

**UNIWERSYTET MEDYCZNY W POZNANIU
WYDZIAŁ LEKARSKI II**

**ZNACZENIE WARIANTÓW POLIMORFICZNYCH GENÓW UKŁADU
TLENEK AZOTU-ENDOTELINA 1 (NO-ET1) W STANIE
PRZEDRZUCAWKOWYM ORAZ NADCIŚNIENIU CIĄŻOWYM**

LEK. MED. MICHAŁ PERLIK

**KLINIKA PERINATOLOGII I CHOROÓB KOBIECYCH
UNIWERSYTET MEDYCZNY W POZNANIU**

**PROMOTOR:
PROF. DR HAB. KRZYSZTOF DREWS
KLINIKA PERINATOLOGII I CHOROÓB KOBIECYCH
UNIWERSYTET MEDYCZNY W POZNANIU**

POZNAŃ 2012

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	6
1.1. Rola tlenku azotu (NO) w organizmie ludzkim	
1.1.1. Historia badań dotyczących NO	
1.1.2. Synteza NO	
1.1.3. Syntaza tlenku azotu – NOS	
1.1.4. Patofizjologia działania tlenku azotu	
1.1.5. Cząsteczki docelowe dla NO	
1.2. Rodzina endoteliny	
1.2.1. Fizjologiczne działanie układu NO-ET-1	
1.2.2. Budowa genu <i>EDN1</i>	
2. CEL PRACY	
3. MATERIAŁ I METODYKA	25
3.1. Grupy badanych pacjentek	26
3.2. Metodyka	
3.2.1. Izolacja DNA	
3.2.2. Oznaczanie jakości i ilości preparatów DNA	
3.2.3. Polimorfizm <i>Glu298Asp</i> syntazy tlenku azotu	
3.2.4. Polimorfizm <i>-786T>C</i> syntazy tlenku azotu	
3.2.5. Polimorfizmy <i>-3A/4A</i> i <i>Lys198Asn</i> genu <i>EDN1</i>	
3.3. Analiza statystyczna	
4. WYNIKI	36
4.1. Analiza danych klinicznych i laboratoryjnych w badanych grupach	
4.1.1. Charakterystyka porównawcza badanych grup kobiet	
4.1.2. Analiza badanych parametrów biochemicznych w grupie z nadciśnieniem w ciąży	
4.1.3. Analiza parametrów urodzeniowych noworodków z badanych grup kobiet	
4.2. Analiza częstości występowania badanych polimorfizmów genetycznych	
4.2.1. Analiza polimorfizmu <i>Glu298Asp</i> genu <i>NOS3</i>	
4.2.2. Analiza polimorfizmu <i>-786T>C</i> genu <i>NOS3</i>	
4.2.3. Analiza polimorfizmu <i>Lys198Asn</i> genu <i>EDN1</i>	
4.2.4. Analiza polimorfizmu <i>-134delA</i> genu <i>EDN1</i>	
4.3. Współwystępowanie genotypów syntazy tlenku azotu oraz endoteliny 1 w grupie kobiet z nadciśnieniem w ciąży oraz w grupie kontrolnej	
4.4. Analiza wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w zależności od badanych polimorfizmów genu <i>NOS3</i> oraz <i>EDN1</i>	
4.5. Analiza średnich parametrów klinicznych oraz biochemicznych w badanych grupach w zależności od genotypu	
4.6. Analiza częstości występowania haplotypów badanych polimorfizmów syntazy tlenku azotu i endoteliny-1	

5. DYSKUSJA	79
5.1. Syntaza śródbłonkowa tlenku azotu (<i>eNOS</i>)	
5.1.1. Rola tlenku azotu w chorobach układu krążenia	
5.1.2. Rola polimorfizmu genu <i>NOS3</i> w rozwoju chorób układu krążenia	
5.1.3. Badania dotyczące polimorfizmu genu śródbłonkowej syntazy NO u ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym	
5.1.4. Implikacje kliniczne polimorfizmu genu <i>NOS3</i> w stanie przedrzucawkowym	
5.2. Endotelina-1	
5.2.1. Stężenie ET-1 we krwi kobiet ze stanem przedrzucawkowym	
5.2.2. Znaczenie polimorfizmu genu <i>EDNI</i> w stanie przedrzucawkowym	
5.2.3. Polimorfizm <i>-134delA</i> genu <i>EDNI</i>	
5.3. Podsumowanie	98
6. WNIOSKI	100
7. Streszczenie	101
8. Summary	103
9. PIŚMIENNICTWO	105
10. SPIS TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII	113

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ADP	adenozynodwufosforan (<i>ang. adenosine diphosphate</i>)
AMP	adenozynomonofosforan (<i>ang. adenosine monophosphate</i>)
ANP	przedsionkowy peptyd natriuretyczny (<i>ang. atrial natriuretic peptide</i>)
ATP	adenozynotrójfosforan (<i>ang. adenosine thriphosphate</i>)
cAMP	cykliczny adenozynomonofosforan (<i>ang. cyclic adenosine monophosphate</i>)
cGMP	cykliczny guanozylomonofosforan (<i>ang. cyclic guanosine monophosphate</i>)
EDRF	śródbłonkowy czynnik wazodylatacyjny (<i>ang. endothelium-dependent relaxing factor</i>)
ET-1	endotelina 1 (<i>ang. endothelin 1</i>)
EDNI	gen kodujący endotelinę 1 (<i>ang. endothelin 1 gene</i>)
FAD	dinukleotyd flawinoadeninowy (<i>ang. flavin adenine dinucleotide</i>)
FMN	mononukleotydu flawinoadeninowy (<i>ang. flavin mononucleotide</i>)
GH	nadciśnienie ciążowe (<i>ang. gestational hypertension</i>)
GTN	trójazotanu glicerolu (<i>ang. glyceryl trinitrate</i>)
BH₄	tetrahydrobiopteryna (<i>ang. tetrahydrobiopterin</i>)
HELLP	zespół HELLP, hemoliza, zwiększenie aktywności transaminaz, trombocytopenia (<i>ang. Haemolysis, Elevated Liver Enzymes and Low Platelet Count</i>)
IUGR	zahamowanie wzrastania wewnątrzmacicznego płodu (<i>ang. intrauterine growth restriction</i>)
L-NAME	L-nitromonometyloarginina (<i>ang. L-nitro-arginine methyl ester</i>)
LPS	lipopolisacharydy (<i>ang. lipopolysaccharides</i>)
NADPH	zredukowany fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowy (<i>ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NO	tlenek azotu (<i>ang. nitric oxide</i>)
NOS	NO-syntaza (<i>ang. nitric oxide syntase</i>)
nNOS	neuronalna NO-syntaza (<i>ang. neuronal nitric synthase</i>)
iNOS	indukowana przez makrofagi NO-syntaza (<i>ang. inducible nitric synthase</i>)
eNOS	śródbłonkowa NO-syntaza (<i>ang. endothelial nitric synthase</i>)
NOS1	gen neuronalnej syntazy tlenku azotu (<i>ang. nitric oxide synthase 1 gene neuronal</i>)
NOS2	gen indukowanej przez makrofagi syntazy tlenku azotu (<i>ang. nitric oxide synthase 2 gene, inducible</i>)
NOS3	gen śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (<i>ang. nitric oxide synthase 3 gene endothelial cell</i>)
OD	gęstość optyczna (<i>ang. optical density</i>)
OR	iloraz szans (<i>ang. odds ratio</i>)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy (<i>ang. central nervous system</i>)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (<i>ang. polymerase chain reaction</i>)
PDE V	fosfodiesteraza V (<i>ang. phosphodiesterase type V</i>)
PE	stan przedrzucawkowy (<i>ang. preeclampsia</i>)
PGI₂	prostaglandyna I ₂ , prostacyklina (<i>ang. prostacyclin</i>)

PKG	cGMP-zależna kinaza białek (<i>ang. cGMP-dependent protein kinase, protein Kinase G</i>)
RAA	układ renina-angiotensyna-aldosteron (<i>ang. renin-angiotensin-aldosterone system</i>)
RFLP	metoda polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (<i>ang. restriction fragment length polymorphism</i>)
SD	odchylenie standardowe (<i>ang. standard deviation</i>)
SH	grupa tiulowa (<i>ang. thiol group</i>)
SOD	dysmutaza ponadtlenkowa (<i>ang. super oxide dismutase</i>)
TNF	czynnik martwicy guza (<i>ang. tumor necrosis factor</i>)
TXA₂	tromboksan A ₂ (<i>ang. thromboxane A2</i>)
VEGF	naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu (<i>ang. vascular endothelial growth factor</i>)

1. WSTĘP

Stan przedrzucawkowy (częstość występowania 6-8% w populacji ogólnej kobiet ciężarnych) uważany jest za główną przyczynę zachorowalności i umieralności matek, płodów i noworodków. Stąd ciągle prowadzone są intensywne badania dotyczące mechanizmów rozwoju tego powikłania u ciężarnych. Zmiany zachodzące we wczesnym okresie ciąży wpływają na zaburzenia równowagi w wielu układach regulujących napięcie naczyń u kobiety ciężarnej (97, 100, 108). W świetle wielu badań zmiany prowadzące do powstania choroby wyjaśnia się dysfunkcją śródbłonna tętnic spiralnych w łożysku już w czasie inwazji komórek trofoblastu do tych naczyń (67, 68, 103, 120). Konsekwencją tego jest wzrost stężenia tromboksanu A2 i spadek stężenia prostacykliny oraz wzrost stężenia endoteliny (szczególnie endoteliny 1) i spadek stężenia tlenu azotu (NO). Tromboksan A2 oraz endotelina 1 są czynnikami działającymi silnie obkurczająco na mięśniówkę naczyń krwionośnych. Dodatkowo tromboksan A2 wykazuje działanie powodujące agregację płytek krwi i wpływa na wzrost czynności skurczowej macicy. Zmiany te mające swój początek we wczesnym stadium rozwoju ciąży, nasilają się i aktywują w drugiej połowie manifestując się pojawieniem się objawów stanu przedrzucawkowego (33, 37, 50, 92, 116).

W licznych doniesieniach dużo uwagi poświęca się znaczeniu zaburzeń w układzie endotelina 1 (ET-1 – endothelin 1) – tlenek azotu (NO – nitric oxide). W ostatnich latach w licznych pracach zasugerowano również udział genów kodujących syntezę NO oraz endoteliny 1 w patogenezie tej jednostki, a w szczególności na możliwy związek pomiędzy polimorfizmami genetycznymi tego układu a powstawaniem stanu przedrzucawkowego (66, 89, 110, 118).

1.1. ROLA TLENKU AZOTU (NO) W ORGANIZMIE LUDZKIM

1.1.1. HISTORIA BADAŃ DOTYCZĄCYCH NO

Już w drugiej połowie XIX wieku pojawiły się doniesienia o pozytywnym działaniu nitrogliceryny w przypadku dusznicy bolesnej. Alfred Nobel, wynalazca dynamitu i fundator nagrody Nobla, który opracowywał formułę udziału nitrogliceryny w materiałach wybuchowych, sam chorował na dusznicę bolesną. Często cytowany jest fragment jego listu

do przyjaciela, gdzie wskazując na lecznicze właściwości tej substancji, pisał: „*O ironio! Mój lekarz powinien zalecić mi stosowanie nitrogliceryny wewnętrznie!*”

Właściwości wazodilacyjne nitrogliceryny zostały dokładnie opisane dopiero 100 lat później. Wykazano, że nie działa ona bezpośrednio, a przez produkcję nitratów, które same w sobie nie posiadają właściwości wazodylacyjnych, a wpływ na naczynia wywierają poprzez labilny czynnik, zidentyfikowany następnie jako tlenek azotu (NO). Równoczesne badania doprowadziły do odkrycia roli śródbłonka w procesie rozszerzania naczyń (badania prowadzone w latach 80-tych XX-wieku). Wykazano, że do uzyskania efektu wazodylacyjnego niezbędna jest obecność komórek śródbłonka oraz związku pośredniczącego między śródbłonkiem a mięśniówką gładką naczyń (10).

Czynnik łączący endotelium z błoną komórek mięśniowych gładkich został nazwany EDRF – *endothelium-dependent relaxing factor*. Wkrótce potem pojawiły się spostrzeżenia, że EDRF działa poprzez wzrost produkcji cyklicznego GMP w komórkach mięśni gładkich ściany naczynia i ten właśnie proces jest bezpośrednio odpowiedzialny za efekt wazodylacji. Wykazano również działanie NO poprzez liczne substancje pośrednie, jak bradykinina, histamina, nukleaza adenylanowa, trombina, substancja P, 5-hydroksytryptamina i serotonina. Enzymy odpowiedzialne za syntezę NO z argininy zostały zidentyfikowane w takich komórkach jak: komórki centralnego układu nerwowego, makrofagi czy śródbłonek. Dzięki temu odkryciu tlenek azotu został uznany za neurotransmitter (61, 94, 125, 129).

W latach 90-tych pojawiły się liczne doniesienia dotyczące fizjologicznego i patologicznego działania NO w różnych układach. Prowadzone badania w tym czasie dotyczyły przede wszystkim zależności między endogennym powstawaniem azotanów i cytotoksycznością reakcji zapalnej, wazodylacyjnego działania pochodnych azotanów oraz roli komórek śródbłonka.

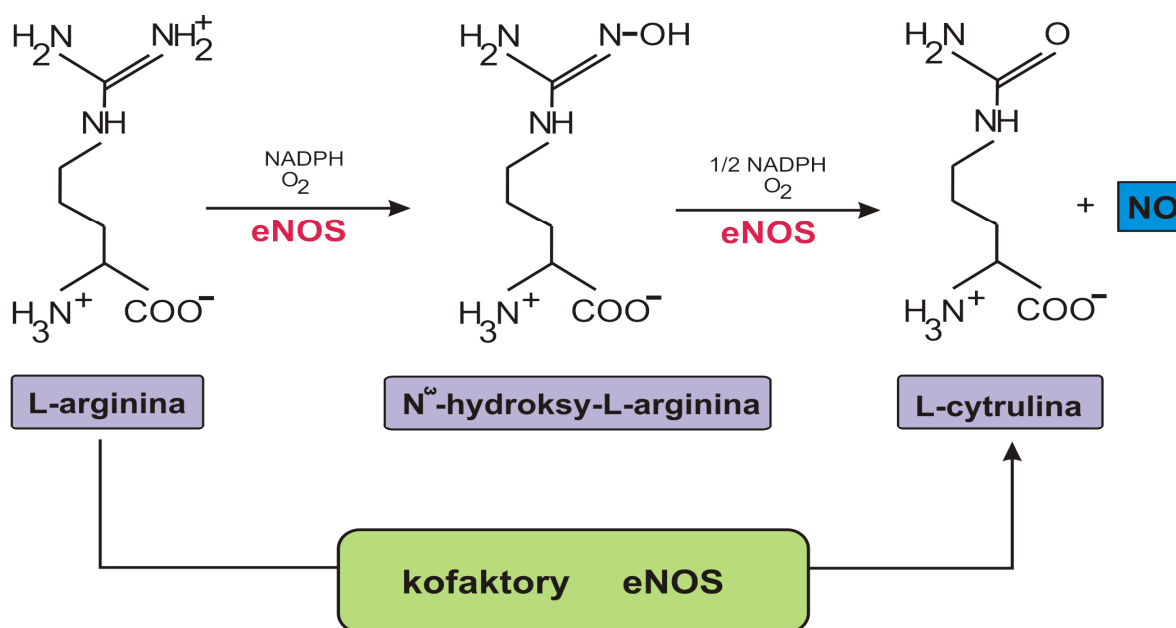
Dzisiaj tlenek azotu uważany jest za jedną z głównych substancji biorących udział w przekazywaniu sygnału w niektórych układach biologicznych organizmu. Jest on neurotransmiterem w ośrodkowym układzie nerwowym, bierze udział w regulacji homeostazy w nerkach, w układzie sercowo-naczyniowym oraz jest mediatorem reakcji zapalnej. Liczba publikacji dotycząca tlenku azotu stale rośnie. Jeżeli w roku 1985 liczba prac na temat NO wynosiła tylko 55, w roku 1994 było ich ponad 5 tysięcy, a w 2009 liczba publikacji wzrosła do ponad 12 tysięcy w bazie PubMed.

Wzrastające zainteresowanie NO spowodowało, że w 1992 roku ta prosta molekula uznana została przez czasopismo *Science* za „cząsteczkę roku”. Odkrycie funkcji śródbłonka

w procesie dylatacji naczyń, określenie roli NO oraz cyklicznego GMP jako czynników odpowiedzialnych za te reakcje oraz identyfikacja enzymów odpowiedzialnych za produkcję NO doprowadziło w 1998 roku do przyznania Nagrody Nobla w zakresie medycyny (49).

1.1.2. SYNTEZA NO

Tlenek azotu (NO) powstaje w dwustopniowej reakcji katalizowanej przez syntazę tlenku azotu (*NOS – nitric oxide synthase*). Do przeprowadzenia reakcji niezbędne są substraty: arginina i tlen cząsteczkowy (O_2), kofaktory: zredukowany fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH), dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD), mononukleotyd flawinoadeninowy (FMN) oraz hem i kompleks Ca-kalmodulina. Aktywność syntazy tlenku azotu jest również stymulowana przez cząsteczkę tetrahydrobiopteryny (BH_4). Schemat omawianej reakcji przedstawia ryc. 1.



Ryc. 1. Reakcja powstawania NO z L-argininy.

Mechanizm reakcji polega na utlenianiu grupy guanidynowej aminokwasu L-argininy. Pierwszym etapem jest hydroksylacja L-argininy z udziałem O_2 i NADPH do N^o-hydroksy-L-argininay a w drugim etapie powstaje L-cytrulina i nadtlenkowy rodnik azotowy (NO^{\bullet}) lub anion nitroksylowy (NO^-). Do utworzenia 1 mola NO zużywane są 2 mole O_2 i 1,5 mola NADPH (64).

1.1.3. SYNTAZA TLENKU AZOTU - NOS

Reakcja powstawania cząsteczki NO jest katalizowana przez enzym syntazę tlenku azotu (*NOS* – *nitric oxide syntase*, EC 1.14.13.39). Istnieją trzy izoformy tego enzymu, kodowane przez trzy różne geny:

- neuronalna *NOS* – (*NOS I*, *nNOS*), kodowana przez gen *NOS1* znajdujący się na chromosomie 12 w pozycji 12q24.2-31; ulega aktywacji, gdy zwiększa się stężenie jonów wapnia np. w wyniku pobudzenia przez kwas glutaminowy receptorów NMDA i otwarcia kanałów wapniowych
- indukowalna *NOS* – (*NOS II*, *iNOS*), kodowana przez gen *NOS2* (17q11.2-12) indukowana przez makrofagi, neutrofile, komórki Browicza – Kupfera, monocyty
- endotelialna (śródbłonkowa) *NOS* – (*NOS III*, *eNOS*), kodowana przez gen *NOS3* (7q35-36), również jej aktywność regulowana jest przez stężenie jonów wapnia. Wykryta w śródbłonku, kardiomiocytach, płytkach krwi, neuronach i monocytach.

Izoformy neuronalna i śródbłonkowa *NOS* są konstytutywne i ich aktywność zależna jest od ilości wewnątrzkomórkowego kompleksu Ca-kalmodulina (70,17). Izoformy *NOS* wykazują znaczne podobieństwo strukturalne, podobną orientację i lokalizację kofaktorów oraz podobne właściwości stereochemiczne centrum aktywnego. Na poziomie DNA podobieństwo w strukturze form *NOS* u człowieka wynosi ok. 55%. Wszystkie trzy izoformy *NOS* są zbudowane z dwóch dużych, funkcjonalnych domen połączonych w jeden polipeptyd miejscem wiążącym kalmodulinę. Domena na C-końcu jest reduktazowa i posiada miejsca wiązania dla NADPH, FMN i FAD. Ta domena jest funkcjonalnie podobna do cytochromu P450. Domena N-końcowa jest domeną oksygenazową łączy się z prostetyczną grupą hemową, tetrahydrobiopteryną i L-argininą. Struktura domen *NOS* została określona na podstawie badań krystalograficznych pod koniec lat 90-tych ubiegłego stulecia (2).

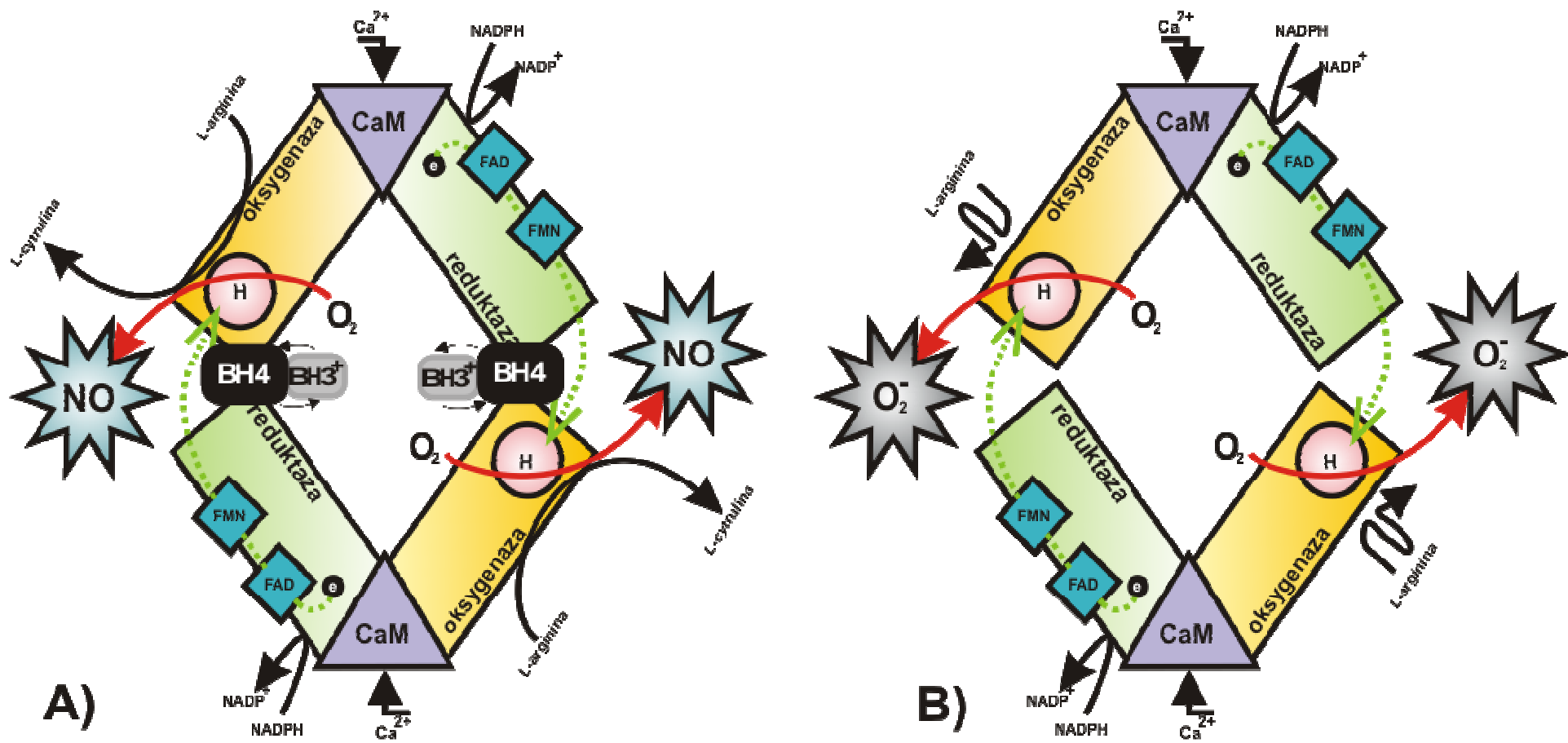
Dla aktywacji endotelialnej syntazy tlenku azotu niezbędne są następujące etapy:

- Umiejscowienie *eNOS* w kaweolach plazmalemy komórek śródbłonka (odrębnych mikrodomenach błony komórkowej). Wymaga potranslacyjnej (zachodzącej jeszcze wtedy gdy łańcuch polipeptydowy jest związany z rybosomem i trwa jego wydłużanie), nieodwracalnej mirystynizacji (dołączenie cząsteczki kwasu mirystynowego) jak również potranslacyjnej, odwracalnej palmitynizacji.

Przyłączenie palmitynianu do cysteiny regulowane jest przez zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} (zależnego np. od bradykininy)

- Kaweolina-1 główne białko okrywające kaweole śródbłonna łączy się z *eNOS* powodując jego inhibicję w sposób zależny od $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Natomiast $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ oddysocjowuje cząsteczkę *eNOS* od kaweoliny jednocześnie ją aktywując.
- Fosforylacja Ser1177 *eNOS* (przez Akt kinazę) zwiększa produkcję NO, fosforylacja Ser486 *nNOS* (przez kinazę zależną od CaM) zmniejsza produkcję NO. Aktywność *eNOS* jest regulowana również przez białko szoku cieplnego 90 (Hsp90), które działa jako modulator allosteryczny (2).

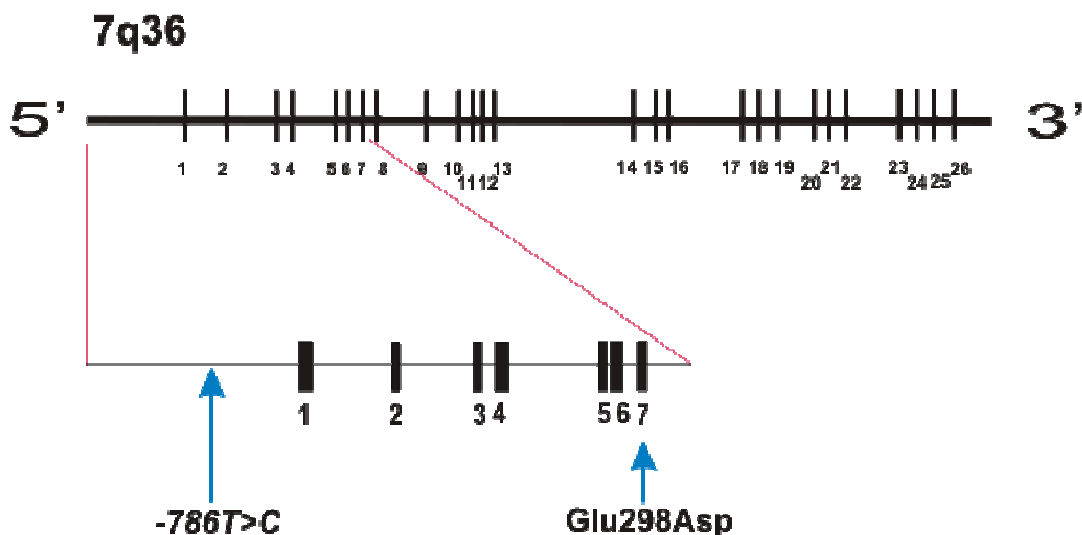
Do aktywacji *NOS* niezbędna jest ich dimeryzacja, a nawet mówi się o ich tetrameryzacji (2 cząsteczki *NOS* i 2 cząsteczki kalmoduliny). W optymalnych warunkach dostępności wszystkich substratów i kofaktorów niezbędnych do aktywności syntazy tlenu azotu (ryc. 2A) elektrony są przenoszone z NADPH do domeny reduktazowej. Transport elektronów przez tą domenę wymaga obecności $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, które poprzez FAD i FMN przenoszone są do domeny oksigenazowej innego monomeru, w której reagują z żelazem hemu i BH_4 w centrum aktywnym, katalizując reakcję utleniania L-argininy. BH_4 ulega przejściowej oksydacji do rodnika BH_3^+ ale szybko zostaje zredukowany do BH_4 . CaM nasila transfer elektronów z NADPH do domen flawinowych. Kluczowym składnikiem dla przeprowadzania efektywnej katalizy przez *eNOS* jest również BH_4 . Niedobór BH_4 (ryc. 2B) może powodować „rozdzielenie” dimeru *eNOS* i przepływ elektronów z flawin do L-argininy staje się niezwiązany z jej oksydacją. Wówczas zamiast produkcji przez enzym NO następuje synteza nadtlenu (O_2^-) z tlenu (32). Mechanizm regulacji syntezy *eNOS* przedstawiony jest na ryc.2.



