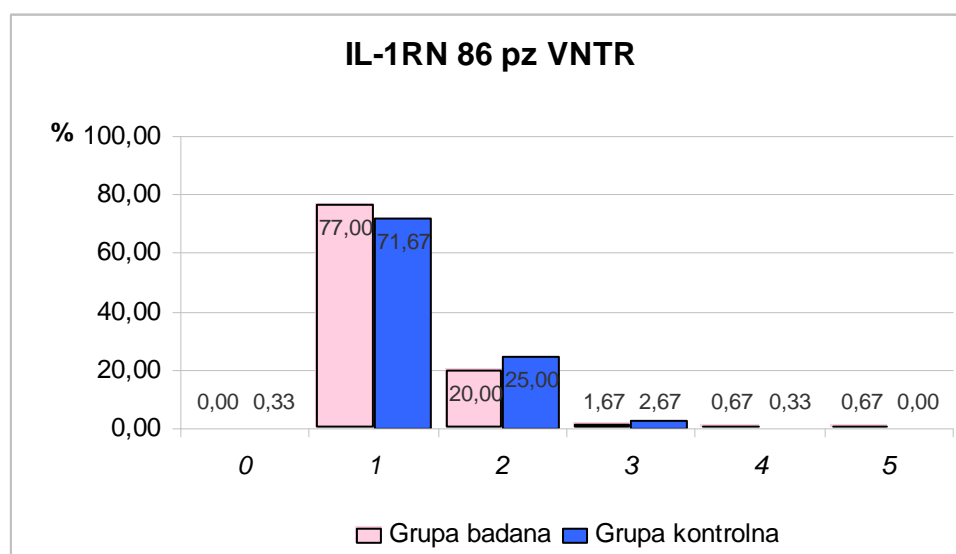
Genotypy	Grupa badana PTD n=150		Grupa kontrolna n=150	
	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)
1/1	88 (58,7)	59,3	80 (53,3)	51,4
1/2	48 (32,0)	30,8	48 (32,0)	35,8
1/3	5 (3,3)	2,5	7 (4,7)	3,9
1/4	1 (0,7)	1,1	0 (0,0)	0,4
1/5	1 (0,7)	1,1	0 (0,0)	0,1
0/2	0 (0,0)	0,0	1 (0,7)	0,2
2/2	5 (3,3)	4,0	12 (8,0)	6,3
2/3	0 (0,0)	0,6	1 (0,6)	1,4
2/4	1 (0,6)	0,3	1 (0,7)	0,2
2/5	1 (0,7)	0,3	0 (0,0)	0,1
nie znalezione*	0 (0,0)	0,0	0 (0,0)	0,2
Suma	150 (100,0)	100,0	150 (100,0)	
Allele	n (%)		n (%)	
0	0 (0,0)	-	1 (0,3)	-
1	231 (77,0)	-	215 (71,7)	-
2	60 (20,0)	-	75 (25,0)	-
3	5 (1,6)	-	8 (2,7)	-
4	2 (0,7)	-	1 (0,3)	-
5	2 (0,7)	-	0 (0,0)	-
Suma	300 (100,0)		300 (100,0)	

* dotyczy genotypów 0/1, 0/3, 0/4, 0/5, 3/3, 3/4, 3/5, 4/4, 4/5, 5/5

W następnej kolejności uporządkowano badane warianty łącząc genotypy o częstości występowania poniżej 1% w jedną grupę. W czasie analizy wyników odnotowano nieco wyższą częstość występowania genotypu 1/1 *IL-1RN* w grupie badanej (58,7%) w porównaniu do kontrolnej (53,3%, $p=ns$). Taką samą frekwencję drugiego, co do częstości występowania genotypu 1/2, odnotowano w obydwu badanych grupach kobiet (32,0 vs. 32,0%). Ciekawym spostrzeżeniem była obserwowana wyższa frekwencja genotypu 2/2 genu *IL-1RN* w grupie kontrolnej (8,0 vs. 3,3%, $WR=0,39$, $p=0,06$) oraz allele 2 w grupie kontrolnej (25,0 vs. 20,0%, $WR=0,75$, $p=0,07$). Genotypy 1/4, 1/5, 0/2, 2/3, 2/4, 2/5 wystąpiły w badanych grupach każdy z częstością poniżej 1% (2,7 vs. 2,0 %). Przeprowadzając analizę z zastosowaniem testu *chi-kwadrat* Pearsona nie odnotowano różnicy statystycznie istotnej w częstości badanych genotypów pomiędzy grupami PTD oraz kontrolną ($p=0,44$ istotność asymptotyczna dwustronna) (tab. 11, ryc. 13).

Tab. 11. Frekwencja najczęściej występujących genotypów i alleli polimorfizmu 86 pz VNTR genu *IL-1RN* w grupach badanej i kontrolnej.

Genotypy	Grupa badana PTD n=150		Grupa kontrolna n=150		WR	95%PU	p
	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)	Wartość obserwowana n (%)	Wartość oczekiwana (%)			
1/1	88 (58,7)	59,3	80 (53,3)	51,4	1,19	0,73-1,93	0,27
1/2	48 (32,0)	30,8	48 (32,0)	35,8	0,97	0,58-1,62	0,50
1/3	5 (3,3)	2,5	7 (4,7)	3,9	0,68	0,17-2,59	0,37
2/2	5 (3,3)	4,0	12 (8,0)	6,3	0,39	0,10-1,22	0,06
inne	4 (2,7)	3,4	3 (2,00)	2,6	-	-	-
Suma	150 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0			
Allele	n (%)		n (%)				
1	231 (77,0)	-	215 (71,7)	-	1,28	0,87-1,88	0,10
2	60 (20,0)	-	75 (25,0)	-	0,75	0,49-1,11	0,07
3	5 (1,6)	-	8 (2,7)	-	0,61	0,15-2,16	0,28
inne	4 (1,4)	-	2 (0,6)	-	2,01	0,29-22,39	0,34
Suma	300 (100,0)		300 (100,0)				

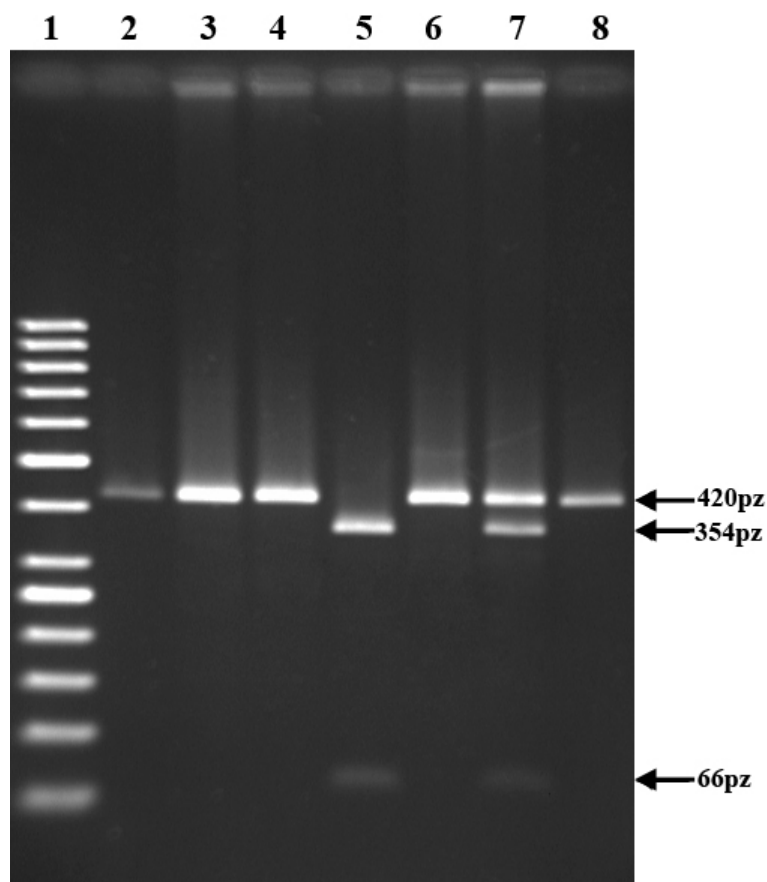


Ryc. 13. Częstość występowania alleli dla polimorfizmu 86 pz VNTR genu *IL-1RN* w grupach badanej i kontrolnej.

4.2.2. POLIMORFIZM GENU *IL-6*

4.2.2.1. POLIMORFIZM -596G>C GENU *IL-6*

W pracy analizowano dwa polimorfizmy znajdujące się w rejonie promotorowym genu *IL-6*: -596G>A oraz -174G>C. Fotografia 3 przedstawia przykładowy wynik uzyskany po hydrolizie z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego *BseGI* (*BtsCI*) jednego z badanych polimorfizmów genu *IL-6* położonego w pozycji -596 od miejsca rozpoczęcia transkrypcji. Dla genotypu homozygotycznego typu dzikiego GG uzyskiwano pojedynczy prążek wielkości 420 pz, trzy prążki wielkości 420, 354, 66 pz dla genotypu heterozygotycznego GA oraz dwa prążki 354, 66 pz w przypadku obecności genotypu homozygotycznego zmutowanego AA (fot. 3).



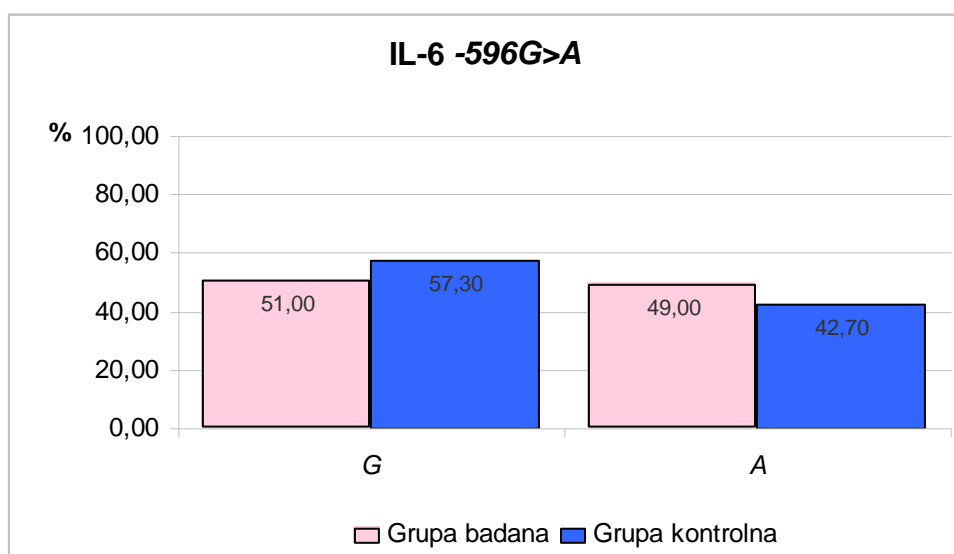
Fot. 3. Analiza genotypów polimorfizmu -596G>A genu *IL-6* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *BseGI* (*BtsCI*). Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 2, 3, 4, 6, 8 homozygoty niezmutowane GG, tor 7 heterozygoty GA, tor 5 homozygota zmutowana AA.

W zakresie polimorfizmu -596G>A genu *IL-6* stwierdzono przewagę w częstotliwości występowania genotypu zawierającego obydwa allele typu dzikiego w grupie zdrowych ciężarnych kobiet (36,0 vs. 26,7% w grupie badanej, $p=0,05$). Otrzymane różnice w tym zakresie kształtowały się na poziomie granicznej istotności statystycznej. W grupie kobiet, u których wystąpił PTD nieznacznie częściej występował genotyp heterozygotyczny -596GA (48,6 vs.

42,7%) oraz genotyp homozygotyczny zawierający dwa zmutowane allele A (24,7 vs. 21,3%). Rozkład alleli w badanych grupach przedstawiał się następująco: allel -596G 51,0% w badanej grupie oraz 57,3% w grupie kontrolnej ($p=0,07$), natomiast zmutowany allel -596A w grupie PTD występował z częstością 49,0% w porównaniu do grupy kontrolnej 42,7% ($p=0,07$). Przeprowadzając analizę z użyciem testu *chi-kwadrat* Pearsona nie odnotowano różnic statystycznie istotnych pomiędzy badanymi grupami ($p=0,22$, istotność asymptotyczna dwustronna) (tab. 12, ryc. 14).

Tab. 12. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -596G>A genu *IL-6* w grupach badanej i kontrolnej.

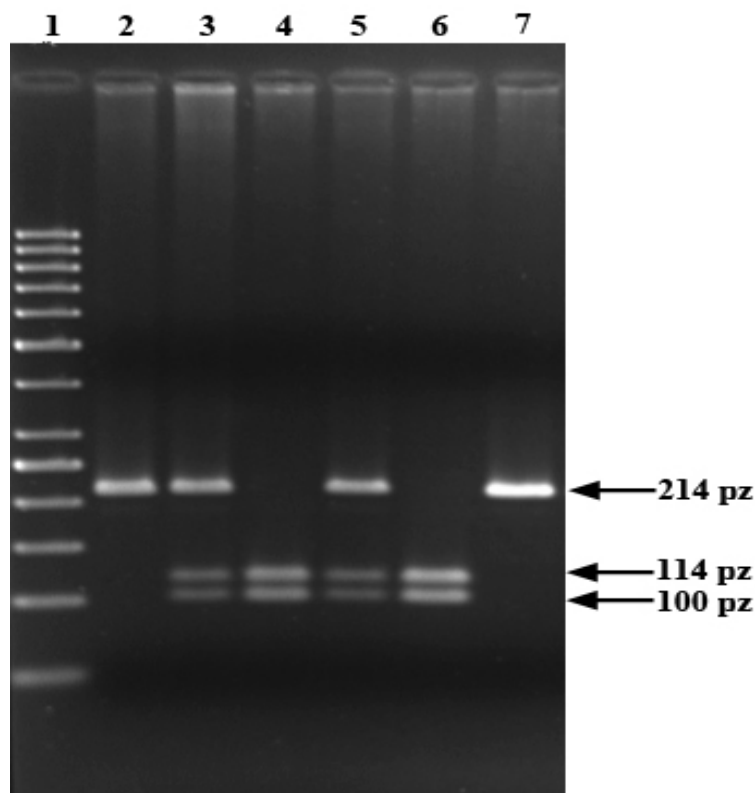
<i>IL-6</i> -596G>A	Grupa badana PTD (n=150)		Grupa kontrolna (n=150)		WR	95%PU	p
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)			
GG	40 (26,7)	26,0	54 (36,0)	32,9	0,65	0,38-1,08	0,05
GA	73 (48,6)	50,0	64 (42,7)	48,9	1,27	0,79-2,06	0,18
AA	37 (24,7)	24,0	32 (21,3)	18,2	1,21	0,68-2,15	0,29
Suma	150 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0			
Allele							
G	153 (51,0)	—	172 (57,3)	—	0,77	0,55-1,08	0,07
A	147 (49,0)	—	128 (42,7)	—	1,29	0,92-1,81	0,07
Suma	300 (100,0)	—	300 (100,0)	—			



Ryc. 14. Częstość występowania alleli dla polimorfizmu -596G>A genu *IL-6* w grupach badanej i kontrolnej.

4.2.2.2. POLIMORFIZM -174G>C GENU *IL-6*

Fotografia 4 przedstawia wszystkie trzy genotypy analizowanego polimorfizmu -174G>C genu *IL-6*. Genotypy uzyskiwano po hydrolizie z użyciem enzymu restrykcyjnego *LweI*. Przy obecności miejsca hydrolizy dla wymienionego enzymu i obecności dwóch prążków 114 oraz 100 pz potwierdzano obecność genotypu homozygotycznego niezmutowanego *GG*, trzy prążki na żelu odczytywano jako genotyp heterozygotyczny *GC*, natomiast jeden prążek wielkości 214 par zasad przedstawia genotyp homozygotyczny zmutowany *CC* (fot. 4).



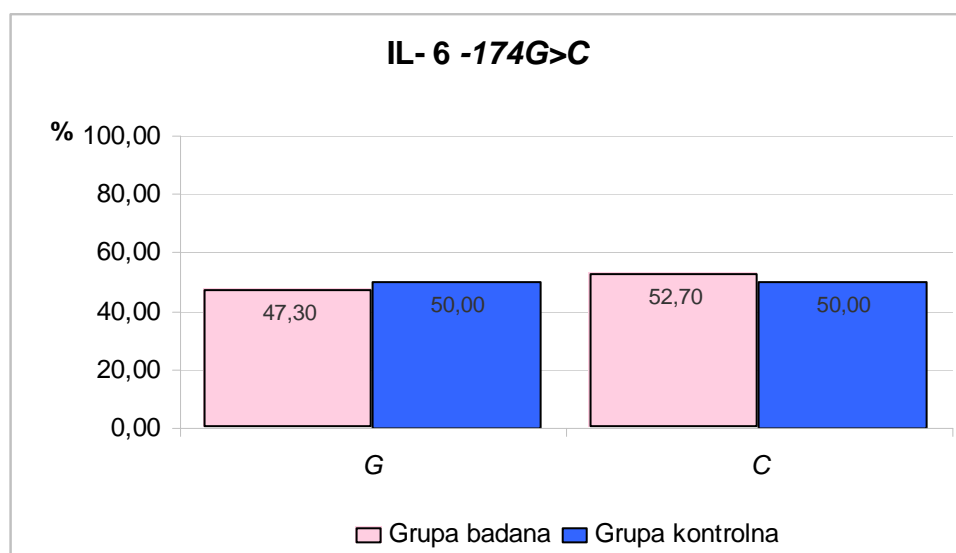
Fot. 4. Analiza genotypów polimorfizmu -174G>C genu *IL-6* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *LweI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 4, 6, homozygoty niezmutowane *GG*, tory 3, 5 heterozygoty *GC*, tory 2, 7 homozygoty zmutowane *CC*.

Analizując częstość występowania genotypów w badanych grupach w zakresie polimorfizmu -174G>C genu *IL-6* stwierdzono porównywalne występowanie zmutowanego genotypu -174CC w grupie badanej (28,0% vs. 24,0% w grupie kontrolnej, WR=1,23, $p=ns$) oraz podobną częstość występowania pozostałych badanych genotypów: heterozygotycznego -174GC (49,3 vs. 52,0% w grupie kontrolnej) oraz homozygotycznego -174GG (22,7 vs. 24,0% w grupie kontrolnej). Zaobserwowano również podobną częstość występowania obydwu alleli dla

analizowanego polimorfizmu: allele dzikiego *-174G* (47,3 vs. 50,0% w grupie kontrolnej) oraz zmutowanego allele *-174C* w grupie kobiet z PTD (52,7%) w porównaniu z grupą kontrolną (50,0%) ($p=ns$). Test *chi*-kwadrat Pearsona nie pokazał różnic statystycznie istotnych pomiędzy badanymi grupami ($p=0,73$, istotność asymptotyczna dwustronna) (tab. 13, ryc. 15).

Tab. 13. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-174G>C* genu *IL-6* w grupach badanej i kontrolnej.

<i>IL-6</i> <i>-174G>C</i>	<i>Grupa badana PTD</i> (<i>n=150</i>)		<i>Grupa kontrola</i> (<i>n=150</i>)		<i>WR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> (%)	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> (%)			
<i>GG</i>	34 (22,7)	22,4	36 (24,0)	25,0	0,93	0,52-1,64	0,45
<i>GC</i>	74 (49,3)	49,9	78 (52,0)	50,0	0,89	0,55-1,45	0,36
<i>CC</i>	42 (28,0)	27,7	36 (24,0)	25,0	1,23	0,71-2,13	0,26
<i>Suma</i>	150 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0			
<i>Allele</i>							
<i>G</i>	142 (47,3)	-	150 (50,0)	-	0,89	0,64-1,25	0,28
<i>C</i>	158 (52,7)	-	150 (50,0)	-	1,11	0,79-1,55	0,28
<i>Suma</i>	300 (100,0)	-	300 (100,0)	-			



Ryc. 15. Częstość występowania alleli polimorfizmu *-174G>C* genu *IL-6* w grupach badanej i kontrolnej.

W następnej kolejności analizowano również współwystępowanie obydwu badanych polimorfizmów genu *IL-6* w grupie kobiet z PTD i w grupie zdrowych ciężarnych. Częstość współwystępowania genotypów homozygotycznych niezmutowanych *-174GG/-596GG* (24,0% vs. 22,0%), jak również genotypów homozygotycznych zmutowanych *-174CC/-596AA* (23,3% vs. 21,3% w grupie kontrolnej) była podobna w obydwu badanych grupach ($p=ns$).

Ciekawą obserwacją było odnotowanie przewagi współwystępowania genotypu heterozygotycznego *-174GC* oraz homozygotycznego niezmutowanego *-596GG* (*-174GC/-596GG*) w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy badanej (10,7 vs. 2,0%, $p=0,00166$). Ponadto w grupie badanej PTD zaobserwowano współwystępowanie genotypów *-174GC/-596AA*, których nie odnotowano w grupie kontrolnej (1,3 vs. 0,0%). Obserwacja ta może sugerować fakt ochronnego wpływu obecności genotypu *-596GG* *IL-6* w stosunku do występowania PTD oraz znaczenia genotypu *-596AA* w etiologii PTD.

Obserwowano także następującą, podobną frekwencję współwystępowania innych kombinacji genotypów *-174GC/-596GA* (45,3 vs. 41,3%), *-174CC/-596GG* (2,7 vs. 1,3%) oraz *-174CC/-596GA* (2,7 vs. 1,4%). W obydwu badanych grupach nie zaobserwowano współwystępowania genotypu homozygotycznego niezmutowanego *GG* (dla polimorfizmu *-174G>C*) z genotypem zawierającym oba zmutowane allele *AA* (dla polimorfizmu *-596G>A*) (tab. 14).

Tab. 14. Współwystępowanie polimorfizmów *-174G>C* i *-596G>A* genu *IL-6* w grupie badanej i kontrolnej.

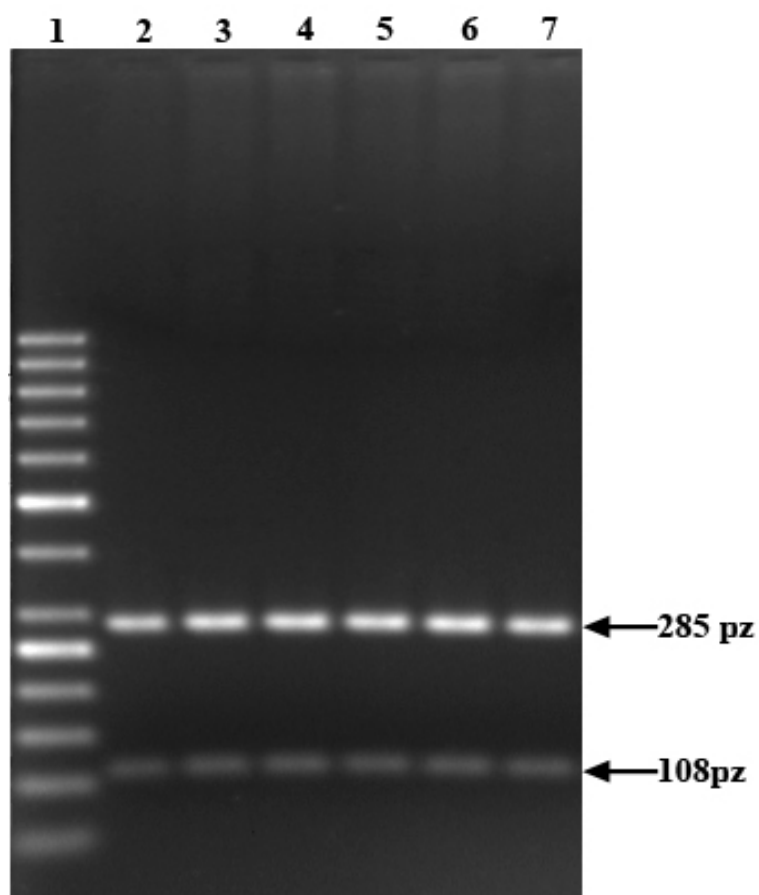
		-596G>A				Suma
			GG	GA	AA	
Grupa badana PTD (n=150)	-174G>C	GG	33 (22,0)	1 (0,7)	0 (0,0)	34 (22,7)
		GC	3 (2,0)*	68 (45,3)	2 (1,3)	73 (48,6)
		CC	4 (2,7)	4 (2,7)	35 (23,3)	43 (28,7)
		Suma	40 (26,7)	73 (48,7)	37 (24,6)	150 (100,0)
Grupa kontrolna (n=150)	-174G>C	GG	36 (24,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	36 (24,0)
		GC	16 (10,7)*	62 (41,3)	0 (0,0)	78 (52,0)
		CC	2 (1,3)	2 (1,4)	32 (21,3)	36 (24,0)
		Suma	54 (36,0)	64 (42,7)	32 (21,3)	150 (100,0)

* $p=0,00166$

4.2.2. POLIMORFIZM GENU *TNF-α*

4.2.2.1. POLIMORFIZM *-163G>A* GENU *TNF-α*

W prezentowanej pracy analizowano cztery polimorfizmy w odcinku promotorowym genu *TNF-α*. Fotografia 5 przedstawia jedno ze zdjęć wykonanych podczas analizy polimorfizmu *-163G>A* *TNF-α* po hydrolizie z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego *Bsh1236I*. Widoczne na żelu dwa prążki wielkości 285 i 108 pz oznaczają występowanie miejsca hydrolizy restrykcyjnej i odpowiadają obecności genotypu typu dzikiego *GG* (fot. 5).



Fot. 5. Analiza genotypów polimorfizmu *-163G>A* genu *TNF-α* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Bsh1236I*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 2-7 homozygoty niezmutowane *GG*.

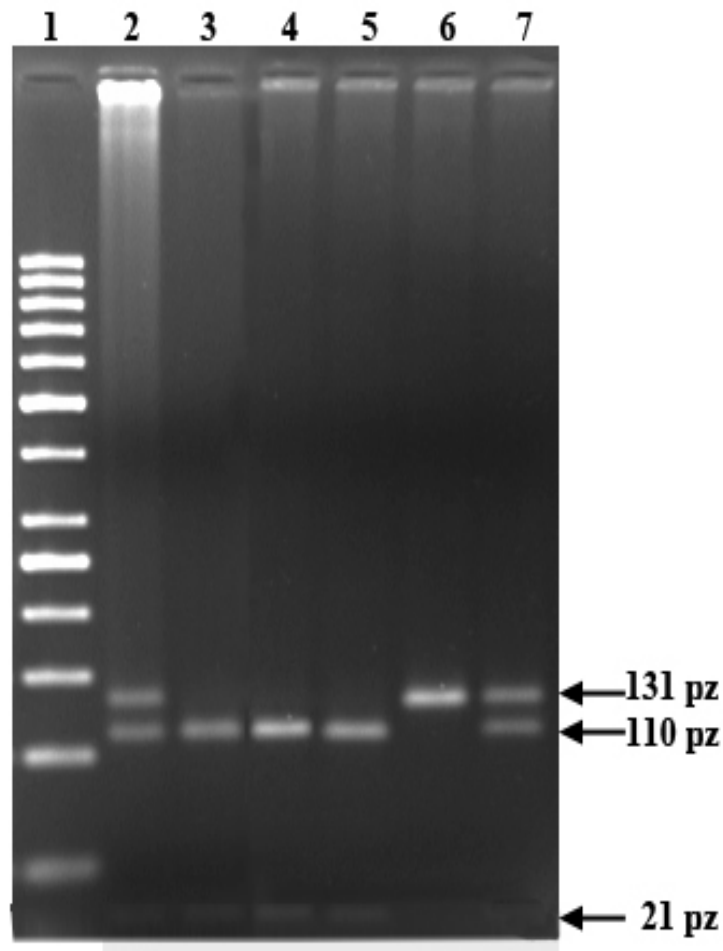
Analizując polimorfizm $-163G>A$ genu $TNF-\alpha$ w obydwu badanych grupach kobiet z porodem przedwczesnym oraz zdrowych ciężarnych u 100% badanych pacjentek potwierdzono występowanie genotypu dzikiego $-163GG$. Nie zaobserwowano obecności genotypu heterozygotycznego $-163GA$ oraz homozygotycznego zmutowanego $-163AA$ (tab. 15).

Tab. 15. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-163G>A$ genu $TNF-\alpha$ w grupach badanej i kontrolnej.

<i>TNFα</i> <i>-163G>A</i>	<i>Grupa badana PTD</i> <i>(n=150)</i>		<i>Grupa kontrola</i> <i>(n=150)</i>		<i>WR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> <i>(%)</i>	<i>wartość obserwowana</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiwana</i> <i>(%)</i>			
<i>GG</i>	150 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0	-	-	-
<i>GA</i>	0 (0,0)	0,0	0 (0,0)	0,0	-	-	-
<i>AA</i>	0 (0,0)	0,0	0 (0,0)	0,0	-	-	-
<i>Suma</i>	150 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0			
<i>Allele</i>							
<i>G</i>	300 (100,0)	-	300 (100,0)	-	-	-	-
<i>A</i>	0 (0,0)	-	0 (0,0)	-	-	-	-
<i>Suma</i>	300 (100,0)	-	300 (100,0)	-			

4.2.2.2. POLIMORFIZM -238G>A GENU *TNF-α*

Poniższa fotografia przedstawia wyniki uzyskane na żelu agarozowym po hydrolizie produktu reakcji PCR enzymem restrykcyjnym *Bsp*PI. Widoczne są na niej wszystkie trzy genotypy uwidocznione podczas analizy polimorfizmu -238G>A genu *TNF-α*. Genotypy odczytywano następująco: homozygota niezmutowana *GG* – obecność dwóch prążków 110 oraz 21 pz, heterozygota *GA* – obecność prążków wielkości 131, 110, 21 pz oraz homozygota zmutowana *AA* – obecność tylko jednego prążka 131 pz (fot. 6).



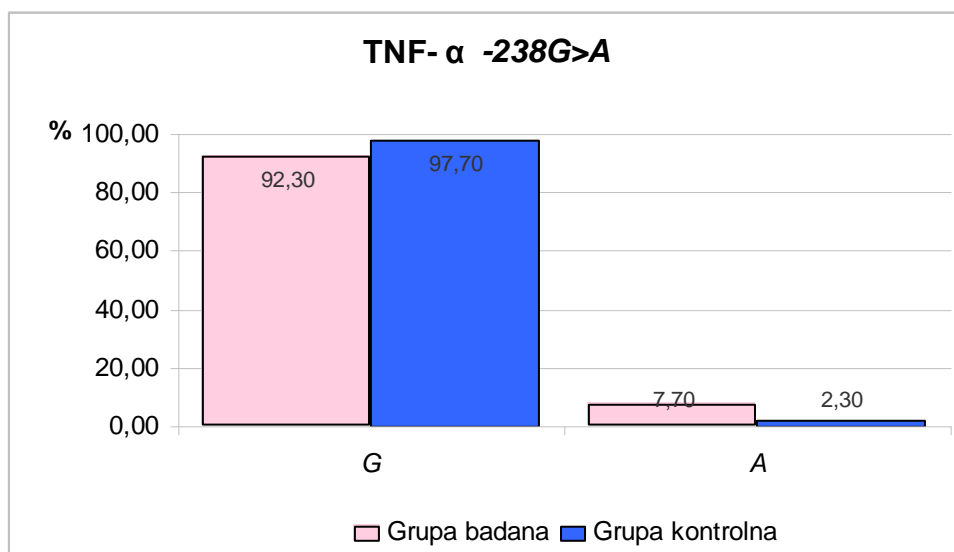
Fot. 6. Analiza genotypów polimorfizmu -238G>A genu *TNF-α* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Bsp*PI. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 3, 4, 5 homozygoty niezmutowane *GG*, tory 2, 7 heterozygoty *GA*, tor 6 homozygota zmutowana *AA*.