Ryc. 2. Mechanizm regulacji syntezy eNOS. A) w warunkach optymalnych oraz B) przy niedoborze BH_4 (wg George and Johnson 2010).

Syntaza śródbłonkowa odpowiada za ciągłą produkcję niewielkich ilości NO, co warunkuje stały toniczny rozkurcz ścian naczyń. Pobudzenie wydzielania NO odbywa się na skutek stymulacji komórek śródbłonka przez naczyniowe siły ścinające, a ponadto przez acetylocholinę, bradykininę i substancję P. Poza komórkami śródbłonka synteza NO odbywa się w mięśniówce macicy oraz trofoblaście. NO stymuluje cyklazę guanylową, co prowadzi do wzrostu stężenia cyklicznego 3,5-monofosforanu guanozyny (cGMP), a w ciągu dalszych przemian biochemicznych warunkuje rozkurcz mięśniówki gładkiej. Biologiczna rola tlenu azotu nie ogranicza się jedynie do efektu wazodylatacyjnego, działa on również antyadhezyjnie, antyagregacyjnie, zmniejsza aktywność plazminogenu, hamuje przebudowę ścian naczyń, a także pełni ważne funkcje w układzie nerwowym i odpornościowym (34,48).

Gen *NOS3* kodujący endotelialną syntazę tlenu azotu złożony jest z 26 eksonów i 25 intronów i koduje 1203 aminokwasy o łącznej wielkości 133 kDa. Najczęściej badanymi w związku z nadciśnieniem polimorfizmami genu *NOS3* są zamiana guaniny na tyminę w pozycji 894 (ekson 7) powodująca zmianę sekwencji aminokwasowej białka (*Glu298Asp*) oraz zamiana tyminy na cytozynę w promotorze genu *NOS3* w pozycji -786. Schemat budowy genu *NOS3* oraz badane w prezentowanej pracy polimorfizmy przedstawione są na ryc. 3.



Ryc. 3. Schemat budowy oraz lokalizacja badanych w pracy polimorfizmów genu *NOS3*.

Tlenek azotu hamuje aktywność *NOS* na drodze ujemnego sprzężenia zwrotnego oddziałując na resztę hemową enzymu. L-cytrulina ulega przemianie do L-argininy poprzez przyłączenie atomu azotu. Arginina bierze udział w kilku wewnątrzkomórkowych szlakach metabolicznych i ścieżkach przekazywania sygnału np. synteza NO, cykl mocznikowy czy synteza kreatyniny. Tylko izoforma *eNOS* posiada miejsce wiążące łańcuchy kwasów tłuszczowych. Właściwość ta umożliwia cząsteczce enzymu związanie się z lipidową błoną komórkową, podczas gdy pozostałe dwie izoformy *NOS* pozbawione lipidowego zakotwiczenia są rozpuszczalne w wodzie. Dlatego izoforma nNOS oraz iNOS zawieszane są w cytozolu. Uważa się, że zlokalizowanie cząsteczek *eNOS* w pobliżu błony komórkowej ułatwia dyfuzję powstałego tlenu azotu do krwioobiegu i do leżących w sąsiedztwie komórek mięśniówki gładkiej ściany naczynia.

Mirystynizacja (dołączenie cząsteczki kwasu mirystynowego) oraz palmitynizacja (dołączenie cząsteczki kwasu palmitynowego) do cząsteczki *eNOS* umożliwia wbudowanie enzymu w błonę fosfolipidową. Wykazano wysokie powinowactwo cząsteczek *eNOS* zakotwiczonych w błonie fosfolipidowej do białka kaweoliny. Związanie *eNOS* z kaweoliną dezaktywuje cząsteczkę enzymu. Natomiast kompleks Ca-kalmodulina oddysocjowuje cząsteczkę *eNOS* od kaweoliny jednocześnie ją aktywując. Fosforylacja oraz prawdopodobnie mirystynizacja i palmitynizacja cząsteczki *eNOS* działa podobnie jak przyłączenie do kaweoliny.

Cząsteczka *eNOS* może również ulegać fosforylacji na resztach tyrozynowych i serynowych enzymu przy udziale odpowiednich kinaz, prowadząc tym samym do aktywacji cząsteczki enzymu. Najpierw dochodzi do mobilizacji wapnia i uwolnienia *eNOS* z kompleksu z kaweoliną przez kompleks Ca-kalmodulina, a następnie reszty tyrozynowe są fosforylowane przy udziale szeregu kinaz niezależnie od obecności wapnia (13).

Endotelialna *NOS* jest w ten sposób poddawana cyklicznie zachodzącemu procesowi asocjacji i dysocjacji z cząsteczką kaweoliny, który to proces jest odpowiedzialny za wzbudzenie cząsteczki enzymu. Belhassen i wsp. dowiedli, że translokacja cząsteczki enzymu *eNOS* jak i jego fosforylacja w kardiomiocytach przy udziale zależnej od cAMP kinazy białka A jest blokowana przez kwas palmitynowy. Powyższy mechanizm może brać udział w obserwowanej aktywacji *eNOS* pod wpływem leków zwiększających wewnątrzkomórkowy poziom cyklicznego AMP (9).

Syntetaza tlenu azotu może również brać udział w powstawaniu nadtlenu (O_2^-), które powstają przy niedoborze argininy. Powyższy proces jest bardzo istotny w aspekcie

wzajemnej zależności pomiędzy tlenkiem azotu a procesem oksydacji w układzie sercowo-naczyniowym (23).

1.1.4. PATOFIZJOLOGIA DZIAŁANIA TLENKU AZOTU

Endogenne powstawanie związków azotowych potwierdzono już na początku XX-wieku. Wnioski te oparto na obserwacji, że ilość wydalanych związków azotowych z moczem była większa niż ich podaż. Co więcej nawet całkowita eliminacja azotanów z diety nie powodowała obniżenia ich stężenia w moczu. Wzrost eliminacji azotanów z ustroju obserwowano ponadto w trakcie infekcji. Doświadczalne wstrzyknięcie endotoksyn bakteryjnych skutkowało wzrostem poziomu wydalanych z moczem azotanów. W warunkach *in vitro* stymulacja makrofagów lipopolisacharydami (LPS) prowadziła do uwolnienia azotanów do podłoża hodowlanego. Jednak to zjawisko obserwowane było tylko w przypadku hodowli makrofagów na podłożu wzbogaconym w argininę. Zauważono również, że zdolność makrofagów do niszczenia komórek nowotworowych, bakteryjnych oraz grzybów zależy właśnie od dostępności tego aminokwasu. Ponadto zdolność ta prowadzi do powstawania cytruliny i może zostać zablokowana przez pochodne argininy (np. L-nitromonometyloargininę, L-NAME). Obecnie zauważono, że wiele substancji pobudza śródbłonek do wydzielania NO (ATP, ADP, serotonina, substancja P, stymulacja α 2-adrenergiczna, bradykinina, angiotensyna II, endotelina 1, histamina) (65,113).

Główny mechanizm modyfikujący działanie układu krążenia w celu zaspokojenia potrzeb tkanek obwodowych jest zależny od aktywności śródbłonna. Pozwala on na specyficzną adaptację łożyska naczyniowego w obszarze aktywnych metabolicznie tkanek. W ten sposób działanie NO jest jednym z najważniejszych mechanizmów wpływających na regulację napięcia naczyń (26,78,80,84).

Rola tlenku azotu w sercu jest bardziej złożona niż w naczyniach krwionośnych. W narządzie tym obecne są wszystkie trzy izoformy NOS. Tlenek azotu wywiera ujemny efekt inotropowy na serce. Początkowo zauważono, podobnie jak w przypadku układu naczyniowego, że usunięcie śródbłonna lub zablokowanie działania NO potencjalizuje mobilizację wapnia w komórkach serca. Jednak tlenek azotu działa zupełnie inaczej na kardiomyocyty niż na komórki mięśniowe gładkie (126). Od działania neuronalnej NOS zależne jest również unerwienie autonomiczne naczyń wieńcowych serca.

Tlenek azotu w tym przypadku współdziała w regulacji przepływu krwi wraz z mechanizmem zależnym od zapotrzebowania metabolicznego oraz zależnym od przepływu krwi.

W nerkach obecne są wszystkie trzy izoformy *NOS*. Tlenek azotu syntetyzowany w nerce bierze udział w regulacji wydalania sodu i wydzielania reniny. Ze względu na obecność poszczególnych izoform *NOS* w różnych częściach nerki (śródbłonek naczyń, nabłonek kłębuszków, nabłonek cewek) bardzo trudno jest dokładnie określić rolę odpowiednich izoform *NOS* w funkcji wydalniczej sodu i wydzielniczej reniny oraz w działaniu kłębuszków i cewek nerkowych. *In vivo* wzrost sekrecji NO wydaje się zwiększać sekrecję reniny, jednak zjawisko to jest trudne do wykazania w warunkach *in vitro*. Fizjologiczną odpowiedzią na dużą dawkę antagonistów argininy (\downarrow NO) jest spadek przepływu nerkowego, spadek filtracji kłębuszkowej, zmniejszenie wydalania sodu i pojawienie się znacznej proteinurii. Każde zaburzenie w układzie tlenku azotu wiąże się ze zwiększeniem retencji sodu i wody, mimo iż dokładna zależność między tlenkiem azotu a powyższym efektem nie jest dokładnie poznana. W nadciśnieniu tętniczym, gdzie obserwowany jest niedobór NO, dochodzi również do zaburzonego wydalania sodu.

1.1.5. CZĄSTECZKI DOCELOWE DLA NO

Tlenek azotu jest przykładem cząsteczki odmiennego sposobu przekazywania sygnału, który zdecydowanie różni się od standardowego procesu polegającego na syntezie, wydzieleniu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i połączeniu z odpowiednim receptorem komórki docelowej. Jest to biochemicznie prosta cząsteczka gazu (rodnik tlenowy), która z łatwością wiąże się kowalencyjnie z kilkoma molekułami docelowymi, podczas gdy standardowe przekaźniki posiadają ściśle określoną strukturę i wymagają obecności specyficznych dla siebie miejsc wiążących na cząsteczce receptorowej. Tlenek azotu nie jest magazynowany w wakuolach wewnątrzkomórkowych i swobodnie dyfunduje z miejsca syntezy, a ponadto jest rozpuszczalny zarówno w środowisku wodnym jak i lipidowym, co umożliwia mu wolne przechodzenie z jednej komórki do drugiej (53).

Tlenek azotu ma wiele cząsteczek docelowych: wiąże się kowalencyjnie z resztą hemową białek, reaguje z wolnymi rodnikami tworząc nadtlenki azotu, reaguje z atomami żelaza lub miedzi zawartymi w cząsteczkach enzymów oraz wiąże wolne grupy tiolowe ($-SH$) licznych białek.

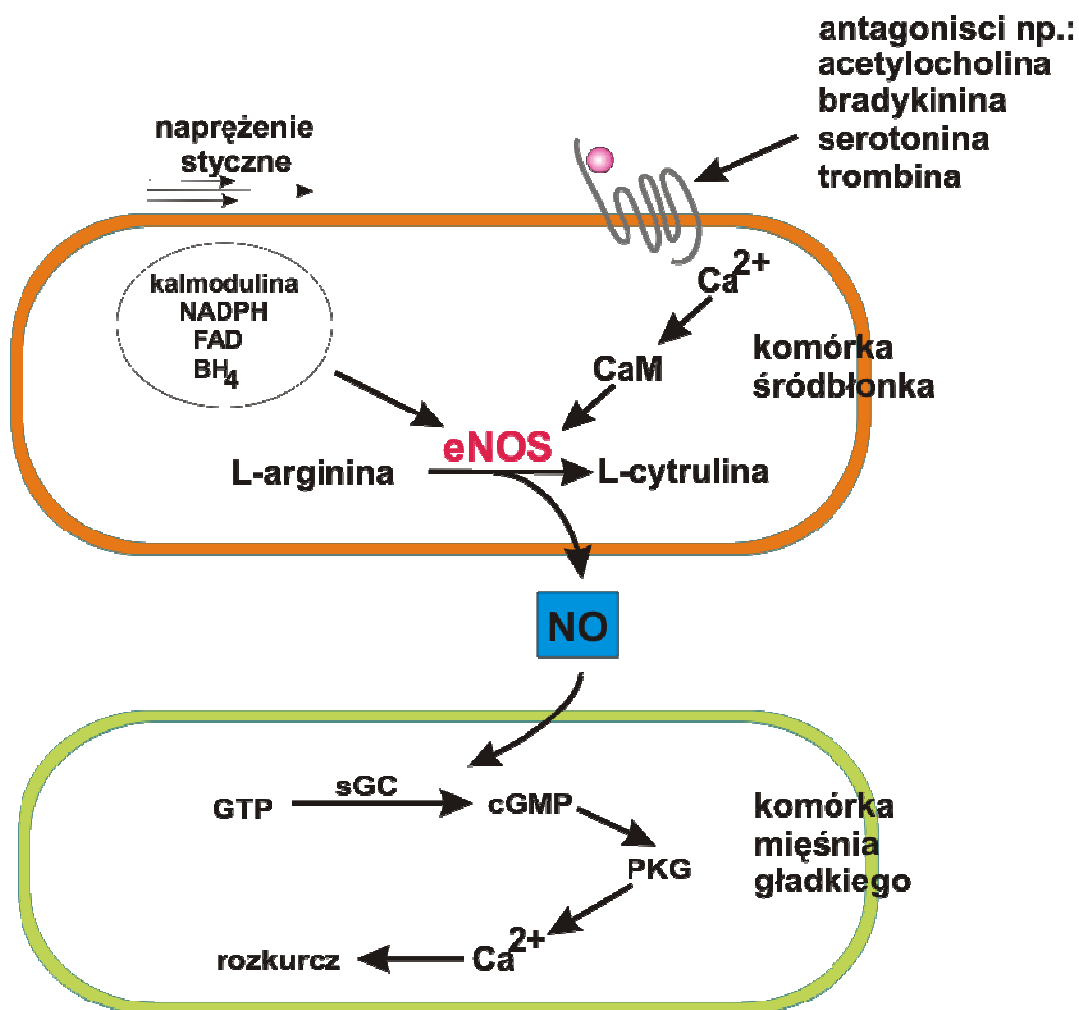
Główną cząsteczką docelową NO w układzie sercowo-naczyniowym jest reszta hemowa cyklazy guanylowej (GC – *guanylate cyclase*, EC 4.6.1.2) (główny wewnątrzkomórkowy wtórny przekaźnik NO). Enzym ten jest heterodimerem utworzonym przez dwie podjednostki, $\alpha 1$ i $\beta 1$. Tlenek azotu wiąże się kowalencyjnie z atomem żelaza zawartym w reszcie hemowej cyklazy guanylowej, co powoduje rozrywanie wiązania pomiędzy żelazem i histydyną pierścienia protoporfirynowego, allosteryczne przemieszczenie części histydynowej i zmianę konformacyjną cząsteczki cyklazy guanylowej (91).

Cyklaza guanylowa zdolna do syntezy cGMP występuje w dwóch postaciach, rozpuszczalnej (sGC – *soluble guanylate cyclase*) i stałej. Forma rozpuszczalna, jak to zostało opisane powyżej jest wrażliwa na stężenie tlenu azotu. Forma stała natomiast jest transmembranalną proteiną z jedną domeną zewnątrzkomórkową będącą miejscem wiążącym dla przedsionkowego peptydu natriuretycznego (ANP – *atrial natriuretic peptide*) oraz z domeną wewnątrzkomórkową regulującą aktywność cyklazy guanylowej. W momencie związania ANP z stałą formą cyklazy guanylowej cGMP jest syntetyzowany i dochodzi do wzrostu wydalania sodu przez nerki.

W głównej mierze NO wywiera swoje działanie wewnątrzkomórkowe poprzez cGMP. Podobnie jak w przypadku cAMP, wewnątrzkomórkowy metabolizm cyklicznego GMP odbywa się przy udziale fosfodiesterazy. Komórki mięśni gładkich ściany naczyń zawierają typ V fosfodiesterazy specyficzny dla cGMP. Jej właściwości zmniejszające wewnątrzkomórkowe stężenie cGMP potencjalizuje działanie efektorowe tej cząsteczki (cGMP), a tym samym miorelaksacyjne działanie tlenu azotu. Oprócz typu V obecny jest w tych komórkach również typ III fosfodiesterazy, dla którego cAMP i cGMP są substratami kompetycyjnymi. Białkiem efektorowym dla cGMP w komórce mięśniowej gładkiej jest cGMP-zależna kinaza białek (PKG, kinaza G, izoforma I). Kinaza ta fosforyluje kilka specyficznych dla siebie protein wywołując efekt miorelaksacyjny komórki. PKG jest enzymem specyficznym dla komórki mięśniowej gładkiej i występuje w niej w dużej ilości. Obecność PKG stwierdza się w cytozolu także przy braku cGMP, ale pozostaje ona w formie niezaktywowanej. Po przyłączeniu cGMP do cząsteczki PKG dochodzi do zmiany allostruktury enzymu i odłączenia pseudosubstratu od miejsca katalitycznego enzymu, który przechodzi w formę zaktywowaną. Przyłączenie cGMP do cząsteczki enzymu jest odwracalne (53,82).

Receptory dla związków wazoaktywnych obecne są zarówno na powierzchni komórek śródbłonna, jak i mięśniowych gładkich. Interakcja ligandu ze specyficznym dla siebie receptorem prowadzi do zwiększenia uwalniania NO i pośrednio do rozszerzenia naczynia, interakcja tego samego ligandu z receptorem na komórce mięśniowej gładkiej wywołuje bezpośredni efekt skurczowy naczynia (122). Zjawisko to jest wynikiem aktywacji przez peptyd lub aminę tej samej wewnątrzkomórkowej ścieżki przewodzenia sygnału w obydwu komórkach. Związki wazoaktywne łączą się z receptorem zawierającym 7 domen transbłonowych (7-transmembrane domain receptor) połączonym z układem fosfolipazy C przez białko G. Enzym ten katalizuje powstawanie z błonowych fosfolipidów rozpuszczalnego w cytoplazmie fosfatydyloinozytolu oraz lipofilnego diacyloglicerolu. Fosfatydyloinozytol jest wtórnym przekaźnikiem pobudzającym mobilizację wapnia wewnątrzkomórkowego z siateczki sarkoplazmatycznej i prowadzi do otwarcia zależnych od napięcia dokomórkowych kanałów wapniowych. Aktywacja tego szlaku w komórce śródbłonna zwiększa aktywność zależnej od kompleksu Ca-kalmodulina syntazy tlenku azotu (*NOS*), natomiast w komórce mięśniowej gładkiej prowadzi do zależnego od wapnia skurczu komórki. W tym mechanizmie peptyd, amina lub inna substancja wazoaktywna może wywoływać efekt pośredni rozkurczowy (przez śródbłonek) lub bezpośredni skurczowy na mięśniówkę gładką naczynia. Inne typy tego receptora są także zdolne aktywować syntezę NO w śródbłonku (29, 30).

PKG, jak to było już wspomniane wcześniej, posiada wiele białek docelowych w komórce mięśniowej gładkiej, spośród których część na pewno nie została jeszcze zidentyfikowana. Jednym z białek docelowych PKG jest fosfolamban powiązany z Ca-ATPazą reticulum sarkoplazmatycznego. Białko to po ufosforylowaniu przy udziale PKG odpowiedzialne jest za aktywację Ca-ATPazy, która nasila aktywny transport jonów Ca z cytozolu. Prowadzi to w konsekwencji do obniżenia poziomu wapnia wewnątrz komórki (53).



Ryc. 4. Schemat relaksacji komórek mięśniowych pod wpływem działania NO.

1.2. RODZINA ENDOTELINY

Endotelina (ET - *endothelin*) jest hormonem parakrynnym występującym w trzech izoformach – ET1, ET2 oraz ET3 różniących się od siebie strukturą. Jest syntetyzowana w komórkach śródbłonki naczyń, mózgu, nerek, jelita, gruczołach wydzielania wewnętrznego, w komórkach endometrium i łożyska, hepatocytach, pneumocytach typu II, komórkach Sertoliego oraz w odpowiedzi na zapalenie również przez komórki krwi. Ekspresja endoteliny jest regulowana przez wiele różnorodnych czynników. Wzrost jej wydzielania zachodzi pod wpływem stymulacji hormonalnej (katecholaminy, angiotensyna II, kortyzol, insulina, wazopresyna), czynników fizykochemicznych (hipoksja, hiperkapnia, kwasica, niedokrwienie) oraz przy udziale trombiny, glukozy, czynników wzrostu i endotoksyn. Natomiast za hamowanie jej syntezy odpowiadają bradykinina, prostacyklina, heparyna,

tlenek azotu, prostaglanyna E2 oraz przedsionkowy peptyd natriuretyczny. Miejscem ich metabolizmu są w głównej mierze płuca oraz wątroba i nerki (36,48,79).

Endoteliny są peptydami zbudowanymi z 21 aminokwasów. Ich struktura chemiczna jest podobna do sarafotoksyny – składnika jadu węża *Actractuspis engaddenensis*. Peptydy te silnie zwężają naczynia krwionośne, a efekt naczynioskurczowy jest znamienne długotrwały i utrzymuje się przez 45-60 minut. Farmakologicznie reakcje wywołane przez endotelinę można podzielić na dwie klasy. Pierwszy typ reakcji obejmuje zwężenie naczyń, oskrzeli i stymulację wydzielania aldosteronu. W tym typie reakcji silniej działają ET-1 i ET-2. Drugi typ reakcji obejmuje przejściowe rozszerzenie naczyń, a wszystkie trzy rodzaje ET mają prawie równą siłę działania. Endotelina 1 jest najsilniejszym jak dotąd zidentyfikowanym czynnikiem zwężającym naczynia. Wydaje się, że żyły bardziej niż tętnice są wrażliwe na działanie ET-1. Zróżnicowaną wrażliwość mogą także wykazywać łożyska naczyniowe poszczególnych narządów organizmu ludzkiego. Endotelina wyizolowana została po raz pierwszy w warunkach hodowli komórek śródbłonna naczyń. Nie znaleziono różnic gatunkowych między izoformami ET ludzkiej, wieprzowej, szczurzej, wołowej czy psiej. Uważa się, że u człowieka najbardziej znaczącym fizjologicznie izopeptydem jest ET-1 produkowana przede wszystkim przez komórki śródbłonnów naczyniowych, obecna także w komórkach mózgu, nerkach, płucach.

Receptor ET-A odpowiada za pierwszy typ reakcji i jest dominującym typem receptora na mięśniówce gładkiej naczyń. Receptor ET-B odpowiada za drugi typ reakcji i znajduje się między innymi na komórkach śródbłonkowych (27, 41). Kolejność powinowactwa dla receptora ET-A to: $ET-1 \geq ET-2 > ET-3$. Receptory ET-B mają jednakowe powinowactwo do wszystkich trzech izoform endoteliny (102).

Produkcja prepro-ET-1 jest pobudzana przez wiele czynników takich jak: angiotensyna II, wazopresyna, adrenalina, czynniki wzrostu, interleukinę 1, TNF, insulinę, niedotlenienie, stres, endotoksyny, trombinę. Prekursor nie jest magazynowany w ziarnistościach wewnątrzkomórkowych, zaś czynna biologicznie „dojrzała” ET-1 jest efektem działania enzymu błonowej metaloproteazy. Znaczenie ET-1 jako krążącego hormonu pozostaje jeszcze nie w pełni wyjaśnione, lecz na pewno wykracza poza oddziaływanie na układ sercowo-naczyniowy. Obecnie wiadomo, że ET-1 bierze udział w utrzymywaniu przepływu krwi w małych, peryferyjnych naczyniach oporowych w sposób parakryny i może odgrywać rolę w utrzymywaniu hemodynamicznej homeostazy poprzez zmianę dystrybucji krwi w ustroju (71, 96). Endotelinę 1 należy uznać raczej za miejscowy

czynnik regulujący niż za hormon krążący, ponieważ ET-1 może być uwalniana preferencyjnie w kierunku mięśniówki gładkiej naczynia, a nie kierunku światła naczynia. Stanowi to poważny dowód, że krążące stężenia ET-1 nie odzwierciedlają rzeczywistego, miejscowego stężenia tego peptydu w ścianie naczynia krwionośnego. Istotnie, w hodowanych komórkach śródbłonna dwa razy więcej ET-1 jest uwalniane poza światło naczynia niż do jego wnętrza (31, 124). Wydaje się, że żyły bardziej niż tętnice są wrażliwe na działanie endoteliny 1.

Produkcja endoteliny przebiega w kilku etapach. Są syntetyzowane pod postacią nieaktywnych preproendoteliny (ppET) zbudowanych z 212 reszt aminokwasowych. Wewnątrzkomórkowo ulegają przekształceniu w proendoteliny (tzw. „duże endoteliny”, bigET) zawierające 38-39 (ET-1), 37-38 (ET-2), 41 (ET-3) aminokwasów. Endotelina 1 powstaje w wyniku proteolizy wiązania 21-Trp i 22-Val. Przemiana „dużych endoteliny” zachodzi wewnątrz- i zewnątrzkomórkowo przy udziale enzymu konwertującego endoteliny (*endothelin-converting enzyme*, ECE) zależnego od jonów cynku. Synteza endoteliny przebiega już po około 10-15 minutach od pobudzenia komórki, które nie mają zdolności do jej gromadzenia (36, 79).

Endoteliny działają poprzez dwa rodzaje receptorów związanych z białkami G: ET-A oraz ET-B. Gen dla receptora ET-A znajduje się na chromosomie 4 (4q31.2), natomiast dla receptora ET-B na chromosomie 13 (13q22). Połączenie z receptorem ET-A prowadzi do wzrostu śródkomórkowego stężenia jonów wapnia i warunkuje skurcz komórki mięśniowej gładkiej. Natomiast aktywacja receptora ET-B stymuluje syntezę tlenku azotu i zmniejsza wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia, jednak w dalszym ciągu przeważa efekt wazokonstrykcyjny endoteliny. Ekspresja receptorów ET-A jest największa w komórkach mięśni gładkich i sercu, natomiast ET-B w komórkach śródbłonna i komórkach mięśniowych, a także w nerwie. Ponadto receptory dla endoteliny zlokalizowano w płucach, ośrodkowym układzie nerwowym, nadnerczach oraz skórze (48, 36, 43).