W prezentowanej pracy najciekawsze wyniki dotyczyły polimorfizmu -238G>A w odcinku promotorowym genu *TNF-α*. Zaobserwowano tutaj częstsze występowanie genotypu homozygotycznego typu dzikiego -238GG w grupie kontrolnej (95,3 vs. 86,0% w grupie badanej, $p=0,004$). Częstość występowania genotypu heterozygotycznego -238GA w badanej grupie PTD była wyższa w porównaniu z grupą kontrolną (12,7 vs. 4,7%, $WR=2,96$, $p=0,011$). Ponadto u dwóch pacjentek z grupy PTD zaobserwowano występowanie genotypu

homozygotycznego zmutowanego -238AA, który nie wystąpił u żadnej ze zdrowych ciężarnych kobiet z grupy kontrolnej (1,3 vs. 0,0%). Jeszcze wyraźniej różnice te uwidoczniły się podczas analizy częstości występowania alleli. Zmutowany allel -238A występował u 7,7% pacjentek z grupy badanej i tylko u 2,3% kobiet z grupy kontrolnej. Różnica ta również była statystycznie istotna ($p=0,002$). Analiza z użyciem testu *chi*-kwadrat Pearsona pokazała różnicę statystycznie istotną w częstości występowania badanych genotypów ($p=0,016$, istotność asymptotyczna dwustronna) (tab. 16, ryc. 16).

Tab. 16. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -238G>A genu *TNF- α* w grupach badanej i kontrolnej.

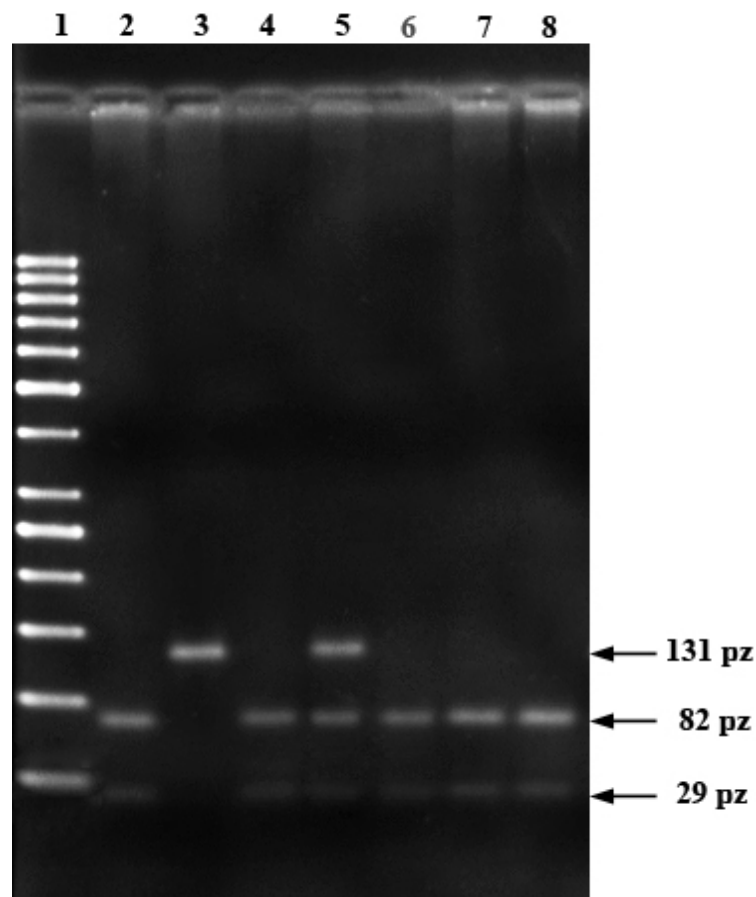
<i>TNF-α</i> -238G>A	Grupa badana PTD (n=150)		Grupa kontrola (n=150)		WR	95%PU	p
Genotypy	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)			
GG	129 (86,0)	85,2	143 (95,3)	95,4	0,30	0,10-0,76	0,004
GA	19 (12,7)	14,2	7 (4,7)	4,6	2,96	1,14-8,59	0,011
AA	2 (1,3)	0,6	0 (0,0)	0,0	-	-	-
Suma	150 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0	-	-	-
Allele							
G	277 (92,3)	-	293 (97,7)	-	0,29	0,10-0,71	0,002
A	23 (7,7)	-	7 (2,3)	-	3,48	1,41-9,72	0,002
Suma	300 (100,0)	-	300 (100,0)	-			



Ryc. 16. Częstość występowania alleli polimorfizmu -238G>A genu *TNF- α* w grupach badanej i kontrolnej.

4.2.2.3. POLIMORFIZM -308G>A GENU *TNF-α*

Poniżej przedstawiono przykładowy wynik uzyskany po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *FaqI* podczas analizy polimorfizmu -308G>A genu *TNF-α*. W przebiegu hydrolizy otrzymywano trzy prążki 131, 82 i 29 pz uwidaczniane na 3% żelu agarozowym. Obecność jednego prążka wielkości 131 pz odczytywano jako genotyp homozygotyczny zmutowany AA, dwa prążki wielkości 131 oraz 82 pz – jako genotyp heterozygotyczny GA, natomiast prążki 82 oraz 29 pz odczytywano jako genotyp homozygotyczny niezmutowany GG (fot. 7).



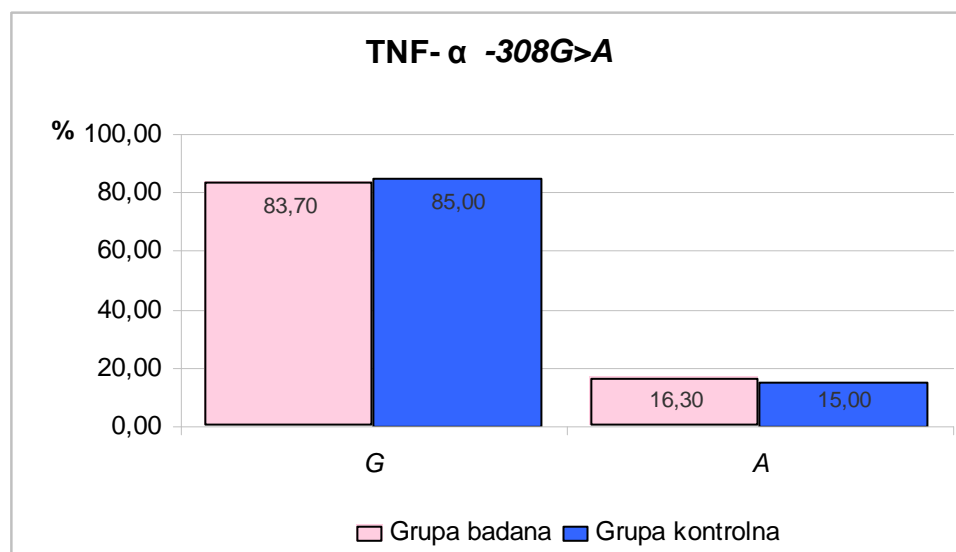
Fot. 7. Analiza genotypów polimorfizmu -308G>A genu *TNF-α* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *FaqI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 2, 4, 6-8 homozygoty niezmutowane GG, tor 5 heterozygota GA, tor 3 homozygota zmutowana AA.

W zakresie analizowanego polimorfizmu -308G>A rozkład genotypów GG : GA : AA przedstawiał się odpowiednio w grupie badanej 68,7 vs. 30,0 vs. 1,3% oraz w grupie kontrolnej 72,0 vs. 26,0 vs. 2,0%. We wszystkich przypadkach odnotowano podobną frekwencję badanych

genotypów ($p=ns$). Również analizując częstość występowania poszczególnych alleli dla tego polimorfizmu stwierdzono podobną frekwencję występowania allela -308G (83,7 vs. 85,0%, $p=ns$) oraz zmutowanego allela -308A (16,3 vs. 15,0%, $p=ns$) w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną. Analiza przy zastosowaniu testu *chi*-kwadrat Pearsona nie ujawniła różnicy statystycznie istotnej w częstości występowania badanych genotypów ($p=0,67$, istotność asymptotyczna dwustronna) (tab. 17, ryc. 17).

Tab. 17. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -308G>A genu *TNF- α* w grupach badanej i kontrolnej.

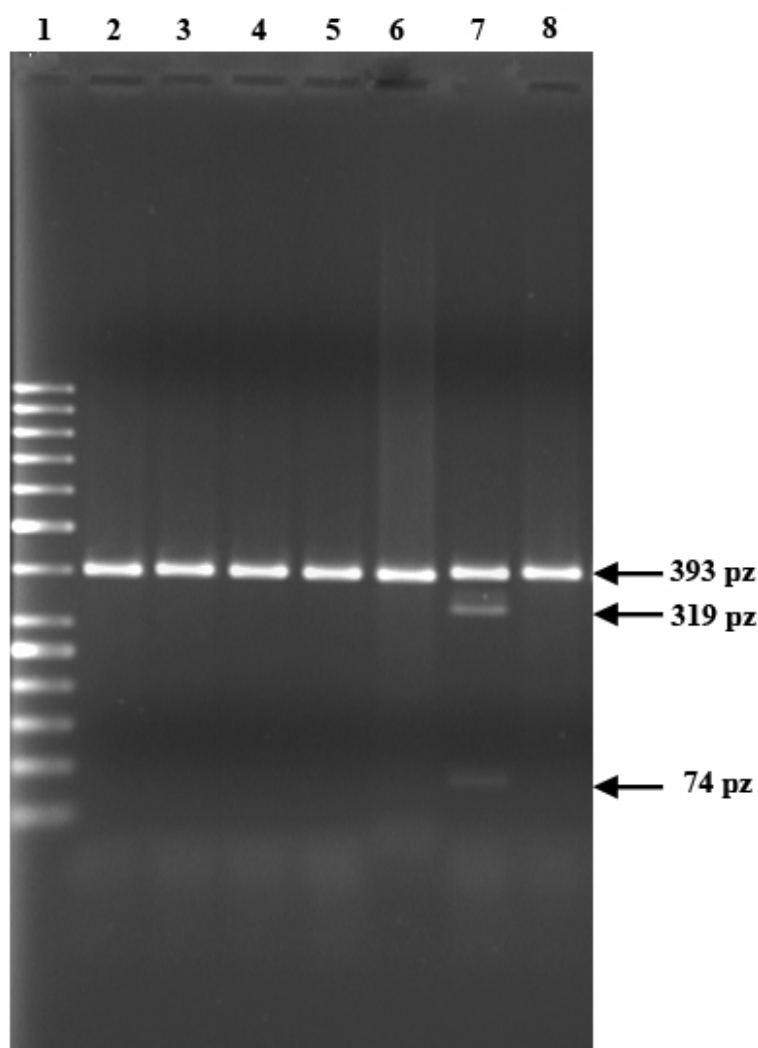
<i>TNF-α</i> -308G>A	Grupa badana PTD (n=150)		Grupa kontrola (n=150)		WR	95%PU	p
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)			
GG	103 (68,7)	70,0	108 (72,0)	72,3	0,85	0,50-1,44	0,31
GA	45 (30,0)	27,3	39 (26,0)	25,5	1,22	0,71-2,08	0,26
AA	2 (1,3)	2,7	3 (2,0)	2,2	0,66	0,05-5,87	0,50
Suma	150 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0			
Allele							
G	251 (83,7)	-	255 (85,0)	-	0,90	0,57-1,44	0,37
A	49 (16,3)	-	45 (15,0)	-	1,11	0,69-1,76	0,37
Suma	300 (100,0)	-	300 (100,0)	-			



Ryc. 17. Częstość występowania alleli polimorfizmu -308G>A genu *TNF- α* w grupach badanej i kontrolnej.

4.2.2.4. POLIMORFIZM -376G>A GENU *TNF-α*

Wyniki uzyskiwane w zakresie ostatniego z badanych polimorfizmów promotora genu *TNF-α* w pozycji -376 przedstawia fotografia 8. Hydroliza produktu reakcji PCR przeprowadzana była z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego *TasI*. Prążek wielkości 393 pz odpowiada obecności genotypu *GG* (homozygota typu dzikiego), natomiast trzy prążki o wielkościach 393, 319 i 74 pz odpowiadają obecności genotypu heterozygotycznego *GA* (fot. 8).



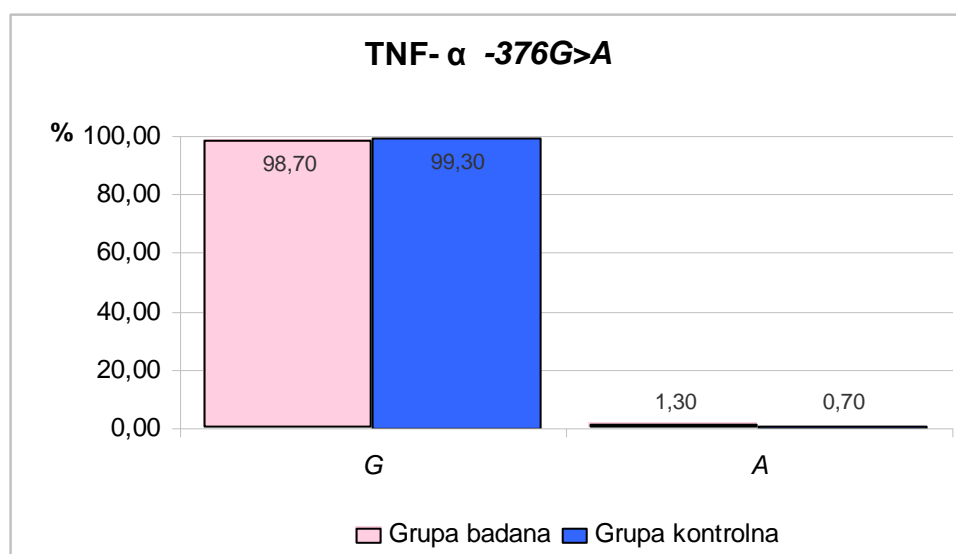
Fot. 8. Analiza genotypów polimorfizmu -376G>A genu *TNF-α* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *TasI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 1-6, 8 homozygoty niezmutowane *GG*, tor 7 heterozygota *GA*.

Dla polimorfizmu -376G>A genu *TNF-α* w badanych grupach kobiet z PTD oraz zdrowych ciężarnych nie zaobserwowano występowania genotypu zawierającego obydwie zmutowane allele A jednocześnie (-376AA). W grupie badanej kobiet z porodem przedwczesnym

odnotowano podobną częstość występowania genotypu heterozygotycznego -376GA (2,7 vs. 1,3% w grupie kontrolnej, WR=2,03, p=ns), jak również zmutowanego allele -376A w grupie kobiet z PTD, która wynosiła 1,3% w porównaniu do grupy kontrolnej 0,67% (WR=2,01, p=ns). W czasie analizy z zastosowaniem testu *chi*-kwadrat Pearsona nie wskazano różnic statystycznie istotnych w częstości występowania badanych genotypów (p=0,41, istotność asymptotyczna dwustronna) (tab. 18, ryc. 18).

Tab. 18. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -376G>A genu *TNF-α* w grupach badanej i kontrolnej.

<i>TNF-α</i> -376G>A	Grupa badana PTD (n=150)		Grupa kontrolna (n=150)		WR	95%PU	p
	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)	wartość obserwowana n (%)	wartość oczekiwana (%)			
GG	146 (97,3)	97,4	148 (98,7)	98,7	0,49	0,04-3,51	0,34
GA	4 (2,7)	2,6	2 (1,3)	1,3	2,03	0,28-22,68	0,34
AA	0 (0,0)	0,0	0 (0,0)	0,0	-	-	-
Suma	150 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0			
Allele							
G	296 (98,7)	-	298 (99,3)	-	0,50	0,04-3,49	0,34
A	4 (1,3)	-	2 (0,7)	-	2,01	0,29-22,39	0,34
Suma	300 (100,0)	-	300 (100,0)	-			



Ryc. 18. Częstość występowania alleli polimorfizmu -376G>A genu *TNF-α* w grupach badanej i kontrolnej.

W toku badań przeanalizowano także współwystępowanie wszystkich badanych polimorfizmów genu *TNF-α*. W grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych statystycznie częściej współwystępowały genotypy homozygotyczne niezmutowane dla czterech badanych polimorfizmów w porównaniu z grupą badaną (68,0 vs. 57,3%, $p=0,037$). Natomiast kombinacje genotypów *TNF-α* zawierających zmutowany allel -238A dla polimorfizmu -238G>A statystycznie częściej występowały w grupie badanej ciężarnych z PTD. W kolejności zaobserwowano wyższą częstość współwystępowania innych kombinacji genotypów: GG/GA/GG/GG (8,0 vs. 2,7%, $p=0,035$), GG/GA/GG/GA (2,7 vs. 1,3%, $p=ns$), GG/GA/GA/GG (2,0 vs. 0,7%, $p=ns$) oraz GG/AA/GG/GG (1,3 vs. 0,0%). Obserwacje te sugerują udział zmutowanego wariantu -238A we wzroście ryzyka wystąpienia PTD (tab. 19).

Tab. 19. Współwystępowanie genotypów *TNF-α* (-163 G>A, -238 G>A, -308 G>A, -376 G>A).

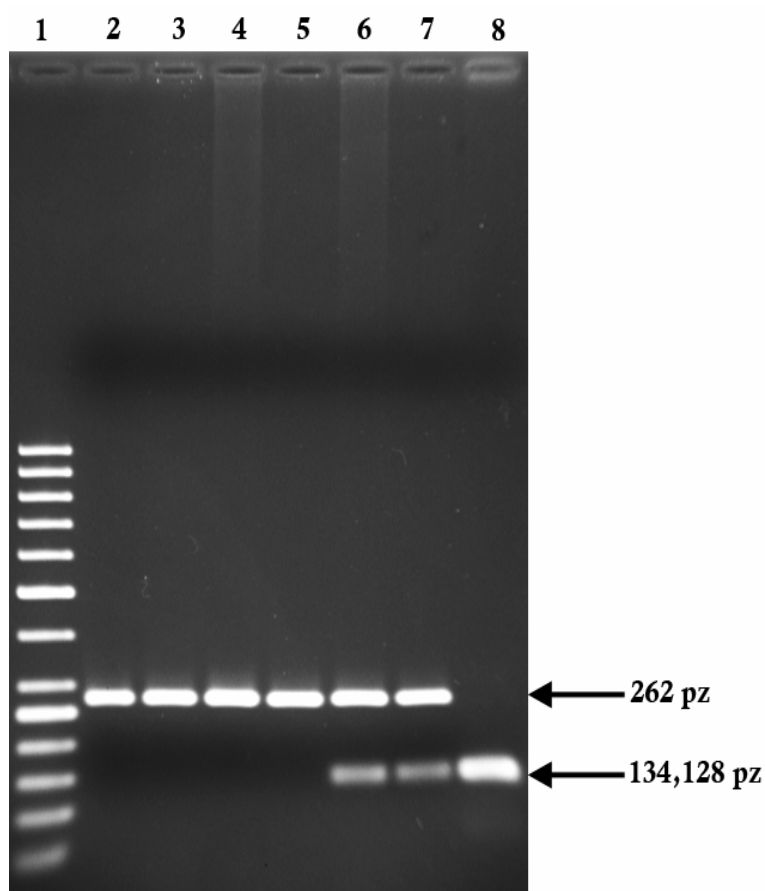
<i>Polimorfizmy -163G>A/-238G>A/-308G>A/-376G>A genu TNF-α</i>	<i>Grupa badana PTD n (%)</i>	<i>Grupa kontrolna n (%)</i>	<i>p</i>
<i>GG/GG/GG/GG</i>	86 (57,3)	102 (68,0)	0,037*
<i>GG/GG/GA/GG</i>	41 (27,3)	38 (25,3)	0,396
<i>GG/GG/AA/GG</i>	2 (1,3)	3 (2,0)	0,500
<i>GG/GA/GG/GG</i>	12 (8,0)	4 (2,7)	0,035*
<i>GG/GA/GG/GA</i>	4 (2,7)	2 (1,3)	0,342
<i>GG/GA/GA/GG</i>	3 (2,0)	1 (0,7)	0,311
<i>GG/AA/GG/GG</i>	2 (1,3)	0 (0,0)	-
<i>Suma</i>	150 (100,0)	150 (100,0)	

* $p < 0,05$

4.2.3. POLIMORFIZM GENÓW RECEPTORÓW TOLL-LIKE

4.2.3.1. POLIMORFIZM GENU *TLR2*

Podczas analizy polimorfizmu *Arg753Gln* ($20877G>A$) genu *TLR2* produkt reakcji PCR (fragment o wielkości 262 pz) poddawano hydrolizie z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego *Pst*I. Przykładowy rozkład genotypów dla tego wariantu genetycznego przedstawia poniższa fotografia. Genotyp homozygotyczny typu dzikiego *GG* rozpoznawano przy obecności jednego prążka wielkości 262 pz. Genotyp homozygotyczny zmutowany *AA* przy dwóch prążków wielkości 134 i 128 pz. Genotyp heterozygotyczny *GA* charakteryzował się obecnością wszystkich trzech prążków (262, 134 oraz 128 pz) (fot. 9).



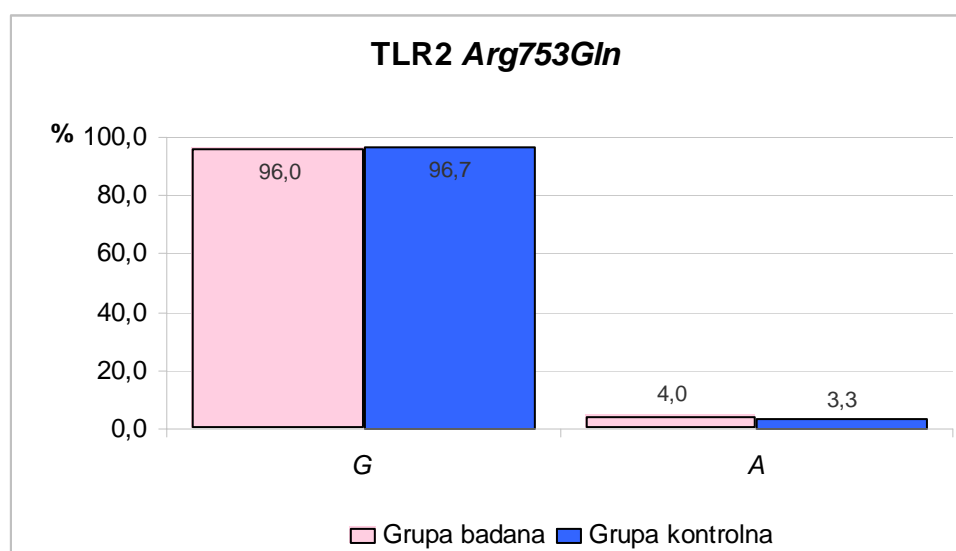
Fot. 9. Analiza genotypów polimorfizmu *Arg753Gln* genu *TLR2* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Pst*I. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 2, 3, 4, 5 homozygoty niezmutowane *GG*, tory 6, 7 heterozygoty *GA*, tor 8 homozygota zmutowana *AA*.

Podczas analizy polimorfizmu *Arg753Gln* genu *TLR2* zaobserwowano podobną częstość występowania niezmutowanego genotypu homozygotycznego $20877GG$ w grupie badanej oraz kontrolnej (92,0% vs. 94,0%, $WR=0,73$, $p=ns$). Odnotowano również podobną częstość występowania heterozygot $20877GA$ w grupie pacjentek z PTD w porównaniu do

grupy kontrolnej zdrowych kobiet ciężarnych (8,0 vs. 5,3%, WR=1,54, $p=ns$). Częstość występowania allele 20877G (96,0 vs. 96,7%, WR=0,83, $p=ns$) oraz zmutowanego allele 20877A (4,0 vs. 3,3%, WR=1,21, $p=ns$) była podobna w obydwu badanych grupach pacjentek. Przy zastosowaniu testu *chi*-kwadrat Pearsona również nie pokazano różnic statystycznie istotnych w częstości występowania genotypów pomiędzy badanymi grupami ($p=0,40$, istotność asymptomatyczna dwustronna) (tab. 20, ryc. 15).

Tab. 20. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Arg753Gln* genu *TLR2* w grupach badanej i kontrolnej.

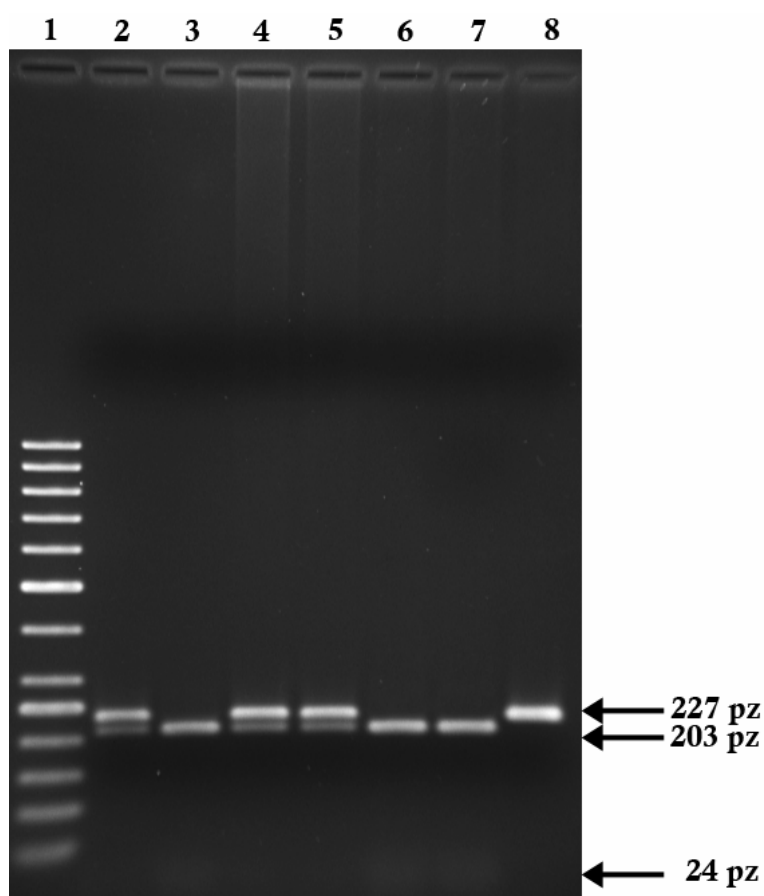
<i>TLR2</i> <i>Arg753Gln</i> (20877G>A)	<i>Grupa badana PTD</i> (<i>n</i> =150)		<i>Grupa kontrola</i> (<i>n</i> =150)		WR	95%PU	<i>p</i>
	wartość obserwowana <i>n</i> (%)	wartość oczekiwana (%)	wartość obserwowana <i>n</i> (%)	wartość oczekiwana (%)			
GG	138 (92,0)	92,2	141 (94,0)	93,5	0,73	0,26-1,96	0,33
GA	12 (8,0)	7,7	8 (5,3)	6,4	1,54	0,55-4,49	0,24
AA	0 (0,0)	0,1	1 (0,7)	0,1	-	-	-
Suma	150 (100,0)	100,00	150 (100,0)	100,0			
Allele							
G	288 (96,0)	-	290 (96,7)	-	0,83	0,32-2,13	0,41
A	12 (4,0)	-	10 (3,3)	-	1,21	0,47-3,17	0,41
Suma	300 (100,0)	-	300 (100,0)	-			



Ryc. 19. Częstość występowania alleli polimorfizmu *Arg753Gln* genu *TLR2* w grupach badanej i kontrolnej.

4.2.3.2. POLIMORFIZM GENU *TLR4*

Przykładowe wyniki analizy polimorfizmu *Thr399Ile* ($8993C>T$) genu *TLR4* widoczne są na fotografii 10. Enzym restrykcyjny *MspI* rozpoznawał we fragmencie uzyskanym po reakcji PCR jedno miejsce restrykcyjne w przypadku występowania allele *C*. Genotypy *CC* widoczne były na żelach agarozowych w postaci dwóch prążków (203 i 24 pz), heterozygoty *CT* - trzech prążków (227, 203 i 24 pz) natomiast genotyp homozygotyczny zmutowany nie posiadał miejsca hydrolizy rozpoznawanego przez stosowany enzym restrykcyjny i rozpoznawany był przy obecności prążka wielkości 227 pz (fot. 10).



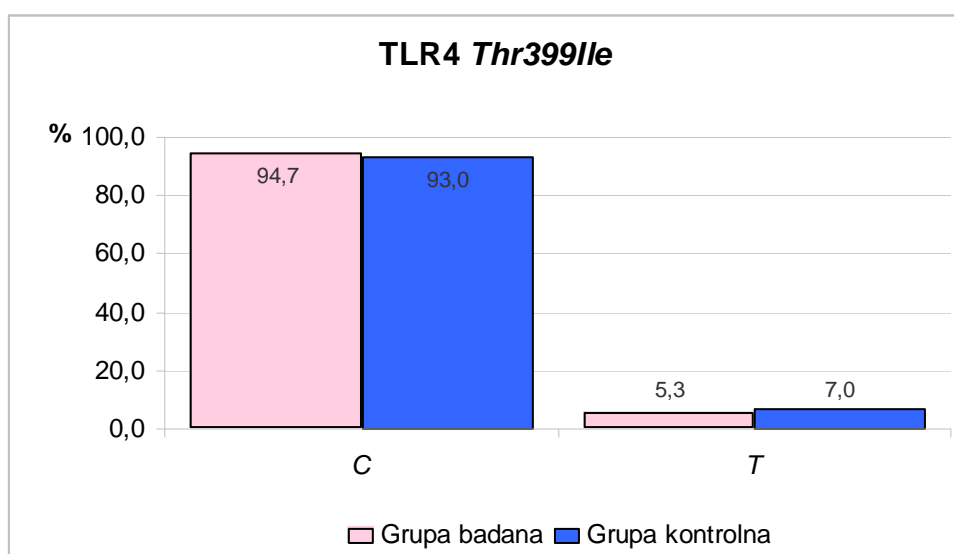
Fot. 10. Analiza genotypów polimorfizmu *Thr399Ile* genu *TLR4* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *MspI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 3, 6, 7 homozygoty niezmutowane *CC*, tory 2, 4, 5 heterozygoty *CT*, tor 8 homozygota zmutowana *TT*.

W czasie analizy polimorfizmu *Thr399Ile* genu *TLR4* odnotowano większą częstość występowania genotypu heterozygotycznego $8993CT$ w grupie kontrolnej (14,0 vs. 9,3%, $WR=0,63$, $p=ns$), jak również nieznacznie większą frekwencję zmutowanego allele $8993T$ w grupie kontrolnej (7,0 vs. 5,3%, $WR=0,75$, $p=ns$) w porównaniu do grupy kobiet z porodem

przedwczesnym. Jedyny zaobserwowany genotyp zawierający dwa zmutowane allele *T* (8993*TT*) stwierdzono u jednej pacjentki z grupy badanej (0,7 vs. 0,0%). Częstość występowania allele dzikiego 8993*C* była podobna w obydwu badanych grupach ciężarnych (94,7 vs. 93,0% w grupie kontrolnej, $WR=1,34$, $p=ns$). Badając różnice w częstości występowania poszczególnych genotypów z zastosowaniem testu *chi*-kwadrat Pearsona nie odnotowano różnicy w istotności statystycznej pomiędzy grupą badaną i kontrolną ($p=0,28$, istotność asymptotyczna dwustronna) (tab. 21, ryc. 20).

Tab. 21. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Thr399Ile* genu *TLR4* w grupach badanej i kontrolnej.

<i>TLR4</i> <i>Thr399Ile</i> (8993 <i>C>T</i>)	<i>Grupa badana PTD</i> (<i>n</i> =150)		<i>Grupa kontrolna</i> (<i>n</i> =150)		<i>WR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
	wartość obserwowana <i>n</i> (%)	wartość oczekiwana (%)	wartość obserwowana <i>n</i> (%)	wartość oczekiwana (%)			
<i>CC</i>	135 (90,0)	89,6	129 (86,0)	86,5	1,46	0,68-3,19	0,19
<i>CT</i>	14 (9,3)	10,1	21 (14,0)	13,0	0,63	0,28-1,37	0,14
<i>TT</i>	1 (0,7)	0,3	0 (0,0)	0,5	—	—	—
<i>Suma</i>	150 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0			
<i>Allele</i>							
<i>C</i>	284 (94,7)	—	279 (93,0)	—	1,34	0,65-2,79	0,25
<i>T</i>	16 (5,3)	—	21 (7,0)	—	0,75	0,36-1,54	0,25
<i>Suma</i>	300 (100,0)	—	300 (100,0)	—			



Ryc. 20. Częstość występowania alleli polimorfizmu *Thr399Ile* genu *TLR4* w grupach badanej i kontrolnej.

W toku badań analizowano również współwystępowanie badanych polimorfizmów genów *TLR2* i *TLR4*. W grupie badanej zaobserwowano podobne współwystępowanie genotypów homozygotycznych niezmutowanych *GG TLR2/CC TLR4* (83,3 vs. 80,0%, $p=ns$) oraz *GA TLR2/CC TLR4* (6,7 vs. 5,3%, $p=ns$) w porównaniu z grupą kontrolną. Uwagę zwraca fakt przewagi współwystępowania genotypów *GG TLR2/CT TLR4* w grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych (14,0 vs. 8,0%, $p=0,0695$). W grupie kobiet z PTD znalazła się jedna pacjentka z kombinacją genotypów *GG TLR2/TT TLR4* (0,7 vs. 0,0%) oraz dwie kobiety z kombinacją genotypów heterozygotycznych w zakresie obydwu badanych polimorfizmów genów receptorów TLR (1,3 vs. 0,0%). Natomiast w grupie kontrolnej jedna z ciężarnych była nosicielką współwystępujących genotypów *AA TLR2 /CC TLR4* (0,7 vs. 0,0% w grupie badanej). W obydwu badanych grupach kobiet nie odnotowano występowania kombinacji genotypów *AA TLR2/CT TLR4*, *GA TLR2/TT TLR4* oraz *AA TLR2/TT TLR4* (tab. 22).

Tab. 22. Współwystępowanie polimorfizmów genów *TLR2* i *TLR4* w grupie badanej i kontrolnej.

			<i>TLR2</i>			<i>Suma</i>
			<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>	
Grupa badana <i>PTD</i> (<i>n=150</i>)	<i>TLR4</i>	<i>CC</i>	125 (83,3)	10 (6,7)	0 (0,0)	165 (90,0)
		<i>CT</i>	12 (8,0)*	2 (1,3)	0 (0,0)	14 (9,3)
		<i>TT</i>	1 (0,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,7)
		<i>Suma</i>	138 (92,0)	12 (8,0)	0 (0,0)	150 (100,0)
Grupa kontrolna (<i>n=150</i>)	<i>TLR4</i>	<i>CC</i>	120 (80,0)	8 (5,3)	1 (0,7)	129 (86,00)
		<i>CT</i>	21 (14,00)*	0 (0,0)	0 (0,0)	21 (14,0)
		<i>TT</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
		<i>Suma</i>	141 (94,0)	8 (5,3)	1 (0,7)	150 (100,0)

* $p=0,0695$

4.3. POLIMORFIZM BADANYCH GENÓW W ZALEŻNOŚCI OD TYGODNIA ZAKOŃCZENIA CIĄŻY W GRUPIE KOBIET Z PTD

W następnym etapie pracy podzielono grupę badaną ciężarnych z PTD na 3 podgrupy: a/ kobiety, u których poród odbył się pomiędzy 22-28 tc. b/ poród pomiędzy 28-32 tc. oraz c/ poród pomiędzy 32-36+6 tc. W każdej z tych grup analizowano częstość występowania genotypów i alleli poszczególnych polimorfizmów badanych genów cytokin i receptorów Toll-like.

W zakresie polimorfizmu $-596G>A$ genu *IL-6* wskazano większą częstość występowania zmutowanego allele $-596A$ w grupie PTD 28-32 tc. (57,9 vs. 42,7%, $p=0,05$) (tab. 24). W stosunku do drugiego z badanych polimorfizmów $-174G>A$ genu *IL-6* w grupie PTD 28-32 tc. wskazano wyższą frekwencję zarówno zmutowanego genotypu $-174CC$ (47,4 vs. 24,0%, $p=0,03$), jak również zmutowanego allele $-174A$ (65,8 vs. 50,0%, $p=0,04$) (tab. 25).

W czasie analizy genu *TNF- α* najciekawszą obserwacją było wykazanie różnic statystycznie istotnych w częstości występowania genotypu heterozygotycznego $-238GA$ genu *TNF- α* w grupie PTD 28-32 tc. (31,6 vs. 4,7%, $p=0,00095$). Częstość zmutowanego allele $-238A$ *TNF- α* w tej podgrupie (PTD 28-32 tc.) wynosiła 21,1% w porównaniu do grupy kontrolnej (2,3%) ($p=0,00004$) (tab. 27).

Również w podgrupie 32-36 tc. wystąpiły różnice statystycznie istotne w częstości występowania genotypu heterozygotycznego zawierającego jeden zmutowany allele $-238GA$ *TNF- α* (10,6 vs. 4,7%, $p=0,033$) oraz zmutowanego allele $-238A$ *TNF- α* (6,1 vs. 2,3%, $p=0,022$) (tab. 27).

Dla polimorfizmu $-376G>A$ *TNF- α* w grupie PTD 28-32 tc. zaobserwowano wyższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego $-376GA$ *TNF- α* (10,5 vs. 1,3%, $WR=8,71$, istotność statystyczna zbliżona do wartości granicznych $p=0,063$). Podobną obserwację odnotowano dla zmutowanego allele $-376A$ *TNF- α* (5,3 vs. 0,7%, $WR=8,28$, istotność statystyczna zbliżona do wartości granicznych $p=0,064$) (tab. 29).

Porównując częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmów *Arg753Gln* genu *TLR2* (tab. 30) i *Thr399Ile* genu *TLR4* (tab. 31) oraz 86 pz *VNTR* genu *IL-1RN* (tab. 32), *-308G>A* genu *TNF- α* (tab. 28) i *+3953C>T* genu *IL-1 β* (tab. 23) w badanych trzech podgrupach kobiet z PTD w zależności od czasu trwania ciąży oraz w grupie kontrolnej nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych.

Tab. 23. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu +3953C>T genu *IL-1 β* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.

<i>IL-1β</i> +3953C>T	<i>Grupa badana PTD</i>									<i>Grupa kontrola</i>
	<i>22-28 tc.</i>			<i>28-32 tc.</i>			<i>32-36 tc.</i>			
	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>n (%)</i>
<i>Genotypy</i>										
<i>CC</i>	4 (50,0)	0,78	0,51	9 (47,4)	0,71	0,31	71 (57,7)	1,07	0,43	84 (56,0)
<i>CT</i>	3 (37,5)	0,92	0,61	10 (52,6)	1,41	0,31	42 (34,2)	0,79	0,22	59 (39,3)
<i>TT</i>	1 (12,5)	2,92	0,34	0 (0,0)	-	-	10 (8,1)	1,81	0,18	7 (4,7)
<i>Suma</i>	8 (100,0)			19 (100,0)			123 (100,0)			150 (100,0)
<i>Allele</i>										
<i>C</i>	11 (68,8)	0,71	0,35	28 (73,7)	0,90	0,46	184 (74,8)	0,95	0,45	227 (75,7)
<i>T</i>	5 (31,2)	0,41	0,35	10 (26,3)	1,11	0,46	62 (25,2)	1,05	0,45	73 (24,3)
<i>Suma</i>	16 (100,0)			38 (100,0)			246 (100,0)			300 (100,0)

wszystkie badane podgrupy kobiet z PTD porównywano do grupy kontrolnej

Tab. 24. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -596G>A genu *IL-6* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.

<i>IL-6</i> -596G>A	<i>Grupa badana PTD</i>									<i>Grupa kontrolna</i> n (%)
	<i>22-28 tc.</i>			<i>28-32 tc.</i>			<i>32-36 tc.</i>			
	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	
<i>Genotypy</i>										
<i>GG</i>	2 (25,0)	0,59	0,41	4 (21,1)	0,47	0,15	34 (27,6)	0,68	0,09	54 (36,0)
<i>GA</i>	5 (62,5)	2,24	0,22	8 (42,1)	0,98	0,58	60 (48,8)	1,28	0,19	64 (42,7)
<i>AA</i>	1 (12,5)	0,52	0,47	7 (36,8)	2,15	0,11	29 (23,6)	1,14	0,38	32 (21,3)
<i>Suma</i>	8 (100,0)	-	-	19 (100,0)	-	-	123 (100,0)	-	-	150 (100,0)
<i>Allele</i>										
<i>G</i>	9 (56,3)	0,96	0,56	16 (42,1)	0,54	0,05*	128 (52,1)	0,80	0,12	172 (57,3)
<i>A</i>	7 (43,7)	1,04	0,56	22 (57,9)	1,85	0,05*	118 (47,9)	1,24	0,12	128 (42,7)
<i>Suma</i>	16 (100,0)	-	-	38 (100,0)	-	-	246 (100,0)	-	-	300 (100,0)

wszystkie badane podgrupy kobiet z PTD porównywano do grupy kontrolnej

* $p < 0,05$

Tab. 25. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -174G>C genu *IL-6* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.

<i>IL-6</i> -174G>C Genotypy	Grupa badana PTD									Grupa kontrola n (%)
	22-28 tc.			28-32 tc.			32-36 tc.			
	n (%)	WR	p	n (%)	WR	p	n (%)	WR	p	
GG	2 (25,0)	1,05	0,61	3 (15,8)	0,59	0,32	29 (23,6)	0,97	0,53	36 (24,0)
GC	5 (62,5)	1,53	0,41	7 (36,8)	0,53	0,15	62 (50,4)	0,93	0,44	78 (52,0)
CC	1 (12,5)	0,45	0,40	9 (47,4)	2,85	*0,03	32 (26,0)	1,11	0,40	36 (24,0)
Suma	8 (100,0)	-	-	19 (100,0)			123 (100,0)			150 (100,0)
Allele										
G	9 (56,3)	1,28	0,41	13 (34,2)	0,52	*0,04	120 (48,8)	0,95	0,42	150 (50,0)
C	7 (43,7)	0,77	0,41	25 (65,8)	1,92	*0,04	126 (51,2)	1,05	0,42	150 (50,0)
Suma	16 (100,0)	-	-	38 (100,0)			246 (100,0)			300 (100,0)

wszystkie badane podgrupy kobiet z PTD porównywano do grupy kontrolnej

*p<0,05

W podgrupie kobiet, u których poród odbył się pomiędzy 28-32 tc., zaobserwowano częstsze współwystępowanie genotypów *-174CC/-596GG* w porównaniu do grupy kontrolnej (10,53 vs. 1,3% w gr. kontrolnej, WR=8,7, 95%, PU 0,58-124,21, $p=0,06$).

W podgrupie kobiet, u których poród odbył się pomiędzy 32-36 tc., zaobserwowano rzadsze współwystępowanie genotypów *-174GC/-596GG* w porównaniu do grupy kontrolnej (10,70 vs. 2,44%, WR=0,21, 95%, PU 0,03-0,76, $p=0,006$) (tab. 26).

Tab. 26. Współwystępowanie genotypów badanych polimorfizmów genu *IL-6* w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.

			<i>IL-6 -174G>C</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>GG</i>	<i>GC</i>	<i>CC</i>	
<i>PTD</i> <i>22-23 tc</i>	<i>IL6</i> <i>-596G>A</i>	<i>GG</i>	2 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (25,0)
		<i>GA</i>	0 (0,0)	5 (62,5)	0 (0,0)	5 (62,5)
		<i>AA</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	1 (12,5)
		<i>Suma</i>	2 (25,0)	5 (62,5)	1 (12,5)	8 (100,0)
<i>PTD</i> <i>28-32 tc</i>	<i>IL6</i> <i>-596G>A</i>	<i>GG</i>	2 (10,5)	0 (0,0)	2 (10,5)*	4 (21,1)
		<i>GA</i>	1 (5,3)	7 (36,8)	0 (0,0)	8 (42,1)
		<i>AA</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	7(36,8)	7 (36,8)
		<i>Suma</i>	3 (15,8)	7 (36,8)	9 (47,3)	19 (100,0)
<i>PTD</i> <i>32-36 tc</i>	<i>IL6</i> <i>-596G>A</i>	<i>GG</i>	30 (24,4)	3 (2,5)*	2 (1,6)	35 (28,5)
		<i>GA</i>	0 (0,0)	55 (44,7)	4 (3,3)	59 (47,9)
		<i>AA</i>	0 (0,0)	3 (2,4)	26 (21,1)	29 (23,6)
		<i>Suma</i>	30 (24,4)	61 (49,6)	32 (26,0)	123 (100,0)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>IL6</i> <i>-596G>A</i>	<i>GG</i>	36 (24,0)	16 (10,7)*	2 (1,3)*	54 (36,0)
		<i>GA</i>	0 (0,0)	62 (41,3)	2 (1,4)	64 (42,7)
		<i>AA</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	32 (21,3)	32 (21,3)
		<i>Suma</i>	36 (24,0)	78 (52,0)	36 (24,0)	150 (100,0)

wszystkie badane podgrupy kobiet z *PTD* porównywano do grupy kontrolnej

Tab. 27. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -238G>A genu *TNF-α* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.

<i>TNF-α</i> -238G>A	<i>Grupa badana PTD</i>									<i>Grupa kontrolna</i> n (%)
	<i>22-28 tc.</i>			<i>28-32 tc.</i>			<i>32-36 tc.</i>			
	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	
<i>Genotypy</i>										
<i>GG</i>	8 (100,0)	-	-	12 (63,2)	0,08	0,00016*	109 (88,6)	0,38	0,033*	143 (95,3)
<i>GA</i>	0 (0,0)	-	-	6 (31,6)	9,43	0,00095*	13 (10,6)	2,62	0,033*	7 (4,7)
<i>AA</i>	0 (0,0)	-	-	1 (5,3)	-	-	1 (0,8)	-		0 (0,0)
<i>Suma</i>	8 (100,0)			19 (100,0)			123 (100,0)			150 (100,0)
<i>Allele</i>										
<i>G</i>	16 (100,0)	-	-	30 (78,9)	0,09	0,00004*	231 (93,9)	0,37	0,022*	293 (97,7)
<i>A</i>	0 (0,0)	-	-	8 (21,1)	11,16	0,00004*	15 (6,1)	2,72	0,022*	7 (2,3)
<i>Suma</i>	16 (100,0)			38 (100,0)			246 (100,0)			300 (100,0)

wszystkie badane podgrupy kobiet z PTD porównywano do grupy kontrolnej

* $p < 0,05$

Tab. 28. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -308G>A genu *TNF-α* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.

<i>TNF-α</i> -308G>A	<i>Grupa badana PTD</i>									<i>Grupa kontrolna</i> n (%)
	<i>22-28 tc.</i>			<i>28-32 tc.</i>			<i>32-36 tc.</i>			
	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	
<i>Genotypy</i>										
GG	6 (75,0)	1,16	0,61	12 (63,2)	0,67	0,29	85 (69,1)	0,87	0,34	108 (72,0)
GA	2 (25,0)	0,94	0,65	7 (36,8)	1,66	0,23	36 (29,3)	1,18	0,32	39 (26,0)
AA	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	-	2 (1,6)	0,81	0,59	3 (2,0)
Suma	8 (100,0)			19 (100,0)			123 (100,0)			150 (100,0)
<i>Allele</i>										
G	14 (87,5)	1,23	0,56	31 (81,6)	0,78	0,36	206 (83,7)	0,91	0,38	255 (85,0)
A	2 (12,5)	0,81	0,56	7 (18,4)	1,28	0,36	40 (16,3)	1,10	0,38	45 (15,0)
Suma	16 (100,0)			38 (100,0)			246 (100,0)			300 (100,0)

wszystkie badane podgrupy kobiet z PTD porównywano do grupy kontrolnej

Tab. 29. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -376G>A genu *TNF-α* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.

<i>TNF-α</i> -376G>A	<i>Grupa badana PTD</i>									<i>Grupa kontrolna</i> n (%)
	<i>22-28 tc.</i>			<i>28-32 tc.</i>			<i>32-36 tc.</i>			
	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	
Genotypy										
GG	8 (100,0)	-	-	17 (89,5)	0,12	0,063*	121 (98,4)	0,81	0,61	148 (98,7)
GA	0 (0,0)	-	-	2 (10,5)	8,71	0,063*	2 (1,6)	1,22	0,61	2 (1,3)
AA	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)
Suma	8 (100,0)			19 (100,0)			123 (100,0)			150 (100,0)
Allele										
G	16 (100,0)	-	-	36 (94,7)	0,12	0,064	244 (99,2)	0,82	0,61	298 (99,3)
A	0 (0,0)	-	-	2 (5,3)	8,28	0,064*	2 (0,8)	1,22	0,61	2 (0,7)
Suma	16 (100,0)	-	-	38 (100,0)			246 (100,0)			300 (100,0)

wszystkie badane podgrupy kobiet z PTD porównywano do grupy kontrolnej

* $p < 0,05$

Tab. 30. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Arg753Gln* genu *TLR2* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.

<i>TLR2</i> <i>Arg753Gln</i> <i>20877G>A</i>	<i>Grupa badana PTD</i>									<i>Grupa kontrolna</i> <i>n (%)</i>
	<i>22-28 tc.</i>			<i>28-32 tc.</i>			<i>32-36 tc.</i>			
	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	
<i>Genotypy</i>										
<i>GG</i>	7 (87,5)	0,45	0,41	18 (94,7)	1,44	0,68	113 (91,9)	0,72	0,33	141 (94,0)
<i>GA</i>	1 (12,5)	2,53	0,38	1 (5,3)	0,98	0,73	10 (8,1)	1,57	0,24	8 (5,3)
<i>AA</i>	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	-	1 (0,7)
<i>Suma</i>	8 (100,0)			19 (100,0)			123 (100,0)			150 (100,0)
<i>Allele</i>										
<i>G</i>	15 (93,7)	0,51	0,44	37 (97,4)	1,27	0,64	236 (95,9)	0,81	0,41	290 (96,7)
<i>A</i>	1 (6,3)	1,93	0,44	1 (2,6)	0,78	0,64	10 (4,1)	1,22	0,41	10 (3,3)
<i>Suma</i>	16 (100,0)			38 (100,0)			246 (100,0)			300 (100,0)

wszystkie badane podgrupy kobiet z PTD porównywano do grupy kontrolnej

Tab. 31. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Thr399Ile* genu *TLR4* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.

<i>TLR4</i> <i>Thr399Ile</i> <i>8993C>T</i>	<i>Grupa badana PTD</i>									<i>Grupa kontrolna</i> <i>n (%)</i>
	<i>22-28 tc.</i>			<i>28-32 tc.</i>			<i>32-36 tc.</i>			
	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	
<i>Genotypy</i>										
<i>CC</i>	8 (100,0)	-	-	18 (94,7)	2,93	0,25	109 (88,6)	1,27	0,33	129 (86,0)
<i>CT</i>	0 (0,0)	-	-	1 (5,3)	0,34	0,25	13 (10,6)	0,73	0,25	21 (14,0)
<i>TT</i>	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	-	1 (0,8)	-	-	0 (0,0)
<i>Suma</i>	8 (100,0)			19 (100,0)			123 (100,0)			150 (100,0)
<i>Allele</i>										
<i>C</i>	16 (100,0)	-	-	37 (97,4)	2,78	0,26	231 (93,9)	1,15	0,40	279 (93,0)
<i>T</i>	0 (0,0)	-	-	1 (2,6)	0,35	0,26	15 (6,1)	0,86	0,40	21 (7,0)
<i>Suma</i>	16 (100,0)			38 (100,0)			246 (100,0)			300 (100,0)

wszystkie badane podgrupy kobiet z PTD porównywano do grupy kontrolnej

Tab. 32. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 86 pz VNTR genu *IL-1RN* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.

<i>IL-1RN</i> 86 pz	<i>Grupa badana PTD</i>									<i>Grupa kontrolna</i> <i>n (%)</i>
	<i>22-28 tc</i>			<i>28-32 tc</i>			<i>32-36 tc</i>			
	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	<i>n (%)</i>	<i>WR</i>	<i>p</i>	
<i>Genotypy</i>										
<i>1/1</i>	6 (75,0)	2,63	0,20	11 (57,9)	1,20	0,44	71 (57,7)	1,19	0,27	80 (53,3)
<i>1/2</i>	2 (25,0)	0,38	0,20	4 (21,0)	0,57	0,24	42 (34,2)	1,10	0,40	48 (32,0)
<i>1/3</i>	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	-	3 (2,4)	0,51	0,26	7 (4,7)
<i>1/4</i>	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	-	1 (0,8)	-	-	0 (0,0)
<i>1/5</i>	0 (0,0)	-	-	1 (5,3)	-	-	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)
<i>0/2</i>	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	-	1 (0,7)
<i>2/2</i>	0 (0,0)	-	-	2 (10,5)	2,40	0,27	5 (4,1)	0,49	0,14	12 (8,0)
<i>2/3</i>	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	-	1 (0,6)
<i>2/4</i>	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	-	1 (0,8)	-	-	1 (0,7)
<i>2/5</i>	0 (0,0)	-	-	1 (5,3)	-	-	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)

Suma	8 (100,0)			19 (100,0)			123 (100,0)			150 (100,0)
Allele										
0	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	-	1 (0,3)
1	14 (87,5)	2,77	0,13	27 (71,0)	0,97	0,54	188 (76,4)	1,28	0,12	215 (71,7)
2	2 (12,5)	0,43	0,21	9 (23,7)	0,93	0,52	53 (21,6)	0,82	0,19	75 (25,0)
3	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	-	3 (1,2)	0,45	0,18	8 (2,7)
4	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)	-	-	2 (0,8)	2,45	0,42	1 (0,3)
5	0 (0,0)	-	-	2 (5,3)	-	-	0 (0,0)	-	-	0 (0,0)
Suma	16 (100,0)			38 (100,0)			246 (100,0)			300 (100,0)

wszystkie badane podgrupy kobiet z PTD porównywano do grupy kontrolnej

4.4. ANALIZA KORELACJI BADANYCH POLIMORFIZMÓW GENETYCZNYCH Z PARAMETRAMI KLINICZNYMI I BIOCHEMICZNYMI

W następnym etapie pracy analizowano również związek wszystkich badanych polimorfizmów genów cytokin i receptorów Toll-like z parametrami klinicznymi oraz biochemicznymi.

W grupie badanej PTD obserwowano korelację pomiędzy polimorfizmem *Thr399Ile* genu *TLR4* a wiekiem ciężarnych ($p=0,024$), masą przed ($p=0,043$) oraz po ciąży ($p=0,024$), jak również wskaźnikiem BMI przed ($p=0,013$) oraz po ciąży ($p=0,005$). W zakresie polimorfizmu $-174G>C$ genu *IL-6* odnotowano korelację pomiędzy masą kobiet przed ciążą ($p=0,007$), po ciąży ($p=0,021$), wskaźnikiem BMI przed ciążą ($p=0,035$). Wskazano również korelację pomiędzy polimorfizmem $-596G>A$ genu *IL-6* a masą kobiet przed ciążą ($p=0,019$). Polimorfizm $+3953C>T$ genu *IL-1 β* korelował z różnicą masy przed i po ciąży ($p=0,021$) oraz z różnicą wskaźników BMI przed i po ciąży ($p=0,017$).

W grupie kontrolnej obserwowano związek pomiędzy polimorfizmem *Thr399Ile* genu *TLR4* a różnicą masy przed i po ciąży ($p=0,029$) oraz wskaźnikiem BMI przed ciążą ($p=0,044$). Korelacja pomiędzy różnicą wskaźników BMI przed i po ciąży pozostawała na granicy istotności statystycznej ($p=0,056$). Polimorfizm $-596G>A$ genu *IL-6* korelował z różnicą masy przed i po ciąży ($p=0,023$), a korelacja z różnicą wskaźników BMI przed i po ciąży pozostawała na granicy istotności statystycznej ($p=0,053$). Polimorfizm $-596G>A$ *IL-6* wykazywał również związek z masą noworodka ($p=0,054$). W zakresie polimorfizmu $-308G>A$ genu *TNF- α* w grupie kontrolnej odnotowano korelację z wiekiem ciężarnych ($p=0,009$).

Również podobna analiza w obydwu grupach łącznie potwierdziła istnienie korelacji masy kobiet przed ciążą ($p=0,033$), wskaźnika BMI przed ciążą ($p=0,003$) oraz wskaźnika BMI po ciąży ($p=0,015$) z polimorfizmem *Thr399Ile* genu *TLR4*. W zakresie polimorfizmu $-174G>C$ genu *IL-6* odnotowano korelację pomiędzy masą kobiet przed ciążą ($p=0,008$) oraz po ciąży ($p=0,007$). Również polimorfizm $-596G>A$ *IL-6* wykazywał korelację z masą kobiet przed ciążą ($p=0,038$) oraz masą kobiet po ciąży ($p=0,023$). W toku badań wskazano również korelację polimorfizmu $-238G>A$ genu *TNF- α* z masą noworodka ($p=0,041$).

W pracy nie wykazano żadnych innych korelacji pomiędzy analizowanymi polimorfizmami genetycznymi a parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi w badanych grupach ciężarnych z PTD i kontrolnej.

4.5. PORÓWNANIE CZĘSTOŚCI HAPLOTYPÓW BADANYCH POLIMORFIZMÓW GENU *TNF-α* ORAZ *IL-6*

Na podstawie otrzymanych w badaniu częstości występowania genotypów polimorfizmów genu *TNF-α* oraz *IL-6* za pomocą programów PHASE wersja 2.1 oraz Haploview wersja 4.2 obliczono frekwencje poszczególnych haplotypów.

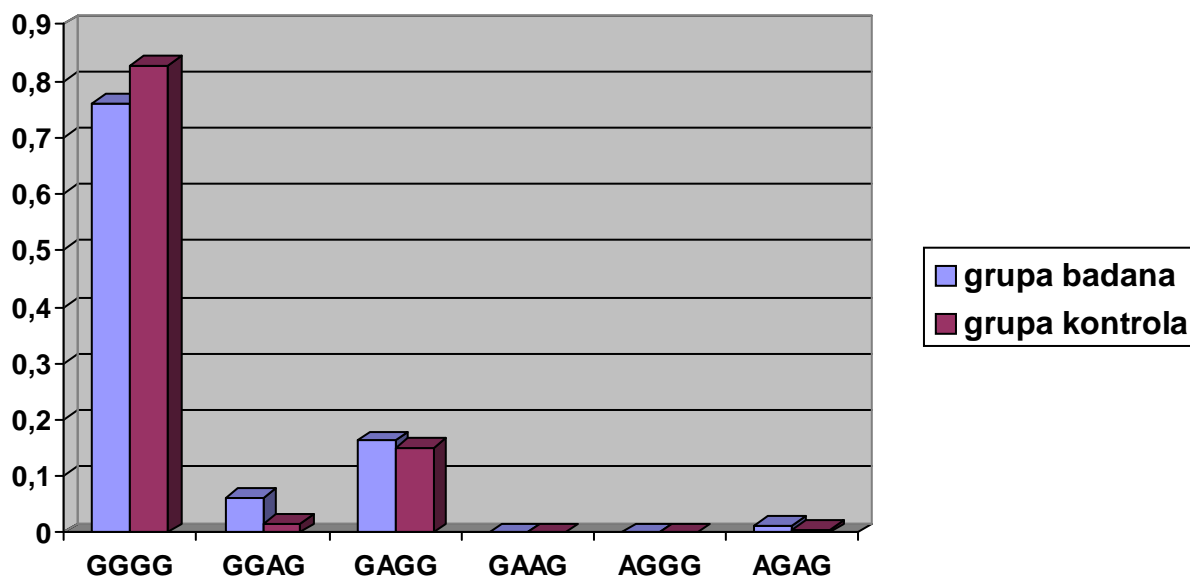
4.5.1. PORÓWNANIE CZĘSTOŚCI HAPLOTYPÓW BADANYCH POLIMORFIZMÓW GENU *TNF-α*

W przebiegu badań w zakresie polimorfizmu genu *TNF-α* wyznaczono obecność sześciu haplotypów (*GGGG*, *GGAG*, *GAGG*, *GAAG*, *AGGG*, *AGAG*) występujących u kobiet w obydwu badanych grupach. W kolumnie „haplotyp” litery oznaczają odpowiednio: pierwsza litera polimorfizm $-376G>A$, druga $-308G>A$, trzecia $-238G>A$ i czwarta $-163G>A$.

W analizie zaobserwowano istotną statystycznie różnicę w częstości występowania haplotypu *GGAG* zawierającego zmutowany allel *A* polimorfizmu $-238G>A$ *TNF-α* (0,063067 vs. 0,016634 w grupie kontrolnej, $p=0,030$) pomiędzy grupą kobiet badanych z PTD i grupą kontrolną. Zauważono również przewagę występowania haplotypu *AGAG* (haplotyp z dwoma zmutowanymi allelami $-376A$ oraz $-238A$ genu *TNF-α*) (0,013300 vs. 0,006400, $p=ns$) w grupie kobiet z porożami przedwczesnymi. W grupie kontrolnej częściej występującymi haplotypami okazały się *GGGG* (0,826699 vs. 0,760266, $p=ns$), *AGGG* (0,000266 vs. 0,000034, $p=ns$) (tab. 33, ryc. 21).

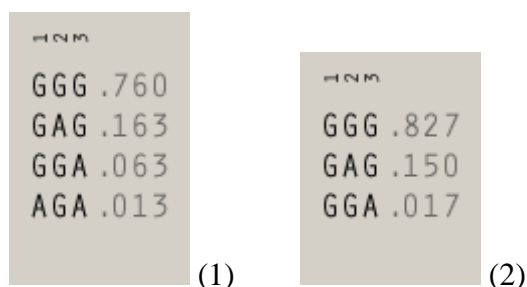
Tab. 33. Częstość występowania poszczególnych haplotypów badanych polimorfizmów genu *TNF-α* oszacowana za pomocą programu PHASE. Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm $-376G>A$, druga $-308G>A$, trzecia $-238G>A$ i czwarta $-163G>A$.

Haplotyp	Grupa badana PTD n=150		Grupa kontrolna n=150		p
	częstość występowania	błąd standardowy	częstość występowania	błąd standardowy	
<i>GGGG</i>	0,760266	0,001519	0,826699	0,001492	ns
<i>GGAG</i>	0,063067	0,001519	0,016634	0,001492	$p=0,030$
<i>GAGG</i>	0,163034	0,001475	0,149701	0,000953	ns
<i>GAAG</i>	0,000300	0,001475	0,000299	0,000953	ns
<i>AGGG</i>	0,000034	0,000333	0,000266	0,001293	ns
<i>AGAG</i>	0,013300	0,000333	0,006400	0,001293	ns



Ryc. 21. Porównanie częstości występowania haplotypów polimorfizmów genu *TNF-α* w grupie badanej (1) i kontrolnej (2) oszacowana za pomocą programu PHASE. Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm -376G>A, druga -308G>A, trzecia - 238G>A i czwarta -163G>A.

Następnym etapem była analiza częstości występowania haplotypów z wykorzystaniem programu Haploview. Ponieważ u żadnej z pacjentek w obu badanych grupach nie stwierdzono występowania zmutowanego allele A w zakresie polimorfizmu -163G>A genu *TNF-α* wariant ten pominięto w prezentowanej analizie. Ze względu na niską frekwencję występowania odrzucono również kombinacje występujące rzadziej niż 0,01. Uzyskane wyniki wyeksportowane bezpośrednio z programu Haploview przedstawione są na ryc. 12. Poszczególne litery oznaczone cyframi 1, 2 i 3 oznaczają w kolejności warianty polimorficzne od wariantu najdalej położonego od miejsca rozpoczęcia transkrypcji (pierwsza litera: polimorfizm -376G>A, druga -308G>A, trzecia - 238G>A genu *TNF-α*).



Ryc. 22. Porównanie częstości występowania w grupie badanej (1) i kontrolnej (2) haplotypów genu *TNF-α* oszacowana za pomocą programu Haploview. Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm -376G>A, druga -308G>A, trzecia - 238G>A.