Najlepiej poznaną izoformą jest endotelina-1. Bierze ona udział w proliferacji i różnicowaniu komórek, utrzymywaniu równowagi kwasowo-zasadowej, funkcjonowaniu układu krążenia, jest zaangażowana w procesy zapalne, hemostazę oraz proces gojenia ran. Sugeruje się jej udział w patogenezie licznych chorób. Zwiększone stężenie tego białka obserwuje się u chorych z zawałem serca, pierwotnym nadciśnieniem tętniczym, ostrą niewydolnością nerek, astmą oskrzelową, ostrym zapaleniem trzustki, nabytymi wadami serca, cukrzycą, zespołem rozsianego krzepnięcia wewnątrznaczyniowego oraz twardziną

układową. Ponadto endotelina bierze udział w progresji czerniaka złośliwego. Niewątpliwa jest również rola tego peptydu w patogenezie nadciśnienia indukowanego ciążą (12, 79, 48, 36).

W początkowym okresie ciąży tętnice spiralne przekształcają się z naczyń o grubej mięśniówce w naczynia o elastycznej ścianie, ulegają wydłużeniu i poszerzeniu. Trofoblast niszczy ich warstwę mięśniową. Ma to na celu zmianę systemu wysokooporowego w niskooporowy, zapewniający prawidłową perfuzję łożyskową. W ciąży prawidłowej migracja trofoblastu odbywa się w dwóch etapach. W drugim etapie fala migracji trofoblastu obejmuje naczynia spiralne w obrębie doczesnej, jak i w obszarze mięśniowym. W etiopatogenezie nadciśnienia indukowanego ciążą tętnice spiralne nie ulegają przebudowie, inwazja trofoblastu jest ograniczona jedynie do naczyń doczesnej. Ostatecznie prowadzi to do niedotlenienia łożyska. Niedotlenienie skutkuje uszkodzeniem śródbłonna naczyń, co zaburza równowagę produkcji czynników wazodylatacyjnych (NO, prostacyklina) i wazokonstrykcyjnych (endotelina, tromboksan A₂), a tym samym zwiększa się opór naczyniowy i rozwija nadciśnienie. Ponadto w nadciśnieniu indukowanym ciążą zwraca uwagę zmniejszona wrażliwość naczyń na substancje rozszerzające naczynia, w tym przede wszystkim na NO. Niedotlenienie łożyska prowadzi do hipoksji, co wzmacnia uwalnianie czynnika martwicy guza oraz interleukiny-1 – substancje te znacznie hamują aktywność syntetazy NO, pogłębia to nieprawidłową przewagę czynników naczyniokurczących. Towarzyszy temu wzrost ekspresji receptora dla VEGF, ale jednocześnie spadek jego stężenia, prowadzi to do upośledzenia łożyskowej angiogenezy i jeszcze bardziej ogranicza przepływ maciczno – łożyskowy 95).

W ciąży aktywność układu syntetyzującego tlenek azotu (L-arginina – NO – cGMP) jest bardzo duża, co hamuje skurcze macicy. W miarę zbliżania się terminu porodu aktywność tego układu spada, ma to prawdopodobnie znaczenie w mechanizmie rozpoczęcia porodu. Wzrost syntezy tlenu azotu w przebiegu ciąży jest wynikiem działania syntazy NO wykrytej w mięśniu macicy i syncytiotrofoblaście, która to jest pobudzana wysokim stężeniem estradiolu (8).

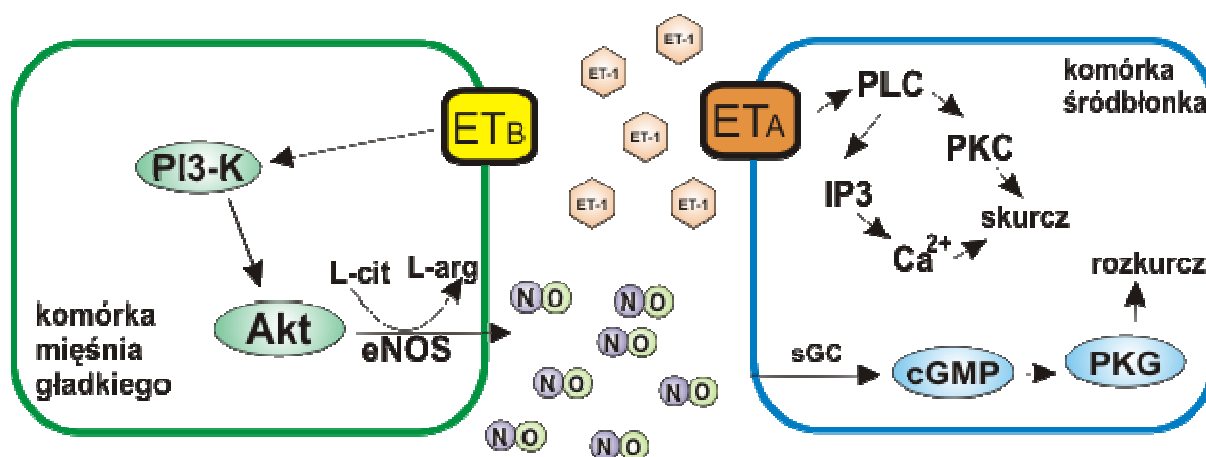
Endotelina-1 wpływa również na skurcz naczyń w czasie porodu. Wykazano jej obecność w doczesnej łożyska, trofoblaście kosmówkowym i pozakosmówkowym, a także w pozanaczyniowych tkankach endometrium, co ma istotny związek z obkurczaniem się naczyń spiralnych. Nie do końca określone jest pierwotne źródło endoteliny w tych tkankach. Przypuszczalnie są to naczynia płodu, a nie naczynia łożyska, ponieważ wykazano wyższe

stężenie endoteliny-1 w żyłę pępowinowej niż we krwi matki. Prawdopodobnie sam płód syntetyzuje to białko w odpowiedzi na hemodynamiczne zmiany zachodzące w czasie czynności skurczowej macicy. Potwierdza to fakt wyższego stężenia endoteliny w żyłę pępowinowej u kobiet z rozpoczętą czynnością skurczową macicy niż u kobiet, u których ciążę rozwiązano elektywnym cięciem cesarskim (przed rozpoczęciem czynności skurczowej), jednakże we krwi obwodowej stężenie to pozostaje takie samo w obu grupach kobiet. Pewnym jest natomiast fakt, że endotelina-1 reguluje przepływ krwi w jednostce łożyskowo-płodowej (8, 124).

1.2.1. FIZJOLOGICZNE DZIAŁANIE UKŁADU NO-ET-1

Układ krew-śródbłonek, w aspekcie fizjologicznym i farmakologicznym, stanowi funkcjonalną jednostkę komunikującą się z przedziałem efektorowym, którym jest mięśniówka ściany naczynia. Śródbłonek, jako najbardziej wewnętrzna warstwa naczynia stanowi powierzchnię, przez którą przekazywane są sygnały do krwioobiegu lub do komórek mięśni gładkich ściany naczynia. Komunikacja w układzie sercowo-naczyniowym odbywa się m. in. przy udziale cząsteczek sygnałowych, które dana komórka przetwarza i generuje nową molekułę przekazującą sygnał do następnej komórki, a cząsteczki o działaniu endokrynowym lub parakrynowym odgrywają w nim istotną rolę. Intensywność naprężenia moduluje ilość wytwarzanego przez śródbłonek NO, który odgrywa ważną rolę w regulacji podstawowego napięcia ściany naczynia oraz w jej adaptacji do zwiększonego zapotrzebowania energetycznego tkanek otaczających.

Tlenek azotu (NO), endotelina oraz naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) są czynnikami w istotny sposób warunkującymi niepowikłany przebieg ciąży i optymalne wzrastanie płodu, między innymi poprzez wpływ na prawidłowy rozwój jednostki maciczno-łożyskowej, angiogenezę, napięcie mięśni macicy podczas ciąży i tuż przed jej zakończeniem oraz obkurczanie się naczyń pępowinowych w czasie porodu. Zaburzenie równowagi ich działania odgrywa bardzo ważną rolę w etiopatogenezie między innymi stanu przedrzucawkowego (54, 69, 29, 95). W pracy Baksu i wsp. wykazano, że ważną rolę patogenetyczną w rozwoju preeklampsji pełni nie tylko samo zwiększone stężenie endoteliny-1, ale również obniżone stężenie tlenu azotu, a tym samym zaburzona równowaga tych dwóch substancji u ciężarnych w stanie przedrzucawkowym. Do podobnych wniosków skłaniają się również autorzy pracy Khetsuriani i wsp. (5, 51) (ryc. 5).



Ryc. 5. Schemat działania układu NO-ET-1.

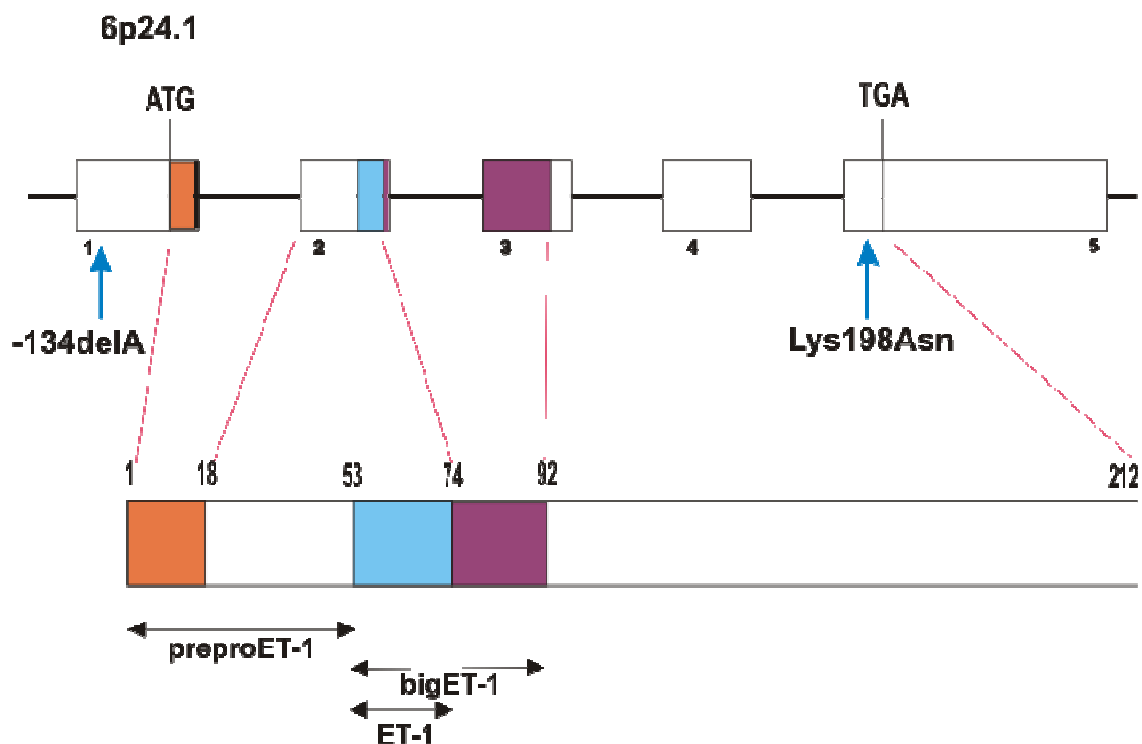
Schemat przedstawiający współdziałanie układu tlenek azotu – endotelina-1 (NO-ET-1) przedstawia ryc. 6. W układzie naczyniowym NO bezpośrednio aktywuje rozpuszczalną cyklazę guanylanową (sGC) prowadząc do powstawania cyklicznego GMP (cGMP). Wzrost wewnątrzkomórkowego cyklicznego GMP powoduje redukcję wewnątrzkomórkowej puli Ca^{2+} , jak również aktywację kinazy białkowej G (PKG). W klasycznym szlaku sygnalizacyjnym ET-1, endotelina 1 stymuluje produkcję NO w komórkach endotelialnych poprzez aktywację *eNOS*. Zachodzi to poprzez aktywację receptorów ETB i szlak PI3-K/Akt, który z kolei stymuluje fosforylację *eNOS* z dalszą produkcją NO. ET-1 łącząc się z receptorem ETA aktywuje fosfolipazę C (PLC), która katalizuje hydrolizę fosfatydyloinozylo-4,5-bisfosforanu (PIP_2) tworząc inozytolo-1,4,5- trifosforan (IP3) i 1,2-diacyloglicerol (DAG). IP3 dyfunduje do specyficznych receptorów na powierzchni reticulum endoplazmatycznego i uwalnia zmagazynowany Ca^{2+} do cytoplazmy. Natomiast DAG w obecności jonów wapnia aktywuje kinazę białkową C (PKC) (47).

Stan hemodynamiczny w preeklampsji w przeciwieństwie do ciąży prawidłowej charakteryzuje się małą objętością krwi, wysokim ciśnieniem i wysokim oporem naczyniowym. Ciśnienie tętnicze może wzrastać w wyniku zmniejszonego uwalniania związków rozszerzających naczynia i/lub poprzez zwiększenie produkcji czynników zwężających naczynia. Zmiany we wzajemnej proporcji PGI_2 i TXA_2 oraz NO i ET-1 w wyniku zaburzonej funkcji śródbłonna naczyń, mogą przybrać postać zmian hemodynamicznych, jakie obserwuje się w preeklampsji (14, 81).

1.2.2. BUDOWA GENU ET-1

Izoformy endoteliny (ET-1, ET-2, ET-3) są kodowane przez trzy odrębne geny. Gen dla ET-1 znajduje się na 6 chromosomie (6p23-p24), składa się z pięciu egzonów o długości 6,84 kb mRNA, dla ET-2 na chromosomie 1 (1p34.2, 5 egzonów o długości 5,9 kb mRNA), natomiast gen dla ET-3 jest zlokalizowany na chromosomie 20 (20q13.2-q13.3, 6 egzonów o długości 25,5 kb mRNA).

Polimorfizm inercyjno-delecyjny -3A/4A znajduje się w regionie niepodlegającym translacji (5'UTR) eksonu 1. Natomiast polimorfizm spowodowany zamianą guaniny na tyminę w pozycji nukleotydowej 5665, powodujący zmianę sekwencji aminokwasowej białka (*Lys198Asn*) zlokalizowany jest w eksonie 5. Schemat budowy genu *EDN1* oraz badane w prezentowanej pracy polimorfizmy przedstawione są na ryc. 6.



Ryc. 6. Schemat budowy oraz lokalizacja badanych w pracy polimorfizmów genu *EDN-1*.

2. CEL PRACY

Celem pracy była ocena częstości występowania polimorfizmów genetycznych wybranych genów układu tlenek azotu (NO) – endotelina 1 (ET-1) i ich znaczenia w rozwoju stanu przedrzucawkowego i nadciśnienia ciążowego.

Cel ten realizowano poprzez:

1. Analizę częstości występowania genotypów i alleli genu syntazy tlenku azotu (*NOS3*) w zakresie polimorfizmu *Glu298Asp* oraz *-786T>C* w grupie badanej kobiet z nadciśnieniem w ciąży oraz grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych,
2. Analizę częstości występowania genotypów i alleli genu endoteliny 1 (*EDN1*) w zakresie polimorfizmu *Lys198Asn* oraz *-134delA* w grupie badanej kobiet z nadciśnieniem w ciąży oraz grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych,
3. Analizę współwystępowania poszczególnych genotypów w grupie badanej kobiet z nadciśnieniem w ciąży oraz grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych,
4. Analizę wybranych parametrów biochemicznych w grupie kobiet z nadciśnieniem w ciąży
5. Analizę korelacji badanych w pracy polimorfizmów genetycznych z parametrami biochemicznymi w grupie kobiet z nadciśnieniem w ciąży.

3. MATERIAŁ I METODYKA

3.1. GRUPY BADANYCH PACJENTEK

Do grupy badanej i kontrolnej pacjentki ciężarne kwalifikowano w obrębie Oddziału Porodowego Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego nr 3 ul. Polna 33 w Poznaniu oraz Oddziału Położniczego I i III Kliniki Perinatologii i Chorób Kobięcych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w okresie od stycznia 2006 roku do kwietnia 2009 roku. Wszystkie objęte badaniem pacjentki zostały poinformowane o celu i zakresie badań oraz wyraziły na nie pisemną zgodę. Na przeprowadzenie badań uzyskano również akceptację Komisji Bioetycznej UM w Poznaniu nr 902/03.

GRUPA BADANA

W grupie badanej analizą objęto 110 kobiet z nadciśnieniem w ciąży (średni wiek $29,46 \pm 4,54$ lat, średni wiek ciążowy $36,88 \pm 3,50$ tyg., średnie skurczowe ciśnienie tętnicze $167,82 \pm 16,87$ mmHg). Klasyfikacja kobiet do grupy badanej została przeprowadzona według kryteriów zalecanych przez Amerykańskie Towarzystwo Położników i Ginekologów (ACOG – *American College of Obstetrician and Gynecologists*). W tej grupie kobiet wartości skurczowego ciśnienia tętniczego wynosiły $\geq 140/90$ mmHg, potwierdzone co najmniej dwukrotnym pomiarem w sześciogodzinnym odstępie czasu, białkomocz ≥ 30 mg% w przypadkowej próbce moczu lub ≥ 300 mg w dobowej zbiorce moczu. W badanej grupie wyodrębniono ciężarne prezentujące objawy nadciśnienia ciążowego (GH) w liczbie 69 oraz ciężarne z rozwiniętym stanem przedrzucawkowym (PE) w liczbie 41. U wszystkich kobiet z tej grupy potwierdzono pojawienie się wyższego ciśnienia tetniczego i białkomoczu po 20 tygodniu czasu trwania ciąży. Pomiar ciśnienia tętniczego przeprowadzano po co najmniej 30 min. odpoczynku, w pozycji siedzącej lub leżącej na lewym boku. U wszystkich kobiet z tej grupy potwierdzono ciążę pojedynczą. Z badań zostały wykluczone pacjentki z ciążą wielopłodową, cukrzycą, zmianami naczyniowymi oraz powikłaniami zakrzepowymi.

W grupie badanej odnotowywano: wartości ciśnienia tętniczego, oznaczenia laboratoryjne w surowicy krwi (wartość mocznika, kwasu moczowego, azotu mocznikowego – BUN, białka całkowitego, poziomu elektrolitów: sodu, potasu, chloru), wartości białka w moczu, wzrost, masę ciała i wskaźnik masy ciała (BMI – *body mass index*). Ponadto odnotowywano stan urodzeniowy noworodka, dane dotyczące wywiadu położniczego oraz przebiegu ciąży i porodu.

GRUPA KONTROLNA

Jako grupę kontrolną przeanalizowano 150 zdrowych kobiet ciężarnych (średni wiek 28,29±4,40 lat, średni wiek ciążowy 39,06±1,28 tyg., średnie ciśnienie skurczowe 112,07±10,75 mmHg). Do grupy kontrolnej kwalifikowano kobiety z prawidłowym ciśnieniem tętniczym <140/90 mmHg, bez obecności chorób internistycznych, nieprawidłowości chromosomalnych lub wad wrodzonych u płodu, z potwierdzoną ciążą pojedynczą.

W grupie kontrolnej odnotowywano: wartości ciśnienia tętniczego, wzrost i masę ciała, wskaźnik masy ciała. Po porodzie zbierano dane dotyczące stanu urodzeniowego noworodka, dane dotyczące wywiadu położniczego oraz przebiegu ciąży i porodu.

U wszystkich badanych kobiet z obydwu grup wiek ciążowy potwierdzano w oparciu o datę ostatniej miesiączki, regularność cykli miesięcznych, datę pierwszych ruchów płodu podawaną przez ciężarną, badanie ultrasonograficzne przeprowadzane w I trymestrze ciąży, jak również kolejne badania ultrasonograficzne w II połowie ciąży. Odnotowane wartości wskaźnika BMI przed ciążą były oparte na masie ciała podawanej przez ciężarną. Wskaźnik BMI kalkulowano jako iloraz masy ciała do kwadratu wzrostu i podawano w kg/m² (niedowaga <19,9, prawidłowa masa ciała 20,0-24,9, nadwaga 25,0-29,9 oraz otyłość >30,0 kg/m²).

Ciśnienie tętnicze krwi w grupie badanej i kontrolnej mierzone było sfigmomanometrem zgodnie ze standaryzowanym protokołem. Mankiet sfigmomanometru dobierany był tak, żeby stanowił 40% średniego obwodu kończyny górnej (średnio szerokości 12-14 cm), zakładany był na wysokości serca 2-3 cm nad zgięciem łokciowym. Za ciśnienie skurczowe przyjmowano I fazę Korotkowa (pierwszy słyszalny ton serca). Ciśnienie rozkurczowe było odczytywane zgodnie z V fazą Korotkowa (moment zaniknięcia tonów serca). U niektórych ciężarnych przy ciśnieniu hiperkinetycznym ciśnienie rozkurczowe odczytywano zgodnie z IV fazą Korotkowa (moment ściszenia tonów serca).

Dane kliniczne i wartości ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego w obydwu grupach ciężarnych zostały zebrane w tabeli 1.

Tab. 1. Dane kliniczne pacjentek z grupy badanej i kontrolnej.

	<i>Nadciśnienie w ciąży</i>	<i>Grupa kontrolna</i>	<i>p</i>
<i>Wiek ciężarnej (lata)</i>			
<i>średnia ± SD</i>	29,46±4,54	28,29±4,40	ns
<i>mediana</i>	29	28	
<i>min/max</i>	18/38	17/41	
<i>Tydzień zakończenia ciąży (tydz.)</i>			
<i>średnia ± SD</i>	36,88±3,50	39,06±1,28	<0,0001
<i>mediana</i>	38	39	
<i>min/max</i>	27/42	37/42	
<i>RR skurczowe (mmHg)</i>			
<i>średnia ± SD</i>	167,82±16,87	112,07±10,75	<0,001
<i>mediana</i>	170	110	
<i>min/max</i>	140/220	85/140	
<i>RR rozkurczowe (mmHg)</i>			
<i>średnia ± SD</i>	104,32±11,62	70,62±9,13	<0,001
<i>mediana</i>	100	70	
<i>min/max</i>	70/140	50/95	

3.2. METODYKA

Do oznaczenia badanych w pracy polimorfizmów genetycznych pobrano od każdej z pacjentek 3-4 ml krwi z żyły odłokciowej do probówek S-Monovette (Sarstedt, Niemcy) z żelem zawierającym antykoagulant K₂EDTA (sól dwupotasową kwasu etylenodiaminotetraoctowego). Probówki z krwią były przechowywane do czasu izolacji zamrożone w temperaturze -20°C.

W grupach badanej i kontrolnej oznaczono częstość występowania czterech polimorfizmów genetycznych: dwóch w genie kodującym enzym syntazę tlenku azotu (*NOS3*) oraz dwóch w genie endoteliny 1 (*EDNI*). Charakterystykę badanych polimorfizmów przedstawiono w tabeli 2.

Tab. 2. Charakterystyka polimorfizmów badanych w pracy.

<i>Gen</i>	<i>Pozycja genu na chromosomie</i>	<i>Zmiana nukleotydu</i>	<i>Zmiana sekwencji białka</i>	<i>dbSNP</i>
<i>NOS3</i>	7p35-36	894G>T	<i>Glu298Asp</i>	rs1799983
		-786T>C	—	rs2070744
<i>EDNI</i>	6p23-24	-134delA	—	rs10478694
		5665G>T	<i>Lys198Asn</i>	rs5370

Do badań zastosowano reakcję łańcuchowej polimerazy (PCR - *polymerase chain reaction*) oraz metodę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP – *restriction fragment length polymorphism*).

3.2.1. IZOLACJA DNA

DNA otrzymywano z leukocytów krwi za pomocą zestawu do izolacji QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Inc., Niemcy). W próbówce 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 próbówki zawierającej kolumnę ze złożem krzemionkowym. Następnie próbówkę wirowano 1 minutę przy obrotach 8000 rpm. Kolumnę przenoszono do nowej próbówki, 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.

3.2.2. OZNACZANIE JAKOŚCI I ILOŚCI PREPARATÓW DNA

Istotne dla dalszej analizy genetycznej jest stężenie i czystość wyizolowanego DNA, które sprawdzano spektrofotometrycznie oraz poprzez elektroforezę w żelu agarozowym. Stężenie otrzymanego preparatu DNA obliczano z pomiaru absorpcji przy długości fali 260 nm określanej jako gęstość optyczna (OD *ang. optical density*).

Przyjmuje się, że gdy A260 równa się 1 to stężenie dwuniciowego DNA (dsDNA) wynosi około 50 µg/ml. Jest to wartość przybliżona, ponieważ wartość współczynnika ekstynkcji zależy od składu zasad azotowych w DNA.

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

Stosunek A260/A280 jest natomiast często stosowaną miarą czystości roztworu DNA, a ściślej miarą zanieczyszczenia DNA białkami (maksimum absorpcji UV dla białek wynosi 280 nm). Ogólnie preparat DNA uznaje się za czysty, jeżeli A260/A280 wynosi 1,8-2,0. Jeżeli próbka DNA zanieczyszczona jest RNA to wartość A260/A280 jest bliższa 2,0 natomiast gdy białkami to wartość ta jest niższa niż 1,8. W przypadku przekroczenia opisanych zakresów absorbancji DNA izolowano ponownie.

Otrzymany DNA sprawdzano również poprzez elektroforezę na 0,8% żelach agarozowych, w których uzyskiwano pojedynczy prążek genomowego DNA.

3.2.3. POLIMORFIZM *GLU298ASP* SYNTAZY TLENKU AZOTU

Do przeprowadzenia reakcji PCR o objętości końcowej 25µl pobierano 25 ng DNA, 2,5 µl buforu 10 x Taq Bufor z (NH₄)₂SO₄ (Fermentas, Litwa), 2,5 mM MgCl₂ (Fermentas, Litwa), 0,25 mM dNTP (GeneCraft Niemcy), 0,45 µM startera F i R (TibMolBiol, Polska), których sekwencja została przedstawiona w tabeli oraz 1U Taq polimerazy (TibMolBiol, Polska). Warunki reakcji PCR dla tego polimorfizmu były następujące: denaturacja wstępna 95°C 4 minuty, następnie 35 cykli obejmujących denaturację właściwą 95°C 1 minuta,

wiązanie starterów 64°C 1 minuta, syntezę 72°C 1,5 minuty, po nich następowała synteza końcowa 72°C 10 minut. Reakcje przeprowadzono używając termocyklera PTC200 Programmable Thermal Controller, (MJ Research Inc., USA). Uzyskany produkt wielkości 248 par zasad hydrolizowano enzymem restrykcyjnym *MboI*. W tym celu pobrano 19µl uzyskanego po PCR produktu, 2,5µl buforu 10 x R Bufor (Fermentas, Litwa), 2,5µl sterylnej wody oraz 1µl enzymu *MboI*. Mieszanina była inkubowana w cieplarni (Mettler, Niemcy) przez całą noc w temperaturze 37°C. Po inaktywacji enzymu w 65°C przez 20 minut dodawano bufor obciążający (30% glicerol w wodzie destylowanej, 0,25% bromofenol blue, 0,25% ksylencjanol FF) i наносono próbki na 2% żel agarozowy (TibMolBiol Universal Agarose, Polska). Po wybarwieniu żelu w bromku etydyny odczytywano genotypy według wielkości fragmentów uzyskanych po trawieniu zgodnie z tabelą 3.

Tab. 3. Startery użyte do reakcji PCR.