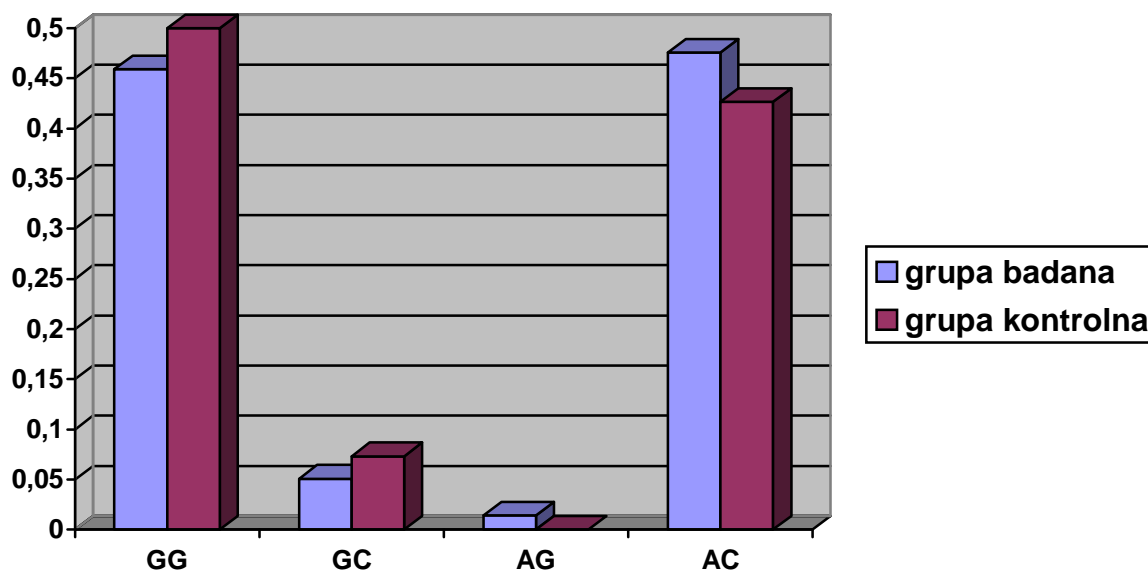
4.5.2. PORÓWNANIE CZĘSTOŚCI HAPLOTYPÓW BADANYCH POLIMORFIZMÓW GENU *IL-6*

W toku analizy dwóch polimorfizmów genu *IL-6* wyznaczono obecność czterech haplotypów (*GG*, *GC*, *AG*, *AC*) występujących pośród kobiet w obydwu badanych grupach. W kolumnie „haplotyp” litery oznaczają odpowiednio: pierwsza - allel polimorfizmu - $596G>A$, druga – allel polimorfizmu - $174G>C$.

W przebiegu badań nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych w częstości występowania obserwowanych haplotypów pomiędzy grupą kobiet badaną i grupą kontrolną. Odnotowano tendencję do częstszego występowania haplotypów zawierających zmutowany allel -596A genu *IL-6*: haplotypu *AG* (0,014365 vs. 0,000033, $p=ns$) oraz *AC* (0,475635 vs. 0,426633, $p=ns$) w grupie kobiet z porodami przedwczesnymi. W grupie kontrolnej nieco częściej występującymi haplotypami okazały się *GG* (0,499967 vs. 0,458968, $p=ns$) oraz *GC* (0,073367 vs. 0,051032, $p=ns$). Częstość występowania poszczególnych haplotypów badanych polimorfizmów genu *IL-6* oszacowana za pomocą programu PHASE przedstawia tab. 34 i ryc. 23.

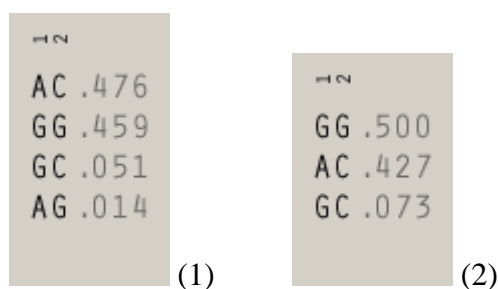
Tab. 34. Częstość występowania poszczególnych haplotypów badanych polimorfizmów genu *IL-6* oszacowana za pomocą programu PHASE. Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm -596G>A, druga -174G>C.

<i>Haplotyp</i>	<i>Grupa badana PTD</i> <i>n=150</i>		<i>Grupa kontrolna</i> <i>n=150</i>		<i>p</i>
	<i>częstość występowania</i>	<i>błąd standardowy</i>	<i>częstość występowania</i>	<i>błąd standardowy</i>	
<i>GG</i>	0,458968	0,001869	0,499967	0,000332	<i>ns</i>
<i>GC</i>	0,051032	0,001869	0,073367	0,000332	<i>ns</i>
<i>AG</i>	0,014365	0,001869	0,000033	0,000332	<i>ns</i>
<i>AC</i>	0,475635	0,001869	0,426633	0,000332	<i>ns</i>



Ryc. 23. Porównanie częstości występowania w grupie badanej (1) i kontrolnej (2) haplotypów polimorfizmów genu *IL-6* oszacowana za pomocą programu PHASE. Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm -596G>A, druga -174G>C.

Analizę częstości występowania haplotypów badanych polimorfizmów genu *IL-6* powtórzono wykorzystując program Haploview. Ze względu na niską frekwencję występowania odrzucono również w grupie kontrolnej kombinację *AG*, ponieważ występowała z częstością mniejszą niż 0,01. Uzyskane wyniki wyeksportowane bezpośrednio z programu Haploview przedstawione są na ryc. 24. Poszczególne litery oznaczają warianty polimorficzne ułożone w kolejności od wariantu najdalej położonego od miejsca rozpoczęcia transkrypcji (pierwsza litera: polimorfizm-596G>A, druga -174G>C).



Ryc. 24. Porównanie częstości występowania w grupie badanej (1) i kontrolnej (2) haplotypów genu *IL-6* oszacowana za pomocą programu Haploview. Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm-596G>A, druga -174G>C.

4.5.3. ANALIZA NIERÓWNOWAGI SPRZĘŻEŃ BADANYCH POLIMORFIZMÓW *IL-6* ORAZ *TNF- α*

W dalszej kolejności w pracy analizowano nierównowagę sprzężeń badanych wariantów genów *IL-6* oraz *TNF- α* . Nierównowagą sprzężeń (LD - ang. *linkage disequilibrium*) nazywana jest różnica pomiędzy oczekiwaną a rzeczywistą (obserwowaną) częstością występowania określonych alleli. Miarą nierównowagi sprzężeń jest wartość *D*. Analiza nierównowagi sprzężeń pozwala stwierdzić, czy położone w pobliskich *loci* polimorfizmy są ze sobą sprzężone (tworzą dziedziczony wspólnie haplotyp). Statystycznie nierównowagę sprzężeń opisuje się parametrami *D'* i przyjmuje się, że jeżeli *D'*=1 to występuje całkowite sprzężenie pomiędzy badanymi allelami. Innym parametrem jest współczynnik korelacji pomiędzy parą alleli r^2 oraz współczynnik LOD (przyjmuje się tradycyjnie, że jeżeli $LOD > 3$ to istnieje dowód obecności sprzężenia). W tabelach 35 i 36 przedstawiono obliczone w programie Haploview wartości *D'*, LOD, r^2 oraz diplotypy dla badanych polimorfizmów genu *IL-6* i *TNF- α* (tab. 35, 36).

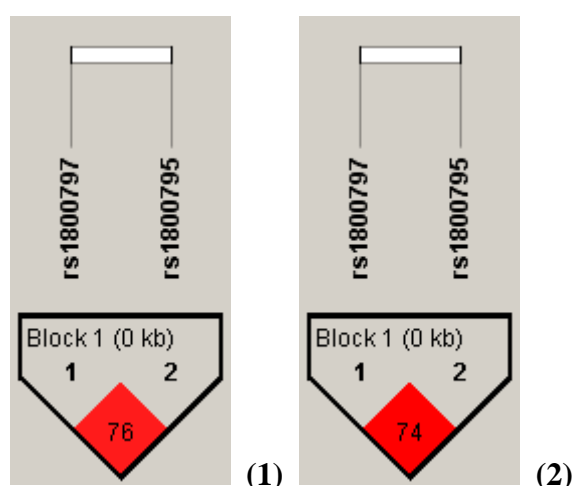
Tab. 35. Analiza nierównowagi sprzężeń pomiędzy analizowanymi wariantami genu *IL-6* - *596G>A* (rs1800797) i *-174G>C* (rs1800795).

	<i>IL-6 -596G>A (rs1800797), -174G>C (rs1800795)</i>	
	<i>Grupa badana PTD</i>	<i>Grupa kontrolna</i>
<i>D'</i>	0,939	1,0
<i>LOD</i>	40,46	43,08
r^2	0,762	0,744
<i>Haplotypy</i>	<i>GG</i> 45,9% <i>GC</i> 5,1% <i>AC</i> 47,6% <i>AG</i> 1,4%	<i>GG</i> 50,0% <i>GC</i> 7,3% <i>AC</i> 42,7%

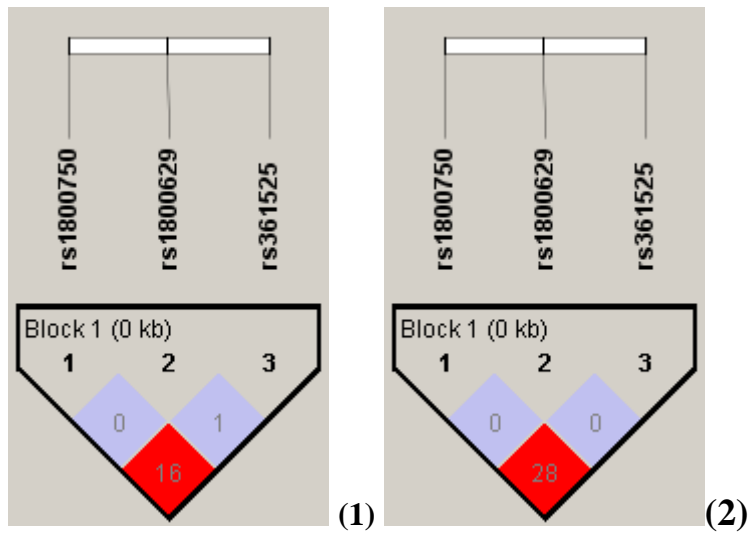
Tab. 36. Analiza nierównowagi sprzężeń pomiędzy analizowanymi wariantami genu *TNF- α* : -376G>A (rs1800750), -308G>A (rs1800629) i -238G>A (rs361525).

	<i>rs1800750, rs1800629</i>		<i>rs1800629, rs361525</i>		<i>rs1800750, rs361525</i>	
	<i>Grupa badana PTD</i>	<i>Grupa kontrolna</i>	<i>Grupa badana PTD</i>	<i>Grupa kontrolna</i>	<i>Grupa badana PTD</i>	<i>Grupa kontrolna</i>
<i>D'</i>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>LOD</i>	0,31	0,14	0,96	0,2	3,41	2,8
<i>r</i> ²	0,0030	0,0010	0,016	0,0040	0,163	0,281
<i>Haplotypy</i>	GA 16,3% GG 82,3% AG 1,3%	GA 15,0% GG 84,3% AG 0,7%	GA 7,7% GG 76,0% AG 16,3% AA 0,0%	GA 2,3% GG 82,7% AG 15,0% AA 0,0%	GG 92,3% GA 6,3% AA 1,3%	GG 97,7% GA 1,7% AA 0,7%

Uzyskane wyniki przedstawione graficznie obrazują wykresy 25 i 26 wyksportowane z programu Haploview. Kolor jasnoczerwony używany w tym programie oznacza ($LOD \geq 2$ i $D' = 1$), niebieski ($D' = 1$ i $LOD < 2$), odcienie różu/czerwieni ($D' < 1$ i $LOD \leq 2$), natomiast kolor biały ($D' < 1$ i $LOD < 2$). W kwadratach podano wartość parametru r^2 pomnożoną przez 100 ($r^2 \times 100$). Pierwszy z wykresów (ryc. 25) przedstawia nierównowagę sprzężeń pomiędzy analizowanymi wariantami IL-6 -596G>A (rs1800797) i -174G>C (rs1800795) natomiast drugi (ryc. 26) pomiędzy analizowanymi wariantami genu *TNF- α* : -376G>A (rs1800750), -308G>A (rs1800629) i -238G>A (rs361525).



Ryc. 25. Wykres obrazujący nierównowagę sprzężeń pomiędzy analizowanymi wariantami genu *IL-6* -596G>A (rs1800797) i -174G>C (rs1800795) w grupie badanej (1) i kontrolnej (2). Kolor czerwony ($LOD \geq 2$ i $D' = 1$). W polach podano wartość r^2 .



Ryc. 26. Wykres obrazujący nierównowagę sprzężeń pomiędzy analizowanymi wariantami genu *TNF- α* : -376G>A (rs1800750), -308G>A (rs1800629) i - 238G>A (rs361525) w grupie badanej (1) i kontrolnej (2). Kolor niebieski ($LOD < 2$ i $D' = 1$), kolor czerwony ($LOD \geq 2$ i $D' = 1$). W polach podano wartość r^2 .

5. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

5.1. UDZIAŁ POLIMORFIZMÓW GENÓW KODUJĄCYCH CYTOKINY W PORODZIE PRZEDWCZESNYM

5.1.1. UDZIAŁ POLIMORFIZMÓW GENÓW UKŁADU INTERLEUKIN W PORODZIE PRZEDWCZESNYM

Obecnie najczęściej wskazywaną przyczyną porodów przedwczesnych są subkliniczne infekcje u kobiet ciężarnych związane z aktywacją układu cytokin. Bezobjawowa infekcja w obrębie jamy owodniowej może inicjować kaskadę czynników zapalnych stymulujących produkcję prostaglandyn, a w konsekwencji czynność skurczową mięśnia macicy, nieodwracalne zmiany w szyjce macicy oraz w strukturach błon płodowych. Stąd liczne badania dotyczą polimorfizmów genetycznych układu cytokin i ich znaczenia w etiologii porodu przedwczesnego. Mimo stosunkowo znacznej liczby badań, doniesienia na ten temat nie są jednoznaczne.

W powyższym badaniu w zakresie układu interleukin analizowano polimorfizm +3953C>T genu *IL-1 β* , polimorfizm genu antagonisty *IL-1RN* i dwa polimorfizmy: -596G>A oraz -174G>C genu *IL-6*.

5.2.2.1. POLIMORFIZM +3953C>T GENU *IL-1 β*

Od dawna szczególną uwagę zwraca się na aktywność IL-1b, która jest mediatorem procesów zapalnych i główną interleukiną prozapalną. Stąd badanie wariantów genetycznych mogących uczestniczyć w regulacji jej aktywności stało się ważnym elementem wskazywanym w etiopatologii niektórych chorób, w tym porodu przedwczesnego. Jednocześnie zwraca się uwagę na możliwą korelację występowania niektórych polimorfizmów genetycznych z ciężkością stanu pacjenta. Kobiety nosicielki zmutowanego allele *T* polimorfizmu +3953C>T genu *IL-1 β* teoretycznie powinny być bardziej narażone na ryzyko PTD ze względu na zwiększony poziom IL-1 β , która jest interleukiną zwiększającą czynność skurczową macicy poprzez indukcję syntezy prostaglandyn w odpowiedzi na czynnik zapalny [Baggia et al., 1996].

W obecnej pracy w toku analizy polimorfizmu $+3953C>T$ genu $IL-1\beta$ nie stwierdzono wpływu tego wariantu na wzrost ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego. Częstość występowania zmutowanego genotypu homozygotycznego TT w grupie badanej była tylko nieznacznie wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej, a obserwowane różnice nie były statystycznie istotne (7,3 vs. 4,7% w grupie kontrolnej, $p=ns$).

Wyniki te są zgodne z analizami innych Autorów. W populacji kobiet polskich (62 kobiet z PTD oraz 63 kobiety z grupy kontrolnej) Kalinka *i wsp.* nie wykazali wpływu tego polimorfizmu na zwiększenie ryzyka wystąpienia PTD [Kalinka *i wsp.*, 2009]. Kalish *i wsp.* analizowali wpływ nosicielstwa u matki i płodu zmutowanego allela polimorfizmu $+3953C>T$ genu $IL-1\beta$ na rozwój PTD. Nie znaleziono związku pomiędzy badanym wariantem genetycznym a występowaniem PTD [Kalish *et al.*, 2003].

Edwards *i wsp.* w swoich badaniach oceniali związek pomiędzy wystąpieniem PTD a polimorfizmem $+3953C>T$ genu $IL-1\beta$. Materiałem do badań była wydzielina szyjki macicy, krew obwodowa oraz próbka krwi pępowinowej pobierana w grupie kobiet, u których poród odbył się pomiędzy 23-32 tc. Stwierdzono, iż zwiększone stężenie $IL-1\beta$ w wydzielinie szyjki macicy wiązały się z wystąpieniem PTD. Natomiast nosicielstwo polimorficznego allela $+3953T$ genu $IL-1\beta$ nie wiązało się ze wzrostem poziomu badanej cytokiny w wydzielinie szyjkowej, jak również z występowaniem przedwczesnej czynności skurczowej macicy i porodu przedwczesnego [Edwards *et al.*, 2006].

Inne obserwacje odnotowano w badaniach w populacji kobiet duńskich. Hollegard *et al.* przeprowadzili ocenę wpływu polimorfizmu wybranych 19 pojedynczych nukleotydów w trzech cytokinach: $TNF-\alpha$, $IL1\beta$ oraz $IL-6$. Analizie poddano 117 kobiet rasy kaukaskiej w ciąży pojedynczej, w tym 62 przypadki z PTD i 55 kobiet, u których wystąpił poród w terminie (>37 tc.). Stwierdzono, że kobiety będące nosicielkami rzadkiego allela T polimorfizmu $-857C>T$ $TNF-\alpha$ oraz homozygoty zmutowane w zakresie polimorfizmów $31T>C$ $IL1\beta$ oraz $-511C> T$ $IL1\beta$ mają zwiększone ryzyko PTD. Autorzy udowodnili, iż polimorfizm genów cytokin $TNF-\alpha$ i $IL-1\beta$ może mieć wpływ na układ odpornościowy u kobiet w ciąży, a tym samym zwiększać ryzyko wystąpienia PTD [Hollegard *et al.*, 2008].

Ciekawych obserwacji dostarczyły także badania polimorfizmu genu $IL-1\alpha$. W badaniach Seta *et al.* przeprowadzono analizę 414 ciężarnych w celu oceny wspólnego działania polimorfizmu cytokin zapalnych prowadzących do PTD, niskiej masy urodzeniowej noworodków oraz zahamowania wewnątrzmacicznego wzrastania płodu. Badania

przeprowadzone były w populacji kobiet japońskich. Ustalono, iż ryzyko PTD znacznie wzrastało u kobiet nosicielek allele 889T *IL1α* (genotyp *CC*; genotyp *CT*). Podobnie udowodniono, że ryzyko porodu przedwczesnego występuje u kobiet nosicielek allele +4845T *IL1α* (genotyp; genotyp *GT*; *GT* + genotypów *TT*). Częstość występowania haplotypów *TT IL1α* u matek z PTD była znacznie wyższa niż u kobiet, które rodziły o czasie, natomiast częstość haplotypów *CG IL1α* w matek, które rodziły przedwcześnie była znacznie niższa. Seta i wsp. udowodnili, iż polimorfizmy w genie *IL1α* są związane wystąpieniem porodu przedwczesnego w populacji kobiet japońskich [Seta et al., 2009].

5.2.2.2. POLIMORFIZM GENU *IL-1RN*

Od dawna sugeruje się, że wiązanie cytokin z receptorami może być hamowane przez ich antagonistów (antagonista receptora). Potwierdzono już, że antagonist *IL-1RA* hamuje aktywność *IL-1β* zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. U kobiet nosicielek allele *IL-1RN*2* polimorfizmu 86 pz *VNTR* genu *IL-1RN* obserwuje się wyższy poziom antagonisty receptora *IL-1* (*IL-1RA*). Stąd nosicielstwo tego allele u matek koreluje ze zwiększonym poziomem antagonisty i niskim ryzykiem porodu przedwczesnego [Kalinka i wsp., 2009, Genc et al., 2002]. Dokładna wiedza na temat funkcji antagonisty receptora *IL-1β* (*IL-1RA*) może być wykorzystywana w praktyce klinicznej.

W prezentowanej analizie obserwowano wyższą frekwencję zarówno genotypu *IL-1RN*2/IL-1RN*2* genu *IL-1RN* w grupie kontrolnej (8,0 vs. 3,3%, $p=0,06$), jak również allele *IL-1RN*2* w grupie kontrolnej (25,0 vs. 20,0%, $p=0,07$) co sugeruje protekcyjne znaczenie tego wariantu w stosunku do wystąpienia porodu przedwczesnego. Wyniki otrzymane w pracy pozostają w przeciwieństwie do rezultatów otrzymanych w innych badaniach.

W analizie przeprowadzonej w populacji kobiet polskich (125 kobiet - 62 ciężarne z PTD oraz 63 zdrowe ciężarne) badano m. in. polimorfizm genu antagonisty receptora dla interleukiny *IL-1β* - *IL-1RN*. Zaobserwowano zwiększone ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego przy obecności allele *IL-1RN*2* (WR=2,75) [Kalinka i wsp., 2009].

Podobnie ciekawe obserwacje przeprowadzili również Autorzy z Brazylii, gdzie w badaniu obejmującym ciężarne i ich noworodki potwierdzono, że u kobiet nosicielek allele *IL-1RN*2* spostrzega się podwyższone ryzyko wystąpienia samoistnego PTD z/lub bez pęknięcia błon płodowych ($p=0,02$) [Chaves et al., 2008].

Zbieżne wyniki uzyskali również Muthra *i wsp.* badając populację kobiet białych i czarnych kobiet (Nowa Karolina, USA). Autorzy ci stwierdzili zwiększone ryzyko występowania PTD u matek będących nosicielkami allele *IL1RN*2*. Najbardziej interesujące było wskazanie, że wszystkie obserwowane przez nich pacjentki z genotypem *IL1RN*2/IL1RN*2* urodziły swoje dzieci przedwcześnie [Muthra et al., 2006].

W pracy Genc *et al.* (2004) podjęto analizę korelacji pomiędzy polimorfizmem w intronie 2 genu antagonisty receptora dla interleukiny-1 β w połączeniu z odpowiedzią na obecność badanej flory w pochwie oraz następczego porodu przedwczesnego. Zebrano materiał od 212 kobiet pomiędzy 18-22 tc. (próbki bakteriologiczne z pochwy, krew na badanie polimorfizmu IL-1RN). Nosicielstwo allele *IL-1RN*2* było związane ze wzrostem pH pochwy zarówno u kobiet z rasy czarnej ($p=0,001$), jak i białej ($p=0,005$). Ponadto nosicielki tego allele wykazywały większe ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego (6 vs. 18%, $p=0,02$) [Genc et al., 2004].

5.2.2.3. POLIMORFIZM -174G>C GENU *IL-6*

Stosunkowo dużo badań dotyczy polimorfizmu -174G>C genu *IL-6*, która jest plejotropową cytokiną o właściwościach nie tylko prozapalnych, ale również przeciwzapalnych oraz immunosupresyjnych. Stąd genetycznie uwarunkowana aktywność *IL-6* może brać udział w patogenezie wielu chorób. W położnictwie zaobserwowano związek polimorfizmu -174G>C *IL-6* ze zwiększonym ryzykiem rozwoju infekcji bakteryjnej, porodu przedwczesnego oraz następczych infekcji u przedwcześnie urodzonych dzieci [Hartel et al., 2004]. Nie jest jednak w pełni jasne, który z badanych polimorficznych alleli koreluje z ryzykiem PTD. Przyjmuje się, że obecność zmutowanego allele -174G wpływa na wzrost syntezy *IL-6*, i następczo na zwiększenie aktywności siatki cytokin [Villuendas et al., 2002, Chen et al., 2006].

Harding *et al.* (2003) oraz Ahrens *et al.* (2004) zasugerowali znaczący związek tego polimorfizmu z występowaniem PTD oraz zakażeń u noworodków przedwcześnie urodzonych [Harding et al., 2004, Ahrens et al., 2004]. Analiza polimorfizmu -174G>C *IL-6* w pracy Reiman *i wsp.* wykazała znaczącą rolę tego wariantu w zakażeniu błon płodowych, porodzie przedwczesnym oraz w rozwoju infekcji u dzieci [Reiman et al., 2008].

Dodatkowo w pracy Goepfert *et al.* (2005) analizie poddanych zostało 497 kobiet z waginozą bakteryjną oraz 388 kobiet bez obecności waginozy. Potwierdzono korelację z

występowaniem waginozy następujących wariantów: $-174G>C$ *IL-6* oraz $+3954$ *IL-1 β* [Goepfert et al., 2005].

W pracy Speer *i wsp.* wykazano na korelację polimorfizmu $-174C>G$ genu *IL-6* z ryzykiem rozwoju PTD (genotyp $-174GG$). Ponadto wariant $-174G$ częściej występował w przypadkach, w których podłożem rozwoju porodu przedwczesnego była infekcja wewnątrzowodniowa lub stan zapalny pochwy [Speer et al., 2006].

W pracy Hartel *et al.* wykazano ścisłą korelację pomiędzy polimorfizmem $-174G>C$ *IL-6* u matki (genotyp homozygotyczny $-174GG$) a występowaniem porodu przedwczesnego ($p=0,018$) [Hartel et al., 2004]. W pracy Simhan *i wsp.* (51 kobiet z porodem przedwczesnym <34 tc. oraz 156 zdrowych ciężarnych, które urodziły w terminie) wykazano, że to zmutowany genotyp $-174CC$ *IL-6* jest znacząco mniej częsty wśród kobiet, u których wystąpił PTD <34 tc. [Simhan i wsp., 2003]. Podobnie w pracy Jamie *et al.* (2005) obecność allela zmutowanego $-174C$ nie korelowała ze stężeniem *IL-6* w wydzielinie z szyjki macicy oraz występowaniem porodu przedwczesnego ($p=0,62$) [Jamie et al., 2005].

W niektórych badaniach natomiast zasugerowano, że to obecność genotypu $-174CC$ wiąże się z pogorszeniem przebiegu infekcji u wcześniaków, uszkodzeniami neurologicznymi, oraz niższym wskaźnikiem rozwoju wśród noworodków, które przeżyły. W pracy analizującej dzieci <32 tc. genotyp $-174CC$ korelował z intensywnością leczenia w NICU, ciężkimi uszkodzeniami mózgu wcześniaków, obecnością leukomalacji okołokomorowej, wentrikulomegalii. Znacząco częściej upośledzenie umysłowe odnotowano u noworodków z genotypem $-174CC$ (31% vs. 13%), jak również u dzieci z porażeniem mózgowym (15% vs. 7%). Autorzy wnioskują, że w populacji noworodków urodzonych <32 tc., które przeżyły obecność zmutowanego genotypu $-174CC$ *IL-6* może wpływać na wzrost syntezy *IL-6* oraz na rozwój niektórych powikłań u dzieci [Harding et al., 2004].

Również w powyższej analizie przeprowadzonej w większej liczbie kobiet polskich wyniki były podobne do prezentowanych w badaniu powyżej. Dla polimorfizmu $-174G>C$ genu *IL-6* stwierdzono podobną częstość występowania zmutowanego genotypu $-174CC$ w grupie badanej (28,0% vs. 24,0% w grupie kontrolnej, $p=ns$). Inne częstości występowania badanych genotypów i alleli również były podobne.

W badaniu przeprowadzonym wcześniej w populacji kobiet polskich analizowano częstość występowania polimorfizmu $-174G>C$ *IL-6* u kobiet z PTD, PROM i IAI (45 kobiet z PROM i IAI oraz 99 zdrowych ciężarnych). Nie wykazano różnic w częstości występowania zmutowanego genotypu $-174CC$ (17,8% w grupie badanej vs. 17,2% w grupie

kontrolnej, $WR=1,04$, *n.s.*). Analiza frekwencji badanych alleli wykazała nieco wyższą częstość występowania allele $-174C$ *IL-6* w grupie kobiet z PTD, bez obserwacji różnicy statystycznie istotnej (52,2% vs. 46,9% w grupie kontrolnej, $WR=1,23$, *n.s.*). Badanie to nie pokazało znaczącego wpływu obecności polimorfizmu *IL-6* na występowanie PTD w populacji kobiet polskich [Seremak-Mrozikiewicz i wsp., 2004].

W innych badaniach również stwierdza się brak związku pomiędzy obecnością wariantów genetycznych interleukin a występowaniem porodu przedwczesnego i infekcji u przedwcześnie urodzonych dzieci. W dużym badaniu w populacji 1626 kobiet również analizowano polimorfizm $-174G>C$ *IL-6* i jego korelację z niektórymi powikłaniami w przebiegu ciąży. W pracy odnotowano brak różnic statystycznie istotnych w częstości występowania genotypów i alleli pomiędzy grupą kontrolną a badanymi grupami kobiet z preeklampsją, zahamowaniem wewnątrzmacicznego wzrastania płodu, jak również porodem przedwczesnym. Autorzy wskazują, że ten polimorfizm genu *IL-6* nie może być markerem genetycznym wystąpienia częstych powikłań w przebiegu ciąży, w tym również porodu przedwczesnego [Stonek et al., 2008].

5.2.2.4. POLIMORFIZMU $-596G>A$ GENU *IL-6*

W przeciwieństwie do dużej ilości badań dotyczących polimorfizmu $-174G>C$ *IL-6* nie ma badań analizujących znaczenie wariantu $-596G>A$ w odcinku promotorowym tego genu w etiologii PTD. Z tego względu jest to także pierwsze tego typu badanie dotyczące ciężarnych z PTD w populacji polskiej. W badaniach analizujących wpływ tego polimorfizmu na układ cytokin potwierdzono związek allele $-596G$ *IL-6* ze wzrostem poziomu obwodowego *IL-6*.

W prezentowanym badaniu najciekawszą obserwacją w zakresie polimorfizmu $-596G>A$ genu *IL-6* było stwierdzenie przewagi w częstości występowania genotypu zawierającego obydwa allele typu dzikiego $-174GG$ w grupie zdrowych ciężarnych kobiet (36,0 vs. 26,7% w grupie badanej, $p=0,05$). Odnotowano również statystycznie istotne różnice częstości występowania w rozkładzie alleli pomiędzy badanymi grupami: dla allele *G* (51,0 vs. 57,3% w grupie kontrolnej, $p=0,07$), natomiast dla zmutowanego allele *A* 49,0 vs. 42,7% w grupie kontrolnej ($p=0,07$).

W zakresie analizy genetycznej współwystępowania obydwu badanych polimorfizmów genu *IL-6* w grupie kobiet z porodem przedwczesnym i w grupie kontrolnej ciekawą obserwacją było odnotowanie przewagi współwystępowania genotypów $-174GC/-$

596GG w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy badanej (10,7 vs. 2,0%). Ponadto w grupie badanej zaobserwowano częstsze występowanie genotypów -174GC/-596AA (1,3 vs. 0,0%), -174GC/-596GA (45,3 vs. 41,3%), -174CC/-596GG (2,7 vs. 1,3%) oraz -174CC/-596GA (2,7 vs. 1,4%).

5.2.3. UDZIAŁ POLIMORFIZMÓW GENU KODUJĄCEGO *TNF-α* W PORODZIE PRZEDWCZESNYM

W licznych badaniach udowodniono, że synteza cytokiny *TNF-α* o właściwościach prozapalnych jest genetycznie uwarunkowana. Wskazano również, że obecność polimorficznych alleli genu *TNF-α* jest związana ze zmianami w syntezie *TNF-α in vitro* [Wilson et al., 1997, Amory et al., 2004].

W powyższym badaniu po raz pierwszy w populacji kobiet polskich kompleksowo analizowano obecność aż 4 polimorfizmów genu *TNF-α*: -163G>A, -238G>A, -308G>A oraz -376G>A.

5.2.3.2. POLIMORFIZM -238G>A GENU *TNF-α*

Badania dotyczące związku polimorfizm -238G>A genu *TNF-α* z występowaniem porodu przedwczesnego są nieliczne. Ponieważ jednak ten polimorfizm występuje w miejscu sekwencji regulatorowej może mieć zasadniczy wpływ ekspresję genu *TNF-α*.

W powyższej pracy najciekawsze wyniki zaobserwowano analizując właśnie polimorfizm -238G>A *TNF-α*. Stwierdzono częstsze występowanie genotypu heterozygotycznego GA w badanej grupie w porównaniu z grupą kontrolną (12,7 vs. 4,7%, $p=0,011$). Ponadto u dwóch pacjentek z porodem przedwczesnym zaobserwowano występowanie genotypu homozygotycznego zmutowanego, który nie wystąpił u żadnej ze zdrowych ciężarnych kobiet (1,3 vs. 0,0%). Jeszcze wyraźniej różnice te uwidoczniły się podczas analizy częstości występowania alleli. Zmutowany allel A występował u 7,7% pacjentek z grupy badanej i tylko u 2,3% kobiet z grupy kontrolnej ($p=0,002$).

W jednej z pierwszych prac dotyczących znaczenia polimorfizmów genetycznych w etiopatologii porodu przedwczesnego w populacji kobiet polskich również analizowano znaczenie wariantu -238G>A *TNF-α*. Częstość występowania genotypu heterozygotycznego -238GA obserwowana była w 32,1 % w grupie z PTD oraz IAI oraz tylko w 15,2% w grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych (WR=2,64, $p=0,014$). Genotyp zmutowany -238AA występował w 3,8% w grupie z PTD oraz IAI, nie potwierdzono występowania tego genotypu

w grupie kontrolnej. Analiza częstości występowania zmutowanego allele -238A wykazała jego znacząco wyższą częstość występowania w grupie kobiet z PTD poprzedzonym PROM oraz IAI (19,8% vs. 7,6%, WR=3,0, $p=0,002$). Autorzy pracy zasugerowali, że polimorfizm ten może odgrywać znaczącą rolę w modulacji odpowiedzi immunologicznej w PTD u kobiet z PROM [Seremak-Mrozikiewicz i wsp., 2001, Seremak-Mrozikiewicz i wsp., 2003].

5.2.3.1. POLIMORFIZM -308G>A GENU TNF- α

Polimorfizm -308G>A genu TNF- α jest jednym z najczęściej analizowanych w literaturze wariantów genetycznych w związku z patomechanizmem PTD. Większość badań sugeruje związek tego polimorfizmu z samoistnym porodem przedwczesnym poprzez zmiany w regulacji na poziomie transkrypcji i zainicjowanie odpowiedzi zapalnej [Kroeger, 1996, Kroeger, 1997].

Jednym z pierwszych badań dotyczących polimorfizmu -308G>A TNF- α było badanie przeprowadzone przez Roberts *et al.* w roku 1999 (57 kobiet z PTD oraz 110 kobiet z grupy kontrolnej - poród >37 tc.). Częstość występowania zmutowanego allele -308A w całej grupie z PTD wynosiła 44,0 vs. 30,0% w grupie kontrolnej (WR=1,81, $p=0,08$). Natomiast częstość zmutowanego allele -308A TNF- α była istotnie częstsza w grupie ciężarnych, u których poród odbył się po uprzednim pęknięciu błon płodowych (WR=3,18, $p=0,008$). Rezultaty tych badań zademonstrowały możliwy związek pomiędzy badanym polimorfizmem genu TNF- α a występowaniem PTD powiązanego z PROM [Roberts *et al.*, 1999].

Chen *et al.* w badaniu w grupie 54 kobiet, które urodziły przedwcześnie oraz w grupie kontrolnej 79 kobiet wykazali statystyczną zależność między polimorfizmem -308G>A genu TNF- α a ryzykiem porodu przedwczesnego. Stwierdzono, że nosicielki zmutowanego genotypu -308AA statystycznie częściej rodziły przedwcześnie [Chen *et al.*, 2003].

W pracy Speera *et al.* przeprowadzono analizę w grupie 80 kobiet, które urodziły <35 tc. Autorzy wykazali związek między występowaniem polimorfizmu -308G>A genu TNF- α a histologicznym rozpoznaniem zapalenia błon płodowych i wystąpieniem PTD. Dalszą obserwacją był związek pomiędzy występowaniem infekcji układu moczowo-płciowego a obecnością genotypu typu dzikiego -308GG TNF- α [Speer *et al.*, 2006].

Opublikowane przez Annels *et al.* wyniki badań potwierdzają wpływ poszczególnych polimorfizmów kilku kluczowych cytokin na ryzyko wystąpienia PTD. Grupę badaną stanowiło 202 kobiety rasy białej, które urodziły przed 35 tc. Wykazano, że

współwystępowanie wariantów $-488A/-238G/-308A$ genu $TNF-\alpha$ silnie wiąże się z ryzykiem wystąpienia porodu przedwczesnego [Annels et al., 2004].

W dużym badaniu obejmującym 834 kobiet obciążone w wywiadzie wystąpieniem PTD analizowano kilka polimorfizmów typu SNPs ($-174G>C$ $IL-6$, $-308G>A$ $TNF-\alpha$ oraz $+3954$ $IL-1\beta$). Kobiety, u których potwierdzono obecność genotypu zmutowanego $-308AA$ $TNF-\alpha$ wykazywały statystycznie istotne skrócenie czasu trwania ciąży w porównaniu do kobiet z genotypem $-308GG$ oraz $-308GA$ ($p=0,03$). Co więcej wśród kobiet nosicielek genotypu $-308AA$ wykazano silną tendencję do występowania samoistnego porodu przedwczesnego <28 tc. ($WR=7,51$). W całości badań wskazano na silny związek polimorfizmu $-308G>A$ $TNF-\alpha$ ze skróceniem czasu trwania ciąży i wzrostem ryzyka samoistnego PTD. Natomiast takich zależności nie potwierdzono w stosunku do badanych polimorfizmów $IL-6$ oraz $IL-1\beta$ [Harper et al., 2011].

Jeszcze innego typu analizę zaproponowali Liang *et al.* (2010) w badaniu przeprowadzonym w Chinach. W grupie kobiet z PTD oraz ich dzieci (250 rodzin badanych, 260 rodzin kontrolnych) oznaczali oni częstość występowania polimorfizmu $-308G>A$ $TNF-\alpha$ jednocześnie u matki, dziecka oraz ojca. Wskazali oni korelację współwystępowania genotypu matki i dziecka ze skróceniem czasu trwania ciąży i porodem przedwczesnym. Przy współwystępowaniu jednego genotypu homozygotycznego $-308AA$ (ze strony matki lub dziecka) wykazano zwiększone ryzyko występowania PTD. Przy obecności genotypu heterozygotycznego $-308GA$ u matki i dziecka ($-308GA/-308GA$) ryzyko PTD zmniejszało się. Autorzy pracy podkreślają również, że łączna analiza genotypu matki i dziecka ma większą wartość predykcyjną dla wystąpienia porodu przedwczesnego w porównaniu z odrębną analizą genotypu [Liang et al., 2010].

Odmienne wyniki badań co związku polimorfizmu $-308G>A$ $TNF-\alpha$ prezentuje kilka innych prac. Mattar *et al.* przebadali grupę 45 kobiet rasy kaukaskiej, 81 kobiet należących do populacji mieszanych zamieszkujących USA (Afroamerykanki, Amerykanki pochodzenia hiszpańskiego) oraz 13 kobiet rasy czarnej, które urodziły przed 37 tc. W analizie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w częstości występowania polimorfizmu $-308G>A$ $TNF-\alpha$ [Mattar et al., 2006].

Również w pracy Chauhan *et al.* (2009) nie stwierdzono korelacji pomiędzy polimorfizmem $-308G>A$ $TNF-\alpha$ a wystąpieniem PTD oraz dysplazji oskrzelowo-płucnej u dzieci urodzonych przedwcześnie (804 dzieci) [Chauhan et al., 2009]. W pracy Amory *i wsp.* badano polimorfizm $-308G>A$ oraz drugi wariant $-863C>A$ genu $TNF-\alpha$ (analiza 118 matek i

ich dzieci urodzonych przed 34 tc.). Matki, które były homozygotami -863AA dla polimorfizmu -863G>A *TNF-α*, statystycznie częściej rodziły przedwcześnie i częściej rozpoznawane było u nich zakażenie wewnątrzodniowe. W tej grupie kobiet Autorzy pracy sugerują związek zakażenia wewnątrzodniowego tylko z wariantem -836A *TNFα*. Podobnych korelacji nie stwierdzono w przypadku polimorfizmu -308G>A *TNF-α* [Amory et al., 2004].

Analiza przeprowadzona przez Stonek *et al.* w grupie 1652 kobiet ciężarnych, pod kątem związku między jedną z patologii położniczych (obumarcie wewnątrzmaciczne płodu, stan przedzruciawkowy, poród przedwczesny, niska masa urodzeniowa noworodka) a częstością występowania polimorfizmu -308G>A genu *TNF-α* wykazała brak istotnych statystycznie różnic w częstości występowania polimorfizmu -308G>A *TNF-α* między grupą badaną a grupą kontrolną [Stonek et al., 2007].

Również w analizie przedstawianej w powyższej pracy w zakresie polimorfizmu -308G>A *TNF-α* nie wykazano zasadniczego wpływu tego wariantu genetycznego na patomechanizm PTD (rozkład genotypu GA: 30,0 vs. 26,0% w grupie kontrolnej, $p=ns$ oraz AA 1,3 vs. 2,0% w grupie kontrolnej, $p=ns$).

5.2.3.3. INNE ANALIZOWANE POLIMORFIZMY GENU *TNF-α*

W niektórych pracach analiza dotyczy również związku innych polimorfizmów genu *TNF-α* z występowaniem PTD, a opublikowane wyniki są niekiedy bardzo interesujące. Również w obecnej rozprawie przeanalizowano aż cztery polimorfizmy tego genu.

W powyższym badaniu po raz pierwszy w populacji kobiet polskich analizowano polimorfizm -163G>A genu *TNF-α* w obydwu badanych grupach kobiet. W żadnej z badanych grup nie stwierdzono obecności genotypu heterozygotycznego -163GA oraz homozygotycznego zmutowanego -163AA. Jest to zgodne z innymi badaniami przeprowadzonymi w innych populacjach rasy kaukaskiej, gdzie allele o niskiej częstości występowania (MAF - *minor allele frequency*) dla tego polimorfizmu szacuje się na 0%.

Dla polimorfizmu -376G>A genu *TNF-α* w grupie badanej kobiet z PTD dwukrotnie częściej występował genotyp heterozygotyczny GA (2,7 vs. 1,3% w grupie kontrolnej, $p=ns$). Częstość zmutowanego allele A w grupie kobiet z porodem przedwczesnym wynosiła 1,3%, natomiast w grupie kontrolnej 0,67%, $p=ns$.

Istotną częścią analizy genetycznej w obecnej pracy jest analiza współwystępowania wszystkich badanych polimorfizmów genu *TNF-α*. W grupie zdrowych ciężarnych częściej

współwystępowały genotypy homozygotyczne niezmutowane w porównaniu z grupą badaną (68,0 vs. 57,3%). Natomiast kombinacje współwystępowania genotypów *TNF-α* zawierające zmutowany allel A dla polimorfizmu -238G>A zawsze częściej występowały w grupie badanej.

Rzadziej opisywany polimorfizm genu *TNF-α* -857C>T badali autorzy pracy Hollegaard *i wsp.* wykazując jego udział w patogenezie PTD. W pracy tej grupę badaną stanowiło 62 kobiet z pozytywnym wywiadem w kierunku porodu przedwczesnego, natomiast grupę kontrolną stanowiło 55 kobiet, u których porody następowały >37 tc.. Wykazano, że u nosicielek zmutowanego allela -857T istnieje wyższe ryzyko zakończenia ciąży PTD [Hollegard et al., 2008].

5.2.2.4. ZNACZENIE BADAŃ OBEJMUJĄCYCH POLIMORFIZMY GENETYCZNE KILKU CYTOKIN W ETIOLOGII PORODU PRZEDWCZESNEGO

Rolę czynników genetycznych w patomechanizmie porodu przedwczesnego najlepiej pokazują wyniki dużych badań analizujących jednocześnie kilkanaście polimorfizmów typu SNPs w dużych grupach ciężarnych z PTD. W roku 2006 jedno z pierwszych tego typu badań obejmowało 101 pacjentek z PTD oraz 321 pacjentek, u których poród odbył się o czasie (populacja kaukaska). Analizowanymi wariantami były polimorfizmy w genie *TNF-α*, genie receptora dla TNF (*TNFR1* oraz *TNFR2*), w genie *IL-6* oraz receptorze dla *IL-6* (*IL-6R*). W pracy prześledzono częstość występowania tych polimorfizmów oraz możliwe interakcje pomiędzy badanymi genami. Analiza pojedynczych wariantów podkreśliła korelację polimorfizmu -7294 (allele oraz genotypy) *TNFR1* oraz 24660 (genotypy) *TNFR2* z PTD. Analiza typu MDR pokazała istotne znaczenie modelu złożonego z 3 *locus*: -3448 *TNF-α*, -7227 *IL-6* oraz 33314 *IL-6R*. Autorzy wskazali, że ten interaktywny model pozwala na przewidywanie wystąpienia PTD w 65,2% oraz zasugerowali zastosowanie analizy typu *multilocus* w studiach asocjacyjnych chorób kompleksowych, takich jak PTD [Menon et al., 2006].

W pracy Romero *et al.* przebadano aż 190 genów i 775 polimorfizmów typu SNPs w grupie 223 kobiet, u których doszło do rozwoju PTD przy zachowanych błonach płodowych oraz 179 noworodków urodzonych przed terminem. Grupę kontrolną stanowiło 599 zdrowych ciężarnych i 628 noworodków z ciąż zakończonych o czasie. Najsilniejszą korelację z

ryzykiem PTD wykazano dla polimorfizmów genu receptora IL-6 (IL-6R) (w grupie noworodków $p=0,00148$) oraz tkankowego inhibitora metaloproteiny (w grupie matek $p=0,00197$) [Romero et al., 2010].

W grupie 410 kobiet z Brazylii z dodatnim wywiadem w kierunku porodu przedwczesnego analizowano następujące polimorfizmy: $-308G>A$ *TNF- α* , $-1082G>A$ *IL-10*, $-819C>T$ *IL-10*, $-592C>A$ *IL-10*, $-174G>C$ *IL-6*, oraz $+874A>T$ *IFN- γ* . W pracy nie wykazano korelacji pomiędzy żadnym z pojedynczych polimorfizmów a występowaniem porodu przedwczesnego. Natomiast zaobserwowano, że dopiero kombinacja współwystępowania genotypów 3 polimorfizmów: $-308G>A$ *TNF- α* , $-174G>C$ *IL-6* oraz $+874A>T$ *IFN- γ* może brać udział w etiologii PTD. Wyznaczona kombinacja genotypów to: $-308GG$ *TNF- α* , $-174GG$ *IL-6* oraz $+874AA$ *IFN- γ* [Moura et al., 2009].

W analizie przeprowadzonej w populacji kobiet polskich (Pracownia Medycznych i Środowiskowych Zagrożeń Ciąży Uniwersytetu Medycznego w Łodzi) (grupa badana 62 ciężarnych z PTD oraz 63 zdrowych ciężarnych) oceniono związek polimorfizmu genów kodujących wybrane cytokiny prozapalne z wystąpieniem porodu przedwczesnego. W pracy badano polimorfizm genu interleukiny *IL-1 β* ($+3953C>T$), promotora genu *IL-6* ($-174G>C$), promotora genu *TNF- α* ($-308G>A$) oraz przeprowadzono analizę wariantów allelicznych w genie antagonisty receptora dla interleukiny IL-1 β - *IL-1RN* [Kalinka i wsp., 2009]. Dla polimorfizmu *IL1 β +3953C>T* najczęściej występującym genotypem w grupie kobiet z porodem przedwczesnym był genotyp *IL1 β +3953*1*. W grupie rodzących przedwcześnie w zakresie polimorfizmu $-174G>C$ promotora genu *IL-6* najczęściej stwierdzono genotyp heterozygotyczny *GC* u 42,6%, następnie genotyp zmutowany *CC* u 31,1% oraz genotyp *GG* u 26,2%. W grupie kobiet rodzących przedwcześnie najczęściej stwierdzono genotyp *TNF α *1* (72,6%), najrzadziej *TNF α *2* (1,6%). U kobiet rodzących o czasie genotyp *TNF α *2* występował 3-krotnie częściej (5,5%). Zwiększone ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego odnotowano dla kobiet nosicielek allele *IL1RN*2* (WR=2,75). Autorzy tej pracy stwierdzili również związek pomiędzy występowaniem porodu przedwczesnego a współwystępowaniem niektórych genotypów genów *IL-1RN* (*IL1RN*1/IL1RN*2*, *IL1RN*1/IL1RN*3*, *IL1RN*2/IL1RN*3*) oraz *IL-6* (*GG*, *GC*) (WR=3,02). Badania przeprowadzone przez Kalinkę i wsp. udowodniły zwiększone ryzyko przedwczesnego zakończenia ciąży u nosicielek allele 2 intronu 2 genu antagonisty receptora interleukiny 1 (*IL1RN*2*). Drugim istotnym wnioskiem z pracy jest zwrócenie uwagi na rolę łącznego wpływu współwystępowania genotypów na wystąpienie porodu przedwczesnego. Łączne występowanie genotypu zawierającego allel *IL1RN*2* oraz co najmniej jednego allele *G* genu

IL-6 również powodowało wzrost ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego [Kalinka i wsp., 2009].

W pracy Speer *i wsp.* opisano związek polimorfizmów genów *IL-6*, *TNF- α* , *IFN- γ* , *IL-10* z rozwojem PTD. Badaniem objęto 80 matek i noworodków, u których poród miał miejsce przed ukończeniem 35 tc. Grupę kontrolną stanowiło 80 kobiet, u których poród odbył się o czasie. Każda z objętych badaniem kobiet była również analizowana pod kątem występowania zakażenia wewnątrzodniowego. W pracy zbadano kilka wariantów polimorficznych: *TNF- α -308G>A*, *+874A>T* interferon- γ (*IFN- γ*), *-174C>G* *IL-6*, *-1082G>A*, *-819C>T*, *-592C>A* *IL-10*, oraz *T>C* kodonu 10, *G>C* kodonu 25 transforming growth factor β 1 (*TGF- β 1*). Wykazano jednak tylko związek polimorfizmu *-174C>G* genu *IL-6* z ryzykiem rozwoju PTD, analiza sugerowała związek wariantu *-174G* z ryzykiem wystąpienia porodu przedwczesnego w przypadku infekcji wewnątrzodniowej [Speer et al., 2006].

5.2.2.5. POLIMORFIZM GENÓW INTERLEUKIN, OBECNOŚĆ WAGINOZY BAKTERYJNEJ A WYSTĘPOWANIE PTD

Dotychczas zasadniczym wnioskiem z przeprowadzonych badań jest konieczność zwrócenia uwagi na możliwy udział w etiologii porodu przedwczesnego co najmniej kilku genów i czynników środowiskowych. Taką zależność sugeruje się w coraz większej ilości prac badawczych. W kilku pracach wskazano już na zdecydowany wzrost wystąpienia PTD u kobiet z waginozą bakteryjną będących jednocześnie nosicielkami określonych wariantów polimorficznych genów cytokin [Genc et al., 2011, Macones et al., 2004]. Wiadomo już, że poród przedwczesny, PROM oraz niska masa urodzeniowa są związane z obecnością patologicznej flory bakteryjnej w pochwie oraz z nawracającymi zakażeniami pochwy ciężarnych. Czynniki, które modulują zmienność odpowiedzi pomiędzy mikroorganizmami a układem immunologicznym gospodarza odgrywają szczególną rolę w możliwości wystąpienia PTD, PROM, IAI w przebiegu ciąży. Wiele genów jest odpowiedzialnych za regulację wewnętrznej odpowiedzi immunologicznej, stąd również polimorfizm genetyczny może wyjaśniać zmiany w odpowiedzi na obecność flory patogennej i indywidualnej skłonności do wystąpienia powyższych powikłań [Genc et al., 2011; Gomez et al., 2010].

Istotną rolę odgrywają badania dotyczące stężenia cytokin w płynie owodniowym i wydzielinie z szyjki macicy oraz oceny ich związku z wystąpieniem PTD. Badania przeprowadzone przez Wasiełę *i wsp.* oceniają ilościowo cytokiny (*IL-1 α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*)

w wydzielinie szyjkowo-pochwowej kobiet ciężarnych jako wczesnego markera wystąpienia porodu przedwczesnego. W latach 2001-2003, przeprowadzono prospektywne badanie u 121 ciężarnych kobiet w wieku ciążowym 21-36 tc., gdzie określono związek pomiędzy infekcjami bakteryjnymi a stężeniem badanych cytokin. Stwierdzono, że obecność waginozy bakteryjnej istotnie korelowała ze wzrostem stężenia IL-1 β (BV 74,55 vs. 19,8 pg/mL dla kobiet z florą prawidłową), IL-1 α (BV 110,2 vs. 33,5 pg/mL) oraz w niewielkim stopniu na wzrost stężeń IL-8 (539,6 vs. 473,7 pg/mL). Nie stwierdzono związku pomiędzy BV a stężeniem IL-6 [Wasiela i wsp., 2005].

Analiza zależności stężeń wybranych cytokin w wydzielinie szyjkowo-pochwowej z porodem przedwczesnym w grupie kobiet z nieprawidłową florą bakteryjną dolnych dróg rodnych w czasie ciąży wykazała istotny wzrost ryzyka urodzenia wcześniaka dla kobiet z niskimi stężeniami (<25%) IL-1 α i IL-8 oraz podobną tendencję dla niskich wartości stężeń IL-6 i IL-1 β . Ryzyko urodzenia wcześniaka dla kobiet z infekcją dróg rodnych i stężeniami IL-1 α i IL-1 β poniżej 25 percentyla wyniosło WR=4,65 w odniesieniu do kobiet z wysokimi stężeniami tych cytokin (>75 percentyla). Jeszcze wyższe ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego odnotowano dla kobiet z infekcją i niskimi stężeniami IL-1 α i IL-8 i wyniosło ono WR=8,00.

Małe stężenia wybranych cytokin u ciężarnych z nieprawidłową florą bakteryjną dolnych dróg rodnych mogą stwarzać korzystne warunki dla rozwoju infekcji wstępujących w czasie ciąży a w konsekwencji zwiększać ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego. Wyniki badań mogą przyczynić się do skuteczniejszej identyfikacji kobiet zagrożonych wystąpieniem porodu przedwczesnego. Podobny mechanizm i ryzyko określono dla noworodków z cechami infekcji wrodzonej. Stwierdzono niższe stężenia IL-1 β , IL-6 i IL-8 w czasie ciąży u kobiet rodzących dzieci z infekcją wewnątrzmaciczną [Wasiela i wsp., 2005].

5.2.4. UDZIAŁ POLIMORFIZMÓW GENÓW KODUJĄCYCH RECEPTORY TLR W PORODZIE PRZEDWCZESNYM

Od dawna dyskutuje się udział polimorfizmu genów receptorów TLR w patogenezie nieswoistych zapaleń jelit oraz rozwoju zakażenia wywołanego przez bakterie *Helicobacter pylori*, co sprzyja rozwojowi przewlekłego zapalenia błony śluzowej żołądka i w konsekwencji, raka żołądka. W tym zakresie udowodniono również, że polimorfizm *Thr399Ile* genu *TLR4* pozostaje w ścisłym związku z ryzykiem rozwoju wrzodziejącego

zapalenia jelita grubego [Hong et al., 2007; Torok et al., 2004]. Udział polimorfizmów *Arg753Gln* genu *TLR2* oraz *Thr399Ile* genu *TLR4* opisywany był również w grupach chorych z przewlekłym i ostrym stanem zapalnym. Badano wpływ powyższych polimorfizmów na rozwój zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa, czy ciężkość przebiegu gorączki reumatycznej [Na et al., 2008]. Prawdopodobny wpływ polimorfizmu *Arg753Gln* genu *TLR2* na wystąpienie gorączki reumatycznej u dzieci został przedstawiony w pracy Berdeli *i wsp.* [Berdeli et al., 2005]. Oceniano również wpływ badanych polimorfizmów genów receptorów TLR na upośledzenie reakcji obronnej organizmu w odpowiedzi na zakażenie przez niektóre bakterie i wirusy. Tulic *i wsp.* badali nasilenie reakcji obronnej organizmu na zakażenie (RSV - *Respiratory Syncytial Virus*). Z przeprowadzonych przez Autorów analiz wynikało, że polimorfizm *Thr399Ile* genu *TLR4* wiąże się z nieprawidłową odpowiedzią na zakażenie RSV, co skutkuje ciężkim przebiegiem tej infekcji szczególnie u dzieci [Tulic et al., 2007]. W związku ze wzrastającym zainteresowaniem znaczeniem polimorfizmów receptorów TLR w etiologii porodu przedwczesnego coraz więcej doniesień obejmuje tą grupę kobiet. Obserwacje dotyczące badania polimorfizmów genów receptorów TLR są niejednoznaczne. Wychodząc z założenia, że receptor TLR4 jest głównym endotoksycznym sygnalizatorem receptora i jest on niezbędny do rozpoczęcia wrodzonej odpowiedzi immunologicznej w stosunku do bakterii Gram-ujemnych, Lorenz *et al.* analizowali obecność polimorfizmów *Asp299Gly* i *Thr399Ile* genu *TLR4* (polimorfizmy pozostające w nierównowadze sprzężeń). Badanie przeprowadzono w populacji kobiet fińskich (351 dzieci urodzonych o czasie oraz 440 dzieci urodzonych przedwcześnie <35 tc. – 281 z ciąż pojedynczych oraz 158 z ciąż wielopłodowych, 94 matki) [Lorenz et al., 2002]. Częstość występowania zmutowanego allele *299Gly TLR4* oraz genotypów *Asp299Gly* oraz *Gly299Gly TLR4* była wyższa w grupie dzieci urodzonych przedwcześnie (różnice statystycznie istotne odpowiednio: $p=0,024$, $p=0,028$). W otrzymanych wynikach stwierdzono, że obecność zmutowanych alleli i genotypów genu receptora TLR4 była związana ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia porodu przedwczesnego [Lorenz et al., 2002].

Kim *et al.* (2004) przeanalizowali lokalizację receptorów TLR2 i TLR4 oraz zmianę ekspresji tych receptorów w błonach płodowych w grupie kobiet z zakażeniem wewnątrzodniowym, u których wystąpiło przedwczesne pęknięcie błon płodowych i poród przedwczesny. Grupę kontrolną w tych badaniach stanowiły kobiety z prawidłowym przebiegiem ciąży, u których ciąża zakończyła się po 37 tygodniu. Na podstawie przeprowadzonych badań udowodniono, że zarówno poród o czasie i poród przedwczesny powikłane występowaniem zakażenia wewnątrzodniowego związane są ze zwiększoną

ekspresją TLR2 oraz TLR4 w błonach płodowych. Ponadto receptory TLR2 i 4 wykazują powinowactwo do ligandów obecnych na powierzchni patogenów odpowiedzialnych za występowanie przedwczesnego pęknięcia błon płodowych [Kim et al., 2005].

Istnieją doniesienia wskazujące na związek polimorfizmu 896A>G genu *TLR4* z obniżoną odpowiedzią organizmu na stymulację LPS, co powoduje, że nosicielki zmutowanego allele są narażone na zwiększone ryzyko infekcji bakteryjnej i w konsekwencji na zwiększone ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego. Arbour *i wsp.* analizowali polimorfizmy genów TLR i ich wpływ na obniżoną odpowiedź organizmu w odpowiedzi na stymulację LPS. Udowodnili oni, że zewnątrzkomórkowe domeny receptora TLR4 związane są z osłabioną odpowiedzią LPS. Stwierdzili, że polimorfizm *Asp299Gly TLR4* ma wpływ na stymulację LPS przez te receptory [Arbour et al., 2000]. Arbour *i wsp.* badali genetyczne podstawy fizjologicznych reakcji na endotoksyny wziewne lub LPS z kilku powodów. Po pierwsze endotoksyny wiążą się z rozwojem i progresją astmy i innych chorób dróg oddechowych. Po drugie badali oni różnorodne reakcje na działanie endotoksyn. Zaobserwowano różnice w reakcji i syntezie endotoksyn przez ludzkie monocyty stymulowane LPS *in vitro* i u pacjentów z nawracającymi zakażeniami bakteryjnymi. Autorzy Ci stwierdzili również, że coraz wyraźniejsze stają się odpowiedzi na LPS w molekularnych reakcjach prowadzących do rozpoznawania i odpowiedzi na LPS. Na podstawie tych wszystkich obserwacji Autorzy udowodnili, że polimorfizm *TLR4* jest związany z różnicami w reakcji na odpowiedź po zadziałaniu LPS bakterii Gram-ujemnych u ludzi, a ponadto obecność polimorfizmu może mieć wpływ na zwiększone ryzyko występowania infekcji [Arbour et al., 2000].

Za jeden ze stanów poprzedzających wystąpienie porodu przedwczesnego uważana jest obecność waginozy bakteryjnej. W pracy Genc *et al.* udowodniono związek genu *TLR4* z kolonizacją pochwy przez bakterie z gatunku *Gardnerella vaginalis* i beztlenowe bakterie Gram-ujemne. Bakteryjna waginoza stwierdzana u 40% kobiet ciężarnych może być przyczyną występowania poronień, zakażenia wewnątrzmacicznego, wystąpienia porodu przedwczesnego i małej masy urodzeniowej dziecka. W pracy Genc *et al.* u 238 kobiet pomiędzy 18 a 22 tc. określono skład mikroflory pochwy. Wykorzystując reakcję łańcuchowej polimerazy oznaczano obecność genotypów polimorfizmu genu receptora TLR4. Stwierdzono, że u 10,3% kobiet nosicielek zmutowanego allele 896G TLR4 doszło do wzrostu pH pochwy. Ponadto u kobiet nosicielek genotypu homozygotycznego 896AA odnotowano podwyższony poziom IL-1 ($p=0,01$), aktywności receptora IL-1ra ($p=0,0000$) co mogło być związane ze zmniejszeniem odporności przed zakażeniami pochwy *Gardnerella*

vaginalis i beztlenowymi pałeczkami Gram-ujemnymi. Zmiana mikroflory pochwy przyczyniała się do wystąpienia przedwczesnego pęknięcia błon płodowych, a co za tym idzie w wielu przypadkach do wystąpienia porodu przedwczesnego [Genc et al., 2004].

Abrahams *et al.* w pracy poświęconej związkowi receptora TLR4 z wystąpieniem zahamowania wewnątrzmacicznego wzrastania płodu, rozwojem stanu przedrzucawkowego czy porodem przedwczesnym udowodnili, że pobudzenie TLR4 wzmacnia produkcję cytokin, a aktywacja receptorów TLR2 indukuje apoptozę komórek trofoblastu. Udowodniono, że tą drogą infekcja wewnątrzmaciczna wpływa na śmierć komórek trofoblastu, co prowadzi m.in. do wystąpienia porodu przedwczesnego [Abrahams et al., 2005].

W przebiegu analizy polimorfizmu receptora TLR2 (*16934T>A* oraz *Arg753Gln*) oraz TLR4 (*Thr399Ile*) wśród 305 dzieci wskazano na związek polimorfizmu TLR2 z występowaniem porodu przedwczesnego. Odnotowano również związek jednoczesnego występowania zmutowanych alleli obydwu badanych polimorfizmów (*16934A/753Gln*) ze statystycznie istotnym krótszym czasem trwania ciąży (30,6 vs. 34,1-36,8 tc. w grupie dzieci nosicieli tylko jednego zmutowanego allela z badanych polimorfizmów, nosicieli alleli typu dzikiego, $p=0,02$) [Krediet et al., 2007].

W badaniach przeprowadzonych w populacji noworodków z Urugwaju zaobserwowano wzrost ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego w przypadku noworodków nosicieli zmutowanego allela dla polimorfizmu *Asp299Gly TLR4* przy jednoczesnym pęknięciu błon płodowych [Rey et al., 2008]. Dane te wskazują na różnice w przebiegu odpowiedzi zapalnej w zależności od obecności różnych wariantów polimorficznych genów czynników biorących udział w procesie zapalnym.

W niektórych natomiast badaniach nie wykazano wpływu badanych polimorfizmów genów TLR na wystąpienie pęknięcia błon płodowych, rozwój zakażenia wewnątrzmacicznego, czy porodu przedwczesnego. Badanie w populacji kobiet niemieckich przeprowadzone przez Härtella *i wsp.* nie potwierdziły istnienia powyższej zależności [Härtell et al., 2004]. Celem tej było określenie wartości predykcyjnej polimorficznych alleli genów kodujących poszczególne warianty układu immunologicznego jako markerów porodu przedwczesnego. Przeanalizowano aż pięć polimorfizmów w dużej grupie wcześniaków o bardzo niskiej masie urodzeniowej, dzieci urodzonych w terminie porodu oraz ich matek. W przeprowadzonym badaniu wskazano, że ogólny wpływ badanych polimorfizmów na rozwój porodu przedwczesnego wydaje się umiarkowany, a żaden z polimorfizmów nie jest istotnie związany z wystąpieniem zakażenia wewnątrzmacicznego jako przyczyną wystąpienia

porodu przedwczesnego. Dla polimorfizmu *Arg753Gln TLR2* potwierdzono podobną częstość występowania genotypów heterozygotycznego/homozygotycznego badanego wariantu (w grupie matek 6,9 vs. 6,1% oraz w grupie dzieci 5,7 vs. 5,1%). Dla polimorfizmu *896G TLR4* stwierdzono częstość występowania genotypów homozygotycznego/heterozygotycznego w grupie matek 8,1 vs. 11,5% oraz w grupie dzieci 11,6 vs. 10,5% [Härtell et al., 2004]. Te wyniki dotyczące polimorfizmu *Arg753Gln TLR2* są zbieżne z obserwacjami zawartymi w powyższej pracy, gdzie analizą objęto stosunkowo dużą grupę 150 kobiet, u których poród zakończył się przed 36+6 tc. Dla polimorfizmu *Arg753Gln* genu *TLR2* odnotowano podobną częstość występowania heterozygot *GA* w grupie kobiet z porodem przedwczesnym (8,0 vs. 5,3% grupa kontrolna, $WR=1,54$, $p=ns$), jak również zmutowanego allela *A* (4,0 vs. 3,3%, $WR=1,21$, $p=ns$). W zakresie polimorfizmu *Thr399Ile TLR4* odnotowano przewagę występowania genotypu heterozygotycznego *CT* w grupie kontrolnej (14,0 vs. 9,3% w grupie badanej, $WR=0,63$, $p=ns$). Taka sama obserwacja dotyczyła częstości zmutowanych alleli *T* (7,0 vs. 5,3% w grupie badanej, $WR=0,75$, $p=ns$). Te ciekawe obserwacje pozwoliły na wysunięcie wniosku o ochronnym wpływie obecności zmutowanego allela *T* polimorfizmu *Thr399Ile TLR4* na występowanie porodu przedwczesnego w badanej populacji kobiet polskich.