<i>Gen</i>	<i>Polimorfizm</i>	<i>Sekwencja starterów</i>	<i>Literatura</i>
<i>NOS3</i>	<i>894G>T</i>	F5` AAg gCA ggA gAC AgT ggA Tgg A 3` R5` CCC AgT CAA TCC CTT Tgg TgC TCA 3`	<i>Yoshimura</i> <i>i wsp. 1998</i>
	<i>-786T>C</i>	F5` CCA CCC TgT CAT TCA gTg AC 3` R5` TCT CTg Agg TCT CgA AAT CA3`	<i>Seremak-</i> <i>Mrozikiewicz</i> <i>i wsp. 2005</i>
<i>EDN1</i>	<i>-134delA</i>	F5` TTg TCT ggg gCT ggA ATA AAg TCg3` R 5` CgA gCg TgC CTA CCT gTT TCT g 3`	<i>Rajput</i> <i>i wsp. 2006</i>
	<i>5665G>T</i>	F5`TCA TgA TCC CAA gCT gAA Agg CTA3` R5`ACC TTT CTT ggA ATg TTT TgA AC3`	<i>Castro</i> <i>i wsp. 2007</i>

3.2.4. POLIMORFIZM -786T>C SYNTAZY TLENKU AZOTU

Do amplifikacji fragmentu genu syntezy tlenku azotu zawierającego miejsce tego polimorfizmu w reakcji PCR pobierano: 25 ng genomowego DNA, 2,5 µl buforu, 10 x Taq Bufor z (NH₄)₂SO₄ (Fermentas, Litwa), 2,5 mM MgCl₂ (Fermentas, Litwa), 0,25 mM dNTP (GeneCraft Niemcy), 0,45 µM startera F i R (TibMolBiol, Polska), 1U Taq polimerazy (TibMolBiol, Polska) i uzupełniano sterylną wodą do końcowej objętości 25µl.

Reakcje przeprowadzono używając termocykler Dyad DNA Engine, (BioRad. USA). Warunki dla tej reakcji PCR to: denaturacja wstępna 95°C 4 minuty, następnie 30 cykli (denaturacja 95°C 30 sekund, wiązanie starterów 56°C 30 sekund, synteza 72°C 1 minuta) oraz synteza końcowa 10 minut w temperaturze 72°C. Uzyskany produkt wielkości 296 par zasad hydrolizowano enzymem restrykcyjnym *PdiI*. W tym celu pobrano 19µl uzyskanego po PCR produktu, 2,5µl buforu 10 x Bufor Tango (Fermentas, Litwa), 2,5µl sterylnej wody oraz 1µl enzymu restrykcyjnego *PdiI*. Mieszaninę inkubowano w cieplarni (Mettler Niemcy) przez całą noc w temperaturze 37°C. Po czym inaktywowano enzym w 65°C przez 20 minut i dodawano bufor obciążający. Elektroforezę prowadzono w 2% żelu agarozowym (TiBMolBiol Universal Agarose, Polska) w buforze 1 x TBE (90 mM Tris-base, 90 mM kwas borowy, 2 mM EDTA, pH 8. przy napięciu 250V przez 1 godzinę i 30 minut. Po wybarwieniu żelu w bromku etydyny odczytywano genotypy zgodnie z tabelą 4.

Tab. 4. Wielkości fragmentów po reakcji hydrolizy oraz stosowane enzymy restrykcyjne przy oznaczeniu polimorfizmów genetycznych badanych genów.

mutacja	enzym restrykcyjny (producent)	rozpoznawana sekwencja	wielkość produktu PCR	wielkość fragmentu po trawieniu
894G>T NOS3	<i>MboI</i> (Fermentas, Litwa)	5`...↓GATC...3` 3`...CTAG↑..5`	248 pz	<i>GG</i> 248pz <i>GT</i> 248, 158, 90 pz <i>TT</i> 158, 90 pz
-786T>C NOS3	<i>PdiI</i> (Fermentas, Litwa)	5`...GCC↓GGC...3` 3`...CGG↑CCG...5`	296 pz	<i>TT</i> 296 pz <i>TC</i> 296, 220, 76 pz <i>CC</i> 220, 76 pz
-3A/4A EDN1	<i>BsI</i> (Fermentas, Litwa)	5` CCNNNNN↓NNGG 3` 3` GGNN↑NNNNNCC 5`	434 pz	-3A 222, 212 pz -3A/4A 434, 222, 212 pz -4A 434 pz
Lys198Asn EDN1	<i>NheI</i> (Fermentas, Litwa)	5`...G↓CTAGC...3` 3` CGATC↑G...5`	228 pz	<i>GG</i> 203, 25pz <i>GT</i> 248, 203, 25 pz <i>TT</i> 228 pz

3.2.5. POLIMORFIZMY *-3A/4A* I *Lys198Asn* GENU *EDNI*

Przygotowując reakcje PCR dla polimorfizmów *-3A/4A* i *Lys198Asn* genu endoteliny I pobierano po 25 ng genomowego DNA, 2,5 µl buforu 10 x (TibMolBiol, Polska), 2,5 mM MgCl₂ (TibMolBiol, Polska), 0,25 mM dNTP (GeneCraft Niemcy), 0,45 µM każdego ze starterów dla tych reakcji (TibMolBiol, Polska) (tabela 3) oraz 1U Taq polimerazy (TibMolBiol, Polska). Suma składników każdej z reakcji PCR wynosiła 25µl. Warunki reakcji PCR, które przeprowadzano używając Dyad DNA Engine, (Biorad, USA) były takie same dla tych dwóch polimorfizmów genu endoteliny 1: denaturacja wstępna 95°C 4 minuty, po czym następowało 30 cykli (denaturacja 94°C 30 sekund, wiązanie starterów 60°C 30 sekund, synteza 72°C 1 minuta). Synteza końcowa trwała 10 minut w temperaturze 72°C.

W polimorfizmie *-3A/4A EDNI* uzyskiwano produkt o wielkości 343 par zasad, który poddawano hydrolizie enzymem restrykcyjnym FastDigest *BsII* (Fermentas, Litwa). Do 19µl uzyskanego w reakcji PCR produktu dodawano 2,5µl buforu 10 x FastDigest Bufor (Fermentas, Litwa), 2,5µl sterylnej wody oraz 1µl enzymu *BsII*. Po 5 minutowej inkubacji mieszaniny w temperaturze 37°C w cieplarni (Memmert Niemcy) dodawano bufor obciążający i nakładano próbki na 2% żel agarozowy (TibMolBiol Universal Agarose, Polska). Elektroforezę prowadzono w buforze 1 x TBE przy napięciu 250V przez 1 godzinę i 30 minut. Żel barwiono bromkiem etydyny i odczytywano genotypy zgodnie z tabelą.

Otrzymany w przypadku polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDNI* produkt PCR o wielkości 228 par zasad hydrolizowano enzymem restrykcyjnym *NheI*. Do reakcji używano 19µl produktu PCR, 2,5µl buforu 10 x Tango (Fermentas, Litwa), 2,5µl sterylnej wody oraz 1µl enzymu. Po całkowitej inkubacji mieszaniny w temperaturze 37°C w cieplarni (Memmert Niemcy) inaktywowano enzym 20 minut w 65°C. Po dodaniu buforu obciążającego nakładano próbki na 2% żel agarozowy (TibMolBiol Universal Agarose, Polska). Elektroforezę prowadzono w buforze 1 x TBE przy napięciu 250V przez 1 godzinę i 30 minut. Żel barwiono bromkiem etydyny przez 20 minut, genotypy odczytywano zgodnie z tabelą 4, wyniki dokumentowano za pomocą systemu UVI-KS4000i/ImagePC (Syngen Biotech, USA).

3.3. ANALIZA STATYSTYCZNA

Uzyskane w pracy wyniki częstości występowania genotypów i alleli badanych genów analizowano stosując oprogramowanie do statystycznej analizy danych SPSS 14.0 PL dla Windows. Na początku utworzono w Edytorze Danych SPSS 14.0 PL bazę, w której zamieszczono dane kliniczne badanych pacjentek wraz z częstością występowania genotypów analizowanych polimorfizmów.

Następnie analizując dane kliniczne pacjentek obliczano wartości średnie arytmetyczne, czyli sumę wszystkich wartości podzielone przez ich liczbę oraz odchylenie standardowe (SD ang. *standard deviation*), które mówi, jak szeroko wartości jakiejś wielkości są rozrzucone wokół jej średniej. Im mniejsza wartość odchylenia tym obserwacje są bardziej skupione wokół średniej. Obliczano także zakres obserwowanych wartości i podano w pracy wartości minimalne i maksymalne.

Dla wszystkich badanych polimorfizmów wartości obserwowane porównywano z wartościami oczekiwanymi (W.O), które obliczano na podstawie częstości występowania alleli danego genu. Proporcje genotypów dla locus o dwu allelach A i a, których frekwencje wynoszą odpowiednio p i q zgodnie z prawem Hardy`ego- Weinberga wyniosą:

	<i>A (p)</i>	<i>a (q)</i>
<i>A (p)</i>	AA (p^2)	Aa (pq)
<i>a (q)</i>	Aa(pq)	aa (q^2)

$$A^2 + 2Aa + a^2 = 1, \quad p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Otrzymane rezultaty podawano z 95% przedziałem ufności (PU) zarówno dla otrzymanych alleli, jak i genotypów, który obliczano dzięki użyciu programu Clinical Trials Design Program wersja 1.0. Przy wszystkich otrzymanych częstościach występowania genotypów i alleli obliczano współczynnik ryzyka (W.R. - współczynnik ryzyka lub iloraz szans, ang. *odds ratio*). Za statystycznie istotną przyjęto wartość $p < 0,05$. Rozkład genotypów w badanych grupach porównywano testem chi-kwadrat z poprawką Fishera. Po oznaczeniu wszystkich badanych polimorfizmów genetycznych wyznaczono ich wzajemne

korelacje, które porównywano za pomocą współczynnika korelacji Pearsona oraz testem chi-kwadrat.

Do analizy statystycznej użyto pakietu SigmaStat 3.5. Analizę rozkładu uzyskanych pomiarów danej cechy przeprowadzono w oparciu o test Kolmorov-Smirnova. Do analizy istotności statystycznej różnic cech ilościowych grupy badanej i grupy kontrolnej zastosowano test t-Studenta dla cech o rozkładzie normalnym oraz test Manna-Witney'a.

Dla cech, których rozkład różnił się od rozkładu normalnego zastosowano test Rank Sum. W analogicznej sytuacji, przy analizie istotności różnic cech w trzech grupach zastosowano test one way-ANOVA (jednoczynnikowa analiza wariancji) lub Kruskall-Wallis ANOVA on Ranks wraz z testem wielokrotnych porównań Dunn'a. Do analizy statystycznej zależności cech niepoliczalnych i niemierzalnych (jakościowych) zastosowano test chi-kwadrat lub dokładny test Fishera. Za statystycznie znamienne przyjęto wartości $p < 0,05$.

Do przeprowadzenia analizy częstości występowania haplotypów badanych w pracy polimorfizmów zastosowano program PHASE wersja 2.1., który wykorzystuje metodę statystyczną Bayesa.

4. WYNIKI

4.1. ANALIZA DANYCH KLINICZNYCH I LABORATORYJNYCH W BADANYCH GRUPACH

4.1.1. CHARAKTERYSTYKA PORÓWNAWCZA BADANYCH GRUP KOBIEŃ

W pierwszym etapie pracy obydwie grupy badaną i kontrolną porównano pod względem średnich wartości wieku matek, wzrostu, masy ciała przed i w trakcie ciąży, BMI przed i w trakcie ciąży, przyrostu BMI podczas ciąży, ciśnienia tętniczego oraz tygodnia zakończenia ciąży.

Średnia wieku w całej grupie kobiet z nadciśnieniem w ciąży wynosiła $29,46 \pm 4,54$ lata, z czego w grupie kobiet z nadciśnieniem ciążowym $29,56 \pm 4,57$ lata, a z preeklampsją $29,34 \pm 4,54$ lata. Natomiast w grupie kontrolnej średnia wieku kobiet wynosiła $28,29 \pm 4,40$ lata. Różnice średniego wieku w badanych grupach nie były statystycznie istotne ($p=ns$).

Średnia wieku ciążowego w momencie zakończenia ciąży w grupie badanej (GH + PE) wynosiła $36,88 \pm 3,50$ tygodnia, w grupie kobiet z nadciśnieniem ciążowym $38,48 \pm 2,37$ tygodnia, z preeklampsją $34,19 \pm 3,48$ tygodnia. Natomiast w grupie kontrolnej wynosiła $39,06 \pm 1,28$ tygodnia. Wartości te różniły się statystycznie istotnie pomiędzy grupą z nadciśnieniem w ciąży a grupą kontrolną ($p < 0,001$) oraz pomiędzy grupą z preeklampsją a grupą z nadciśnieniem ciążowym ($p < 0,001$).

Porównując średnie wartości ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego zaobserwowano znacznie niższy ich poziom w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy kobiet z nadciśnieniem w ciąży. W grupie kontrolnej średnia wartość ciśnienia skurczowego wynosiła $112,07 \pm 10,75$ mmHg, natomiast w grupie badanej $167,82 \pm 16,87$ mmHg. Odnotowane różnice były istotnie statystycznie ($p < 0,001$). Podobnie różnica między średnim rozkurczowym ciśnieniem tętniczym w grupie zdrowych ciężarnych ($70,62 \pm 9,13$ mmHg) a

średnim rozkurczowym ciśnieniem tętniczym w grupie badanej ($104,32 \pm 11,66$ mmHg) była statystycznie istotna ($p < 0,001$). W grupie kobiet z nadciśnieniem ciążowym średnia wartość skurczowego ciśnienia tętniczego wynosiła $162,54 \pm 14,49$ mmHg, rozkurczowego $103,48 \pm 11,48$ mmHg. Natomiast w grupie z preeklampsją odpowiednio $176,71 \pm 17,02$ mmHg oraz $105,73 \pm 11,97$ mmHg. Różnica między ciśnieniem skurczowym w grupie z nadciśnieniem ciążowym i w grupie z preeklampsją była statystycznie istotna ($p < 0,001$).

Nie wykazano różnicy statystycznie istotnej, porównując wzrost w obydwu grupach kobiet (w grupie badanej $165,72 \pm 6,58$ cm, w grupie kontrolnej $166,51 \pm 5,67$ cm, $p = 0,277$). Zaobserwowano natomiast, że masa ciała przed i w trakcie ciąży u pacjentek z nadciśnieniem ciążowym była wyższa w porównaniu do zdrowych ciężarnych. W grupie badanej średnia masa ciała przed ciążą wynosiła $68,44 \pm 14,86$ kg, w trakcie ciąży $85,11 \pm 16,35$ kg, w grupie kontrolnej odpowiednio $59,71 \pm 8,86$ kg oraz $75,74 \pm 10,92$ kg. Porównując te wartości wykazano istotność statystyczną ($p < 0,001$).

Średnia wartość BMI przed i w trakcie ciąży kobiet z grupy badanej wynosiła odpowiednio $24,87 \pm 5,01$ kg/m² oraz $30,91 \pm 5,26$ kg/m², a w grupie kontrolnej $21,53 \pm 3,03$ kg/m² oraz $27,34 \pm 3,9$ kg/m². Odnotowane różnice były istotne statystycznie ($p < 0,001$). Natomiast przyrost BMI w ciąży nie różnił się znacznie pomiędzy grupą kobiet z nadciśnieniem ciążowym i grupą zdrowych ciężarnych (odpowiednio $6,04 \pm 2,39$ kg/m² oraz $5,81 \pm 2,46$ kg/m²; $p = 0,112$).

Ponadto odnotowano, że średnia masa ciała i BMI przed ciążą oraz średnia masa ciała i BMI w ciąży były większe w grupie z nadciśnieniem ciążowym niż z preeklampsją. Różnice te były istotne statystycznie. U kobiet z nadciśnieniem ciążowym średnia masa ciała przed ciążą wynosiła $71,04 \pm 14,83$ kg, średnia wartość BMI przed ciążą $25,74 \pm 5,07$ kg/m², średnia masa ciała w ciąży $88,42 \pm 16,74$ kg, średnia wartość BMI w ciąży $32,01 \pm 5,43$ kg/m². W grupie kobiet z preeklampsją wartości te wynosiły odpowiednio $64,05 \pm 14,02$ kg ($p = 0,011$), $23,40 \pm 4,59$ kg/m² ($p = 0,021$), $79,54 \pm 14,19$ kg ($p = 0,005$), $29,07 \pm 4,46$ kg/m² ($p = 0,006$). Przyrost BMI w trakcie ciąży nie różnił się statystycznie istotnie pomiędzy grupą z nadciśnieniem ciążowym i z preeklampsją ($p = 0,185$).

Przeprowadzono również analizę porównawczą wyników morfologii krwi w obydwu badanych grupach (hemoglobina, hematokryt, erytrocyty, leukocyty, płytki krwi). Średnia wartość leukocytozy w grupie kontrolnej wynosiła $16,62 \pm 3,06$ tys/ μ l, natomiast w grupie badanej $12,35 \pm 4,08$ tys/ μ l. Odnotowano istotność statystyczną tej różnicy ($p < 0,001$). Zaobserwowano wyższą wartość średniego stężenia hemoglobiny w grupie badanej ($7,26 \pm 1,95$ g/dL) niż w grupie kontrolnej ($6,60 \pm 0,98$ g/dL). Różnica ta była istotna statystycznie ($p = 0,040$). W trakcie analizy średnich wartości hematokrytu, ilości płytek krwi oraz erytrocytów w obydwu badanych grupach nie wykazano znamienych różnic.

Dane kliniczne, wartości ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego oraz dane dotyczące wzrostu, masy ciała i wskaźnika BMI zebrano i przedstawiono w tabeli 5.

Tab. 5. Porównanie danych klinicznych, ciśnienia tętniczego, masy ciała oraz wskaźnika BMI pomiędzy badanymi grupami.

	<i>Nadciśnienie w ciąży</i>	<i>Grupa GH</i>	<i>Grupa PE</i>	<i>Grupa kontrolna</i>	<i>p</i>
Wiek ciężarnej (lata) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana, min/max</i>	29,46 ± 4,54 29, 18/38	29,46 ± 4,59 29, 18/38	29,34 ± 4,54 29, 18/38	28,29 ± 4,40 28, 17/41	ns
Tydzień zakończenia ciąży (tydz.) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana, min/max</i>	36,88 ± 3,50 38, 27/42	38,43 ± 2,35 39, 31/42	34,20 ± 3,48 35, 27/39	39,06 ± 1,28 39, 37/42	<0,0001
RR skurczowe (mmHg) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana, min/max</i>	167,82 ± 16,87 170, 140/220	162,48 ± 14,53 160, 140/200	176,71 ± 17,02 170, 150/220	112,07 ± 10,75 110, 85/140	<0,001
RR rozkurczowe (mmHg) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana, min/max</i>	104,32 ± 11,62 100, 70/140	103,35 ± 11,57 100, 80/140	105,73 ± 11,97 110, 70/120	70,62 ± 9,13 70, 50/95	<0,001
Wzrost <i>średnia ± SD</i> <i>mediana, min/max</i>	165,72 ± 6,58 165, 149/179	166,04 ± 6,39 165, 150/179	165,22 ± 6,91 166, 149/176	166,51 ± 5,67 166, 150/180	ns
Masa przed ciążą <i>średnia ± SD</i> <i>mediana, min/max</i>	68,44 ± 14,86 66, 42/113	71,84 ± 15,58 70, 48/113	71,84 ± 15,58 70, 48/113	59,71 ± 8,86 58, 39/90	<0,001
Masa ciała po ciąży <i>średnia ± SD</i> <i>mediana, min/max</i>	85,11 ± 16,35 85, 55/128	89,14 ± 17,35 88, 60/128	89,14 ± 17,35 88, 60/128	75,74 ± 10,92 73,5, 48/111	<0,001
BMI przed ciążą <i>średnia ± SD</i> <i>mediana, min/max</i>	24,87 ± 5,01 23,45, 16,14/42,15	26,03 ± 5,41 24,24, 18,42/42,15	26,03 ± 5,41 24,24, 18,42/42,15	21,53 ± 3,03 20,63, 17,15/33,20	<0,001
BMI po ciąży <i>średnia ± SD</i> <i>mediana, min/max</i>	30,91 ± 5,26 30,42, 21,61/47,80	32,27 ± 5,72 31,25, 21,61/47,80	32,27 ± 5,72 31,25, 21,61/47,80	27,34 ± 3,90 26,43, 21,33/42,58	<0,001

4.1.2. ANALIZA BADANYCH PARAMETRÓW BIOCHEMICZNYCH W GRUPIE Z NADCIŚNIENIEM W CIĄŻY

W pracy analizowano parametry biochemiczne (mocznik, kwas moczowy, poziom białka w surowicy krwi, obecność białka w moczu, poziom elektrolitów – Na, K, Cl) u każdej pacjentki z grupy badanej z nadciśnieniem w ciąży, jak również u kobiet w poszczególnych podgrupach – z nadciśnieniem izolowanym (GH) oraz ze stanem przedzucawkowym (PE).

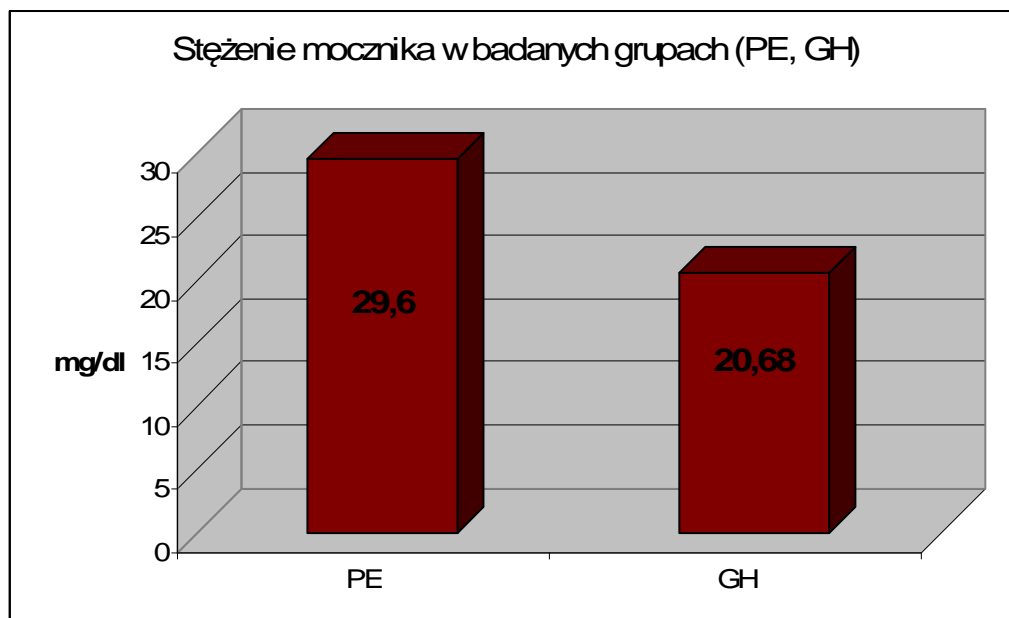
Zaobserwowano istotne statystycznie różnice w średnich stężeniach mocznika, kwasu moczowego oraz białka całkowitego pomiędzy grupą z nadciśnieniem ciążowym a grupą kobiet z preeklampsją. Zdecydowanie wyższe wartości mocznika zaobserwowano w grupie kobiet ze stanem przedzucawkowym (29,60 mg/dL) w porównaniu do grupy z nadciśnieniem izolowanym (20,68 mg/dL) ($p < 0,001$). Ta sama obserwacja dotyczyła stężenia kwasu moczowego – wyższy poziom odnotowano w grupie kobiet z PE (6,60 vs. 5,38 mg/dL w grupie z GH, $p < 0,001$). Natomiast poziom białka w surowicy krwi był mniejszy u kobiet z PE (5,85 mg/dL) w porównaniu do kobiet z GH (6,39 mg/dL) ($p < 0,001$). Również zdecydowanie wyższy białkomocz zaobserwowano w grupie kobiet z preeklampsją (271,34 vs. 6,61 mg/dL) ($p < 0,001$) (ryc. 4, 5, 6, 7).

Nie odnotowano różnic w poziomie sodu w surowicy w obydwu badanych grupach PE oraz GH (136,22 vs. 136,99 mEq/L) ($p = ns$). Odnotowano bardzo niewielkie różnice w poziomie potasu oraz chloru pomiędzy badanymi grupami (statystycznie nieistotne, $p = ns$). Największe wartości tych elektrolitów zaobserwowano w surowicy kobiet z preeklampsją – dla potasu 4,44 mEq/L oraz dla chloru 106,57 mEq/L. Uzyskane wyniki dla badanych grup – kobiet z nadciśnieniem ciążowym, stanem przedzucawkowym oraz obydwu grup łącznie przedstawiono w tabeli 6.

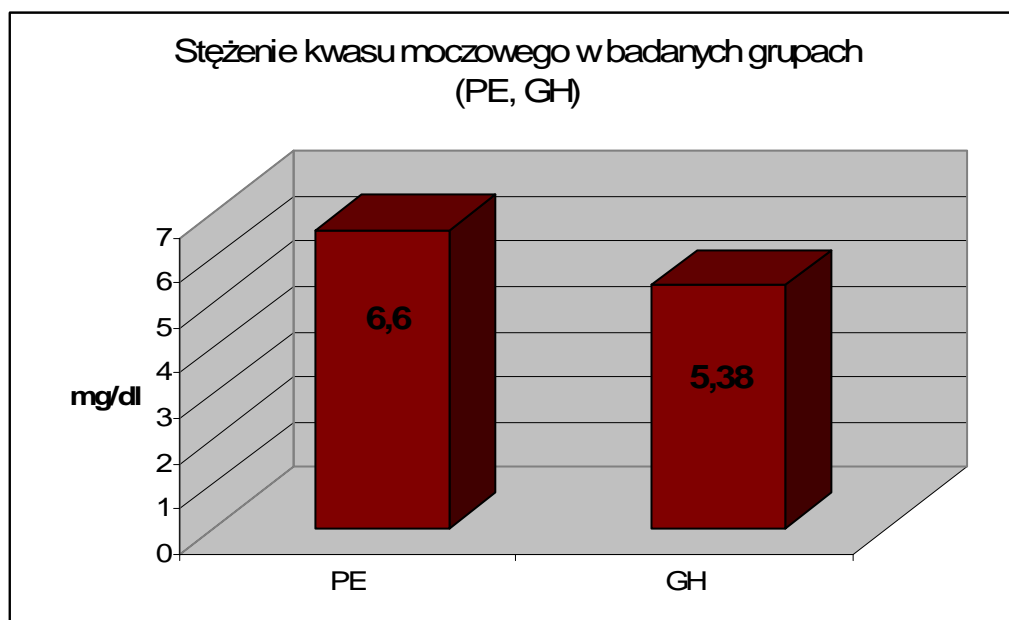
Tab. 6. Parametry biochemiczne w grupie kobiet z nadciśnieniem w ciąży.

	<i>Nadciśnienie w ciąży</i> <i>n=110</i>	<i>Nadciśnienie ciążowe (GH)</i> <i>n=69</i>	<i>Preeklampsja (PE)</i> <i>n=41</i>
<i>mocznik (mg/dL)</i> <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>min/max</i>	23,77 ± 11,09 22,33 8,53/2,52	20,68 ± 6,45 20,46 9,64/35,91	29,60 ± 14,52 27,88 10,30/92,52
<i>kwas moczowy (mg/dL)</i> <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>min/max</i>	5,83 ± 1,37 5,64 3,52/9,16	5,38 ± 1,19 5,20 3,52/8,98	6,60 ± 1,32 6,67 3,57/9,16
<i>białko w surowicy (g/dL)</i> <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>min/max</i>	6,18 ± 0,73 6,27 4,34/8,76	6,39 ± 0,52 6,40 4,45/7,33	5,85 ± 0,85 5,77 4,34/8,76
<i>białko w moczu (mg/dL)</i> <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>min/max</i>	105,23 ± 175,67 25 0/500	6,61 ± 11,11 0 0/25	271,34 ± 196,97 150 75/500
<i>Na (mEq/L)</i> <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>min/max</i>	136,70 ± 2,27 136,40 130,40/144,00	136,99 ± 2,07 136,65 133,30/144,00	136,22 ± 2,53 136,00 130,50/142,00
<i>K (mEq/L)</i> <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>min/max</i>	4,25 ± 0,44 4,21 3,35/6,26	4,14 ± 0,38 4,10 3,35/5,13	4,44 ± 0,47 4,36 3,70/6,26
<i>Cl (mEq/L)</i> <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>min/max</i>	105,31 ± 9,12 104,80 97,00/197,00	104,55 ± 2,27 104,80 97,00/109,00	106,57 ± 14,67 104,37 100,3/197,00

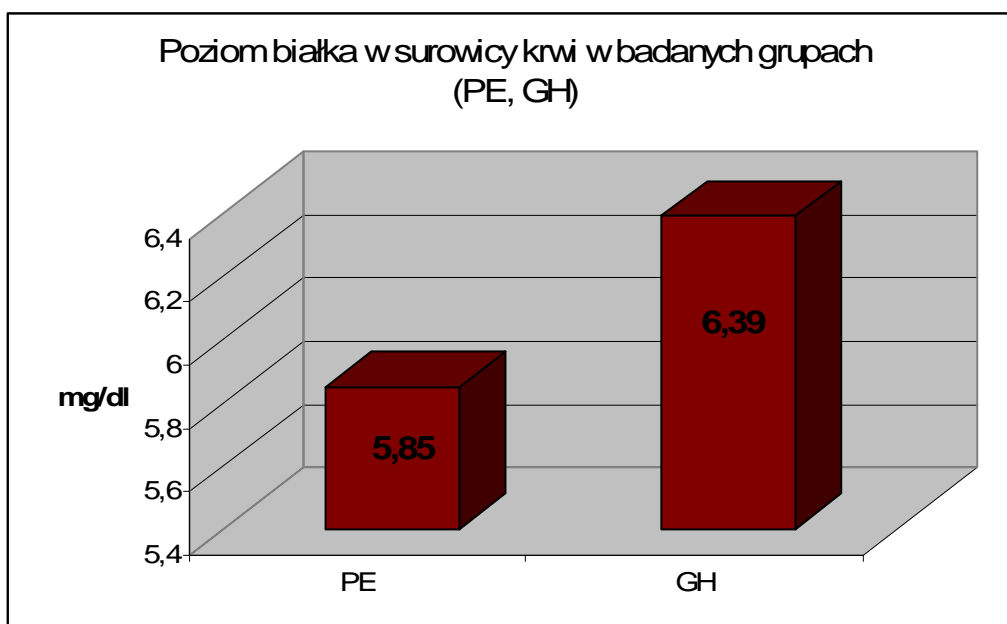
Na poniższych schematach przedstawiono porównanie wartości stężenia mocznika, kwasu moczowego, białka w surowicy krwi oraz białkomoczu w grupie badanej kobiet z nadciśnieniem w ciąży (ryc. 7 ryc. 8 ryc. 9 ryc. 10).



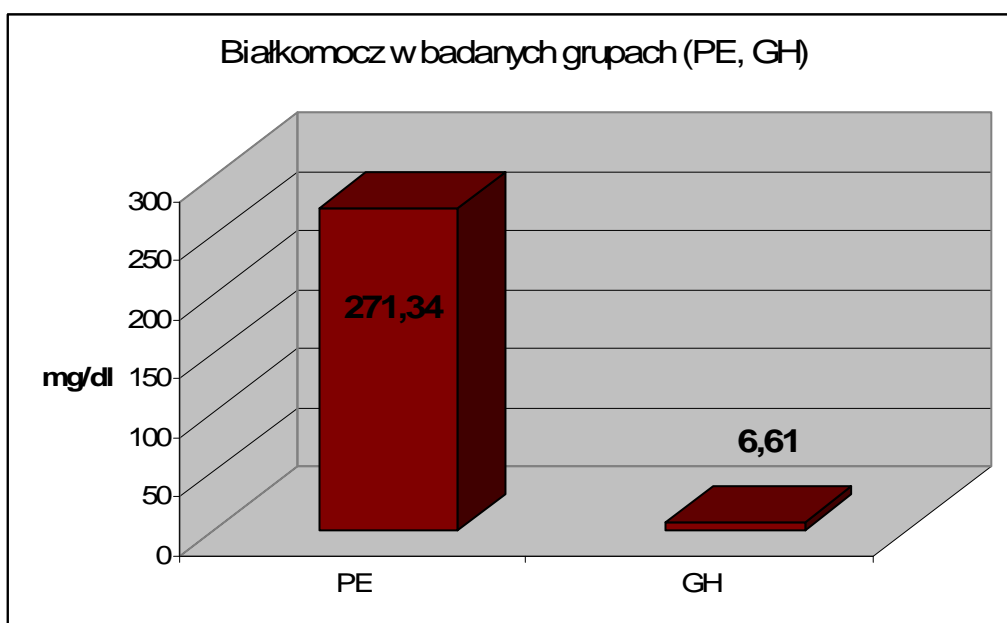
Ryc. 7 Stężenie mocznika w grupie kobiet z preeklampsją (PE) oraz nadciśnieniem izolowanym (GH).



Ryc. 8 Stężenie kwasu moczowego w grupie kobiet z preeklampsją (PE) oraz nadciśnieniem izolowanym (GH).



Ryc. 9 Poziom białka w surowicy krwi w grupie kobiet z preeklampsją (PE) oraz nadciśnieniem izolowanym (GH).



Ryc. 10. Poziom białkomoczu w grupie kobiet z preeklampsją (PE) oraz nadciśnieniem izolowanym (GH).

4.1.3. ANALIZA PARAMETRÓW UODZENIOWYCH NOWORODKÓW Z BADANYCH GRUP KOBIET

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono analizę parametrów urodzeniowych noworodków (urodzeniowa masa ciała, gazometria krwi pępowinowej, ilość punktów w skali Apgar w 1 i 5 minucie życia) w grupie kobiet z nadciśnieniem ciążowym, stanem przedrzucawkowym i w grupie zdrowych ciężarnych.

Średni tydzień zakończenia ciąży był najniższy w grupie kobiet z PE ($34,2 \pm 3,5$ tc.) w porównaniu do czasu zakończenia ciąży w grupie z GH ($38,5 \pm 2,4$ tc.) oraz w grupie kontrolnej ($39,1 \pm 1,3$ tc.). Różnice te były statystycznie istotne ($p < 0,001$) (tab. 7).

Średnia urodzeniowa masa ciała noworodków kobiet z całej grupy badanej (GH + PE) była znacznie niższa niż w przypadku noworodków kobiet z grupy kontrolnej ($2809,00 \pm 985,77$ g vs. $3491,133 \pm 406,28$ g), a różnica ta była statystycznie istotna ($p < 0,001$). Podobnie średnia masa ciała noworodków kobiet z preeklampsją ($2038,5 \pm 07,6$ g) była niższa niż kobiet z nadciśnieniem ciążowym ($3242,8 \pm 825,5$ g) ($p < 0,001$) (tab. 7).

Porównując średnie wartości gazometrii krwi pępowinowej pomiędzy całą grupą badaną, a grupą kontrolną odnotowano zależność istotną statystycznie jedynie w przypadku pH krwi żyłnej. W grupie noworodków z ciąż powikłanych nadciśnieniem tętniczym wartość pH krwi żyłnej wynosiła średnio $7,30 \pm 0,10$, a w grupie kontrolnej $7,29 \pm 0,46$, $p = 0,006$. Średnia wartość pH z tętnicy pępowinowej była porównywalna w obu grupach, $p = 0,227$. Porównując średnią wartość pH z żyły pępowinowej u noworodków z ciąż powikłanych preeklampsją ($7,29 \pm 0,10$) i noworodków kobiet z nadciśnieniem ciążowym ($7,30 \pm 0,09$) nie wykazano istotnej statystycznie różnicy ($p = 0,687$). Również pH z tętnicy pępowinowej noworodków kobiet z nadciśnieniem ciążowym i z preeklampsją nie różniło się znamienne ($7,23 \pm 0,09$ vs. $7,25 \pm 0,10$; $p = 0,098$) (tab. 7).

Analiza średniej punktacji w skali Apgar w 1 i 5 minucie życia wykazała, że była ona istotnie niższa w grupie noworodków matek z nadciśnieniem w ciąży niż w grupie kontrolnej. W pierwszej minucie życia wynosiła średnio $8,2 \pm 2,4$ vs. $9,4 \pm 1,5$ w grupie kontrolnej,

$p < 0,001$. Podobnie różnica ta była istotna statystycznie w piątej minucie życia ($9,3 \pm 1,3$ w grupie badanej vs. $9,9 \pm 0,4$ w grupie kontrolnej, $p < 0,001$). Porównując noworodki urodzone przez kobiety z nadciśnieniem ciążowym oraz te urodzone przez pacjentki z preeklampsją odnotowano znamienne niższą średnią wartość punktacji w skali Apgar zarówno w 1 ($p < 0,001$), jak i w 5 ($p < 0,001$) minucie życia w grupie z preeklampsją (tab. 7).

Średnia masa łożyska z ciąż powikłanych nadciśnieniem w ciąży była znamienne niższa niż z ciąż prawidłowych. W grupie badanej wynosiła średnio $562,6 \pm 178,7$ g, natomiast w grupie kontrolnej $629,7 \pm 115,3$ g. Różnica ta również była istotna pod względem statystycznym ($p = 0,001$). Ponadto zaobserwowano, że średnia masa łożyska z ciąż z nadciśnieniem ciążowym była wyższa niż z ciąż z towarzyszącą preeklampsją, a różnica ta była istotna pod względem statystycznym ($614,5 \pm 169,0$ vs. $475,1 \pm 161,1$; $p < 0,001$) (tab. 7).

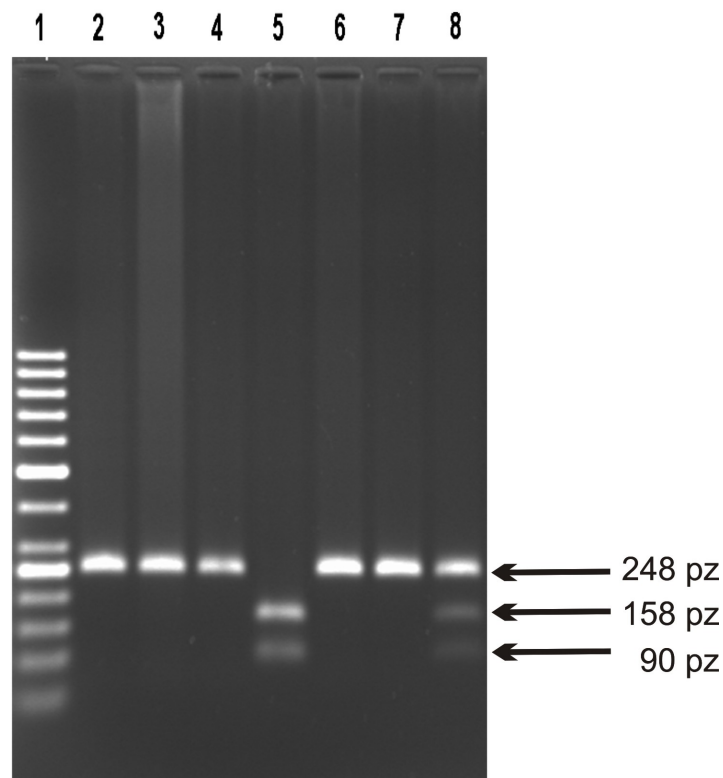
Tab. 7. Parametry urodzeniowe noworodków z badanych grup.

	<i>Nadciśnienie w ciąży</i> <i>n=110</i>		<i>Grupa GH</i> <i>n=69</i>		<i>Grupa PE</i> <i>n=41</i>		<i>Grupa kontrolna</i> <i>n=150</i>	
Masa noworodka (g) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>min/max</i>	2809,0 ± 985,0 2920 620/5110		3242,8 ± 825,5 3265 890/5110		2038,5 ± 807,6 2000 620/3930		3491,1 ± 406,3 3440 2560/4580	
Agar	<i>1 min.</i>	<i>5 min.</i>	<i>1 min.</i>	<i>5 min.</i>	<i>1 min.</i>	<i>5 min.</i>	<i>1 min.</i>	<i>5 min.</i>
<i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>min/max</i>	8,2 ± 2,4 9 1/10	9,3 ± 1,3 10 3/10	8,7 ± 1,9 10 1/10	9,6 ± 0,7 10 8/10	7,3 ± 2,7 8 1/10	8,7 ± 1,7 9,5 3/10	9,3 ± 1,5 10 1/10	9,9 ± 0,4 10 9/10
pH żyła pępowinowa <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>min/max</i>	7,30 ± 0,10 7,31 6,80/7,50		7,30 ± 0,09 7,32 7,01/7,50		7,29 ± 0,10 7,31 6,80/7,42		7,29 ± 0,46 7,34 3,37/7,53	
pH tętno pępowinowa <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>min/max</i>	7,24 ± 0,10 7,26 6,69/7,43		7,23 ± 0,09 7,23 6,96/7,43		7,25 ± 0,10 7,27 6,69/7,36		7,26 ± 0,08 7,27 7,01/7,43	
Tydz. zakończ. ciąży (tyg.) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>min/max</i>	36,9 ± 3,5 38 27/42		38,5 ± 2,4 39 31/42		34,2 ± 3,5 35 27/39		39,1 ± 1,3 39 37/42	
Masa łożyska (g) <i>średnia ± SD</i> <i>mediana</i> <i>min/max</i>	562,6 ± 178,7 550 220/1060		614,5 ± 169,0 610 240/1060		475,1 ± 161,1 500 220/840		629,7 ± 115,3 620 360/1100	

4.2. ANALIZA CZĘSTOŚCI WYSTĘPOWANIA BADANYCH POLIMORFIZMÓW GENETYCZNYCH

4.2.1. ANALIZA POLIMORFIZMU *GLU298ASP* GENU *NOS3*

W wyniku hydrolizy enzymem restrykcyjnym *MboI* (Fermentas, Litwa) fragmentu genu syntazy tlenu azotu o wielkości 248 par zasad zawierającego miejsce polimorfizmu *894G>T* uzyskiwano od 1 do 3 fragmentów o różnej wielkości. W genotypie homozygotycznym niezmutowanym *GG* (typ dziki) otrzymywano jeden prążek, ponieważ w sekwencji dwóch alleli zanalizowanego fragmentu nie występuje miejsce hydrolizy rozpoznawane przez enzym restrykcyjny *MboI*. W przypadku genotypu homozygotycznego zmutowanego (*TT*) enzym ten hydrolizował produkt PCR genu *NOS3* na dwa mniejsze fragmenty o wielkości 158, 90 pz ponieważ w tym przypadku w dwóch allelach występowała transwersja guaniny na tyminę. W genotypie heterozygotycznym (*GA*), który posiada oba allele uzyskiwano wszystkie trzy prążki (248, 158, 90) (fot. 1).



Fot. 1. Na zdjęciu przedstawiono fragmenty hydrolizy enzymem *MboI* produktu PCR genu *NOS3* dla polimorfizmu *Glu298Asp*. Prążki 1 – marker DNA, prążki 2, 3, 4 – genotyp homozygotyczny *GG*, prążek 5 - genotyp homozygotyczny zmutowany *TT*, prążek 8 - genotyp heterozygotyczny *GT*.

W pierwszym etapie pracy zbadano polimorfizmy związane z genem *NOS3*. W stosunku do polimorfizmu *Glu298Asp* przy porównaniu obydwu badanych grup stwierdzono przewagę częstości występowania genotypu homozygotycznego *GG* w grupie z nadciśnieniem w ciąży (54,6 vs. 48,7% w grupie kontrolnej, brak różnicy statystycznie istotnej).

Zaobserwowano również nieznacznie wyższą frekwencję zmutowanego genotypu *TT* w grupie kontrolnej 8,7% w porównaniu do całej grupy z nadciśnieniem 5,4% (WR=0,61, $p=ns$). Podobne obserwacje dotyczyły zmutowanego allela *T* (25,5% w grupie z nadciśnieniem vs. 30,0% w grupie kontrolnej, WR=0,79, $p=ns$) (tab. 8).

Tab. 8. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

<i>NOS3 Glu298Asp (894G>T)</i>	<i>Grupa z nadciśnieniem w ciąży n=110</i>		<i>Grupa kontrolna n=150</i>		WR	95% PU	p
	<i>wartość obserw. n (%)</i>	<i>wartość oczekiw. (%)</i>	<i>wartość obserw. n (%)</i>	<i>wartość oczekiw. (%)</i>			
<i>GG</i>	60 (54,6)	55,6	73 (48,7)	49,0	1,26	0,75-2,13	0,21
<i>GT</i>	44 (40,0)	37,9	64 (42,6)	42,0	0,89	0,52-1,52	0,38
<i>TT</i>	6 (5,4)	6,5	13 (8,7)	9,0	0,61	0,18-1,78	0,23
<i>Suma</i>	110 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0	-	-	-
<i>Allele</i>							
<i>G</i>	164 (74,6)	-	210 (70,0)	-	1,25	0,83-1,89	0,15
<i>T</i>	56 (25,4)	-	90 (30,0)	-	0,79	0,52-1,19	0,15
<i>Suma</i>	220 (100,0)	-	300 (100,0)	-	-	-	-

Analizując polimorfizm *Glu298Asp* genu *NOS3* w dwóch podgrupach kobiet z nadciśnieniem ciążowym oraz ze stanem przedzrzucaawkowym zaobserwowano podobną częstość występowania genotypu homozygotycznego zmutowanego *TT* w grupie z PE oraz w grupie kontrolnej (12,2 vs. 8,7% w grupie kontrolnej, WR = 1,46, $p=ns$).

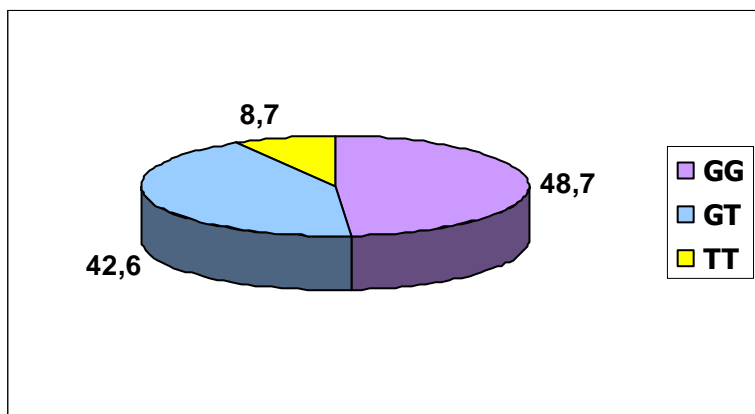
Ciekawą obserwacją było natomiast odnotowanie występowania tylko jednego genotypu homozygotycznego *TT* ($n=1/69$) w grupie z GH w porównaniu do grupy kontrolnej (1,4 vs. 8,7% w grupie kontrolnej, WR=0,16, 95%CL 0,01-1,08). Różnica ta była statystycznie znamienne ($p=0,033$). Również częstość występowania zmutowanego allele *T* była wyższa w grupie kontrolnej (30%) w porównaniu do grupy PE (26,8%, $p=ns$) oraz w porównaniu do grupy GH (24,6%, $p=ns$).

Częstość występowania zmutowanego genotypu *TT* pomiędzy grupą GH oraz PE (1,4 vs. 12,2% w grupie kontrolnej, WR=0,11, 95%CL 0,01-1,02, $p=0,026$) (tab. 9).

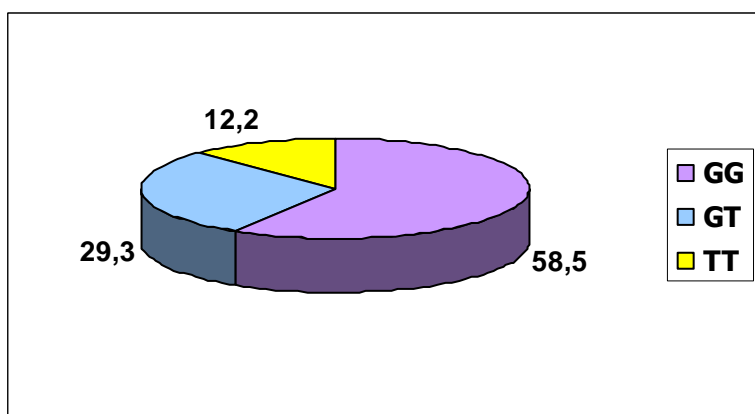
Tab. 9. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* w podgrupie GH oraz PE oraz w grupie kontrolnej.

<i>NOS3</i> <i>Glu298Asp</i> (894G>T)	<i>Grupa z nadciśnieniem w ciąży</i>				<i>Grupa kontrolna</i> <i>n=150</i>	
	<i>Grupa GH</i> <i>n=69</i>		<i>Grupa PE</i> <i>n=41</i>			
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserw. n (%)</i>	<i>wartość oczekiw. (%)</i>	<i>wartość obserw. n (%)</i>	<i>wartość oczekiw. (%)</i>	<i>wartość obserw. n (%)</i>	<i>wartość oczekiw. (%)</i>
<i>GG</i>	36 (52,2)	56,8	24 (58,5)	53,5	73 (48,7)	49,0
<i>GT</i>	32 (46,4)	37,1	12 (29,3)	39,3	64 (42,6)	42,0
<i>TT</i>	1 (1,4)	6,1	5 (12,2)	7,2	13 (8,7)	9,0
<i>Suma</i>	69 (100,0)	100	41 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0
<i>Allele</i>						
<i>G</i>	104 (75,4)	-	60 (73,2)	-	210 (70,0)	-
<i>T</i>	34 (24,6)	-	22 (26,8)	-	90 (30,0)	-
<i>Suma</i>	138 (100,0)	-	82 (100,0)	-	300 (100,0)	-

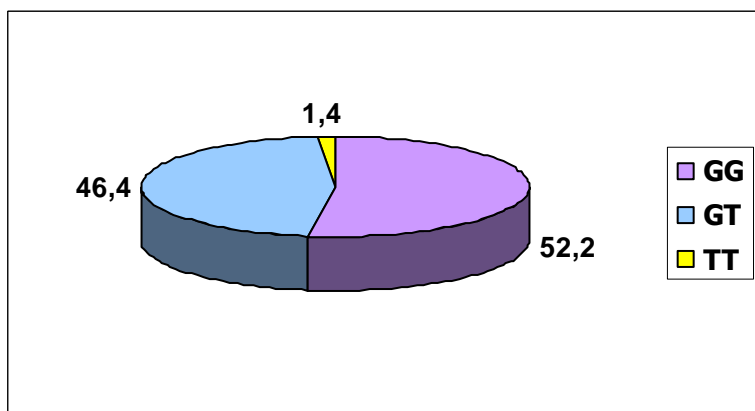
Na poniższych schematach przedstawiono procentową częstość występowania genotypów polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* w grupie kontrolnej (ryc. 11), grupie PE (ryc. 12) oraz grupie GH (ryc. 13).



Ryc. 11. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* w grupie kontrolnej (%).



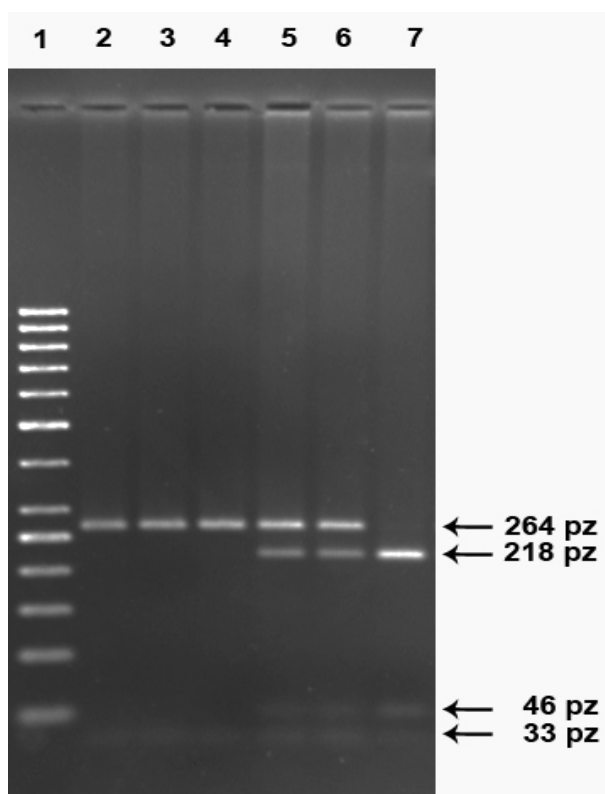
Ryc. 12. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* w podgrupie PE (%).



Ryc. 13. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* w podgrupie GH (%).

4.2.2. ANALIZA POLIMORFIZMU -786T>C GENU NOS3

W wyniku hydrolizy enzymem restrykcyjnym *MspI* (Eurx, Polska) fragmentu genu *NOS3* o wielkości 297 par zasad, zawierającego miejsce występowania polimorfizmu -786T>C, uzyskiwano od 2 do 4 fragmentów o różnej wielkości. W przypadku homozygot niezmutowanych *TT* (typ dziki) uzyskiwano dwa fragmenty 264 i 33 par zasad. Genotyp zmutowany *CC*, powoduje dodatkowe miejsce hydrolizy dla enzymu *MspI* i powstają trzy prążki o wielkości 218, 46 i 33 par zasad. Heterozygotyczny genotyp *TC* powoduje wystąpienie wszystkich czterech możliwych miejsc cięcia dla enzymu restrykcyjnego w tym fragmencie genu *NOS3* i uzyskuje się prążki wielkości 264, 218, 46 i 33 par zasad (fot. 2)



Fot. 2. Na zdjęciu przedstawiono fragmenty hydrolizy enzymem *MspI* produktu PCR genu *NOS3* dla polimorfizmu -786T>C. Prążki 1 – marker wielkości DNA (50 pz), prążki 2, 3, 4 – genotyp homozygotyczny *TT*, prążki 5, 6 – genotyp heterozygotyczny *TC*, prążek 7 – genotyp homozygotyczny zmutowany *CC*.

Analiza następnego polimorfizmu -786T>C genu *NOS3* w całej grupie z nadciśnieniem w ciąży oraz w grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych pokazała brak różnic statystycznie istotnych pomiędzy tymi grupami w częstości występowania powyższego wariantu genetycznego. W pracy odnotowano podobną częstość występowania genotypu zmutowanego *CC* w obydwu grupach kobiet z nadciśnieniem i kontrolnej (13,6 vs. 15,3%, $p=ns$), jak również zmutowanego allela *C* (37,3 vs. 38,0%, $p=ns$) (tabela 10).