W pracy Łukaszewskiego i wsp. również dotyczącej populacji kobiet polskich oceniano polimorfizm *Arg753Gln* w genie *TLR2* oraz polimorfizm *Thr399Ile* w genie *TLR4* w grupie kobiet z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych i porodem przedwczesnym (33 kobiety z PROM między 30 a 36 tc.). Na podstawie zebranych danych stwierdzono, że przewaga występowania heterozygotycznego genotypu *CT* oraz zmutowanego allela *T* dla polimorfizmu *Thr399Ile (C8993T)* w genie *TLR4*, w grupie kontrolnej zdrowych kobiet ciężarnych może sugerować jego ochronną rolę w stosunku do występowania przedwczesnego pęknięcia błon płodowych i porodu przedwczesnego [Łukaszewski i wsp., 2009].

W tabeli 37 zebrano dostępne doniesienia wskazujące potencjalne znaczenie badanych w pracy polimorfizmów genów cytokin i receptorów Toll-like oraz ich możliwy wpływ na ekspresję genów, syntezę cytokin oraz stężenie obwodowe.

Tab. 37. Polimorfizmy genów cytokin oraz receptorów Tol-like i ich znaczenie w organizmie człowieka.

<i>Gen</i>	<i>Polimorfizm</i>	<i>Potencjalne znaczenie polimorfizmu</i>	<i>Literatura</i>
<i>IL-1β</i>	+3953C>T +3953T	Wzrost stężenia IL-1 β Wzrost stężenia prostaglandyn, wzrost stężenia czynności skurczowej macicy	Baggia et al., 1996
<i>IL1RA</i>	86 VNTR <i>IL1RN</i> *2	Spadek syntezy białka IL-1RA, niemożność zahamowania aktywności IL-1 β , brak zahamowania reakcji zapalnej modulowanej przez IL-1 β Wzmoczona odpowiedź zapalna, osłabienie błon płodowych	Baggia et al., 1996 Mingione et al., 2006
	<i>IL1RN</i> *2	Wzrost syntezy białka IL-1RA Niższe ryzyko wystąpienia PTD	Genc et al., 2002
<i>IL-6</i>	-174G>C -174C	Brak zmian w stężeniu IL-6 po stymulacji LPS, IL-1 β	Fishman et al., 1998
	-174G	Wzrost ekspresji mRNA Wzrost syntezy IL-6	Chen et al., 2006
	-596G>A -596G	Wzrost stężenia IL-6	Villuendas et al., 2002
<i>TNF-α</i>	-163G>A -163A	Lokalizacja w obrębie sekwencji bogatej w zasady GC wiążącej czynniki transkrypcyjne Egr-1 i Sp-1 Regulacja procesu transkrypcji	Krämer 1994 Juszczynski i Warzocha 2002
	-238G>A -238A	Lokalizacja w obrębie sekwencji podobnej do sekwencji nazywanej Y-box, motyw regulatorowy, regulacja procesu transkrypcji	D'Alfonso et al., 1994
	-308G>A -308A	Utrata miejsca wiążącego czynnik transkrypcyjny AP-2, indukcja odpowiedzi zapalnej Wzrost syntezy MMP, apoptozy komórek błon płodowych osłabienie błon płodowych Wzrost syntezy TNF- α	Kroeger 1996 Kroeger 1997
	-376G>A -376A	<i>In vitro</i> wpływa na ekspresję TNF- α Zmiana w wiązaniu czynnika transkrypcyjnego OCT-1 Zwiększenie o 35% podstawowej aktywności transkrypcyjnej promotora genu TNF- α , ale nie wpływa na aktywność transkrypcyjną indukowaną przez LPS	Knight 1999

OCT-1 - ang. *octamer binding transcription factor* Egr-1 - ang. *early growth response protein 1*

5.3. POLIMORFIZMY INNYCH GENÓW KANDYDUJĄCYCH W ETIOLOGII PORODU PRZEDWCZESNEGO

Najczęstsze badania dotyczące udziału genów kandydujących w etiopatogenezie PTD dotyczą cytokin i receptorów Toll-like. Z pewnością należy jednak podkreślić również rolę innych polimorfizmów genetycznych, które mogą współdziałać ze sobą lub z polimorfizmami genów cytokin przyczyniając się do wzrostu ryzyka porodu przedwczesnego poprzez wpływ na zmiany w aktywności hormonów biorących udział w regulacji czasu trwania ciąży, zmiany w aktywności enzymów, czy indukcję zaburzeń w krążeniu maciczno-łożyskowym. Wpływa to na wystąpienie samoistnej czynności skurczowej macicy, osłabienie wytrzymałości błon płodowych, skrócenie szyjki macicy.

Obecnie wskazuje się również na inne geny kandydujące w etiologii porodu przedwczesnego, jak gen kortykoliberyny (CRH – *corticotropin-releasing hormone*), enzymu cyklooksygenazy 2 (COX2 – *cyclo-oxygenase-2*) oraz receptora progesteronowego [Harding et al., 2007, Guoyang et al., 2008, Diaz-Cueto et al., 2008, Manuck et al., 2010, Torricelli et al., 2011]. Z drugiej strony w mechanizmie porodu uczestniczą także procesy związane z procesami dojrzewania szyjki macicy. Procesy te podlegają regulacji ze strony interleukiny-8, prostaglandyny PGE2, jak również metaloproteinaz: -8 oraz -9 (MMPs – *metalloproteinases*). Te ostatnie degradują białka macierzy pozakomórkowej, odgrywają ważną rolę w przebudowie i procesach naprawczych tkanek oraz w przebiegu reakcji zapalnej. W jednym badaniu wskazano na związek polimorfizmu polegającego na insercji guaniny w pozycji – 1607GG genu metaloproteinazy-1 (MMP1) u płodu z pęknięciem błon płodowych, jak i wystąpieniem porodu przedwczesnego [Fujimoto et al., 2002]. Ważną rolę przypisuje się czynnikowi jądrowemu NF *kappa* B, który bezpośrednio reguluje ekspresję innych genów np. COX2, IL-1 β , IL-6, IL-8, MMP9 i może być włączony w rozwój PTD.

Na podstawie badań ukierunkowanych na wpływ czynników genetycznych związanych z zaburzeniami przepływu krwi w jednostce maciczno-łożyskowej stwierdzono, że prawidłowe funkcjonowanie łożyska zależy od równowagi pomiędzy mechanizmami pro i przeciwzakrzepowymi. Naruszenie tej równowagi może prowadzić do wystąpienia zawałów i zakrzepów w łożysku, niedotlenienia i niedokrwienia łożyska wywołającego stres płodowy i aktywującego oś podwzgórze-przysadka-nadnercza, co z kolei może być jedną z przyczyn porodu przedwczesnego. Stąd coraz liczniejsze są prace dotyczące znaczenia dziedzicznych trombofilii i ich udziału w PTD. Badania te dotyczą częstości występowania mutacji Leiden

V czynnika krzepnięcia (*1691G>A*), mutacji genu protrombiny (*G20210G>A*), czy polimorfizmu genu *MTHFR* (*677C>T*) [Resch et al., 2004, Valdez et al., 2004]. Hao *i wsp.* udowodnili, że nosicielstwo polimorfizmu genu kodującego czynnik krzepnięcia V (mutacja Leiden) jest związane z wystąpieniem porodu przedwczesnego [Hao et al., 2004].

Poszczególne warianty genetyczne mogą wpływać na odpowiedź organizmu po jego ekspozycji na różnorodne czynniki środowiskowe, stąd obecnie nie można pominąć wpływu czynników środowiskowych na rozwój PTD. Do tych czynników należą: waginoza bakteryjna, choroby przyzębia oraz bakteriuria ciężarnych. Przykładem najczęściej przytaczanym jest badanie Maconesa *et al.* wykazujące związek zmutowanego allela -308A TNF- α z występowaniem waginozy bakteryjnej oraz porodu przedwczesnego [Macones et al., 2004]. Innym przykładem współdziałania czynników genetycznych i środowiskowych w PTD jak również możliwy związek polimorfizmu -308G>A TNF- α , stanów zapalnych przyzębia u ciężarnych z wystąpieniem porodu przedwczesnego. Jednak w pracy Moore *i wsp.* nie stwierdzono takiej korelacji z wystąpieniem PTD [Moore et al., 2004]. Innym przykładem może być modulowanie aktywności niektórych enzymów z rodziny cytochromu P450 (CYP450: CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1/NAT2 przez obecność polimorfizmów genetycznych i ich wpływ na występowanie porodu przedwczesnego. W pracy Wanga *i wsp.* wskazano, że u kobiet nosicielki polimorfizmu *HincII* genu CYP1A1 (genotyp *CYP1A1 AA*) obserwuje się skrócenie czasu trwania ciąży [Wang et al., 2002].

5.4. WPLYW ANALIZOWANYCH CZYNNIKÓW ŚRODOWISKOWYCH NA WYSTĄPIENIE PORODU PRZEDWCZESNEGO

Prace dotyczące wpływu czynników socjo-ekonomicznych na przebieg i czas trwania ciąży są stosunkowo liczne. Najczęściej analizowane są dane dotyczące wykształcenia, miejsca zamieszkania oraz rodzaju wykonywanej pracy. Ważnym elementem wpływu czynników środowiskowych na czas trwania ciąży jest apalenie papierosów przez kobiety przed ciążą, a także w czasie trwania ciąży.

W badaniu przeprowadzonym przez Karwan-Pońską w grupie pacjentek hospitalizowanych w I Katedrze i Klinice Położnictwa i Ginekologii Akademii Medycznej w Warszawie poddano analizie klinicznej 392 porody przedwczesne między 28. a 37 tc. Szczególną uwagę zwrócono na wiek, warunki socjalno-ekonomiczne, stan zdrowia, wpływ palenia papierosów, przeszłość położniczą, przebieg ciąży u rodzących przedwcześnie kobiet. Grupę kontrolną w badaniu stanowiły 392 pacjentki, które urodziły w terminie porodu.

Stwierdzono, że w grupie badanej najwięcej porodów wystąpiło u kobiet między 25. a 35. rokiem życia, podczas gdy w grupie kontrolnej w przedziale wieku 20-25 lat. Zauważono, że ryzyko PTD wzrasta dwukrotnie u rodzących po raz pierwszy powyżej 30. roku życia, zaś sześciokrotnie u pierworódek powyżej 35. roku życia. Podczas badania zwrócono uwagę na warunki socjalno-ekonomiczne takie jak miejsce zamieszkania, wykształcenie, zawód matki i ojca, matki bezrobotne, samotne i stan odżywienia kobiety zarówno przed ciążą jak i w jej trakcie. Obydwie grupy - badana PTD i kontrolna – nie różniły się w sposób istotny pod względem wykształcenia i miejsca zamieszkania (miasto/wieś). Wskaźnik BMI jako jedyny czynnik ryzyka nie wpływał na częstość występowania PTD. Wykazano wyraźny wpływ palenia papierosów na częstość występowania porodów przedwczesnych. W grupie badanej 180 kobiet czyli 45,9% paliło papierosy co stanowiło bardzo wysoki odsetek w porównaniu z danymi z piśmiennictwa. W grupie kontrolnej paliło papierosy 112 kobiet – 28%. Zwrócono uwagę na fakt, że kobiety palące statystycznie częściej nie mają wyższego wykształcenia. Na podstawie przeprowadzonych badań w obydwu grupach pacjentek stwierdzono, że złe warunki socjalno-ekonomiczne, obciążony wywiad położniczy oraz palenie papierosów przez kobiety ciężarne znamienne przyczyniają się do występowania PTD [Karwan-Płońska, 1999].

W badaniach przeprowadzonych przez Piekarską *i wsp.* prześledzono przebieg i zakończenie ciąży u 1539 kobiet. Badania przeprowadzone były na podstawie retrospektywnej analizy dokumentacji położniczej matek, które rodziły w Klinice Położnictwa Ginekologii ICZMP w Łodzi. Wykształceniem zawodowym lub podstawowym w badanej populacji łącznie wykazała się około 1/3 badanych matek. Średni wiek ciężarnych zamieszkujących tereny wiejskie wyniósł 27,9 lat, miejskie 28,4 lat. Matki nieletnie stanowiły 2% ogółu, najmłodsze z nich miały 15 lat i były to ich pierwsze ciążę. Średni czas trwania ciąży dla kobiet zamieszkujących środowisko wiejskie osiągnął 38,1 tc., dla mieszkających w mieście 38,5 tc. Najkrótszy średni czas trwania ciąży (średnio 36,9 tc.) dotyczył grupy licznych wieloródek tj. rodzących zwykle 4 lub 5 raz (średnio 4,7). Miejsce zamieszkania ciężarnych nie wykazało istotnego wpływu na czas trwania ciąży. Jednak odsetek porodów przedwczesnych w grupie zamieszkującej wieś, osiągnął wartość większą o 3,02% w porównaniu z odsetkiem porodów przedwczesnych kobiet z miasta (23,22%). Badanie nie wykazało statystycznej zależności między badanymi parametrami ($p=0,5613$). W powyższym badaniu stwierdzono iż wykształcenie ciężarnych stanowiło najsilniejszy czynnik socjalno-demograficzny istotnie determinujący przedwczesne zakończenie ciąży [Piekarska *i wsp.*, 2010].

Mozurkewich *i wsp.* przeprowadzili analizę wpływu niekorzystnych warunków pracy na poród przedwczesny. Na podstawie zbiorczej analizy wyników 21 badań (n=146 457 kobiet) stwierdzili oni z częstszym występowaniem PTD związana jest praca wymagająca wysiłku fizycznego (OR=1,22). Również analizując poszczególne parametry pracy wskazano na częstsze przedwczesne zakończenie ciąży przy wykonywaniu pracy w pozycji stojącej (14 badań, n=24 859, OR=1,26), pracy zmianowej (6 badań, n=9922, OR=1,39), także wskaźnik punktowy uciążliwości pracy (6 badań, n=7719, OR=1,63) był związany z PTD). Natomiast przedłużony czas pracy (10 badań, n=22 211) nie był związany z większą częstością porodów przedwczesnych (OR=1,03). Wykazane różnice nie były zależne od stosowanej metody analizy, jak również od podziału badanych kobiet na podgrupy. Stwierdzono, iż warunki pracy, w tym ciężka praca fizyczna lub praca w pozycji stojącej, mogą istotnie zwiększać ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego lub urodzenia noworodka o zbyt małej masie w stosunku do wieku ciążowego [Mozurkewich *i wsp.*, 2000].

Badania Windham *et al.* wykazały wśród 4454 żywo urodzonych noworodków zwiększone ryzyko urodzenia dziecka przedwcześnie (<35 tc.) przez matki palące ponad 10 papierosów na dobę [Windham *et al.*, 2000].

W powyżej przeprowadzonych badaniach analizując pacjentki w grupie kontrolnej i badanej nie stwierdzono istotnego wpływu na wystąpienie porodu przedwczesnego: wieku matki (średnia w grupie badanej 29,18 lat, średnia w grupie kontrolnej 29,03 lat), nie zanotowano również istotnego wpływu na wystąpienie PTD masy ciała matki oszacowanego na podstawie wskaźnika BMI (brak znamiennej różnicy pomiędzy grupą badaną a kontrolną).

Uwagę zwracał fakt, że w grupie z PTD zdecydowanie więcej kobiet miało tylko wykształcenie podstawowe (25,9 vs. 7,3% w grupie kontrolnej). Natomiast więcej kobiet z wykształceniem wyższym odnotowano w grupie kontrolnej (64,7% vs. 40,2% w grupie badanej). W grupie z PTD więcej kobiet pracowało fizycznie (32,7 vs. 14,5% w porównaniu do grupy kontrolnej). W grupie kontrolnej większość kobiet pracowała umysłowo (77,4 vs. 49,0% w grupie PTD). Na podstawie analizy wykształcenia kobiet w obydwu grupach stwierdzono, iż kobiety z grupy badanej są osobami o niższym wykształceniu, częściej wykonują pracę fizyczną lub pozostają w domu. Odnotowano również istotne różnice podczas analizy wpływu stosowanych używek przed i podczas ciąży. Analiza ta ujawniła, że w grupie badanej PTD więcej kobiet paliło papierosy przed ciążą (31,0 vs. 20,0% w grupie kontrolnej). Pacjentki z grupy badanej PTD również znacznie częściej niż pacjentki z grupy kontrolnej

pały w czasie ciąży (9,8 vs. 4,7% w grupie kontrolnej). W grupie z PTD mniej kobiet przyjmowało kwas foliowy przed ciążą (45,8 vs. 57,3%) oraz w czasie ciąży (68,0 vs. 75,8%).

5.5. IMPLIKACJE KLINICZNE OZNACZANIA POLIMORFIZMÓW GENETYCZNYCH W PORODZIE PRZEDWCZESNYM

Analiza polimorfizmów genów cytokin i receptorów Toll-like w etiologii PTD w przyszłości może prowadzić do wskazania markerów genetycznych i wyłonienia grupy ryzyka pacjentek najbardziej predysponowanych do wystąpienia tego powikłania. Z drugiej natomiast strony badania te pozwolą wskazać ciężarne, u których będzie można włączyć terapię mogącą opóźnić lub nawet zapobiec wystąpieniu PTD.

Blokada aktywności cytokin może prowadzić do zahamowania kaskady cytokiny-prostaglandyny i opóźnić lub zapobiec wystąpieniu pęknięcia błon płodowych oraz wystąpienia zakażenia wewnątrzowodniowego. Najwięcej badań dotyczy terapii PTD związanej z zastosowaniem antagonistów TNF- α . Entuzjazm związany z zastosowaniem tej terapii pochodzi z wniosków z badań dotyczących porodów przedwczesnych u zwierząt doświadczalnych indukowanych działaniem lipopolisacharydów błon bakterii Gram ujemnych. Modele zwierzęce terapii antycytokinami mają na celu utrzymanie równowagi pomiędzy mediatorami z grupy cytokin Th1 oraz Th2. TNF- α jest pierwotnym regulatorem syntezy IL-1 beta, IL-10 i prostaglandyny E2, co sugeruje, że TNF- α jest również potencjalnym celem dla interwencji leczniczej w przypadku PTD. Blokowanie TNF- α za pomocą przeciwciała monoklonalnego D2E7 powoduje spadek syntezy mRNA dla IL-1 β w krążeniu systemowym i redukcję endogennych antagonistów dla IL-1 β i TNF- α i innych cytokin biorących udział w odpowiedzi ostrej fazy, jak IL-6.

Terapia z zastosowaniem przeciwciał anti-TNF- α w klinice stosowana jest w reumatoidalnym zapaleniu stawów, toczeniu rumieniowatym układowym, chorobie Crohna, wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego, łuszczycy, astmie oskrzelowej. Zauważono znaczne zmiany ekspresji genów u pacjentów otrzymujących tą terapię (anti-TNF- α) włączając w to supresję IL-6, IL-1 β , receptora TLR2, CD14, cyklooksygenazy-1. Dostępne dzisiaj strategie blokowania osi TNF- α obejmują stosowanie następujących leków: infliximab, adalimumab oraz golimumab.

Infliximab jest chimerycznym przeciwciałem monoklonalnym klasy IgG1 (mysim, humanizowanym) wiążącym się z dużym powinowactwem zarówno z rozpuszczalną, jak i

transbłonową formą ludzkiego TNF- α specyficznie blokując jego aktywność. Infliksymab tworzy *in vivo* stabilne kompleksy z ludzkim TNF- α , co jest równoznaczne z utratą aktywności biologicznej przez tę cytokinę. W przypadku tego leku opisano wyraźne blokowanie działania osi TNF- α . Adalimumab i golimumab są w pełni humanizowanymi przeciwciałami i uważane są za mniej immunogenne w porównaniu do infliximabu. Adalimumab jest rekombinowanym ludzkim przeciwciałem monoklonalnym klasy IgG1 skierowanym przeciw TNF- α . Wiąże się w sposób swoisty z TNF- α i niweluje jego aktywność. Na skutek działania leku dochodzi do hamowania interakcji podjednostki α cząsteczki TNF z receptorami p55 oraz p75 znajdującymi się na powierzchni komórki. Adalimumab moduluje ponadto odpowiedź biologiczną regulowaną normalnie przez TNF- α w zakresie różnych mechanizmów, między innymi na poziomie cząsteczek adhezji międzykomórkowej odpowiedzialnych za zjawisko migracji leukocytów (cząsteczki ELAM-1, VCAM-1, ICAM-1). Golimumab, przeciwciało monoklonalne, specyficznie przyłącza się do TNF- α , blokuje jego aktywność i zmniejsza stan zapalny.

Potencjalnymi działaniami niepożądanymi przy zastosowaniu terapii przeciwciałami anti-TNF- α są infekcje oportunistyczne oraz formacja przeciwciał przeciw anti-TNF- α , co wiąże się ze zmniejszeniem efektywności terapii. Inne działania niepożądane to rozwój chłoniaka T-komórkowego wątroby, choroby demielinizacyjnej (zespół Guillain- Barré), zaburzenia czynności wątroby, zaburzenia czynności serca, wystąpienie zmian skórnych.

Korzystne działanie tych leków hamujące oś TNF- α próbuje się również wykorzystać w zahamowaniu rozwoju PTD. Holmgren i wsp. przeprowadzili badania na modelu zwierzęcym u myszy z zastosowaniem terapii anti-TNF- α potwierdzając, że terapia ta zmniejsza ryzyko występowania zgonu wewnątrzmacicznego oraz porodu przedwczesnego indukowanego przez LPS [Holmgren et al., 2008].

W pracy Sado i wsp. przeanalizowano rolę cytokin w porodzie przedwczesnym, zahamowanie kaskady cytokiny-prostaglandyny i opóźnienie lub zmniejszenie ryzyka wystąpienia PTD oraz powikłań związanych z wcześniactwem. Badania przeprowadzono na modelu zwierzęcym, w którym przeanalizowano rolę mediatorów z grup Th1 i Th2. Stwierdzono, iż antycytokinowa terapia wcześniactwa może być kierowana od Th1 przeciwko Th2.

Aktualnie w piśmiennictwie dostępne są tylko nieliczne prace oceniające potencjalny wpływ antagonistów TNF- α na przebieg ciąży i stan płodu. Dostępne są tylko limitowane dane o bezpieczeństwie stosowania tej terapii podczas ciąży w grupie kobiet, które otrzymywały leki z gupy przeciwciał monoklonalnych anti-TNF- α w przebiegu chorób układowych. Nie stwierdzono wpływu na płodność, rozwój płodu, zwiększonego ryzyka embriotoksyczności, teratogenności lub innego szkodliwego wpływu na przebieg ciąży u pacjentek z reumatoidalnym zapaleniem stawów, toczeniem układowym, czy chorobą Crohna. Prawdopodobnie wiąże się to z faktem, że dużego rozmiaru cząsteczkowego przeciwciała anti-TNF- α nie przenikają przez łożysko [Hoentjen et al., 2009]. W innym doniesieniu w grupie ciężarnych otrzymujących infliximab z powodu choroby Crohna lub reumatoidalnego zapalenia stawów odnotowano 67% żywych urodzeń, 15% poronień oraz przeprowadzenie germinacji ciąży ze względu na stan zdrowia matki w 18% [Katz et al., 2004]. Badania nad zastosowanie leków z przeciwciałami anti-TNF- α przeprowadził również Schnitzler i wsp. Analiza obejmowała grupę 212 kobiet, które chorowały na wrzodziejące zapalenie jelita grubego i stosowały infiximab oraz adalimumab. W analizie wyników pracy nie stwierdzono istotnego wpływu stosowanych leków na rozwój ciąży w badanej grupie kobiet [Schnitzler et al., 2011]. Te ciekawe obserwacje do tej pory nie zostały jednoznacznie potwierdzone w randomizowanych kontrolowanych z grupą placebo badaniach u ludzi. Brakuje ponadto długoterminowych badań typu follow-up oceniających stan noworodków i dzieci urodzonych po zastosowaniu terapii antycytokinami w ciąży.

Dodatkowo w badaniach *in vitro* udowodniono, że tocilizumab, monoklonalne przeciwciało przeciw receptorowi dla IL-6, hamuje aktywność osi: IL-6, a tym samym wydzielanie MMP-2 oraz MMP-9 w przedwczesnym pęknięciu błon płodowych [Mano et al., 2009].

Ponieważ aktywność TNF- α uwarunkowana poprzez warianty polimorficzne tego genu odgrywa niesłychanie istotną rolę w rozwoju nadmiernej odpowiedzi skurczowej macicy, osłabieniu błon płodowych zastosowanie terapii anti-TNF- α może przynieść wymierne korzyści w prewencji PTD szczególnie u kobiet wcześniej włączonych do grup ryzyka wystąpienia PTD – kobiet nosicielek zmutowanych alleli polimorfizmów genu TNF- α , czy genu receptora IL-6. W tym względzie na uwagę z pewnością zasługuje związek badanych polimorfizmów cytokin prozapalnych z odpowiedzią kliniczną na leczenie.

5.6. PODSUMOWANIE

Pomimo postępu wiedzy w medycynie perinatalnej problematyka porodu przedwczesnego, jego przyczyny, wczesna diagnostyka i leczenie nadal pozostają w kręgu gorących dyskusji. Kilka międzynarodowych organizacji intensywnie zajmuje się zapobieganiem wzrostu ryzyka występowania porodu przedwczesnego. Badania w tym zakresie dotyczą epidemiologii PTD, udziału poszczególnych genów i interakcji gen-środowisko (z wyznaczeniem fenotypów wysokiego ryzyka), różnic etnicznych i rasowych, roli odpowiedzi zapalnej i udziału stresu w PTD [Green et al., 2005].

Obok znanych już i dobrze udokumentowanych czynników ryzyka PTD coraz bardziej zwraca się uwagę na czynniki genetyczne, a szczególnie na geny kandydujące do udziału w patomechanizmie PTD. Obecnie PTD zaliczany jest do grupy chorób kompleksowych (*complex human diseases*), stąd w jego etiologii należy brać pod uwagę współdziałanie czynników genetycznych, środowiskowych oraz uwarunkowania rodzinne.

Należy jednak podkreślić, że dotychczasowe wyniki w tym zakresie wymagają dalszej kontynuacji. Słabą stroną dotychczasowych analiz genetycznych jest brak wskazania wszystkich genów kandydujących w etiologii PTD. W badaniach genetycznych dotyczących PTD analizowany jest wpływ alleli o dużej frekwencji ale małym efekcie, natomiast rzadko występujących o dużym efekcie (*point to critical effect*). Z drugiej strony wskazuje się na małe liczebnie grupy badanych ciężarnych z PTD i grup kontrolnych kobiet, u których ciąża zakończyła się w terminie porodu. Z pewnością w wyjaśnieniu etiopatogenezy PTD najbardziej przydatne są meta-analizy obejmujące duże liczebnie grupy kobiet i pochodzące niekiedy z wielu centrów badawczych. Bardzo wartościowe są też opracowania obejmujące jednoczesną analizę kilku polimorfizmów genetycznych, uwzględnające współdziałanie genotypów oraz współlistnienie haplotypów analizowanych genów. Coraz większą uwagę zwraca się na analizę interakcji gen-środowisko, które wskazywane już w kilku pracach wzbudzają duże zainteresowanie. Istnieje również konieczność pełnego poznania wszystkich szlaków w patofizjologii PTD oraz uwzględnienie heterogenności fenotypu. [Esplin et al., 2005, Verner et al., 2005].

W przedstawianej rozprawie doktorskiej badana grupa była stosunkowo liczna a analiza genetyczna obejmowała aż 10 polimorfizmów genetycznych, w tym także polimorfizmy nie

analizowane do tej pory w populacji kobiet polskich (-596G>A genu *IL-6*, -163G>A oraz -238G>A genu *TNF- α*). W pracy natomiast nie sprawdzano w grupach ciężarnych obecności waginozy bakteryjnej, czy obecności innych bakterii Gram-ujemnych w korelacji z badanymi wariantami genetycznymi oraz ryzykiem wystąpienia PTD.

Ponadto w wielu pracach wskazuje się na udział jeszcze innych czynników działających w koniunkcji do oznaczanych w powyższej pracy wariantów genetycznych. Mogą to być zarówno inne polimorfizmy genetyczne, jak również czynniki środowiskowe. Bardziej zaawansowane badania dotyczą zastosowania genomiki i proteomiki (ekspresja białek) w diagnostyce i wykrywaniu pacjentek ze wzrostem ryzyka wystąpienia PTD. W przyszłości prawdopodobnie analizy genetyczne obejmujące badania polimorfizmów genetycznych, analizę całego genomu, czy ekspresji mRNA pozwolą na wyznaczenie nowych biomarkerów w diagnostyce PTD oraz rozwój skutecznych metod profilaktyki i terapii PTD. Będzie to podstawą do zastosowanie farmakogenomiki w położnictwie i być może pozwoli na rozwój terapii indywidualnej (*tailored therapy*) w grupie ciężarnych zagrożonych porodem przedwczesnym.

6. WNIOSKI

1. W pracy wskazano na związek zmutowanych alleli polimorfizmu $-596G>A$, $-174G>C$ genu *IL-6* oraz $-238G>A$, $-376G>A$ genu *TNF- α* ze zwiększonym ryzykiem występowania porodu przedwczesnego.
2. Analiza częstości występowania genotypów i alleli badanych w pracy polimorfizmów w grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży sugeruje największe znaczenie wariantów polimorficznych genu *IL-6* oraz *TNF- α* w etiologii tego powikłania u kobiet rodzących pomiędzy 28 a 32 tc.
3. Tendencja do częstszego występowania haplotypu *AGAG* genu *TNF- α* zawierającego dwa zmutowane allele polimorfizmu $-376G>A$ oraz $-238G>A$ wskazuje na sumowanie się wpływu tych alleli w zwiększaniu ryzyka porodu przedwczesnego.
4. Polimorfizmy $-163G>A$, $-308G>A$ genu *TNF- α* , polimorfizm $+3953C>T$ genu *IL-1 β* , oraz *Arg753Gln* genu *TLR2* prawdopodobnie nie zwiększają ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego.
5. Analiza wyników pracy wskazuje na możliwy modulujący wpływ allele *IL-1RN*2* (polimorfizm 86 pz *VNTR*) genu *IL-1RN* oraz zmutowanego allele *399Ile* (polimorfizm *Thr399Ile*) genu *TLR4* na zmniejszenie ryzyka porodu przedwczesnego.
6. Wyniki badań potwierdzają udział czynników środowiskowych (wykształcenia, rodzaju wykonywanej pracy oraz palenia papierosów i stosowania kwasu foliowego przed i w czasie ciąży) w etiologii porodu przedwczesnego.