Tab. 10. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -786T>C genu *NOS3* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

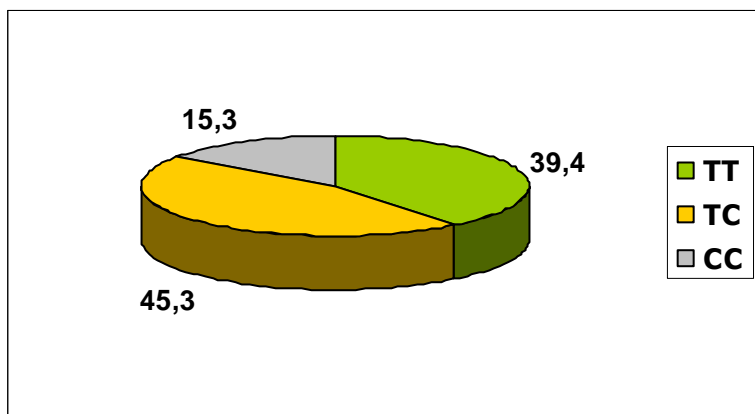
<i>NOS3</i> -786T>C	<i>Grupa z nadciśnieniem w ciąży n=110</i>		<i>Grupa kontrola n=150</i>		<i>WR</i>	<i>95% PU</i>	<i>p</i>
	<i>wartość obserw. n (%)</i>	<i>wartość oczekiw. (%)</i>	<i>wartość obserw. n (%)</i>	<i>wartość oczekiw. (%)</i>			
<i>Genotypy</i>							
<i>TT</i>	43 (39,1)	39,4	59 (39,4)	38,4	0,98	0,58-1,69	0,54
<i>TC</i>	52 (47,3)	46,7	68 (45,3)	47,1	1,08	0,64-1,83	0,43
<i>CC</i>	15 (13,6)	13,9	23 (15,3)	14,5	0,87	0,40-1,85	0,42
<i>Suma</i>	110 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0	-	-	-
<i>Allele</i>							
<i>T</i>	138 (62,7)	-	186 (62,0)	-	1,03	0,71-1,51	0,47
<i>C</i>	82 (37,3)	-	114 (38,0)	-	0,97	0,66-1,41	0,47
<i>Suma</i>	220 (100,0)	-	300 (100,0)	-	-	-	-

Porównując badane podgrupy GH oraz PE pod względem prevalencji poszczególnych genotypów i alleli stwierdzono podobną częstość występowania wszystkich trzech rodzajów genotypów w grupach oraz w grupie kontrolnej. Częstość występowania heterozygot *TC* była podobna we wszystkich trzech badanych grupach kobiet (47,8 vs. 46,3 vs. 45,3%, $p=ns$). Częstość występowania genotypu homozygotycznego zmutowanego *CC* polimorfizmu -786T>C genu *NOS3* wynosiła 18,8 vs. 4,9 vs. 15,3% ($p=ns$) odpowiednio w grupach: z GH, PE oraz kontrolnej. Frekwencja zmutowanych alleli wynosiła natomiast w grupach z

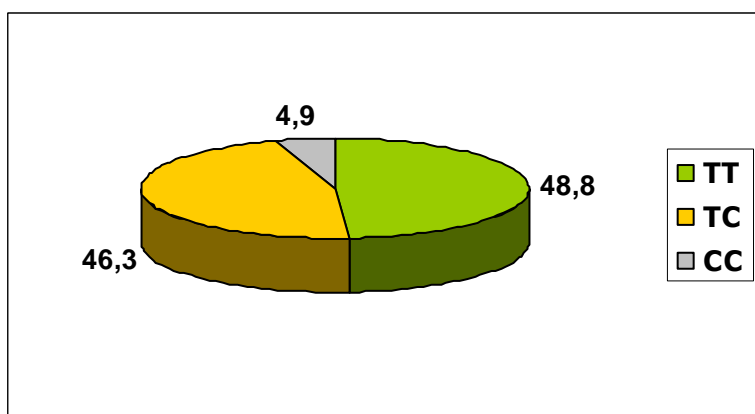
nadciśnieniem ciążowym, stanem przedrzucawkowym i grupą kontrolną 43,5 vs. 28,0 vs. 38,0%, $p=ns$ (tabela 11).

Tab. 11. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -786T>C genu *NOS3* w podgrupie GH, PE oraz w grupie kontrolnej.

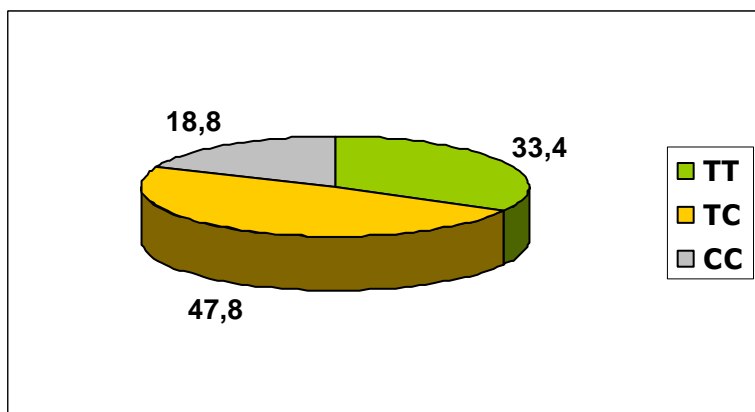
<i>NOS3</i> -786T>C	<i>Grupa z nadciśnieniem w ciąży</i>				<i>Grupa kontrolna</i> <i>n=150</i>	
	<i>Grupa GH</i> <i>n=69</i>		<i>Grupa PE</i> <i>n=41</i>		<i>wartość obserw.</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiw.</i> <i>(%)</i>
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserw.</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiw.</i> <i>(%)</i>	<i>wartość obserw.</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość oczekiw.</i> <i>(%)</i>		
<i>TT</i>	23 (33,4)	32,8	20 (48,8)	51,7	59 (39,4)	38,4
<i>TC</i>	33 (47,8)	48,9	19 (46,3)	40,4	68 (45,3)	47,1
<i>CC</i>	13 (18,8)	18,3	2 (4,9)	7,9	23 (15,3)	14,5
<i>Suma</i>	69 (100,0)	100,0	41 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0
<i>Allele</i>						
<i>T</i>	79 (56,5)	-	59 (72,0)	-	186 (62,0)	-
<i>C</i>	59 (43,5)	-	23 (28,0)	-	114 (38,0)	-
<i>Suma</i>	138 (100,0)	-	82 (100,0)	-	300 (100,0)	-



Ryc. 14. Częstość występowania genotypów polimorfizmu $-786T>C$ genu *NOS3* w grupie kontrolnej (%).



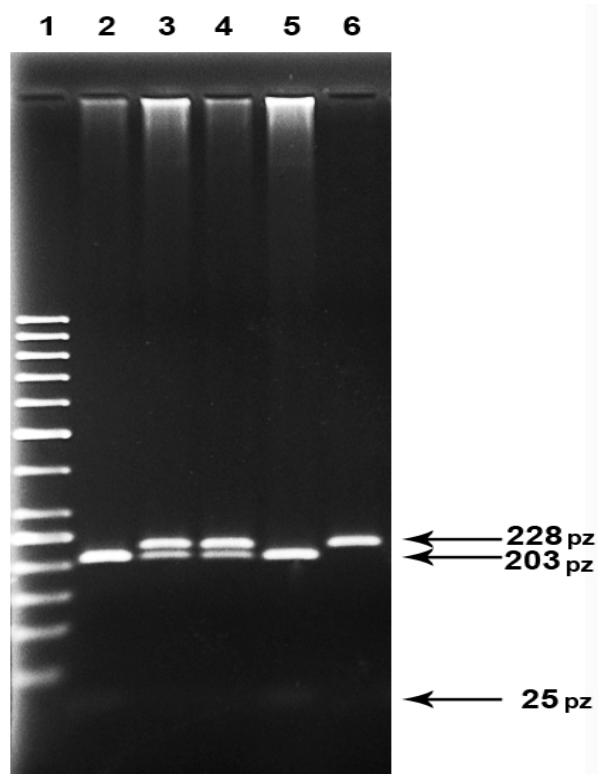
Ryc. 15. Częstość występowania genotypów polimorfizmu $-786T>C$ genu *NOS3* w podgrupie PE (%).



Ryc. 16. Częstość występowania genotypów polimorfizmu $-786T>C$ genu *NOS3* w podgrupie GH (%).

4.2.3. ANALIZA POLIMORFIZMU *Lys198Asn* GENU *EDNI*

W celu zbadania polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDNI* przeprowadzono amplifikację genomowego DNA ze starterami przedstawionymi w tabeli 3 i uzyskano produktu PCR o wielkości 228 pz. Po hydrolizie restrykcyjnej enzymem *NheI* (Fermentas, Litwa) odczytywano genotypy z 2% żeli agarozowych, których jeden, przykładowy przedstawia fot.3. Obraz prążków o wielkości 203 i 25 pz odczytywano jako homozygota typu dzikiego *GG*. W genotypie heterozygotycznym *GT* uzyskiwano trzy fragmenty o wielkości 228, 203 i 25 par zasad, a w homozygotycznym zmutowanym *TT* nie występowało miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny *NheI* i pozostawał fragment o wielkości 228 par zasad (fot.3).



Fot. 3. Na zdjęciu przedstawiono fragmenty hydrolizy enzymem *NheI* produktu PCR genu *EDNI* dla polimorfizmu *Lys198Asn*. Prążki 1 – marker wielkości DNA (50 pz), prążki 2, 5 – genotyp homozygotyczny *GG*, prążki 3, 4 - genotyp heterozygotyczny *GT*, prążek 6 - genotyp homozygotyczny zmutowany *TT*.

Następnie w pracy przeprowadzono analizę funkcjonalnego polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDNI*. W całej badanej grupie kobiet z nadciśnieniem w ciąży obserwowany rozkład częstości występowania genotypów polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDNI* wynosił: *GG* : *GT* : *TT* = 67,3 : 28,1 : 4,6% i był podobny do rozkładu genotypów w grupie kontrolnej *GG* : *GT* : *TT* = 68,0 : 28,0 : 4,0%. Nie odnotowano żadnej różnicy statystycznie istotnej w występowaniu genotypów pomiędzy badanymi grupami - z nadciśnieniem w ciąży oraz kontrolną. Również częstość występowania alleli *G* (81,4 vs. 82,0%, $p=ns$) oraz *T* (18,6 vs. 18,0%, $p=ns$) w obydwu grupach była podobna (tabela 12).

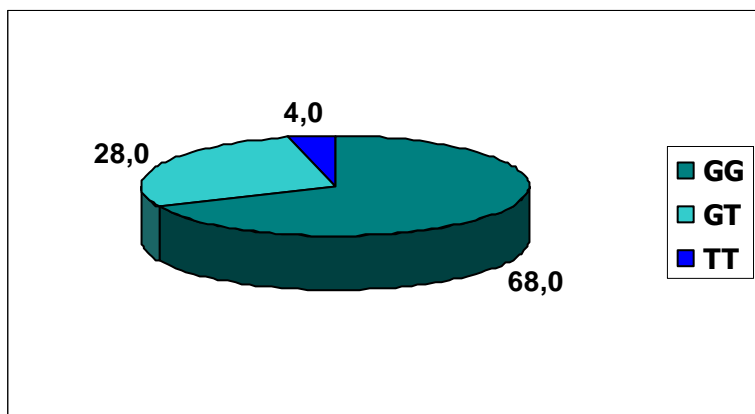
Tab. 12 Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDNI* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

<i>EDNI</i> <i>Lys198Asn</i>	<i>Grupa z nadciśnieniem w ciąży n=110</i>		<i>Grupa kontrola n=150</i>		<i>WR</i>	<i>95% PU</i>	<i>p</i>
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserw. n (%)</i>	<i>wartość oczekiw. (%)</i>	<i>wartość obserw. n (%)</i>	<i>wartość oczekiw. (%)</i>			
<i>GG</i>	74 (67,3)	66,2	102 (68,0)	67,3	0,97	0,55-1,69	0,50
<i>GT</i>	31 (28,1)	30,3	42 (28,0)	29,5	1,01	0,56-1,81	0,54
<i>TT</i>	5 (4,6)	3,5	6 (4,0)	3,2	1,14	0,27-4,63	0,53
<i>Suma</i>	110 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0	-	-	-
<i>Allele</i>							
<i>G</i>	179 (81,4)	-	246 (82,0)	-	0,96	0,59-1,55	0,47
<i>T</i>	41 (18,6)	-	54 (18,0)	-	1,04	0,65-1,04	0,47
<i>Suma</i>	220 (100,0)	-	300 (100,0)	-	-	-	-

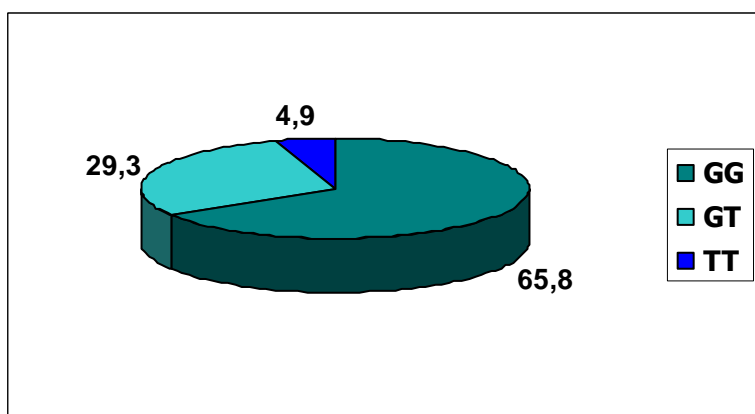
Analizując częstość występowania genotypów i alleli w poszczególnych podgrupach kobiet – z nadciśnieniem ciążowym (GH) i preeklampsją (PE) nie wykazano różnic statystycznie istotnych pomiędzy badanymi grupami. W podgrupie GH częstość występowania genotypu *TT* polimorfizmu *Lys198Asn* wynosiła 4,4%, natomiast w podgrupie z PE wynosiła 4,9% w porównaniu do kontroli 4,0%. W podgrupie GH dla porównania stosunku genotypów *TT* : *GT+GG* współczynnik ryzyka WR wynosił 1,09, 95% PU 0,17-5,29, $p=ns$, w podgrupie PE natomiast współczynnik ryzyka WR wynosił 1,23, 95% PU 0,11-7,23, $p=ns$ (tabela 13).

Tab. 13. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDN1* w podgrupie GH, PE oraz w grupie kontrolnej.

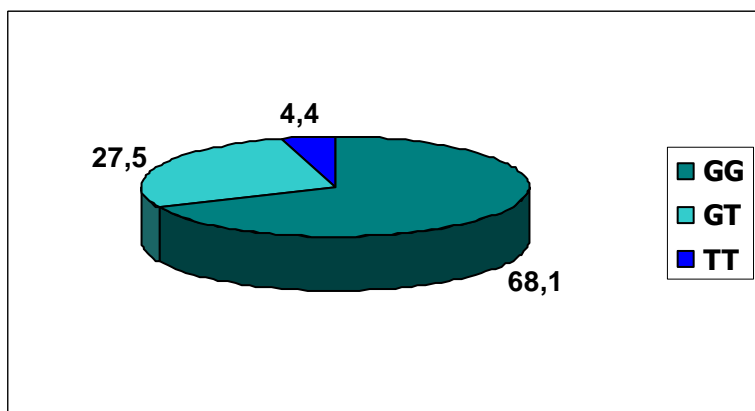
<i>EDN1</i> <i>Lys198Asn</i>	<i>Grupa z nadciśnieniem</i>				<i>Grupa kontrolna</i> <i>n=150</i>	
	<i>Grupa GH</i> <i>n=69</i>		<i>Grupa PE</i> <i>n=41</i>			
<i>Genotypy</i>	<i>wartość obserw. n (%)</i>	<i>wartość oczekiw. (%)</i>	<i>wartość obserw. n (%)</i>	<i>wartość oczekiw. (%)</i>	<i>wartość obserw. n (%)</i>	<i>wartość oczekiw. (%)</i>
<i>GG</i>	47 (68,1)	67,0	27 (65,8)	64,8	102 (68,0)	67,3
<i>GT</i>	19 (27,5)	29,7	12 (29,3)	31,4	42 (28,0)	29,5
<i>TT</i>	3 (4,4)	3,3	2 (4,9)	3,8	6 (4,0)	3,2
<i>Suma</i>	69 (100,0)	100,0	41 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0
<i>Allele</i>						
<i>G</i>	113 (81,9)		66 (80,5)		246 (82,0)	
<i>T</i>	25 (18,1)		16 (19,5)		54 (18,0)	
<i>Suma</i>	138 (100,0)		82 (100,0)		300 (100,0)	



Ryc. 17. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDN1* w grupie kontrolnej (%).



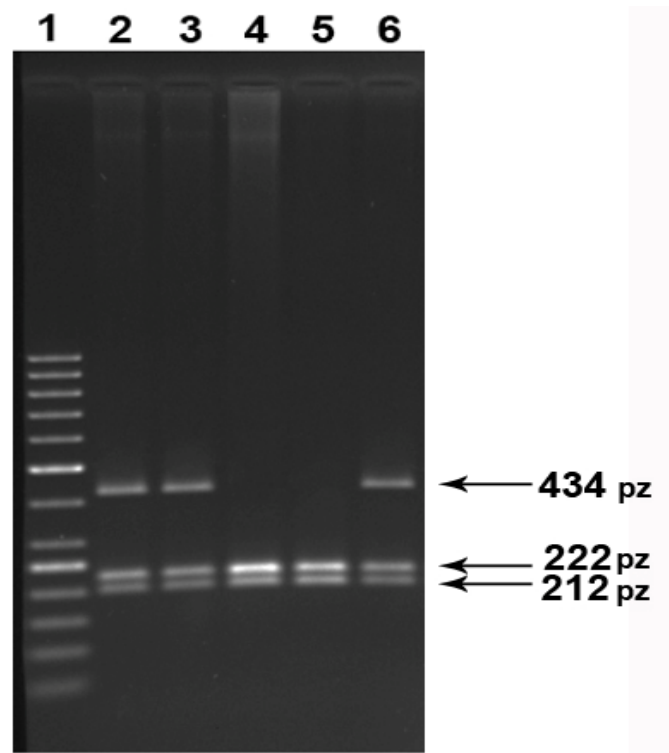
Ryc. 18. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDN1* w podgrupie PE (%).



Ryc. 19. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDN1* w podgrupie GH (%).

4.2.4. ANALIZA POLIMORFIZMU *-134delA* GENU *EDN1*

Po hydrolizie enzymem *Bs**II* produktu PCR fragmentu genu *EDN1* o wielkości 434 par zasad oskrzydlańca miejsce polimorfizmu *-134delA* możliwe było uzyskanie od jednego do trzech mniejszych fragmentów DNA. W przypadku genotypu homozygotycznego *-3A/-3A* uzyskiwano dwa prążki o wielkości 222, 212 par zasad. W genotypie heterozygotycznym *-3A/-4A* uzyskiwano trzy fragmenty o wielkości 434, 222 i 212 par zasad. Genotyp *-4A/-4A*, który nie występował w badanej grupie kobiet byłby widoczny jako pojedynczy prążek równy produktowi PCR (434 pz) (fot. 4).



Fot. 4. Na zdjęciu przedstawiono fragmenty po hydrolizie enzymem *Bs**II* produktu PCR genu *EDN1* dla polimorfizmu *-134delA*. Prążki 1 – marker wielkości DNA (50 pz), prążki 2, 3, 6 – genotyp heterozygotyczny *-3A/-4A*, prążki 4, 5 – genotyp homozygotyczny niezmutowany *-3A/-3A*.

Porównując grupę kobiet z nadciśnieniem w ciąży oraz grupę kontrolną w zakresie polimorfizmu *-134delA* genu *EDNI* pod względem częstości występowania genotypów i alleli nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych pomiędzy tymi grupami. Częstość występowania genotypu homozygotycznego typu dzikiego *-3A/-3A* wynosiła 57,3% oraz 60,7%, natomiast genotypu heterozygotycznego *-3A/-4A* 42,7% oraz 39,3% odpowiednio w grupie z nadciśnieniem występującym w przebiegu ciąży oraz w grupie zdrowych ciężarnych (tabela 12.). Zwraca uwagę fakt braku obecności genotypu homozygotycznego zmutowanego *-4A/-4A* polimorfizmu *-134delA* genu *EDNI* zarówno w grupie kobiet z nadciśnieniem w ciąży, jak i w grupie kontrolnej (tabela 14.).

Tab. 14. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-134delA* genu *EDNI* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

<i>EDNI</i> <i>-134delA</i>	<i>Grupa z nadciśnieniem</i> <i>w ciąży</i> <i>n=110</i>		<i>Grupa kontrola</i> <i>n=150</i>		<i>WR</i>	<i>95% PU</i>	<i>p</i>
	<i>wartość</i> <i>obserw.</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiw.</i> <i>(%)</i>	<i>wartość</i> <i>obserw.</i> <i>n (%)</i>	<i>wartość</i> <i>oczekiw.</i> <i>(%)</i>			
<i>Genotypy</i>							
<i>-3A/-3A</i>	63 (57,3)	61,8	91(60,7)	64,5	0,87	0,51-1,48	0,34
<i>-3A/-4A</i>	47(42,7)	33,6	59(39,3)	31,6	1,15	0,68-1,96	0,34
<i>-4A/-4A</i>	0 (0,0)	4,6	0(0,0)	3,9	-	-	-
<i>Suma</i>	110 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0	-	-	-
<i>Allele</i>							
<i>-3A</i>	173(78,6)	-	241(80,3)	-	0,90	0,57-1,42	0,36
<i>-4A</i>	47(21,4)	-	59(19,7)	-	1,11	0,70-1,74	0,36
<i>Suma</i>	220 (100,0)	-	300 (100,0)	-	-	-	-

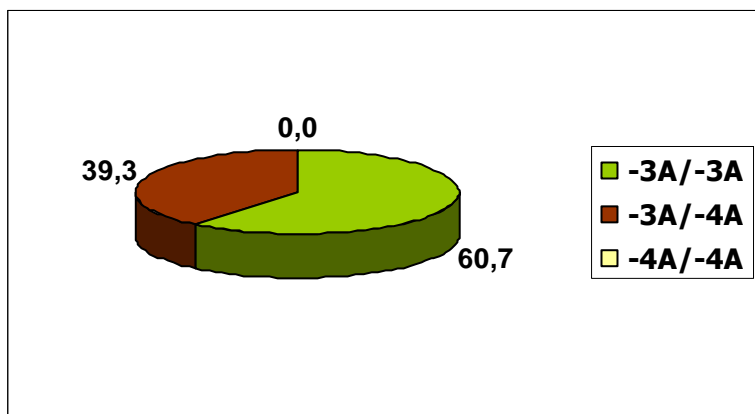
Przy porównaniu podgrupy z GH oraz PE z grupą kontrolną nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w częstości pojawiania się obserwowanych genotypów homozygotycznego -3A/-3A oraz heterozygotycznego -3A/-4A oraz alleli -3A i -4A.

W grupie z GH w porównaniu do grupy z PE obserwowano wyższą częstość występowania heterozygot -3A/-4A (44,9%) w porównaniu do grupy z PE (39,0%, WR=1,27, 95% PU 0,54-3,03, $p=ns$). Natomiast w grupie z PE częstość homozygot -3A/-3A była odpowiednio wyższa (61,0 vs. 55,1%, WR=0,78, 95% PU 0,33-1,85, $p=ns$) (tabela 15).

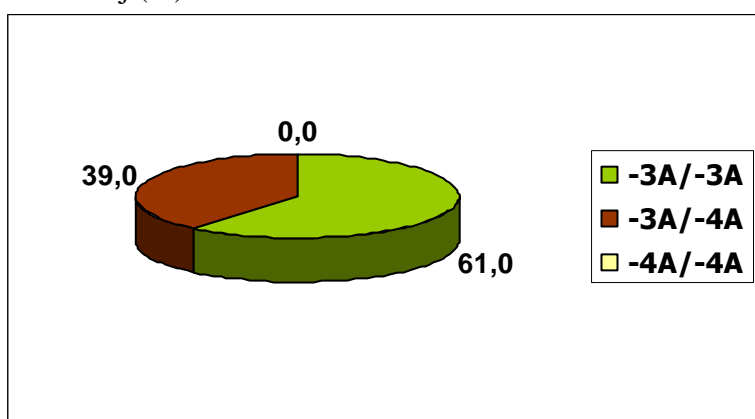
Tab. 15. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu -134delA genu EDN1 w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

<i>EDN1</i> <i>-134delA</i>	<i>Grupa z nadciśnieniem w ciąży</i>				<i>Grupa kontrolna</i> <i>n=150</i>	
	<i>Grupa GH</i> <i>n=69</i>		<i>Grupa PE</i> <i>n=41</i>			
<i>Genotypy</i>	wartość obserw. n (%)	wartość oczekiw. (%)	wartość obserw. n (%)	wartość oczekiw. (%)	wartość obserw. n (%)	wartość oczekiw. (%)
<i>-3A/-3A</i>	38 (55,1)	60,1	25 (61,0)	64,8	91 (60,7)	64,5
<i>-3A/-4A</i>	31 (44,9)	34,8	16 (39,0)	31,4	59 (39,3)	31,6
<i>-4A/-4A</i>	0 (0,0)	5,1	0 (0,0)	3,8	0 (0,0)	3,9
<i>Suma</i>	69 (100,0)	100,0	41 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0
<i>Allele</i>						
<i>-3A</i>	107 (77,5)	-	66 (80,5)	-	241 (80,3)	-
<i>-4A</i>	31 (22,5)	-	16 (19,5)	-	59 (19,7)	-
<i>Suma</i>	138 (100,0)	-	82 (100,0)	-	300 (100,0)	-

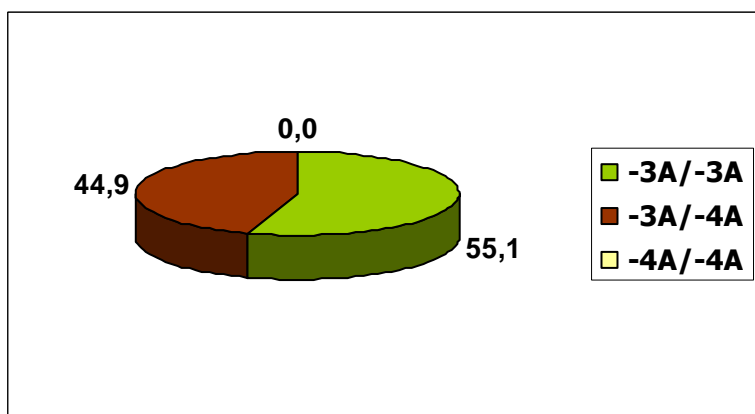
Porównanie procentowej częstości występowania genotypów polimorfizmu -134delA genu EDN1 w w grupie kontrolnej, grupie GH oraz grupie PE przedstawiają odpowiednio ryciny 20, 21 oraz 22.



Ryc. 20. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *-134delA* genu *EDNI* w grupie kontrolnej (%).



Ryc. 21. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *-134delA* genu *EDNI* w podgrupie PE (%).



Ryc. 22. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *-134delA* genu *EDNI* w podgrupie GH (%).

4.3. WSPÓLWYSTĘPOWANIE GENOTYPÓW SYNTAZY TLENKU AZOTU ORAZ ENDOTELINY 1 W GRUPIE Kobiet Z NADCIŚNIENIEM W CIĄŻY ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ

W tym etapie najpierw analizowano współwystępowanie uzyskanych w pracy genotypów polimorfizmów genu kodującego syntazę tlenku azotu.