7. PIŚMIENNICTWO

1. Abrahams VM, Bole-Aldo P, Kim YM, Straszewski-Chavez SL, Chaiworapongsa T, Romero R, Mor G. Divergent trophoblast responses to bacterial products mediated by TLRs. *J Immunol.* 2004, 173, 4286-4296.
2. Abrahams VM, Mor G. Toll-like receptors and their role in the trophoblast. *Placenta.* 2005, 26(7), 540-547.
3. Adams KM, Eschenbach DA. The genetic contribution towards preterm delivery. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2004, 9(6), 445-452.
4. Ahrens P, Kattner E., Köhler C, Seidenberg J, Sagerer H, Möller J, Göpel W. Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in very low birth weight infants. *Pediatr Res.* 2004, 55(4), 652-656.
5. Amory JH, Adams KM, Lin MT, Hansen JA, Eschenbach DA, Hitti J. Adverse outcomes after preterm labor are associated with tumor necrosis factor-alpha polymorphism -863, but not -308, in mother- infant pairs. *Am J Obstet Gynecol.* 2004, 191, 1362-1367.
6. Annells MF, Hart PH, Mullighan CG, Heatley SL, Robinson JS, Bardy P, McDonald HM. Interleukin- 1, -4, -6, -10, tumor necrosis factor, transforming growth factor-beta, FAS, and mannose-binding protein C gene polymorphisms in Australian women: Risk of preterm birth. *Am J Obstet. Gynecol.* 2004, 191, 2056-2067.
7. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. *TLR4* mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans, Nature America Inc. 2000, 15, 187-189.
8. Baggia S, Gravett M, Witkin S. Interleukin-1 beta intra-amniotic infusion induces tumor necrosis factor-alpha, prostaglandin production and preterm contraction in pregnant rhesus monkeys. *J Soc Gynecol Investig.* 1996, 3, 121-126.
9. Bal J, Bocian E. Zmienność i dziedziczność. W: *Biologia molekularna w medycynie*, pod red. Bal J, Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa. 2001, 59-79.
10. Bal J. Metody badań genomu. W: *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej*. Pod red.: Bal J. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa. 2001, 142-162.
11. Bazan JF. A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989, 31, 164(2), 788-95.
12. Berdeli A, Celik H, Ozyurek R. TLR-2 gene Arg753Gln polymorphism is strongly associated with acute rheumatic fever in children. *J Mol Med.* 2005, 83, 535-541.
13. Brakenhoff JP, Hart M, Aarden LA. Analysis of human IL-6 mutants expressed in *Escherichia coli*. Biologic activities are not affected by deletion of amino acids 1-28. *J Immunol.* 1989, 143(4), 1175-1182.
14. Bręborowicz GH, Paszkowski T. Poród przedwczesny. Ośrodek Wydawnictw Naukowych. Poznań. 2006, 11-16.
15. Brylski J. PCR - najpopularniejsza metoda badania DNA. *IGM.* 2009, 3, 1-3.
16. Chauhan M, Bombell S, McGuire W. Tumour necrosis factor (-308A) polymorphism in very preterm infants with bronchopulmonary dysplasia: a meta-analysis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2009, 94, 257-259.

17. Chaves JH, Babayan A, Bezerra Cde M, Linhares IM, Witkin SS. Maternal and neonatal interleukin-1 receptor antagonist genotype and pregnancy outcome in a population with a high rate of pre-term birth. *Am J reprod Immunol.* 2008, 60(4), 312-317.
18. Chen D, Hu Y, Wu B, Chen L, Fang Z, Yang F, Wang L. Tumor necrosis factor alpha gene G308A polymorphism is associated with the risk of preterm delivery. *Beijing Da Xue Xue Bao.* 2003, 35, 377-381.
19. Chen H, Li XJ, Kong JJ, Liang FB, He J. Analysis of periodontal status in pregnant women with a diagnosis of threatened premature labor. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2006, 15(5), 478-481.
20. Chen Y, Pawlikowska L, Yao JS, Shen F, Zhai W, Achrol AS, Lawton MT, Kwok PY, Yang GY, Young WL. Interleukin-6 involvement in brain arteriovenous malformations. *Ann. Neurol.* 2006, 59, 72-80.
21. Christiaens I, Zaragoza DB, Guilbert L, Robertson SA, Mitchell BF, Olson DM. Inflammatory processes in preterm and term parturition. Review article. *J Reprod Immunol.* 2008, 79, 50-57.
22. Ciara E, Popowska E, Piekutowska-Abramczuk D. SLOS carrier frequency in Poland as determined by screening for *Trp151X* and *Val326Leu DHCR7* mutations. *Eur. J. Med. Genet.* 2006, 49, 499-504.
23. Coleman M, Keelan A, McCowan M, Townend KM, Mitchell MD. Predicting preterm delivery: comparison of cervicovaginal interleukin IL-1beta, IL-6 and IL-8 with fetal fibronectin and cervical dilatation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001, 95, 154-158.
24. Crider KS, Whitehead N, Buus RM. Genetic variation associated with preterm birth: a HuGE review. *Genet Med.* 2005, 7, 593-604.
25. Czajka R. Etiopatogeneza porodu przedwczesnego. W: *Poród przedwczesny.* pod red. Bręborowicz GH, Paszkowski T. Ośrodek Wydawnictw Naukowych. Poznań. 2006, 11-18.
26. Czajka R. Nieprawidłowy czas trwania ciąży. W: *Ciąża wysokiego ryzyka.* pod red. Bręborowicz GH. Ośrodek Wydawnictw Naukowych. Poznań. 2006, 139-151.
27. Czajka R. Poród przedwczesny. W: *Ciąża wysokiego ryzyka.* pod red.: Bręborowicz GH. Ośrodek Wydawnictw Naukowych. Poznań. 2010, 121-136.
28. D' Alfonso S. A polymorphic variation in a putative regulation box of the. TNFA promoter region *Immunogeneacs.* 1994, 39, 150-154.
29. Diaz-Cueto L, Dominguez-Lopez P, Cantillo-Cabarcas J, Perez-Figueroa G, Arechavaleta-Velasco M, Arechavaleta-Velasco F. Progesterone receptor gene polymorphisms are not associated with preterm birth in a Hispanic population. *Int J Gynaecol Obstet.* 2008, 103(2), 153-157.
30. Dinarello CA. Interleukin-1 antagonists. *J Interferon Res.* 1994, 14(5), 307.
31. Drews K, Seremak-Mrozikiewicz A. Genetyczne uwarunkowania porodu przedwczesnego. W: *Poród przedwczesny.* pod red. Bręborowicz GH, Paszkowski T. Ośrodek Wydawnictw Naukowych. Poznań. 2006, 19-20.
32. Drews K, Seremak-Mrozikiewicz A. Polimorfizm genów kodujących do wystąpienia porodu przedwczesnego. W: *Poród przedwczesny.* pod red. Bręborowicz GH, Paszkowski T. Ośrodek Wydawnictw Naukowych. Poznań. 2006, 21-23.
33. Edwards RK, Ferguson RJ, Duff P. The interleukin-1 beta +3953 single nucleotide polymorphism: cervical protein concentration and preterm delivery risk. *Am J Report Immunol.* 2006, 55(4), 259-264.
34. Erickson K, Thorsen P, Chrousos G, Grigoriadis DE, Khongsaly O, McGregor J, Schulkin J. Preterm Birth: Associated Neuroendocrine, Medical, and Behavioral Risk Factors. *J Clin Endocrinology and Metabolism.* 1986, (6), 2544-2552.

35. Esplin MS, Varner MW. Genetic factors in preterm birth – the future. *BJOG*. 2005, 112(1), 97-102.
36. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*. 1998, 1, 102(7), 1369-1376.
37. Florio P, Linton EA, Torricelli M, Faldini E, Reis FM, Imperatore A, Calonaci G, Picciolini E, Petraglia F. Prediction of preterm delivery based on maternal plasma urocortin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004, 92(12), 4734-477.
38. Fredrick J, Anderson ABM. Factors associated with spontaneous preterm birth. *Obstet Gynecol*. 1976, 83, 342-350.
39. Fujimoto T, Parry S, Urbanek M, Sammel M, Macones G, Kuivaniemi H, Romero R, Strauss JF. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) promoter influences amnion cell MMP-1 expression and risk for preterm premature rupture of the fetal membranes. *J Biol Chem*. 2002, 277, 6296-6302.
40. Gelert KD. *Immunology: understanding the immune system*. John Wiley and Sons, 2009, 285-321.
41. Genc MR, Onderdonk A. Endogenous bacterial flora in pregnant women and the influence of maternal genetic variation. *BJOG*. 2011, 118(2), 154-163.
42. Genc MR, Onderdonk AB, Vardhana S, Delaney ML, Norwitz ER, Tuomala RE, Paraskevas LR, Witkin SS. MAP Study Group. Polymorphism in intron 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene, local midtrimester cytokine response to vaginal flora, and subsequent preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2004, 191(4), 1324-1330.
43. Genc MR, Vardhana S, Delaney M. Relationship between a toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine responses in pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004, 116(2), 152-156.
44. Genc MR, Vardhana S, Delaney ML, Onderdonk A, Tuomala R, Norwitz E, Witkin SS. MAP Study Group. Relationship between a toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine responses in pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004, 116(2), 152-156.
45. Giffei JM, Saling E. First results and experiences with our prematurity and dysmaturity prevention program (PDP-Program). *J. Perinat Medicin*. 1974.
46. Goepfert AR, Varner M, Ward K, Macpherson C, Klebanoff M, Goldenberg RL, Mercer B, Meis P, Iams J, Moawad A, Carey JC, Leveno K, Wapner R, Caritis SN, Miodovnik M, Sorokin Y, O'Sullivan MJ, Van Dorsten JP, Langer O. NICHD Maternal-Fetal Medicine Units Network. Differences in inflammatory cytokine and Toll-like receptor genes and bacterial vaginosis in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2005, 193(4), 1478-1485.
47. Goldenberg RL, Cliver SP, Mulvihill FX. Medical, psychosocial, and behavioral risk factors do not explain the increased risk for low birth weight among black women. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 1996, 175, 1317.
48. Goldfeld AE, Maniatis T. Coordinate viral induction of tumor necrosis factor alpha and interferon beta in human B cells and monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 86(5), 1490-1494.
49. Goldfeld AE, McCaffrey PG, Strominger JL, Rao A. Identification of a novel cyclosporin-sensitive element in the human tumor necrosis factor alpha gene promoter. *J Exp Med*. 1993, 178(4), 1365-1379.
50. Goldfield AE, Doyle C, Maniatis T. Human tumor necrosis factor alpha gene regulation by virus and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990, 87(24), 9769-9773.

51. Gomez LM, Sammel MD, Appleby DH, Elovitz MA, Baldwin DA, Jeffcoat MK, Macones GA, Parry S. Evidence of a gene-environment interaction that predisposes to spontaneous preterm birth: a role for asymptomatic bacterial vaginosis and DNA variants in genes that control the inflammatory response. *Am J Obstet Gynecol.* 2010, 202(4), 386-392.
52. Green NS, Damus K, Simpson JL, Iams J, Reece EA, Hobel CJ, Merkatz IR, Greene MF, Schwarz RH. March Of Dimes Scientific Advisory Committee On Prematurity. Research agenda for preterm birth: recommendations from the March of Dimes. *Am J Obstet Gynecol.* 2005, 193(3), 626-635.
53. Guoyang L, Morgan T, Bahtiyar MO, Snegovskikh VV, Schatz F, Kuczynski E, Funai EF, Dulay AT, Huang ST, Buhimschi CS, Buhimschi IA, Fortunato SJ, Menon R, Lockwood CJ, Norwitz ER. Single nucleotide polymorphisms in the human progesterone receptor gene and spontaneous preterm birth. *Reprod Sci.* 2008, 15(2), 147-155.
54. Hao K, Wang X, Niu T, Xu X, Li A, Chang W, Wang L, Li G, Laird N, Xu X. A candidate gene association study on preterm delivery: application of high-throughput genotyping technology and advanced statistical methods. *Hum Mol Genet.* 2004, 13(7), 683-691.
55. Harding DR, Dhamrait S, Whitelaw A, Humphries SE, Marlow N, Montgomery HE. Does interleukin-6 genotype influence cerebral injury or developmental progress after preterm birth? *Pediatrics.* 2004, 114(4), 941-947.
56. Harding DR, Humphries SE, Whitelaw A, Marlow N, Montgomery HE. Cognitive outcome and cyclo-oxygenase-2 gene (-765 G/C) variation in the preterm infant. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2007, 92(2), 108-112.
57. Harper M, Zheng SL, Thom E, Klebanoff MA, Throp J Jr, Sorokin Y, Varner MW, Iams JD, Dinsmoor M, Mercer BM, Rouse DJ, Ramin SM, Anderson GD. Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) Maternal-Fetal Medicine Units Network (MFMU). Cytokine gene polymorphisms and length of gestation. *Obstet Gynecol.* 2011, 117, 125-130.
58. Härtel C, Finas D, Ahrens P, Kattner E, Schaible T, Muller D, Segerer H, Albrecht K, Moller J, Diedrich K, Gopel W. Genetic Factors in Neonatology Study Group. Polymorphisms of genes involved in innate immunity: association with preterm delivery. *Mol Hum Reprod.* 2004, 10(12), 911-915.
59. Härtel Ch, Finas D, Ahrens P, Kattner E, Schaible T, Müller D, Segerer H, Albrecht K, Möller J, Diedrich K, Göpel W. Polymorphisms of genes involved in innate immunity: association with preterm delivery. *Mol Hum Reprod.* 2004, 10(12), 911-915.
60. Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J.* 1998, (2), 297-314.
61. Heinrich PC, Horn F, Greve L, Dittrich E, Kerr I, Müller-Newen G, Grötzinger J, Wollmer A. Interleukin-6 and related cytokines: effect on the acute phase reaction., *Z Ernährungswiss.* 1998, 37(1), 43-49.
62. Hoentjen F, van Bodegraven AA. Safety of anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease., *World J. Gastroenterol.* 2009, 15(17), 2067-2073.
63. Hoffman HJ, Bakketeig LS. Risk factors associated with the occurrence of preterm birth. *Clin. Obstet. Gynecol.* 1984, 27, 539-552.
64. Hoffman JD, Ward K. Genetic factors in preterm delivery. *Obstet Gynecol Surv.* 1999, 54(3), 203-210.
65. Hollegard MV, Grove J, Thorsen P, wang X, Mandrup S, Christiansen M, Norgard-Pedersen B, Wojdemann KR, Tabor A, Attermann J, Hougaard DM. Polymorphisms in the tumor necrosis factor alpha and interleukin 1-beta promoters with possible gene

- regulatory functions increase the risk of preterm birth. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008, 87(12), 1285-1290.
66. Holmgren C, Esplin MS, Hamblin S, Molenda M, Simonstein S, Silver R. Evaluation of the use of anti-TNF- α in an LPS-induced murine model., *J. Report Immunol.* 2008, 78, 134-139.
 67. Hong J, Leung E, Fraser A. TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian Cohort. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007, 22(11), 1760-1766.
 68. Jakóbsiak M, Gołab J, Zagrożdżon R. Cytokiny. W: *Immunologia*, pod red. Jakóbsiak M, Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa. 2000, 215-279.
 69. Jakóbsiak M, Odporność nieswoista. W: *Immunologia*, pod red. Jakóbsiak M., Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa. 2000, 169-223.
 70. Jamie WE, Edwards RK, Ferguson RJ, Duff P. The interleukin-6 -174 single nucleotide polymorphism: cervical protein production and the risk of preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2005, 192(4), 1023-1027.
 71. Jansen HM, van der Sluijs KF, van Elden L, Nijhuis M, Schuurman R, Florquin S, Lutter R, van der Poll T. Toll-like receptor 4 is not involved in host defense against respiratory tract infection with Sendai virus. *Immunol Lett.* 2003, 31, 89(2-3), 201-206.
 72. Juszczynski P, Warzocha K. Czynniki martwicy nowotworów: przekazywanie sygnału wewnątrzkomórkowego, molekularne mechanizmy ekspresji i udział w patogenezie chorób zapalnych i chłoniaków. *Acta Haematologica Polonica.* 2002, 33, 2.
 73. Kalinka J, Bitner A. Selected cytokine gene polymorphisms and the risk of preterm delivery in the population of Polish women. *Ginekol. Pol.* 2009, 80, 111-117.
 74. Kalish RB, Vardhana S, Gupta M, Chasen ST, Perni SC, Witkin SS. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism and multifetal pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 2003, 189(4), 911-914.
 75. Karwan-Płońska A. Kliniczna analiza porodów przedwczesnych. *Borgis - Nowa Medycyna.* 1999, (6), 21-23.
 76. Katz JA, Antoni C, Keenan GF, Smith DE, Jacobs SJ, Lichtenstein GR. Outcome of pregnancy in women receiving infliximab for the treatment of Crohn's disease and rheumatoid arthritis. *Am. J. Gastroenterol.* 2004, 99, 2385-2392.
 77. Katz JA, Antoni C, Keenan GF, Smith DE, Jacobs SJ, Lichtenstein GR. Outcome of pregnancy in women receiving infliximab for the treatment of Crohn's disease and rheumatoid arthritis. *Am J Gastroenterol.* 2004, 99(12), 2385-2392.
 78. Kim YM, Romero R, Chaiworapongsa T. Tolllike receptor-2 and -4 in the chorioamniotic membranes in spontaneous labor at term and preterm parturition that are associated with chorioamnionitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004, 191, 1346-1355.
 79. Kim YM, Romero R, Oh S. Toll-like receptor 4: A potential link between „danger signals”, the innate immune system, and preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol.* 2005.
 80. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood.* 1989, 74(1), 1-10.
 81. Kliegman RM, Rottman CJ, Behrman RE. Strategies for the prevention of low birth weight. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1990, 162, 1073-1083.
 82. Knight J, MBChB, Phil D. Polymorphisms in Tumor Necrosis Factor and Other Cytokines As Risks for Infectious Diseases and the Septic Syndrome, *Current Infectious Disease Reports.* 2001, 3, 427-439.
 83. Knight JC, Kwiatkowski D. Inherited variability of tumor necrosis factor production and susceptibility to infectious disease. *Proc Assoc Am Physicians.* 1999, 111, 290-298.
 84. Knight JC, Udalova I, Hill A. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat. Genet.* 1999, 22, 145-150.
 85. Kontyn E, Maśliński W. Interleukina 6- znaczenie biologiczne i rola w patogenezie zapalenia. *Reumatologia.* 2009.

86. Korbowicz A. Biology of tumor necrosis factor type alpha (TNF-alpha). *Pol Merkur Lekarski*. 2006, 21(124), 358-361.
87. Krämer B, Meichle A, Hensel G, Charnay P, Kronke M. Characterization of a Krox-24/Egr-1-responsive element in the human tumor necrosis factor promoter. *Biochim. Biophys. Acta*. 1994, 1219, 413-421.
88. Krediet TG, Wiertsema SP, Vossers MJ, Hoeks SB, Fler A, Ruven HJ, Rijkers GT. Toll-like receptor 2 polymorphism is associated with preterm birth. *Pediatr Res*. 2007, 62(4), 474-476.
89. Kroeger KM, Abraham LJ. Identification of an AP-2 element in the -323 to -285 region of the TNF-alpha gene. *Biochem Mol Biol Int*. 1996, 40(1), 43-51.
90. Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. *Mol Immunol*. 1997, 34(5), 391-399.
91. Lange M, Chen F, Wessel J. Elevation of interleukin-6 levels in cervical secretions as a predictor of preterm delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2003, 82, 326-329.
92. Larski Z. Postęp w badaniach nad odpornością wrodzoną. *Medycyna Wet*. 2002.
93. Leitich H. Controversies in diagnosis of preterm labour. *BJOG*. 2005, 112(1), 61-63.
94. Liang M, Wang X, Li J, Yang F, Fang Z, Wang L, Hu Y, Chen D. Association of combined maternal-fetal TNF-alpha gene G308A genotypes with preterm delivery: a gene-gene interaction study. *J Biomed Biotechnol*. 2010, 396184, 1-7.
95. Liang M., Wang X., Li J. Association of combined maternal-fetal TNF-alpha gene G308A genotypes with preterm delivery: a gene-gene interaction study. *J. Biomed. Biotechnol*. 2010, 39, 61-84.
96. Lorenz E, Hallman M, Marttila R, Haataja R, Schwartz DA. Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population. *Pediatr Res*. 2002, 52(3), 373-376.
97. Łukaszewicz M, Mroczo B, Szmitkowski M. Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease]. *Pol Arch Med Wewn*. 2007, 117(5-6), 247-251.
98. Łukaszewski T, Barlik M, Seremak-Mrozikiewicz A, Kurzawińska G, Mrozikiewicz PM, Sieroszewski P, Drews K. Polimorfizm genów receptorów Tollpodobnych typu 2 oraz 4 (TLR-2 i TLR-4) a ryzyko wystąpienia przedwczesnego pęknięcia błon płodowych. *Ginekol Pol*. 2009, 80(12), 914-919.
99. Macones GA, Parry S, Elkousy M, Clothier B, Ural S, Strauua JF III. A polymorphism in the promoter region of TNF and bacterial vaginosis: Preliminary evidence of gene-environment interaction in the etiology of spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2004, 190, 1504-1508.
100. Mano Y, Shibata K, Sumigama S, Hayakawa H, Ino K, Yamamoto E, Kajiyama H, Nawa A, Kikkawa F. Tocilizumab inhibits interleukin-6-mediated matrix metalloproteinase-2-and-9 secretions from human amnion cells in preterm premature rupture of membranes *Gynecol. Obstet. Invest*. 2009, 68, 145-153.
101. Manuck TA, Major HD, Varner MW, Chettier R, Nelson L, Esplin MS. Progesterone receptor genotype, family history, and spontaneous preterm birth. *Obstet Gynecol*. 2010, 115(4), 765-770.
102. Marianowski L, Cyganek A. Poród przedwczesny. W: *Położnictwo i Ginekologia*. pod red. Pisarski T. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa. 2002, 357-365.
103. Martin JA, Hamilton BE, Ventura SJ, Menacker F, Park MM, Sutton PD. Britts: final data for 2001. *National Vital Statistics Reports*. 2002, 49(7), 1-14.
104. Martius G. Patologia porodu i okresu łożyskowego. W: *Ginekologia i położnictwo*, pod red. Martius G, Breckwoldt M, Pfleiderer A. Wydanie I pod red. Rzempełucha J. Urban & Partner. Wrocław. 1996, 263-266.

105. Mattar R, de Souza E, Daher S. Preterm delivery and cytokine gene polymorphisms. *J. Reprod. Med.* 2006, 51, 317-320.
106. Menon R, Velez DR, Simhan H, Ryckman K, Jiang L, Thorsen P, Vogel I, Jacobsson B, Merialdi M, Williams SM, Fortunato SJ. Multilocus interactions at maternal tumor necrosis factor-alpha, tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-6 receptor genes predict spontaneous preterm labor in European-American women. *Am J Obstet Gynecol.* 2006, 194(6), 1616-1624.
107. Moore S, Ide M, Randhawa M, Walker JJ, Reid JG, Simpson NA. An investigation into the association among preterm birth, cytokine gene polymorphisms and periodontal disease. *BJOG.* 2004, 111(2), 125-132.
108. Moraes MO, Duppre NC, Suffys PN, Santos AR, Almeida AS, Nery JAC, Sampaio EP, Sarno EN. Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism TNF2 is associated with a stronger delayed-type hypersensitivity reaction in the skin of borderline tuberculoid leprosy patients. *Immunogenetics.* 2001, 53, 45-47.
109. Moura E, Mattar R, de Souza E, Torloni MR, Gonçalves-Primo A, Daher S. Inflammatory cytokine gene polymorphisms and spontaneous preterm birth. *J Reprod Immunol.* 2009, 80(1-2), 115-121.
110. Mozurkewich EL, Luke B, Avni M, Wolf FM. Wpływ warunków pracy na niekorzystne zakończenie ciąży – metaanaliza. *Obstetrics & Gynecology.* 2000, 95, 623-663.
111. Murtha A, Nieves A, Hauser E. Association of maternal IL-1 receptor antagonist intron 2 gene polymorphism and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2006, 195, 1249-1253.
112. Na K, Kim T, Rahman P. Analysis of single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor 4 shows no association with ankylosing spondylitis in a Korean population. *Rheumatol Int.* 2008, 28, 627-630.
113. Nedwin GE, Svedersky LP, Bringman TS, Palladino MA Jr, Goeddel DV. Effect of interleukin 2, interferon-gamma, and mitogens on the production of tumor necrosis factors alpha and beta. *J Immunol.* 1985, 135(4), 2492-2497.
114. Nguyen DP, Genc M, Vardhana S, Babula O, Onderdonk A, Witkin SS. Ethnic differences of polymorphisms in cytokine and innate immune system genes in pregnant women. *Obstet Gynecol.* 2004, 104(2), 293-300.
115. Patterson D, Jones C, Hart I, Bleskan J, Berger R, Geyer D, Eisenberg SP, Smith MF Jr, Arend WP. The human interleukin-1 receptor antagonist (IL1RN) gene is located in the chromosome 2q14 region. *Genomics.* 1993, 15(1), 173-176.
116. Perni SC, Vardhana S, Tuttle SL, Kalish RB, Casen ST, Witkin SS. Fetal interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism, intramniotic interleukin-1beta levels, and history of spontaneous abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004, 191(4), 259-264.
117. Piekarska E, Krasomski G, Dominowska J, Tobor E. Ocena wpływu wybranych czynników socjalno-demograficznych na przedwczesne zakończenie ciąży i urodzeniową masę ciała noworodków. *Perinat Neonat Ginekol.* 2010, T3(4), 277-281.
118. Pisarski T. (red.). *Położnictwo i ginekologia.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa. 2002, 5, 369-370.
119. Popiernik-Berkhauer E. Coefficient de risque d'accouchement premature. *Presse Medicine* 77. 1969, 793-794.
120. Popowski T, Goffinet F, Batteux F, Maillard F, Kayem G. Prediction of maternofetal infection in preterm premature rupture of membranes: serum maternal markers. *Gynecol Obstet Fertil.* 2011, 39(5), 302-308.
121. Porter TF, Fraser AM, Hunter CY, Ward RH, Varner MW. The risk of preterm birth across generations. *Obstet Gynecol.* 1997, 90, 63-67.
122. Ptak W, Majewska M, Bryniarski K, Ptak M, Lobo FM, Zajac K, Askenase PW, Szczepanik M. Epicutaneous immunization with protein antigen in the presence of TLR4

- ligand induces TCR alpha beta+CD4+ T contrasuppressor cells that reverse skin-induced suppression of Th1-mediated contact sensitivity. *J Immunol.* 2009, 15, 182(2), 837-850.
123. Qin X, Chuda PK, Ohira RH, Bryant-Greenwood GD. An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. II. Stromelysin-1 (MMP-3) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1). *Biol. Reprod.* 1997, 56(4), 812-820.
 124. Qin X, Garibay-Tupas J, Chua PK, Cachola L, Bryant-Greenwood GD. An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. I. Interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) and tissue plasminogen activator. *Biol. Reprod.* 1997, 56(4), 800-811.
 125. Resch B, Gallistl S, Kutschera J, Mannhalter C, Muntean W, Mueller WD. Thrombophilic polymorphisms – factor V Leiden, prothrombin G20210A, and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutations – and preterm birth. *Wien Klin Wochenschr.* 2004, 116(17-18), 622-626.
 126. Rey G, Skowronek F, Alciaturi J, Alonso J, Bertoni B, Sapiro R. Toll receptor 4 Asp299Gly polymorphism and its association with preterm birth and premature rupture of membranes in a South American population. *Mol Hum Reprod.* 2008, 14(9), 555-559.
 127. Roberts AK, Monzon-Bordonaba F, Van Deerlin PG, Holder J, Macones GA, Morgan MA, Strauss JF 3rd, Parry S. Association of polymorphism within the promoter of the tumor necrosis factor alpha gene with increased risk of preterm premature rupture of the fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1999, 180(5), 1297-1302.
 128. Romero R, Friel LA, Velez Edwards DR, Kusanovic JP, Hassan SS, Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E, Kim CJ, Erez O, Chaiworapongsa T, Pearce BD, Bartlett J, Salisbury BA, Anant MK, Vovis GF, Lee MS, Gomez R, Behnke E, Oyarzun E, Tromp G, Williams SM, Menon R. A genetic association study of maternal and fetal candidate genes that predispose to preterm prelabor rupture of membranes (PROM). *Am J Obstet Gynecol.* 2010, 203(4), 361-370.
 129. Romero R, Velez Edwards DR, Kusanovic JP, Hassan SS, Mazaki-Tovi S, Vaisbuch E, Kim CJ, Chaiworapongsa T, Pearce BD, Friel LA, Bartlett J, Anant MK, Salisbury BA, Vovis GF, Lee MS, Gomez R, Behnke E, Oyarzun E, Tromp G, Williams SM, Menon R. Identification of fetal and maternal single nucleotide polymorphisms in candidate genes that predispose to spontaneous preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2010, 202(5), 431-435.
 130. Romero R, Velez Edwards DR, Kusanovic JP. Identification of fetal and maternal single nucleotide polymorphisms in candidate genes that predispose to spontaneous preterm labor with intact membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2010, 202, 407-408.
 131. Rozwadowska N, Fiszer D, Kurpisz M. Function of the interleukin-1 gene system in immunomodulation, apoptosis and proliferation in the male gonad. *Postepy Hig Med Dosw.* 2005, (7)59, 56-67.
 132. Rudnik-Schöneborn S, Nicholson GA, Morgan G. Different patterns of obstetric complications in myotonic dystrophy in relation to the disease status of the fetus. *Am. J. Med. Genet.* 1998, 80, 314.
 133. Saling E. Prä maturitäts- und Dysmuturitas-Präventions – programm (PDP-Program). W: Geburtshilfe Perinatol. 1972.
 134. Santhanam U, Avila C, Romero R, Viguet H, Ida N, Sakurai S, Sehgal PB. Cytokines in normal and abnormal parturition: elevated amniotic fluid interleukin-6 levels in women with premature rupture of membranes associated with intrauterine infection. *Cytokine.* 1991, 3(2), 155-163.
 135. Sata F, Toya S, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Yamazaki A, Minakami H, Kishi R. Proinflammatory cytokine polymorphisms and the risk of preterm birth and low birthweight in a Japanese population. *Mol Hum Reprod.* 2009, 15, 121-130.