Porównując genotypy polimorfizmów *Glu298Asp* z polimorfizmem *-786T>C* genu *NOS3* pomiędzy grupą 110 kobiet z nadciśnieniem w ciąży, a grupą kontrolną 150 zaobserwowano częstsze występowanie w grupie kontrolnej złożonych genotypów homozygotycznych niezmutowanych *GG/TT* (24,55 vs. 26,00%, $p=ns$), heterozygotycznych *GT/TC* (19,09 vs. 24,67%, $p=ns$). Istotnie różniły się również złożone genotypy homozygotyczne zmutowane *TT/CC* (0,90 vs. 6,67% w grupie kontrolnej, $p=0,019$). Występowanie pozostałych genotypów porównywanych polimorfizmów genu *NOS3* było nieznacznie częstsze w grupie kobiet z nadciśnieniem w ciąży ($p=ns$).

Pozostałe częstości współwystępowania genotypów polimorfizmów genu *NOS3* pomiędzy grupą kontrolną oraz podgrupami PE i GH, pomimo obserwowanych nieznacznych różnic co do częstości procentowego występowania, nie różniły się statystycznie istotnie (tab. 16).

Tab. 16. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *Glu298Asp* oraz *-786T>C* genu *NOS3* pomiędzy badanymi grupami kobiet.

			<i>NOS3 Glu298Asp (894G>T)</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>GG</i>	<i>GT</i>	<i>TT</i>	
<i>Nadciśnienie w ciąży</i>	<i>NOS3 -786T>C</i>	<i>TT</i>	27 (24,55)	14 (12,73)	2 (1,82)	43 (39,10)
		<i>TC</i>	28 (25,45)	21 (19,09)	3 (2,73)	52 (47,27)
		<i>CC</i>	5 (4,55)	9 (8,18)	1 (0,90)*	15 (13,63)
		<i>suma</i>	60 (54,55)	44 (40,00)	6 (5,45)	110 (100,00)
<i>GH</i>	<i>NOS3 -786T>C</i>	<i>TT</i>	13 (18,84)	10 (14,49)	0 (0,00)	23 (33,33)
		<i>TC</i>	19 (27,54)	14 (20,29)	0 (0,00)	33 (47,83)
		<i>CC</i>	4 (5,80)	8 (11,59)	1 (1,45)	13 (18,84)
		<i>suma</i>	36 (52,18)	32 (46,37)	1 (1,45)	69 (100,00)
<i>PE</i>	<i>NOS3 -786T>C</i>	<i>TT</i>	14 (34,14)	4 (9,76)	2 (4,88)	20 (48,78)
		<i>TC</i>	9 (21,95)	7 (17,07)	3 (7,32)	19 (46,34)
		<i>CC</i>	1 (2,44)	1 (2,44)	0 (0,00)	2 (4,88)
		<i>suma</i>	24 (58,53)	12 (29,27)	5 (12,20)	41 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>NOS3 -786T>C</i>	<i>TT</i>	39 (26,00)	19 (12,67)	1 (0,67)	59 (39,34)
		<i>TC</i>	29 (19,33)	37 (24,67)	2 (1,33)	68 (45,33)
		<i>CC</i>	5 (3,33)	8 (5,33)	10 (6,67)*	23 (15,33)
		<i>suma</i>	73 (48,66)	64 (42,67)	13 (8,67)	150 (100,00)

* $p=0,019$

Analizując współwystępowanie genotypów polimorfizmów *Lys198Asn* i *-134delA* genu *EDN1* obserwowano podobne częstości występowania badanych wariantów we wszystkich podgrupach kobiet – kontrolnej, PE oraz GH. Wszystkie obserwowane różnice nie były statystycznie istotne. W grupie kontrolnej odnotowano niewielką tylko przewagę współwystępowania genotypów *-3A/-3A* oraz *TT* (4,00 vs. 2,73 w grupie z nadciśnieniem, $p=ns$). Interesującą obserwacją było spostrzeżenie współwystępowania genotypu heterozygotycznego *-3A/-4A* z genotypem homozygotycznym zmutowanym *TT* u dwóch pacjentek z grupy kobiet z nadciśnieniem w ciąży (1,82%). Genotypy te nie współwystępowały u żadnej z pacjentek grupy kontrolnej (tab. 17).

Tab. 17. Współwystępowanie genotypów *Lys198Asn* oraz *-134delA* genu *EDN1* między całą grupą badaną kobiet z nadciśnieniem w ciąży oraz grupą kontrolną.

			<i>EDN1 Lys198Asn</i>			<i>Ogółem</i>
			<i>GG</i>	<i>GT</i>	<i>TT</i>	
<i>Nadciśnienie w ciąży</i>	<i>EDN1 -134delA</i>	<i>-3A/-3A</i>	39 (35,45)	21 (19,09)	3 (2,73)	63 (57,27)
		<i>-3A/-4A</i>	35 (31,82)	10 (9,09)	2 (1,82)	47 (42,73)
		<i>-4A/-4A</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	74 (67,27)	31 (28,18)	5 (4,55)	110 (100,00)
<i>GH</i>	<i>EDN1 -134delA</i>	<i>-3A/-3A</i>	23 (33,33)	13 (18,84)	2 (2,90)	38 (55,07)
		<i>-3A/-4A</i>	24 (34,78)	6 (8,70)	1 (1,45)	31 (44,93)
		<i>-4A/-4A</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	47 (68,11)	19 (27,54)	3 (4,35)	69 (100,00)
<i>PE</i>	<i>EDN1 -134delA</i>	<i>-3A/-3A</i>	16 (39,02)	8 (19,51)	1 (2,44)	25 (60,97)
		<i>-3A/-4A</i>	11 (26,83)	4 (9,76)	1 (2,44)	16 (39,03)
		<i>-4A/-4A</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	27 (65,85)	12 (29,27)	2 (4,88)	41 (100,00)
<i>Grupa kontrolna</i>	<i>EDN1 -134delA</i>	<i>-3A/-3A</i>	58 (38,67)	27 (18,00)	6 (4,00)	91 (60,67)
		<i>-3A/-4A</i>	44 (29,33)	15 (10,00)	0 (0,00)	59 (39,33)
		<i>-4A/-4A</i>	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
		<i>suma</i>	102 (68,00)	42 (28,00)	6 (4,00)	150 (100,00)

4.4. ANALIZA WARTOŚCI CIŚNIENIA SKURCZOWEGO I ROZKURCZOWEGO W ZALEŻNOŚCI OD BADANYCH POLIMORFIZMÓW GENÓW *NOS3* ORAZ *EDN1*

Przy porównywaniu średnich wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w podgrupach GH oraz PE w zależności od rozkładu badanych genotypów polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* nie zaobserwowano istotnych zależności tej badanej zmiennej od poszczególnych wariantów genetycznych. Ciekawą natomiast obserwacją było odnotowanie w grupie PE wyraźnej tendencji do zdecydowanie wyższego ciśnienia skurczowego ($205,0 \pm 21,2$ mmHg) u kobiet z genotypem homozygotycznym zmutowanym *CC* polimorfizmu $-786T>C$ genu *NOS3* w porównaniu do kobiet nosicielek genotypu homozygotycznego niezmutowanego *TT* ($177,0 \pm 17,8$ mmHg) oraz heterozygotycznego *TC* ($173,4 \pm 13,5$ mmHg) ($p=ns$) (tab. 18).

Tab. 18. Wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w badanych podgrupach GH oraz PE w zależności od polimorfizmów genu *NOS3*.

		<i>GH (n=69)</i>		<i>PE (n=41)</i>	
		<i>RR skurczowe (mmHg)</i>	<i>RR rozkurczowe (mmHg)</i>	<i>RR skurczowe (mmHg)</i>	<i>RR rozkurczowe (mmHg)</i>
<i>NOS3 Glu298Asp (894G>T)</i>	<i>GG</i>	n=36 średnia ± SD 161,8 ± 13,6 mediana 160 zakres 140-200	n=36 średnia ± SD 105,1 ± 12,7 mediana 100 zakres 80-140	n=24 średnia ± SD 177,9 ± 17,4 mediana 175 zakres 150-220	n=24 średnia ± SD 105,8 ± 12,6 mediana 110 zakres 70-120
	<i>GT</i>	n=32 średnia ± SD 162,7 ± 15,6 mediana 160 zakres 140-190	n=32 średnia ± SD 100,8 ± 9,6 mediana 100 zakres 90-130	n=12 średnia ± SD 177,1 ± 15,7 mediana 175 zakres 150-200	n=12 średnia ± SD 104,6 ± 12,7 mediana 100 zakres 90-120
	<i>TT</i>	n=1 średnia ± SD 180 mediana zakres	n=1 średnia ± SD 120 mediana zakres	n=5 średnia ± SD 170,0 ± 20,0 mediana 160 zakres 150-200	n=5 średnia ± SD 108,0 ± 8,4 mediana 110 zakres 100-120
<i>NOS3 -786T>C</i>	<i>TT</i>	n=23 średnia ± SD 164,6 ± 13,4 mediana 160 zakres 145-190	n=23 średnia ± SD 101,7 ± 10,2 mediana 100 zakres 80-130	n=20 średnia ± SD 177,0 ± 17,8 mediana 175 zakres 150-210	n=20 średnia ± SD 107,3 ± 11,2 mediana 110 zakres 80-120
	<i>TC</i>	n=33 średnia ± SD 160,6 ± 14,1 mediana 160 zakres 140-180	n=33 średnia ± SD 104,0 ± 11,7 mediana 100 zakres 90-130	n=19 średnia ± SD 173,4 ± 13,5 mediana 170 zakres 150-200	n=19 średnia ± SD 103,7 ± 12,9 mediana 100 zakres 70-120
	<i>CC</i>	n=13 średnia ± SD 163,5 ± 18,0 mediana 160 zakres 140-200	n=13 średnia ± SD 104,6 ± 13,9 mediana 100 zakres 90-140	n=2 średnia ± SD 205,0 ± 21,2 mediana 205 zakres 190-220	n=2 średnia ± SD 110,0 ± 14,1 mediana 110 zakres 100-120

Również w obydwu badanych podgrupach GH oraz PE analizowano wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego dla polimorfizmu *Lys198Asn* oraz *-134delA* genu *EDNI*. Odnotowano tutaj w grupie PE wyższe ciśnienie skurczowe u ciężarnych nosicielek genotypu homozygotycznego niezmutowanego *GG* ($180,7 \pm 15,9$ mmHg) w porównaniu do pozostałych genotypu heterozygotycznego *GT* ($169,6 \pm 18,1$ mmHg) oraz homozygotycznego zmutowanego *TT* ($165,0 \pm 7,1$ mmHg) ($p=ns$) polimorfizmu *Lys198Asn* *EDNI*. Pozostałe wartości ciśnienia zarówno skurczowego i rozkurczowego w analizowanych podgrupach przy porównywaniu nie wykazywały takich różnic (tab. 19).

Tab. 19. Wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w badanych podgrupach GH oraz PE w zależności od polimorfizmów genu *EDNI*.

		<i>GH (n=69)</i>		<i>PE (n=41)</i>	
		<i>RR skurczowe (mmHg)</i>	<i>RR rozkurczowe (mmHg)</i>	<i>RR skurczowe (mmHg)</i>	<i>RR rozkurczowe (mmHg)</i>
<i>EDNI Lys198Asn</i>	<i>GG</i>	n=47	n=47	n=27	n=27
	<i>średnia ± SD</i>	$160,8 \pm 13,7$	$101,6 \pm 10,3$	$180,7 \pm 15,9$	$107,6 \pm 12,4$
	<i>mediana</i>	160	100	180	110
	<i>zakres</i>	140-180	80-130	160-220	70-120
	<i>GT</i>	n=19	n=19	n=12	n=12
	<i>średnia ± SD</i>	$165,8 \pm 14,3$	$107,1 \pm 10,8$	$169,6 \pm 18,1$	$102,1 \pm 11,6$
	<i>mediana</i>	170	100	167,5	100
	<i>zakres</i>	140-190	95-130	150-210	80-120
	<i>TT</i>	n=3	n=3	n=2	n=2
	<i>średnia ± SD</i>	$168,3 \pm 28,4$	$106,7 \pm 28,9$	$165,0 \pm 7,1$	$102,5 \pm 3,5$
	<i>mediana</i>	160	90	165	102,5
	<i>zakres</i>	145-200	90-140	160-170	100-105
<i>EDNI -134delA</i>	<i>-3A/-3A</i>	n=38	n=38	n=25	n=25
	<i>średnia ± SD</i>	$164,1 \pm 14,7$	$105,3 \pm 12,8$	$178,6 \pm 18,0$	$104,8 \pm 11,3$
	<i>mediana</i>	160	100	180	100
	<i>zakres</i>	140-200	80-140	150-220	80-120
	<i>-3A/-4A</i>	n=31	n=31	n=16	n=16
	<i>średnia ± SD</i>	$160,5 \pm 14,3$	$101,0 \pm 9,6$	$173,8 \pm 15,4$	$107,2 \pm 13,2$
	<i>mediana</i>	160	100	170	110
	<i>zakres</i>	140-180	90-130	150-200	70-120
	<i>-4A/-4A</i>	n=0	n=0	n=0	n=0
	<i>średnia ± SD</i>	0	0	0	0
	<i>mediana</i>				
	<i>zakres</i>				

Następnie w pracy analizowano rozkład średnich wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w zależności od współwystępowania wariantów genetycznych obydwu badanych genów *NOS3* oraz *EDN1*. W grupie GH istotną obserwacją było odnotowanie wyższego ciśnienia skurczowego (169,5±22,2 mmHg) przy współwystępowaniu genotypów *GG Glu298Asp / CC -786T>C* genu *NOS3* w porównaniu do pozostałych wartości ciśnienia skurczowego dla innych kombinacji genotypów ($p=ns$). Jednocześnie obserwowano wyższe wartości ciśnienia rozkurczowego (112,5±22,2 mmHg) przy współwystępowaniu genotypów *GG Glu298Asp / CC -786T>C* genu *NOS3* w porównaniu do pozostałych wartości ciśnienia rozkurczowego dla innych kombinacji genotypów ($p=ns$) (tab. 20).

Tab. 20. Wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w grupie kobiet z GH w zależności od współwystępowania polimorfizmów genu *NOS3*.

			<i>NOS3 Glu298Asp (894G>T)</i>		
			<i>GG</i>	<i>GT</i>	<i>TT</i>
<i>RR</i> <i>skurczowe</i> <i>(mmHg)</i> <i>w grupie</i> <i>GH</i> <i>(n=69)</i>	<i>NOS3</i> <i>-786T>C</i>	<i>TT</i>	n=13 średnia ± SD 160,4 ± 10,9 mediana 160 zakres 145-180	n=10 165,0 ± 14,9 160 150-190	n=0 0
		<i>TC</i>	n=19 161,6 ± 13,7 160 140-180	n=14 159,4 ± 14,9 160 140-180	n=0 0
		<i>CC</i>	n=4 169,5 ± 22,2 165 150-200	n=8 159,4 ± 16,6 157,5 140-180	n=1 180
<i>RR</i> <i>rozkurczowe</i> <i>(mmHg)</i> <i>w grupie</i> <i>GH</i> <i>(n=69)</i>	<i>NOS3</i> <i>-786T>C</i>	<i>TT</i>	n=13 100,4 ± 8,8 100 80-110	n=10 103,5 ± 12,0 100 90-130	n=0 0
		<i>TC</i>	n=19 106,8 ± 12,2 100 90-130	n=14 100,1 ± 10,3 100 90-120	n=0 0
		<i>CC</i>	n=4 112,5 ± 22,2 110 90-140	n=8 98,8 ± 3,5 100 95-105	n=1 120

W grupie kobiet z PE średnie wartości ciśnienia skurczowego były najwyższe (179,3±17,3 mmHg) dla współwystępowania genotypów *GG Glu298Asp / TT -786T>C* genu *NOS3*. Nie odnotowano natomiast różnic statystycznie istotnych pomiędzy obserwowanymi wartościami ciśnienia skurczowego i rozkurczowego dla badanych kombinacji współwystępowania genotypów ($p=ns$). Wartości ciśnienia rozkurczowego były podobne dla wszystkich badanych konfiguracji współwystępowania genotypów badanych polimorfizmów genu *eNOS*. Analiza wartości ciśnienia rozkurczowego nie pokazała zależności od współwystępowania genotypów polimorfizmów genu *NOS3* (tab. 21).

Tab. 21. Wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w grupie kobiet z PE w zależności od współwystępowania polimorfizmów genu *NOS3*.

			<i>NOS3 Glu298Asp (894G>T)</i>		
			<i>GG</i>	<i>GT</i>	<i>TT</i>
RR skurczowe (mmHg) w grupie PE (n=41)	<i>NOS3 -786T>C</i>	<i>TT</i>	n=14	n=4	n=2
		<i>średnia ± SD</i>	179,3 ± 17,3	177,5 ± 22,2	160,0 ± 0,0
		<i>mediana</i>	180	180	160
		<i>zakres</i>	150-210	150-200	160-160
		<i>TC</i>	n=9	n=7	n=3
		<i>średnia ± SD</i>	171,1 ± 10,5	175,0 ± 13,2	176,7 ± 25,2
		<i>mediana</i>	170	170	180
		<i>zakres</i>	160-190	160-200	150-200
		<i>CC</i>	n=1	n=1	n=0
		<i>średnia ± SD</i>	220	190	0
		<i>mediana</i>			
		<i>zakres</i>			
RR rozkurczowe (mmHg) w grupie PE (n=41)	<i>NOS3 -786T>C</i>	<i>TT</i>	n=14	n=4	n=2
		<i>średnia ± SD</i>	108,9 ± 11,5	102,5 ± 12,6	105,0 ± 7,1
		<i>mediana</i>	110	100	105
		<i>zakres</i>	80-120	90-120	100-110
		<i>TC</i>	n=9	n=7	n=3
		<i>średnia ± SD</i>	101,7 ± 14,1	103,6 ± 13,1	110,0 ± 10,0
		<i>mediana</i>	100	100	110
		<i>zakres</i>	70-120	90-120	100-120
		<i>CC</i>	n=1	n=1	n=0
		<i>średnia ± SD</i>	100	120	0
		<i>mediana</i>			
		<i>zakres</i>			

Analiza rozkładu średniego ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w podgrupie GH w zależności od współwystępowania obydwu badanych polimorfizmów *Lys198Asn* oraz

-134delA genu *EDNI* pokazała wyraźną tendencję do wyższych wartości ciśnienia zarówno skurczowego, jak i rozkurczowego przy współwystępowaniu genotypów *TT Lys198Asn*

-3A/-3A -134delA genu *EDNI* (ciśnienie skurczowe $180,0 \pm 28,3$ mmHg oraz ciśnienie rozkurczowe $115,0 \pm 35,4$ mmHg), nie odnotowano jednak różnic statystycznie istotnych pomiędzy obserwowanymi wartościami ciśnienia dla współwystępowania badanych genotypów (tab. 22).

Tab. 22. Wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w grupie GH w zależności od współwystępowania polimorfizmów genu *EDNI*.

			<i>EDNI Lys198Asn</i>		
			<i>GG</i>	<i>GT</i>	<i>TT</i>
RR skurczowe (mmHg) w grupie GH (n=69)	EDNI -134delA	<i>-3A/-3A</i>	n=23	n=13	n=2
		<i>średnia ± SD</i>	161,1 ± 12,0	166,9 ± 16,5	180,0 ± 28,3
		<i>mediana</i>	160	170	180
		<i>zakres</i>	140-180	140-190	160-200
		<i>-3A/-4A</i>	n=24	n=6	n=1
		<i>średnia ± SD</i>	160,5 ± 15,4	163,3 ± 8,2	145
		<i>mediana</i>	155,5	165	
		<i>zakres</i>	140-180	150-170	
		<i>-4A/-4A</i>	n=0	n=0	n=0
		<i>średnia ± SD</i>	0	0	0
		<i>mediana</i>			
		<i>zakres</i>			
RR rozkurczowe (mmHg) w grupie GH (n=69)	EDNI -134delA	<i>-3A/-3A</i>	n=23	n=13	n=2
		<i>średnia ± SD</i>	102,4 ± 11,2	108,8 ± 11,2	115,0 ± 35,4
		<i>mediana</i>	100	100	115
		<i>zakres</i>	80-130	100-130	90-140
		<i>-3A/-4A</i>	n=24	n=6	n=1
		<i>średnia ± SD</i>	100,9 ± 9,6	103,3 ± 9,8	90
		<i>mediana</i>	100	100	
		<i>zakres</i>	90-130	95-120	
		<i>-4A/-4A</i>	n=0	n=0	n=0
		<i>średnia ± SD</i>	0	0	0
		<i>mediana</i>			
		<i>zakres</i>			

W grupie kobiet ciężarnych z PE najwyższe średnie wartości ciśnienia skurczowego obserwowano przy współwystępowaniu genotypów *GG EDNI/ -3A/-3A EDNI* ($183,1 \pm 16,6$ mmHg). Wartości średnie ciśnienia rozkurczowego były podobne dla wszystkich badanych konfiguracji współwystępowania genotypów. Obserwowane różnice pomiędzy wartościami ciśnienia skurczowego i rozkurczowego dla badanych kombinacji współwystępowania genotypów nie były statystycznie znamienne (tab. 23).

Tab. 23. Wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w grupie PE w zależności od współwystępowania polimorfizmów genu *EDNI*.

			<i>EDNI Lys198Asn</i>		
			<i>GG</i>	<i>GT</i>	<i>TT</i>
RR skurczowe (mmHg) w grupie PE (n=41)	EDNI -134delA	-3A/-3A średnia \pm SD mediana zakres	n=16 183,1 \pm 16,6 180 160-220	n=8 170,6 \pm 19,7 167,5 150-210	n=1 170
		-3A/-4A średnia \pm SD mediana zakres	n=11 177,3 \pm 14,9 180 160-200	n=4 167,5 \pm 17,1 165 150-190	n=1 160
		-4A/-4A średnia \pm SD mediana zakres	n=0 0 0	n=0 0 0	n=0 0
RR rozkurczowe (mmHg) w grupie PE (n=41)	EDNI -134delA	-3A/-3A średnia \pm SD mediana zakres	n=16 107,2 \pm 10,9 110 90-120	n=8 100,0 \pm 12,0 100 80-120	n=1 105
		-3A/-4A średnia \pm SD mediana zakres	n=11 108,2 \pm 14,7 110 70-120	n=4 106,3 \pm 11,1 105 95-120	n=1 100
		-4A/-4A średnia \pm SD mediana zakres	n=0 0 0	n=0 0 0	n=0 0

4.5. ANALIZA ŚREDNICH PARAMETRÓW KLINICZNYCH ORAZ BIOCHEMICZNYCH W BADANYCH GRUPACH W ZALEŻNOŚCI OD GENOTYPU

W kolejnym etapie pracy podzielono całą badaną grupę kobiet z nadciśnieniem w ciąży (n=110) w zależności od występowania genotypów dla badanych polimorfizmów: *Glu298Asp*, *-786T>C* genu *NOS3* oraz *Lys198Asn*, *-134delA* genu *EDN1*. Kolejno porównywano wartości badanych parametrów klinicznych i biochemicznych pomiędzy grupą kobiet nosicielek genotypu homozygotycznego a grupą kobiet nosicielek genotypu heterozygotycznego i homozygotycznego zmutowanego.

W zakresie tej analizy dla polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* zaobserwowano istotne statystycznie różnice w wartości pH żylnego w grupie noworodków ($7,288 \pm 0,107$ vs. $7,344 \pm 0,162$, $p=0,013$). Dla polimorfizmu *-786T>C* genu *NOS3* zaobserwowano istotne statystycznie różnice w wartości stężenia chloru ($104,0 \pm 2,57$ vs. $106,0 \pm 11,4$, $p=0,014$). Podczas porównywania pozostałych parametrów nie uzyskano różnic istotnych pod względem statystycznym (tab. 24, 25, 26, 27).

Tab. 24. Analiza porównawcza parametrów klinicznych i biochemicznych w całej grupie badanej pacjentek z nadciśnieniem w ciąży (n=110) w zależności od poszczególnych genotypów polimorfizmu *Glu298Asp* (894G>T) genu *NOS3*.

	GG (n=60)	GT + TT (n=50)	p
wiek (lata)	30,267 ± 4,632	28,4 ± 4,271	p=ns
wiek ciążowy (tydzień)	36,583 ± 3,806	37,18 ± 3,055	p=ns
RR skurczowe (mmHg)	168,25 ± 17,07	162,22 ± 16,857	p=ns
RR rozkurczowe (mmHg)	105,417 ± 12,531	102,82 ± 10,627	p=ns
mocznik (mg/dl)	24,221 ± 12,135	23,155 ± 9,757	p=ns
kwas moczowy (mg/dl)	5,901 ± 1,464	5,764 ± 1,265	p=ns
białko całkowite (g%)	6,211 ± 0,775	6,165 ± 0,686	p=ns
Na (mEq/l)	136,748 ± 2,294	136,695 ± 2,315	p=ns
K(mEq/l)	4,286 ± 0,434	4,234 ± 0,461	p=ns
Cl (mEq/l)	106,132 ± 12,173	104,368 ± 2,225	p=ns
BMI przed ciążą (kg/m ²)	25,358 ± 5,366	24,682 ± 5,156	p=ns
BMI w ciąży (kg/m ²)	31,365 ± 5,636	30,729 ± 5,343	p=ns
przyrost BMI (kg/m ²)	6,007 ± 2,459	6,047 ± 2,322	p=ns
masa noworodka (g)	2695,167 ± 1056,187	2950,62 ± 886,31	p=ns
Ap 1	7,897 ± 2,587	8,592 ± 2,061	p=ns
Ap 5	9,158 ± 1,412	9,42 ± 1,052	p=ns
pH żyłne	7,288 ± 0,107	7,344 ± 0,162	p=0,013
pH tętnicze	7,226 ± 0,105	7,269 ± 0,149	p=ns
masa łożyska (g)	535,5 ± 193,693	600,22 ± 158,643	p=ns

Tab. 25. Analiza porównawcza parametrów klinicznych i biochemicznych w całej grupie badanej pacjentek z nadciśnieniem w ciąży (n=110) w zależności od poszczególnych genotypów polimorfizmu -786T>C genu NOS3.

	<i>TT</i> (n=43)	<i>TC + CC</i> (n=67)	<i>p</i>
<i>wiek (lata)</i>	29,4 ± 4,75	29,4 ± 4,45	<i>p=ns</i>
<i>wiek ciążowy (tydzień)</i>	36,8 ± 3,09	36,9 ± 3,74	<i>p=ns</i>
<i>RR skurczowe (mmHg)</i>	170,0 ± 16,6	166,0 ± 17,0	<i>p=ns</i>
<i>RR rozkurczowe (mmHg)</i>	104,0 ± 10,9	104,0 ± 12,3	<i>p=ns</i>
<i>mocznik (mg/dl)</i>	22,4 ± 6,78	24,6 ± 13,1	<i>p=ns</i>
<i>kwas moczowy (mg/dl)</i>	5,97 ± 1,33	5,77 ± 1,4	<i>p=ns</i>
<i>białko całkowite (g%)</i>	6,18 ± 0,85	6,19 ± 0,66	<i>p=ns</i>
<i>Na (mEq/l)</i>	136,0 ± 2,16	137,0 ± 2,34	<i>p=ns</i>
<i>K(mEq/l)</i>	4,24 ± 0,36	4,28 ± 0,49	<i>p=ns</i>
<i>Cl (mEq/l)</i>	104,0 ± 2,57	106,0 ± 11,4	<i>p=0,014</i>
<i>BMI przed ciążą (kg/m²)</i>	24,5 ± 4,47	25,4 ± 5,71	<i>p=ns</i>
<i>BMI w ciąży (kg/m²)</i>	30,9 ± 5,16	31,2 ± 5,73	<i>p=ns</i>
<i>przyrost BMI (kg/m²)</i>	6,38 ± 2,32	5,82 ± 2,44	<i>p=ns</i>
<i>masa noworodka (g)</i>	2733,0 ± 997,0	2862,0 ± 997,0	<i>p=ns</i>
<i>Ap 1</i>	8,22 ± 2,24	8,21 ± 2,47	<i>p=ns</i>
<i>Ap 5</i>	9,33 ± 1,37	9,25 ± 1,2	<i>p=ns</i>
<i>pH żyłne</i>	7,29 ± 0,1	7,33 ± 0,16	<i>p=ns</i>
<i>pH tętnicze</i>	7,24 ± 0,11	7,25 ± 0,14	<i>p=ns</i>
<i>masa łożyska (g)</i>	571,0 ± 178,0	561,0 ± 184,0	<i>p=ns</i>

Tab. 26. Analiza porównawcza parametrów klinicznych i biochemicznych w całej grupie badanej pacjentek z nadciśnieniem w ciąży (n=110) w zależności od poszczególnych genotypów polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDN1*.