136. Sawicki K, Sawicka E. Porody z ciąż wielopłodowych w Polsce w latach 1981-2001 według danych Głównego Urzędu Statystycznego. W: Ciąża wielopłodowa. pod red. Bręborowicz GH, Malinowki W, Ronin-Walkowska E. Ośrodek Wydawnictw Naukowych. Poznań. 2003, 21-25.
137. Schnitzeler F, Fidder H, Ferrante M, Ballet V, Noman M, Van Assche G, Spitz B, Hoffman I, Van Stehen K, Vermeire S, Rutgeerts P. Outcome of pregnancy in women with inflammatory bowel disease treated with antitumor necrosis factor therapy. *Inflamm. Bowel Dis.* 2011, 17, 1846-1854.
138. Seghal PB, Zilberstein A, Ruggieri RM, May LT, Ferguson-Smith A, Slate DL, Revel M, Ruddle FH. Human chromosome 7 carries the beta 2 interferon gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986, 83(14), 5219-5222.
139. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Kopyra P, Wojewoda A, Mrozikiewicz PM. Interleukin-6 promoter -174G/C polymorphism and intra-amniotic infection. *Arch Perinat Med.* 2004, 10, 21-23.
140. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Łowicki Z, Mrozikiewicz PM. Intra-amniotic infection: influence of TNF- α gene polymorphisms. *Arch Perinat Med.* 2001, 7(1), 23-24.
141. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K. The significance of genetic factors in aetiology of preterm delivery. *Ginekol Pol.* 2007, 78(4), 317-323.
142. Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K. Znaczenie polimorfizmu restrykcyjnego *AluI* genu kodującego tumor necrosis factor (TNF- α) w zakażeniu wewnątrzrodniowym. *Klin Perinat Ginek.* 2003, 39, 50-53.
143. Sikora S. Epidemiologia porodu przedwczesnego. W: Poród przedwczesny. pod red.: Bręborowicz GH, Paszkowski T. Ośrodek Wydawnictwo Naukowych. Poznań. 2006, 39-46.
144. Simhan HN, Krohn MA, Roberts JM, Zeevi A, Caritis SN. Interleukin-6 promoter -174 polymorphism and spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2003, 189(4), 915-918.
145. Simmonds MJ, Heward JM, Howson JM, Foxall H, Nithiyananthan R, Franklyn JA, Gough SC. A systematic approach to the assessment of known TNF-alpha polymorphisms in Graves' disease. *Genes Immun.* 2004, 5(4), 267-273.
146. Słomski R. Analiza DNA – teoria i praktyka, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. 2008, 7, 131-143.
147. Speer EM, Gentile DA, Zeevi A. Role of Single Nucleotide Polymorphisms of Cytokine Genes in Spontaneous Preterm Delivery. *Human Immunology* 67. 2006, 915-923.
148. Stonek F, Bentz EK, Hafner E. A tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism and pregnancy complications: results of a prospective cohort study in 1652 pregnant women. *Reprod. Sci.* 2007, 14, 425-429.
149. Stonek F, Metzenbauer M, Hafner E, Philipp K, Tempfer C. Interleukin 6-174 G/C promoter polymorphism and pregnancy complications: results of a prospective cohort study in 1626 pregnant women. *Am J Reprod Immunol.* 2008, 59(4), 347-351.
150. Stryer L, Augustyniak J, Michejda J. *Biochemia.* Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa. 2003, 149-151.
151. Szczepański MJ, Góralski I, Mozer-Lisewska I, Samara H, Żeromski J. Rola receptorów toll-podobnych w odporności. *Postępy Biologii Komórki.* 2004, 31, 543-561.
152. Tarlow JK, Blekmore AI, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasser A. Polimorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Human Genetics.* 1993, 91, 403.
153. Tokarz-Deptuła B, Niedźwiedzka P, Deptuła W. Receptory Toll-podobne- nowe znaczniki w immunologii. *Katedra Mikrobiologii i Immunologii Wydziału Nauk*

- Przyrodniczych Uniwersytetu Szczecińskiego. *Allergia. Astma Immunologia*. 2005, 11(1), 23-28.
154. Torok H, Glas J, Tonenchi L. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol*. 2004, 112(1), 85-91.
 155. Torricelli M, Novembri R, Bloise E, De Bonis M, Challis JR, Petraglia F. Changes in placental CRH, urocortins, and CRH-receptor mRNA expression associated with preterm delivery and chorioamnionitis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011, 96(2), 534-540.
 156. Torricelli M, Novembri R, Bloise E, De Bonis M, Challis JR, Petraglia F. Changes in placental CRH, urocortins, and CRH-receptor mRNA expression associated with preterm delivery and chorioamnionitis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011, 96(2), 534-540.
 157. Tulic M, Hurrelbrink R, Prele C. TLR4 polymorphisms mediate impaired responses to respiratory syncytial virus and lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2007, 179, 132-140.
 158. Urban J. Nieprawidłowy czas trwania ciąży. W: *Położnictwo i Ginekologia*, pod red. Bręborowicz GH. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa. 2007, T1, 77-84.
 159. Valdez LL, Quintero A, Garcia E, Olivares N, Celis A, Rivas F Jr., Rivas F. Thrombophilic polymorphisms in preterm delivery. *Blood Cells Mol Dis*. 2004, 33(1), 51-56.
 160. Vamvakopoulos J. Interleukin 1 gene polymorphisms. *Ann Rheum Dis*. 2001, 60(7), 718-719.
 161. Varner MW, Esplin MS. Current understanding of genetics factors in preterm birth. *BJOG*. 2005, 112 (1), 28-31.
 162. Villuendas G, San Millán JL, Sancho J, Escobar-Morreale HF. The -597G>A and -174G>C polymorphisms in the promoter of the IL-6 gene are associated with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002, 87(3), 1134-1141.
 163. Vogel I, Glavind-Kirstensen M, Thorsen P, Armbruster FP, Uldbjerg N. S-relaxin as a predictor of preterm delivery in women with symptoms of preterm labour. *BJOG*. 2002, 109(9), 977-982.
 164. Wang X, Zuckerman B, Pearson C, Kaufman G, Chen C, Wang G, Niu T, Wise PH, Bauchner H, Xu X. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA*. 2002, 9, 287(2), 195-202.
 165. Ward K, Argyle V, Meade M, Nelson L. The heritability of preterm delivery. *Obstet Gynecol*. 2005, 106, 1235-1239.
 166. Ward K. Genetic factors in preterm birth. *BJOG*. 2003, 110, 117-121.
 167. Wasiela M, Krzemiński Z, Kalinka J, Brzezińska-Błaszczyk E. Correlation between levels of selected cytokines in cervico-vaginal fluid of women with abnormal vaginal bacterial flora. *Med Dosw Mikrobiol*. 2005, 57(3), 327-333.
 168. Wei SQ, Fraser W, Luo ZC. Inflammatory cytokines and spontaneous preterm birth in asymptomatic women: a systematic review. *Obstet Gynecol*. 2010, 116(2 Pt 1), 393-401
 169. Wilson A, Symons J, McDowell T, McDevitt H, Duff G. Effects of a polymorphism in the human tumour necrosis factor α promoter on transcriptional activation. *Proc Nat Acad Sci*. 1997, 94(7), 3195-3199.
 170. Windham CC, Hopkins B, Fenster L, Shwan SH. Prenatal active and passive tobacco exposure and risk of preterm delivery or low birth weight. *Epidemiology*. 2000, 4, (11), 427-433.
 171. Winter PC, Hickey GI, Fletcher HL. *Genetyka. Krótkie wykłady*. Pod red.: Augustyniak J, Prus-Głowacki W. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa. 2001, 373-378.
 172. Zhang Y, Blattman J M, Kennedy NJ. Regulation of innate and adaptive immune responses by MAP kinase phosphatase 5. *Nature Lond*. 2004, 430, 793-797.

173. Zilberstein A, Ruggieri R, Korn JH, Revel M. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. *EMBO J.* 1986, 5(10), 2529-2537.

8. STRESZCZENIE

Wstęp: Poród przedwczesny (PTD – *preterm delivery*) stanowi jedno z największych wyzwań dla współczesnej medycyny perinatalnej, przede wszystkim ze względu na wcześniactwo i towarzyszące powikłania u noworodka. Mechanizmy prowadzące do wystąpienia PTD nie są jeszcze do końca poznane. Prawdopodobnie PTD jest zjawiskiem złożonym, wywoływanym przez wiele różnych czynników. Obecnie coraz większą rolę przypisuje się genetycznym uwarunkowaniom wystąpienia PTD wskazując na możliwe znaczenie wariantów polimorficznych genów kandydujących do udziału w etiologii PTD.

Cel pracy: ocena znaczenia wybranych polimorfizmów genów układu cytokin oraz receptorów Toll-like w etiologii porodu przedwczesnego w populacji kobiet polskich. Analizie poddano polimorfizmy: +3953C>T genu *IL-1 β* , 86 pz VNTR genu *IL-1RN*, -174G>C i -596G>A genu *IL-6*, -163G>A, -238G>A, -308G>A, -376G>A genu *TNF- α* , Arg753Gln (20877G>A) genu *TLR2*, Thr399Ile (8993C>T) genu *TLR4*. W obydwu grupach ciężarnych oceniano parametrów demograficzne, kliniczne, laboratoryjne oraz parametry urodzeniowe noworodków. Analizowano częstość współwystępowania genotypów i frekwencji haplotypów wybranych polimorfizmów, jak również korelację parametrów klinicznych i laboratoryjnych z występowaniem badanych wariantów genetycznych.

Materiał i metody: Grupę badaną stanowiło 150 kobiet (średnia wieku 29,2 \pm 5,6 lat, średni tydzień zakończenia ciąży 33,7 \pm 2,8 tc.), u których ciąża zakończyła się porodem przedwczesnym (22+0 tc.- 36+6 tc.). Grupę kontrolną stanowiło 150 zdrowych kobiet ciężarnych (średnia wieku 29,0 \pm 3,7 lat, średni tydzień zakończenia ciąży 39,3 \pm 1,2 tc.), u których ciąża zakończyła się porodem o czasie (>37 tc.). Wszystkie badane polimorfizmy analizowano metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR - *polymerase chain reaction*) oraz polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP - *restriction fragment length polymorphism*). Analiza częstości haplotypów badanych wariantów genetycznych przeprowadzona została z zastosowaniem programów PHASE (v. 2.1) oraz Haploview (v. 4.2). Analizę statystyczną wykonano z użyciem programu SPSS.

Wyniki:

Analiza częstości występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów: Dla polimorfizmu -238G>A genu *TNF- α* zarówno częstość występowania genotypu

heterozygotycznego -238GA (12,7 vs. 4,7%, $p=0,011$), jak i zmutowanego allele -238A (7,7 vs. 2,3% w grupie kontrolnej, $p=0,002$) była wyższa w grupie PTD w porównaniu z grupą kontrolną. Dla polimorfizmu -596G>A genu *IL-6* w grupie kobiet, u których wystąpił PTD częściej występował genotyp heterozygotyczny -596GA (48,6 vs. 42,7%) oraz genotyp homozygotyczny -596AA (24,7 vs. 21,3%). Zmutowany allel -596A w grupie PTD występował z częstością 49,0% w porównaniu do grupy kontrolnej 42,7% ($p=0,07$).

W pracy obserwowano wyższą częstość występowania w grupie kontrolnej genotypu 2/2 genu *IL-1RN* (8,0 vs. 3,3%, $p=0,06$) oraz allele 2 w grupie kontrolnej (25,0 vs. 20,0%, $p=0,07$). Również w czasie analizy polimorfizmu *Thr399Ile* genu *TLR4* odnotowano większą częstość występowania genotypu heterozygotycznego 8993CT w grupie kontrolnej (14,0 vs. 9,3%, $p=ns$), jak również nieznacznie większą frekwencję zmutowanego allele *T* w grupie kontrolnej (7,0 vs. 5,3%, $p=ns$).

Po podziale całej grupy badanej PTD na trzy podgrupy: a/ poród pomiędzy 22-28 tc. b/28-32 tc. oraz c/32-36+6 tc., największe różnice w częstości występowania badanych wariantów genetycznych zaobserwowano pomiędzy grupą kontrolną a podgrupą 28-32 tc. W tym zakresie wykazano: dla genu *IL-6* większą częstość występowania zmutowanego allele -596A (57,9 vs. 42,7%, $p=0,05$), oraz zmutowanego genotypu -174CC (47,4 vs. 24,0%, $p=0,03$), jak również zmutowanego allele -174A (65,8 vs. 50,0%, $p=0,04$). W czasie analizy genu *TNF- α* wykazano wyższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego -238GA genu *TNF- α* w grupie kobiet 28-32 tc. (31,6 vs. 4,7%, $p=0,00095$) oraz allele -238A *TNF- α* (21,1% vs. 2,3%) ($p=0,00004$). Dla polimorfizmu -376G>A *TNF- α* zaobserwowano wyższą częstość występowania genotypu heterozygotycznego -376GA *TNF- α* (10,5 vs. 1,3%, $p=0,063$) oraz zmutowanego allele -376A *TNF- α* (5,3 vs. 0,7%, $p=0,064$).

Współwystępowanie genotypów: W czasie analizy współwystępowania wariantów polimorficznych dla genu *TNF- α* zaobserwowano statystycznie istotnie wyższą częstość współwystępowania genotypów zawierających zmutowany allel -238A polimorfizmu -238G>A w grupie PTD (GG/GA/GG/GG: 8,0 vs. 2,7%, $p=0,035$). Uwagę zwraca również fakt zdecydowanej przewagi współwystępowania genotypów 20877GG *TLR2* / 8993CT *TLR4* w grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych (14,0 vs. 8,0%, $p=0,0695$).

Analiza haplotypów: W analizie zaobserwowano istotną statystycznie różnicę w częstości występowania haplotypu GGAG zawierającego zmutowany allel A polimorfizmu -238G>A *TNF- α* (0,063067 vs. 0,016634 w grupie kontrolnej, $p=0,030$) pomiędzy grupą kobiet badanych z PTD i grupą kontrolną. Odnotowano również tendencję do częstszego występowania

haplotypów zawierających zmutowany allel -596A genu *IL-6*: haplotypu AG (0,014365 vs. 0,000033, $p=ns$).

Analiza danych socjo-ekonomicznych: W toku badań zbierano dane socjo-ekonomiczne dotyczące wykształcenia, miejsca zamieszkania oraz rodzaju wykonywanej pracy. W grupie PTD więcej kobiet wykonywało pracę fizyczną (32,7 vs. 14,5% w grupie kontrolnej), miało wykształcenie podstawowe (25,9 vs. 7,3% w grupie kontrolnej) i paliło papierosy (30,7 vs. 20,0%). W grupie PTD mniej kobiet przyjmowało kwas foliowy, zarówno przed (46,0 vs. 57,3% w grupie kontrolnej), jak i w czasie ciąży (68,0 vs. 76,0%). Wszystkie obserwowane różnice były statystycznie istotne.

Wnioski

1. W pracy wskazano na związek zmutowanych alleli polimorfizmu -596G>A, -174G>C genu *IL-6* oraz -238G>A, -376G>A genu *TNF- α* ze zwiększonym ryzykiem występowania porodu przedwczesnego.
2. Analiza częstości występowania genotypów i alleli badanych w pracy polimorfizmów w grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży sugeruje największe znaczenie wariantów polimorficznych genu *IL-6* oraz *TNF- α* w etiologii tego powikłania u kobiet rodzących pomiędzy 28 a 32 tc.
3. Tendencja do częstszego występowania haplotypu AGAG genu *TNF- α* zawierającego dwa zmutowane allele polimorfizmu -376G>A oraz -238G>A wskazuje na sumowanie się wpływu tych alleli w zwiększaniu ryzyka porodu przedwczesnego.
4. Polimorfizmy -163G>A, -308G>A genu *TNF- α* , polimorfizm +3953C>T genu *IL-1 β* , oraz Arg753Gln genu *TLR2* prawdopodobnie nie zwiększają ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego.
5. Analiza wyników pracy wskazuje na możliwy modulujący wpływ allela *IL-1RN*2* (polimorfizm 86 pz VNTR) genu *IL-1RN* oraz zmutowanego allela 399Ile (polimorfizm Thr399Ile) genu *TLR4* na zmniejszenie ryzyka porodu przedwczesnego.
6. Wyniki badań potwierdzają udział czynników środowiskowych (wykształcenia, rodzaju wykonywanej pracy oraz palenia papierosów i stosowania kwasu foliowego przed i w czasie ciąży) w etiologii porodu przedwczesnego.

9. SUMMARY

Introduction: Preterm delivery (PTD) is one of the important challenge for perinatal medicine due to prematurity and associated complications. The mechanisms leading to the PTD occurrence are not fully clarified and it is assumed that PTD is a complex phenomenon caused by many different pathophysiological factors. Nowadays, important role is attributed to genetic determinants of PTD, pointing to possible relevance of polymorphic variants of candidate genes to participate in the etiology of PTD.

Aim of study: to assess the relevance of polymorphisms of genes coding for selected cytokines and Toll-like receptors in the etiology of PTD in Polish women. We analyzed following polymorphisms: +3953C>T of *IL-1 β* gene, 86 bp VNTR polymorphism of *IL-1RN* gene, -174G>C and -596G>A of *IL-6* gene, -163G>A, -238G>A, -308G>A, -376G>A of *TNF- α* gene, Arg753Gln (20877G>A) of *TLR2* gene, Thr399Ile (8993C>T) of *TLR4* gene. In both groups of pregnant women demographic, clinical and laboratory parameters, including also newborn parameters have been evaluated. In the study co-occurrence frequency of genotypes and haplotypes of investigated polymorphisms, such as the correlation of clinical and laboratory parameters with the occurrence of studied genetic variants has been assessed.

Material and methods: Study group consisted of 150 women (mean age 29,2 \pm 5,6 years, mean weeks of gestational age 33,7 \pm 2,8 gw.) with preterm delivery (22+0 - 36+6 gw.). To the control group 150 healthy pregnant women (mean age 29,0 \pm 3,7 years, mean weeks of gestational age 39,3 \pm 1,2 gw.) who delivered >37 gw. were enrolled. All investigated polymorphisms were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). Haplotype analysis of investigated genetic variants was performed by PHASE (v. 2.1) and Haploview (v. 4.2) software. Statistical analysis was performed using SPSS software.

Results:

Frequency of genotypes and alleles of investigated polymorphisms: For -238G>A *TNF- α* polymorphism the frequency of heterozygous -238GA genotype (12,7 vs. 4,7%, $p=0,011$), and the frequency of mutated -238A allele (7,7 vs. 2,3%, $p=0,002$) was higher in the PTD group compared with the controls. For -596G>A polymorphism of *IL-6* gene in PTD group heterozygous -596GA genotype (48,6 vs. 42,7%) and homozygous -596AA genotype

(24,7 vs. 21,3%) occurred more frequently. The -596A mutated allele in the PTD group appeared at higher frequency of 49,0% (42,7% in controls, $p=0,07$).

The interesting observation was the notice of overrepresentation of 2/2 genotype of *IL-1RN* gene in the control group (8,0 vs. 3,3%, $p=0,06$) and 2 allele in the control group (25,0 vs. 20,0%, $p=0,07$). Moreover, the analysis of *Thr399Ile* polymorphism of *TLR4* gene shows higher incidence of *CT* heterozygous in the control group (14,0 vs. 9,3%, $p=ns$), as well as slightly higher frequency of mutated *T* allele in the controls (7,0 vs. 5,3%, $p=ns$) compared to PTD group.

Furthermore, PTD entire study group was divided into three subgroups: a/ delivery between 22-28 gw. b/28-32 gw. and c/32-36+6 gw. The largest differences in the incidence of genetic variants were observed between the controls and the subgroup of 28-32 gw. In this respect has been shown: for *IL-6* gene higher frequency of mutated -596A allele (57,89 vs. 42,67%, $p=0,05$), and mutated -174CC genotype (47,4 vs. 24,0%, $p=0,03$), as well as mutated -174A allele (65,8 vs. 50,0%, $p=0,04$). During the analysis of *TNF- α* gene higher frequency of heterozygous -238GA genotype in women delivered between 28-32 gw. (31,6 vs. 4,7%, $p=0,00095$), and mutated -238A allele (21,1% vs. 2,3%, $p=0,00004$) has been observed. Additionally, for -376G>A polymorphism a higher frequency of heterozygous -376GA genotype (10,5 vs. 1,3%, $p=0,063$), and for mutated -376A allele (5,3 vs. 0,7%, $p=0,064$) of *TNF- α* gene was observed.

Genotypes co-occurrence: Integrated analysis of four *TNF- α* gene polymorphisms shows statistically significant overrepresentation of genotypes co-occurrence containing always mutated -238A allele in PTD group (*GG/GA/GG/GG*: 8,0 vs. 2,7%, $p=0,035$) was noted. Furthermore combination of *20877GG TLR2 / 8993CT TLR4* genotypes in the control group of healthy pregnant women was significantly higher compared to PTD (14,0 vs. 8,0%, $p=0,0695$).

Haplotype analysis: Haplotype analysis shows statistically significant difference between PTD and the control groups in the incidence of *GGAG* haplotype containing mutated -238A allele of -238G>A *TNF- α* polymorphism (0,063067 vs. 0,016634 in the control group, $p=0,030$) has been noted. There was also a tendency to higher prevalence of *AG* haplotype containing mutated -596A allele of *IL-6* gene (0,14365 vs. 0,000033, $p=ns$).

Analysis of socio-economic data: In the study the collection of socio-economic data, such as education, place of residence and type of work has been made. In PTD group greater amount of women performed physical work (32,7 vs. 14,5% in the control group), with primary education (25,9 vs. 7,3% in the control group) and were the smokers (30,7 vs. 20,0%)

has been noted. In the PTD group fewer women received folic acid, both before (46,0 vs. 57,3% in the control group), as well as during pregnancy (68,0 vs. 76,0%). All observed differences were statistically significant.

Conclusion

1. The study indicated the association of mutated alleles of $-596G>A$, $-174G>C$ polymorphisms in *IL-6* gene and $-238G>A$, $-376G>A$ polymorphisms in *TNF- α* gene with increased risk of preterm delivery.
2. Analysis of the prevalence of genotypes and alleles of investigated polymorphisms in women with PTD divided according to gestational age suggests the most significant role of polymorphic variants of *IL-6* and *TNF- α* genes in the etiology of this complication in women delivering between 28 and 32 gw.
3. The tendency for higher frequency of *AGAG* haplotype of *TNF- α* gene containing two mutated alleles of the $-376G>A$ and $-238G>A$ polymorphisms indicated for the impact of these alleles in the increased risk of preterm delivery.
4. The $-163G>A$, $-308G>A$ polymorphisms of *TNF- α* gene, $+3953C>T$ of *IL-1 β* gene and *Arg753Gln* of *TLR2* gene probably are not connected with the risk of preterm delivery.
5. The study results points to the possible modulating effect of mutated *IL-1RN* 2* allele (86 bp *VNTR* polymorphism) of *IL-1RN* gene and mutated *399Ile* allele (*Thr399Ile* polymorphism) in *TLR4* gene in decreased risk of preterm delivery.
6. The results confirm the contribution of environmental factors (education, type of work, cigarette smoking and use of folic acid before and during pregnancy) in the risk of preterm delivery.

10. SPIS TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII

- Tab. 1.** Najczęstsze czynniki ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego.
- Tab. 2.** Dane kliniczne pacjentek z grupy badanej (150 osób) i kontrolnej (150 osób).
- Tab. 3.** Startery zastosowane do reakcji PCR.
- Tab. 4.** Skład mieszaniny dla reakcji PCR (wartości podano w μ l).
- Tab. 5.** Warunki reakcji PCR dla badanych polimorfizmów genetycznych.
- Tab. 6.** Warunki reakcji hydrolizy restrykcyjnej produktu PCR.
- Tab. 7.** Porównanie danych demograficznych, klinicznych i laboratoryjnych ciężarnych z grupy badanej (150 osób) i kontrolnej (150 osób).
- Tab. 8.** Dane kliniczne noworodków z grupy badanej (150 osób) i kontrolnej (150 osób).
- Tab. 9.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $+3953C>T$ genu *IL-1 β* w grupach badanej i kontrolnej.
- Tab. 10.** Częstość występowania wszystkich genotypów i alleli polimorfizmu 86 pz VNTR genu *IL-1RN* w grupach badanej i kontrolnej.
- Tab. 11.** Frekwencja najczęściej występujących genotypów i alleli polimorfizmu 86 pz VNTR genu *IL-1RN* w grupach badanej i kontrolnej.
- Tab. 12.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-596G>A$ genu *IL-6* w grupach badanej i kontrolnej.
- Tab. 13.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-174G>C$ genu *IL-6* w grupach badanej i kontrolnej.
- Tab. 14.** Współwystępowanie polimorfizmów $-174G>C$ i $-596G>A$ genu *IL-6* w grupie badanej i kontrolnej.
- Tab. 15.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-163G>A$ genu *TNF- α* w grupach badanej i kontrolnej.
- Tab. 16.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-238G>A$ genu *TNF- α* w grupach badanej i kontrolnej.
- Tab. 17.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-308G>A$ genu *TNF- α* w grupach badanej i kontrolnej.
- Tab. 18.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-376G>A$ genu *TNF- α* w grupach badanej i kontrolnej.
- Tab. 19.** Współwystępowanie genotypów *TNF- α* ($-163 G>A$, $-238 G>A$, $-308 G>A$, $-376 G>A$).
- Tab. 20.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Arg753Gln* genu *TLR2* w grupach badanej i kontrolnej.
- Tab. 21.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Thr399Ile* genu *TLR4* w grupach badanej i kontrolnej.
- Tab. 22.** Współwystępowanie polimorfizmów genów *TLR2* i *TLR4* w grupie badanej i kontrolnej.
- Tab. 23.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $+3953C>T$ genu *IL-1 β* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.
- Tab. 24.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-596G>A$ genu *IL-6* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.
- Tab. 25.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-174G>C$ genu *IL-6* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.
- Tab. 26.** Współwystępowanie genotypów badanych polimorfizmów genu *IL-6* w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.

- Tab. 27.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-238G>A$ genu *TNF- α* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.
- Tab. 28.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-308G>A$ genu *TNF- α* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.
- Tab. 29.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu $-376G>A$ genu *TNF- α* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.
- Tab. 30.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Arg753Gln* genu *TLR2* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.
- Tab. 31.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Thr399Ile* genu *TLR4* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.
- Tab. 32.** Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -86 pz *VNTR* genu *IL-1RN* w badanej grupie kobiet z PTD w zależności od tygodnia zakończenia ciąży.
- Tab. 33.** Częstość występowania poszczególnych haplotypów badanych polimorfizmów genu *TNF- α* oszacowana za pomocą programu PHASE. Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm $-376G>A$, druga $-308G>A$, trzecia $-238G>A$ i czwarta $-163G>A$.
- Tab. 34.** Częstość występowania poszczególnych haplotypów badanych polimorfizmów genu *IL-6* oszacowana za pomocą programu PHASE. Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm $-596G>A$, druga $-174G>C$.
- Tab. 35.** Analiza nierównowagi sprzężeń pomiędzy analizowanymi wariantami *IL-6* - $-596G>A$ (rs1800797) i $-174G>C$ (rs1800795).
- Tab. 36.** Analiza nierównowagi sprzężeń pomiędzy analizowanymi wariantami *TNF- α* : - $-376G>A$ (rs1800750), $-308G>A$ (rs1800629) i $-238G>A$ (rs361525).
- Tab. 37.** Polimorfizmy genów cytokin oraz receptorów Tol-like i ich znaczenie w organizmie człowieka

Spis rycin

- Ryc. 1.** Schemat odpowiedzi ze strony matki i płodu w inicjacji porodu przedwczesnego.
- Ryc. 2.** Możliwe szlaki patofizjologiczne w etiologii porodu przedwczesnego [wg Drews i Seremak-Mrozikiewicz, 2006].
- Ryc. 3.** Schemat pięciu rodzin receptorów dla cytokin: 1 - receptor cytokin typu I, 2 - receptor typu II, 3 - receptor *TNF*, 4 - receptor dla immunoglobulin, 5 - receptor dla chemokin.
- Ryc. 4.** Lokalizacja na chromosomie, schemat budowy genu *IL-1 β* i umiejscowienie badanego polimorfizmu $+3954C>T$.
- Ryc. 5.** Lokalizacja na chromosomie, schemat budowy genu *IL-1RN* i umiejscowienie badanego polimorfizmu 86 pz *VNTR*.
- Ryc. 6.** Lokalizacja na chromosomie, schemat budowy genu *IL-6* i rozmieszczenie badanych polimorfizmów $-596G>A$ oraz $-174G>C$.
- Ryc. 7.** Lokalizacja na chromosomie, schemat budowy genu *TNF- α* i rozmieszczenie w promotorze badanych polimorfizmów $-376G>A$, $-308G>A$, $-238G>A$ oraz $-163G>A$.
- Ryc. 8.** Ogólny schemat budowy receptorów Toll-like.
- Ryc. 9.** Udział receptorów Toll-like w etiologii porodu przedwczesnego.
- Ryc. 10.** Lokalizacja na chromosomie, schemat budowy genu *TLR2* i umiejscowienie badanego polimorfizmu *Arg753Gln*.
- Ryc. 11.** Lokalizacja na chromosomie, schemat budowy genu *TLR4* i umiejscowienie badanego polimorfizmu *Thr399Ile*.
- Ryc. 12.** Częstość występowania alleli polimorfizmu $+3953C>T$ genu *IL-1 β* w grupach badanej i kontrolnej.
- Ryc. 13.** Częstość występowania alleli dla polimorfizmu 86 pz *VNTR* genu *IL-1RN* w grupach badanej i kontrolnej.

Ryc. 14. Częstość występowania alleli dla polimorfizmu $-596G>A$ genu *IL-6* w grupach badanej i kontrolnej.

Ryc. 15. Częstość występowania alleli polimorfizmu $-174G>C$ genu *IL-6* w grupach badanej i kontrolnej.

Ryc. 16. Częstość występowania alleli polimorfizmu $-238G>A$ genu *TNF- α* w grupach badanej i kontrolnej.

Ryc. 17. Częstość występowania alleli polimorfizmu $-308G>A$ genu *TNF- α* w grupach badanej i kontrolnej.

Ryc. 18. Częstość występowania alleli polimorfizmu $-376G>A$ genu *TNF- α* w grupach badanej i kontrolnej.

Ryc. 19. Częstość występowania alleli polimorfizmu *Arg753Gln* genu *TLR2* w grupach badanej i kontrolnej.

Ryc. 20. Częstość występowania alleli polimorfizmu *Thr399Ile* genu *TLR4* w grupach badanej i kontrolnej.

Ryc. 21. Porównanie częstości występowania haplotypów polimorfizmów genu *TNF- α* w grupie badanej (1) i kontrolnej (2) oszacowana za pomocą programu PHASE. Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm $-376G>A$, druga $-308G>A$, trzecia $-238G>A$ i czwarta $-163G>A$.

Ryc. 22. Porównanie częstości występowania w grupie badanej (1) i kontrolnej (2) haplotypów genu *TNF- α* oszacowana za pomocą programu Haploview. Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm $-376G>A$, druga $-308G>A$, trzecia $-238G>A$.

Ryc. 23. Porównanie częstości występowania w grupie badanej (1) i kontrolnej (2) haplotypów polimorfizmów genu *IL-6* oszacowana za pomocą programu PHASE. Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm $-596G>A$, druga $-174G>C$.

Ryc. 24. Porównanie częstości występowania w grupie badanej (1) i kontrolnej (2) haplotypów genu *IL-6* oszacowana za pomocą programu Haploview. Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm $-596G>A$, druga $-174G>C$.

Ryc. 25. Wykres obrazujący nierównowagę sprzężeń pomiędzy analizowanymi wariantami *IL-6* $-596G>A$ (rs1800797) i $-174G>C$ (rs1800795) w grupie badanej (1) i kontrolnej (2). Kolor czerwony ($LOD \geq 2$ i $D' = 1$). W polach podano wartość r^2 .

Ryc. 26. Wykres obrazujący nierównowagę sprzężeń pomiędzy analizowanymi wariantami *TNF- α* : $-376G>A$ (rs1800750), $-308G>A$ (rs1800629) i $-238G>A$ (rs361525) w grupie badanej (1) i kontrolnej (2). Kolor niebieski ($LOD < 2$ i $D' = 1$), kolor czerwony ($LOD \geq 2$ i $D' = 1$). W polach podano wartość r^2 .

Spis fotografii

Fot. 1. Analiza genotypów polimorfizmu $+3953C>T$ genu *IL-1 β* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *TaqI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 3, 6 homozygoty niezmutowane *CC*, tory 2, 5, 7 heterozygoty *CT*, tor 4 homozygota zmutowana *TT*.

Fot. 2. Analiza genotypów polimorfizmu 86 pz *VNTR* genu *IL-1RN* po reakcji PCR. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 2,5 genotyp 1/2, tory 3,8 genotyp 2/4, tory 4,6,7,9,10 odpowiednio genotypy 2/5, 1/1, 2/2, 1/3, 0/2.

Fot. 3. Analiza genotypów polimorfizmu $-596G>A$ genu *IL-6* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *BseGI* (*BtsCI*). Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 2, 3, 4, 6, 8 homozygoty niezmutowane *GG*, tor 7 heterozygoty *GA*, tor 5 homozygota zmutowana *AA*.

Fot. 4. Analiza genotypów polimorfizmu $-174G>C$ genu *IL-6* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *LweI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 4, 6, homozygoty niezmutowane *GG*, tory 3, 5 heterozygoty *GC*, tory 2, 7 homozygoty zmutowane *CC*.

Fot. 5. Analiza genotypów polimorfizmu $-163G>A$ genu *TNF- α* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *Bsh1236I*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 2-7 homozygoty niezmutowane *GG*.

Fot. 6. Analiza genotypów polimorfizmu $-238G>A$ genu *TNF- α* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *BspI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 3, 4, 5 homozygoty niezmutowane *GG*, tory 2, 7 heterozygoty *GA*, tor 6 homozygota zmutowana *AA*.

Fot. 7. Analiza genotypów polimorfizmu $-308G>A$ genu *TNF- α* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *FaqI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 2, 4, 6-8 homozygoty niezmutowane *GG*, tor 5 heterozygota *GA*, tor 3 homozygota zmutowana *AA*.

Fot. 8. Analiza genotypów polimorfizmu $-376G>A$ genu *TNF- α* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *TasI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 1-6, 8 homozygoty niezmutowane *GG*, tor 7 heterozygota *GA*.

Fot. 9. Analiza genotypów polimorfizmu *Arg753Gln* genu *TLR2* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *PstI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 2, 3, 4, 5 homozygoty niezmutowane *GG*, tory 6, 7 heterozygoty *GA*, tor 8 homozygota zmutowana *AA*.

Fot. 10. Analiza genotypów polimorfizmu *Thr399Ile* genu *TLR4* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym *MspI*. Tor 1 marker wielkości (50 pz), tory 3, 6, 7 homozygoty niezmutowane *CC*, tory 2, 4, 5 heterozygoty *CT*, tor 8 homozygota zmutowana *TT*.