	GG (n=74)	GT + TT (n=36)	p
<i>wiek (lata)</i>	29,0 ± 4,79	30,3 ± 3,93	<i>p=ns</i>
<i>wiek ciążowy (tydzień)</i>	36,8 ± 3,6	37,0 ± 3,28	<i>p=ns</i>
RR skurczowe (mmHg)	168,0 ± 17,4	167,0 ± 16,1	<i>p=ns</i>
RR rozkurczowe (mmHg)	104,0 ± 11,4	105,0 ± 12,5	<i>p=ns</i>
<i>mocznik (mg/dl)</i>	24,6 ± 11,7	22,0 ± 9,62	<i>p=ns</i>
<i>kwas moczowy (mg/dl)</i>	5,97 ± 1,44	5,61 ± 1,19	<i>p=ns</i>
<i>białko całkowite (g%)</i>	6,26 ± 0,78	6,04 ± 0,61	<i>p=ns</i>
<i>Na (mEq/l)</i>	137,0 ± 2,3	137,0 ± 2,31	<i>p=ns</i>
<i>K(mEq/l)</i>	4,31 ± 0,46	4,16 ± 0,4	<i>p=ns</i>
<i>Cl (mEq/l)</i>	106,0 ± 11,0	104,0 ± 2,45	<i>p=ns</i>
BMI przed ciążą (kg/m²)	25,6 ± 5,61	24,0 ± 4,33	<i>p=ns</i>
BMI w ciąży (kg/m²)	31,6 ± 5,61	30,0 ± 5,13	<i>p=ns</i>
przyrost BMI (kg/m²)	6,06 ± 2,47	5,96 ± 2,24	<i>p=ns</i>
masa noworodka (g)	2832,0 ± 982,0	2770,0 ± 1008,0	<i>p=ns</i>
Ap 1	8,03 ± 2,53	8,62 ± 1,97	<i>p=ns</i>
Ap 5	9,15 ± 1,42	9,58 ± 0,71	<i>p=ns</i>
pH żyłne	7,32 ± 0,16	7,31 ± 0,09	<i>p=ns</i>
pH tętnicze	7,25 ± 0,15	7,24 ± 0,08	<i>p=ns</i>
masa łożyska (g)	567,0 ± 188,0	561,0 ± 168,0	<i>p=ns</i>

Tab. 27. Analiza porównawcza parametrów klinicznych i biochemicznych w całej grupie badanej pacjentek z nadciśnieniem w ciąży (n=110) w zależności od poszczególnych genotypów polimorfizmu *-134delA* genu *EDN1*.

	-3A/-3A (n=63)	-3A/-4A + -4A/-4A (n=47)	<i>p</i>
wiek (lata)	29,6 ± 4,68	29,5 ± 4,65	<i>p</i> =ns
wiek ciążowy (tydzień)	37,1 ± 3,28	36,6 ± 3,68	<i>p</i> =ns
RR skurczowe (mmHg)	168,0 ± 17,4	165,0 ± 15,8	<i>p</i> =ns
RR rozkurczowe (mmHg)	104,0 ± 11,9	103,0 ± 11,2	<i>p</i> =ns
mocznik (mg/dl)	22,9 ± 8,59	25,0 ± 13,5	<i>p</i> =ns
kwas moczowy (mg/dl)	6,02 ± 1,35	5,71 ± 1,46	<i>p</i> =ns
białko całkowite (g%)	6,18 ± 0,76	6,24 ± 0,65	<i>p</i> =ns
Na (mEq/l)	137,0 ± 2,23	137,0 ± 2,38	<i>p</i> =ns
K(mEq/l)	4,22 ± 0,38	4,37 ± 0,52	<i>p</i> =ns
Cl (mEq/l)	105,0 ± 2,09	106,0 ± 13,8	<i>p</i> =ns
BMI przed ciążą (kg/m²)	24,9 ± 5,05	25,6 ± 5,64	<i>p</i> =ns
BMI w ciąży (kg/m²)	31,0 ± 4,99	31,4 ± 5,95	<i>p</i> =ns
przyrost BMI (kg/m²)	6,08 ± 2,15	5,82 ± 2,72	<i>p</i> =ns
masa noworodka (g)	2855,0 ± 871,0	2815,0 ± 1122,0	<i>p</i> =ns
Ap 1	8,38 ± 2,21	7,98 ± 2,67	<i>p</i> =ns
Ap 5	9,38 ± 1,15	9,22 ± 1,32	<i>p</i> =ns
pH żyłne	7,3 ± 0,09	7,33 ± 0,19	<i>p</i> =ns
pH tętnicze	7,23 ± 0,09	7,27 ± 0,17	<i>p</i> =ns
masa łożyska (g)	562,0 ± 153,0	580,0 ± 213,0	<i>p</i> =ns

4.6. ANALIZA CZĘSTOŚCI WYSTĘPOWANIA HAPLOTYPÓW BADANYCH POLIMORFIZMÓW SYNTAZY TLENKU AZOTU I ENDOTELINY-1

Wykorzystując program PHASE (wersja 2.1) analizowano częstość występowania haplotypów badanych polimorfizmów genów syntazy tlenku azotu i endoteliny-1. W toku badań stwierdzono występowanie czterech haplotypów dla każdego z dwóch genów.

Dla badanych polimorfizmów genu *NOS3* stwierdzono występowanie następujących haplotypów: *TG*, *CG*, *CT*, *TT*. Zaobserwowano częstsze występowanie haplotypu *CG* w grupie badanej (0,234892 vs. 0,184909, $p=ns$), natomiast haplotypu *CT* w grupie kontrolnej (0,137836 vs. 0,195091, $p=ns$). Uzyskane wyniki dla badanych polimorfizmów genu *NOS3* przedstawiono w tabeli 28.

Tab. 28. Częstość występowania poszczególnych haplotypów badanych polimorfizmów genu *NOS3* oszacowana za pomocą programu PHASE. Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm -786T>C, druga 894G>T (*Glu298Asp*).

<i>Haplotyp</i>	<i>Cała grupa (n=260)</i>		<i>Grupa badana (n=110)</i>		<i>Grupa kontrolna (n=150)</i>	
	<i>częstość występowania</i>	<i>błąd standardowy</i>	<i>częstość występowania</i>	<i>błąd standardowy</i>	<i>częstość występowania</i>	<i>błąd standardowy</i>
<i>TG</i>	0,513177	0,011359	0,510563	0,012112	0,515091	0,013352
<i>CG</i>	0,206054	0,011359	0,234892	0,012112	0,184909	0,013352
<i>CT</i>	0,170869	0,011359	0,137836	0,012112	0,195091	0,013352
<i>TT</i>	0,109900	0,011359	0,116710	0,012112	0,104909	0,013352

p-value for testing H0: cases ~ controls = 0.2

Dla genu *EDNI* zobserwowano występowanie następujących haplotypów: *3AT*, *3AG*, *4AT*, *4AG*. W tym zakresie odnotowano podobne wartości częstości występowania haplotypów w grupie badanej i kontrolnej (haplotyp *3AT*: 0,155944 vs. 0,157551, $p=ns$, haplotyp *3AG*: 0,630420 vs. 0,645783, $p=ns$, haplotyp *4AT*: 0,030420 vs. 0,022449, $p=ns$, haplotyp *4AG*: 0,183217 vs. 0,174217, $p=ns$). Wyniki analizy haplotypów dla badanych polimorfizmów genu *EDNI* przedstawiono w tabeli 29.

Tab. 29. Częstość występowania poszczególnych haplotypów badanych polimorfizmów genu *EDNI* oszacowana za pomocą programu PHASE. Zapis haplotypów: pierwsza litera polimorfizm -134delA, druga *Lys198Asn*.

<i>Haplotyp</i>	<i>Cała grupa (n=260)</i>		<i>Grupa badana (n=110)</i>		<i>Grupa kontrolna (n=150)</i>	
	<i>częstość występowania</i>	<i>błąd standardowy</i>	<i>częstość występowania</i>	<i>błąd standardowy</i>	<i>częstość występowania</i>	<i>błąd standardowy</i>
<i>3AT</i>	0,156871	0,006260	0,155944	0,007661	0,157551	0,008174
<i>3AG</i>	0,639283	0,006260	0,630420	0,007661	0,645783	0,008174
<i>4AT</i>	0,025822	0,006260	0,030420	0,007661	0,022449	0,008174
<i>4AG</i>	0,178024	0,006260	0,183217	0,007661	0,174217	0,008174

p-value for testing H0: cases ~ controls = 0,89

5. DYSKUSJA

Pomimo licznych hipotez etiopatogeneza nadciśnienia ciążowego i stanu przedrzucawkowego nie została jednoznacznie wyjaśniona. Prawdopodobnie jest to złożony proces wieloczynnikowy prowadzący do rozwoju objawów w drugiej połowie ciąży. Obecnie sugeruje się dwuetapowy model rozwoju tej jednostki chorobowej obejmujący w pierwszym etapie nieprawidłową inwazję komórek trofoblastu do końcowych odcinków tętnic spiralnych co w korelacji z pewnymi czynnikami matczynymi prowadzi do hipoperfuzji łożyska, aktywacji neutrofilów, produkcji wolnych rodników tlenowych czyli tzw. stresu oksydacyjnego i rozwoju drugiego etapu w etiopatogenezie choroby jakim jest uszkodzenie komórek śródbłonna naczyniowego (92, 93). Jednymi z wielu czynników prowadzącymi do rozwoju stanu przedrzucawkowego są uwarunkowania genetyczne wśród których dominuje koncepcja genów kandydujących tzn. takich dla których udokumentowana jest biologiczna funkcja i których działanie warunkuje rozwój procesów patofizjologicznych (105). Obecnie uważa się, że rozwój preeklampsji uwarunkowany jest współdziałaniem wielu genów i ich polimorfizmów (ponad 60 genów kandydujących) wśród których wymienić należy: geny związane z regulacją ciśnienia tętniczego tj. geny układu renina- angiotensyna, geny kaskady krzepnięcia i fibrynolizy, geny odpowiedzialne za angiogenezę, geny układu cytokin, stresu oksydacyjnego i metabolizmu lipidów oraz geny związane z funkcją śródbłonna (115, 87).

5.1. SYNTAZA TLENKU AZOTU (ENOS)

5.1.1. ROLA TLENKU AZOTU W CHOROBAH UKŁADU KRĄŻENIA

Wiele informacji dotyczących roli NO w układzie sercowo-naczyniowym pochodzi z obserwacji jego działania w przebiegu chorób tego układu. Niedobór NO wiąże się z takimi zaburzeniami jak nadciśnienie, cukrzyca, miażdżyca i niewydolność serca (86).

Jak wspomniano wcześniej gwałtowne wstrzyknięcie antagonistów syntazy tlenku azotu lub przewlekła inhibicja syntezy NO prowadzi do spadku rzutu serca i wzrostu ciśnienia tętniczego krwi. Przewlekłe zablokowanie *NOS* prowadzi bardzo szybko do rozwinięcia się wszystkich konsekwencji organicznych towarzyszących wieloletniemu, ciężkiemu

nadciśnieniu tętniczemu (masywna miażdżycza prowadząca do znacznych zaburzeń unaczynienia OUN, nerek i serca; kłębuszki nerkowe ulegają zniszczeniu i rozwija się niewydolność nerek, w sercu obserwuje się rozsiane zmiany zawałowe a następnie bliznowacenie tkanki sercowej). Co więcej sytuacja ta prowadzi do remodelingu tętniczek, ich przerostu i zwiększenia potencjału agregacji płytek krwi. Jednak dokładny mechanizm i rola tych ostatnich zjawisk nie jest jeszcze do końca poznany (25). Powyższe wyniki obserwacji klinicznych jasno dowodzą, że NO uczestniczy w regulacji ciśnienia tętniczego krwi, a jego brak może być przyczyną nadciśnienia. Specyficzne zablokowanie genów odpowiedzialnych za syntezę NO w endotelium skutkuje wzrostem średniego ciśnienia tętniczego o 15-20 mmHg.

Wzrost oporu obwodowego, który pojawia się w niewydolności serca może być tylko częściowo tłumaczony aktywacją układu katecholamin czy układu RAA. Sugeruje to, że w przebiegu tej choroby obecny jest defekt odpowiedniej adaptacji naczyń obwodowych do zwiększonych potrzeb metabolicznych okolicznych tkanek. Zaburzenie to jest połączone z obwodowym procesem patofizjologicznym, w którym NO odgrywa istotną rolę. Jednakże zjawisko to jest na pewno złożone i różne zmiany dotyczące syntezy NO zachodzą w krążeniu płucnym i krążeniu dużym. Różnice obserwowane są także w profilu syntazy indukowalnej i śródbłonkowej komórek mięśniowych gładkich w krwioobiegu małym i dużym (83).

Nadciśnienie tętnicze prowadzi do hipertrofii błony środkowej ściany naczynia i nadmiernej syntezy włókien kolagenowych. Tlenek azotu bierze udział w utrzymaniu prawidłowej struktury ściany naczynia. Powstrzymuje proliferację komórek mięśniowych gładkich i zwiększa średnicę światła naczynia. Każde lekarstwo, które stymuluje syntezę NO zmniejsza ryzyko stenozы światła naczynia (72).

Zwiększeniu się wymiaru naczynia towarzyszy wzrost aktywności syntazy tlenu azotu, skutkując wzrostem stężenia cGMP w ścianie naczynia, a jeśli stymulacja ta utrzymuje się dłużej, to dochodzi także do wzmożenia syntezy NOS III. Wzrost średnicy naczynia hamowany jest w obecności antagonistów argininy. Regularne ćwiczenia fizyczne jak i długotrwały wzrost aktywności metabolicznej otaczających tkanek także powodują wzrost aktywności syntazy NO, jednak w mniejszym stopniu niż wzrost naprężenia stycznego. Podobnie w przypadku przewlekłego zmniejszenia przepływu krwi w wyniku długotrwałego zmniejszenia aktywności metabolicznej otaczających tkanek lub w wyniku stałego zahamowania aktywności syntazy NO antagonistami argininy dochodzi do zmniejszenia średnicy światła tętnicy. Powyższe dane świadczą o udziale syntazy NO w adaptacji struktury

ściany naczyń na zmieniające się warunki hemodynamiczne (patologiczne i fizjologiczne) w danym naczyniu, czyli w remodelingu ściany naczyń (37).

Wydaje się również, iż NO odgrywa bardzo ważną rolę w patomechanizmie miażdżycy. W przebiegu miażdżycy dochodzi do powstania blaszki miażdżycowej, remodelingu i stenozy co prowadzi do upośledzonej wazodylatacyjnej odpowiedzi ściany naczyń na zwiększone zapotrzebowanie metaboliczne otaczających tkanek i zwiększony przepływ krwi w zmienionym miażdżycowo naczyniu. Dodatkowo zdolność śródbłoka do zapobiegania agregacji płytek jest osłabiona na skutek zmniejszenia całkowitej powierzchni zdrowego śródbłoka. Powyższe dwa patomechanizmy przyczyniają się do powstania defektu syntezy i metabolizmu NO.

5.1.2. ROLA POLIMORFIZMU GENU *NOS3* W ROZWOJU CHOROÓB UKŁADU KRAŻENIA

Polimorfizmy genu śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (*NOS3*) stały się przedmiotem licznych analiz. Ponieważ dostępność śródbłonkowego tlenu azotu jest regulowana głównie na poziomie jego produkcji, w patogenezie chorób układu krążenia sugeruje się udział polimorfizmów genu syntazy tlenu azotu. Warianty genetyczne syntazy tlenu azotu mają wpływ na rozwój chorób sercowo-naczyniowych, w tym nadciśnienia tętniczego, niewydolności i zawału serca, czy udaru mózgu. Prawdopodobnie zwiększają również ryzyko powikłań naczyniowych w przebiegu cukrzycy.

Do najczęściej analizowanych polimorfizmów należą *Glu298Asp* oraz *-786T>C*. Wykazano już między innymi związek polimorfizmu *Glu298Asp* z ryzykiem zawału serca, nadciśnienia tętniczego oraz ze zwiększoną podatnością naczyń wieńcowych na skurcz (88, 101, 121, 123, 117). Wyniki pracy Nakayama i wsp. wskazują na trzykrotnie większą podatność naczyń wieńcowych na skurcz w przypadku osób będących homozygotami *CC* (polimorfizm *-786T>C*) (85).

Syntaza tlenu azotu odgrywa istotną rolę w utrzymywaniu prawidłowego ciśnienia tętniczego krwi, a tym samym ma znaczny udział w patogenezie nadciśnienia. Autorzy pracy Hyndman i wsp. badali związek polimorfizmu *-786T>C* genu *NOS3* z rozwojem izolowanego nadciśnienia tętniczego (40). Genotypowanie oraz pomiar ciśnienia tętniczego przeprowadzono w grupie aż 705 mężczyzn w średnim wieku (± 45 lat). Z analizy wykluczono osoby z dodatnim wywiadem w kierunku choroby wieńcowej,

chorób naczyniowych ośrodkowego układu nerwowego i chorób naczyń obwodowych. Nadciśnienie rozpoznawano w przypadku ciśnienia skurczowego > 140 mmHg lub rozkurczowego > 95 mmHg. Spośród 705 badanych nadciśnienie tętnicze stwierdzono u 106 pacjentów. Analiza genetyczna wykazała istotnie statystycznie wyższe średnie ciśnienie tętnicze krwi u badanych z genotypem *CC* w porównaniu do nosicieli genotypu *TT* ($p < 0,05$). 22,6% pacjentów z genotypem *CC* miało nadciśnienie tętnicze, w przypadku genotypów *TT* i *CT* wartości te wynosiły odpowiednio 12,4% i 14,8% (36).

Hyndam i wsp. zwrócili ponadto uwagę na istotnie wyższą masę ciała, poziom triglicerydów w surowicy oraz starszy wiek pacjentów z rozpoznaniem nadciśnieniem (40). Pozostaje to w zgodności z koncepcją obszarów zdrowia Lalonda, w której na stan zdrowia populacji aż w 50% wpływ ma styl życia. Yoshimura i wsp. wykazali, że palenie tytoniu potęguje ryzyko choroby serca (wynikającej z podatności naczyń wieńcowych na skurcz) u osób będących homozygotami *CC* (128). Natomiast badania Nasreen i wsp. dowodzą niższego przepływu krwi w naczyniach mózgowych u palaczy homozygot *CC* w porównaniu do osób palących nie będących homozygotami *CC* (86).

Ciekawych wyników dostarcza badanie Velosso i wsp. Autorzy tej pracy zwrócili uwagę na zróżnicowanie etniczne ryzyka rozwoju niewydolności serca w powiązaniu z polimorfizmem *Glu298Asp* genu *NOS3* (117). Badanie zostało przeprowadzone wśród populacji brazylijskiej. Grupę badaną stanowiło 100 pacjentów z rozpoznaną niewydolnością serca, natomiast do grupy kontrolnej włączono 103 zdrowych ochotników. U wszystkich pacjentów wykonano pomiary lewego przedsionka i lewej komory serca oraz oznaczono frakcję wyrzutową lewej komory. Częstość występowania alleli wynosiła w grupie badanej *Glu298*=72%/ *Asp298*=28%. Rozkład genotypów w grupie pacjentów z niewydolnością serca był następujący: *Glu298Glu*:49%; *Glu298Asp*:47%; *Asp298Asp*:4%. Natomiast w grupie kontrolnej częstości te wynosiły odpowiednio 60% *Glu298*, 40% *Asp298*; 35% *Glu298Glu*, 49.5% *Glu298Asp* oraz 15.5% *Asp298Asp*. Częstość występowania allele *Glu298* była wyższa w grupie badanej ($p=0,009$), podobnie jak częstość genotypu *Glu298Glu* ($p=0,03$).

Allel *Glu298* z podobną częstością występował u białych pacjentów (67%) i u Afro-Brazylijczyków (79%), jednak wykazano istotną różnicę w częstości występowania genotypu *Glu298Glu* wśród białych i ciemnoskórych chorych ($p=0,03$). Na tej podstawie Autorzy badania sugerują regionalne zróżnicowanie w częstości występowania polimorfizmu

Glu298Asp. Ponadto wykazano zwiększone ryzyko wystąpienia nadciśnienia tętniczego oraz większy wymiar lewego przedsionka u pacjentów będących homozygotami *Glu298Glu* (117).

Relacji polimorfizmu *Glu298Asp* z nadciśnieniem tętniczym dotyczy też praca Souza-Costa i wsp. Celem tego badania była ocena związku polimorfizmów *Glu298Asp*, *-786T/C* oraz *4b/4a* genu *NOS3* z rozwojem nadciśnienia tętniczego u otyłych dzieci i nastolatków. Genotypowanie przeprowadzono u 110 otyłych dzieci z prawidłowymi wartościami ciśnienia tętniczego oraz u 73 otyłych dzieci z rozpoznaniem nadciśnienia tętniczego. Grupę kontrolną stanowiło 175 zdrowych dzieci i nastolatków. Częstość występowania genotypu *4a4a* była wyższa u otyłych dzieci, zarówno tych z nadciśnieniem tętniczym, jak i tych z prawidłowymi wartościami ciśnienia tętniczego ($p<0,01$). Genotyp *Asp298Asp* występował rzadziej u otyłych dzieci z prawidłowym ciśnieniem ($p<0,02$). Nie wykazano żadnych istotnych różnic w rozkładzie alleli i genotypów badanych polimorfizmów w badanych grupach. Jednak współwystępowanie alleli *786C*, *4b* oraz *Glu298* było częstsze u otyłych dzieci z nadciśnieniem tętniczym w porównaniu do grupy kontrolnej i grupy dzieci otyłych z prawidłowym ciśnieniem tętniczym (106).

Tepliakov i wsp. analizowali związek polimorfizmów $(CCTTT)n$ genu *NOS2* oraz *Glu298Asp* i *4a/4b* genu *NOS3* z ryzykiem rozwoju przewlekłej niewydolności serca u pacjentów z chorobą niedokrwienną serca. Grupę badaną stanowiło 165 pacjentów z chorobą wieńcową, natomiast do grupy kontrolnej włączono 114 zdrowe osoby. Ilość powtórzeń $(CCTTT)n$ oraz genotyp *Glu298Glu* zwiększały ryzyko rozwoju przewlekłej niewydolności serca. Ponadto genotyp homozygotyczny *Glu298Glu* wiązał się z niepomyślnym przebiegiem choroby (111).

Badanie przeprowadzone przez Cheng i wsp. w populacji chińskiej zwraca uwagę na możliwy związek wariantów genu *NOS3* (*-922A/G*, *-786T/C*, *894G/T*) z ryzykiem wystąpienia niedokrwiennego udaru mózgu. Genotypowanie przeprowadzono u 309 pacjentów z udarem niedokrwiennym mózgu i u takiej samej liczby zdrowych osób. Częstość występowania allele *-922G* była znacznie częstsza w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej (12,14% vs 8,09%, $p=0,018$). Ponadto wykazano większą częstość występowania genotypu *786CC* w grupie pacjentów z przebyłym udarem niedokrwiennym mózgu ($p=0,029$). W odniesieniu do polimorfizmu *-922A/G* zwiększone ryzyko wystąpienia udaru odnotowano w przypadku genotypów *AG+GG* ($p=0,047$) (17).

5.1.3. BADANIA DOTYCZĄCE POLIMORFIZMU GENU ŚRÓDBŁONKOWEJ SYNTAZY NO U CIĘŻARNYCH ZE STANEM PRZEDRZUCAWKOWYM

Wyniki licznych badań potwierdzają jednoznacznie wieloczynnikową etiopatogenezę rozwoju nadciśnienia w ciąży, gdzie oprócz roli czynników genetycznych istotny wpływ na rozwój choroby ma jeszcze szereg innych uwarunkowań. Znajduje to odzwierciedlenie w analizach korelacji polimorfizmów genu *NOS3* z rozwojem stanu przedrzucawkowego, gdzie część badań dowodzi istnienia takiego związku, inne natomiast temu zaprzeczają. Prawdopodobnie uwarunkowane jest to zmiennymi takimi jak rasa, wiek, status socjoekonomiczny i innymi czynnikami środowiskowymi mogącymi mieć wpływ na rozwój nadciśnienia w ciąży.

Yoshimura i wsp. w 2000 r. badali wpływ poszczególnych genotypów i alleli polimorfizmu *Glu298Asp* w grupie 152 kobiet japońskich spełniających kryteria stanu przedrzucawkowego oraz grupie kontrolnej 170 zdrowych ciężarnych. W grupie badanej wyodrębniono: 35 kobiet ciężarnych z łagodną postacią stanu przedrzucawkowego tj. RR \geq 140/90mmHg i białkomocz \geq 30 mg/dL, 80 ciężarnych z ciężką postacią stanu przedrzucawkowego tj. RR \geq 160/110 mmHg, białkomocz \geq 2g/24h, poziom płytek krwi $<$ 100000/mm³, wzrost stężenia enzymów wątrobowych, oraz grupę 37 kobiet, u których nadciśnienie tętnicze rozpoznano przed ciążą. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano częstsze występowanie heterozygotycznego genotypu *TG NOS3* (27,5%) oraz zmutowanego allela *T* (15,0%) w grupie kobiet z ciężką postacią stanu przedrzucawkowego, w stosunku do grupy kontrolnej (odpowiednio 12,9% i 7,6%). Zwrócono również uwagę na brak różnicy częstości występowania tego heterozygotycznego genotypu w grupie ciężarnych z łagodną postacią PE i ciężarnych z nadciśnieniem z przed ciąży w stosunku do grupy kontrolnej. Analizowano także średni wiek zakończenia ciąży i masę urodzeniową noworodków w poszczególnych grupach badanych, gdzie wykazano różnice istotne statystycznie. Dowiedziono korelacji pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* a rozwojem różnych postaci stanu przedrzucawkowego i powikłaniami jakimi są wcześniactwo i niska masa urodzeniowa noworodków (127).

Ta sama grupa badaczy Yoshimura i wsp. w 2003 r. w następnej publikacji przedstawiła wyniki pracy dotyczącej analizy częstości występowania poszczególnych genotypów w zakresie polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* w grupie 112 kobiet ciężarnych

ze stanem przedrzucawkowym z rejonu Bangladeszu w stosunku do grupy kontrolnej 119 zdrowych ciężarnych. Przeprowadzając analizę przyjęto te same kryteria włączenia i wyłączenia pacjentek do badania. Uzyskano zaskakujące wyniki w których wykazano brak istotnych statystycznie różnic w częstości występowania poszczególnych genotypów tj. homozygot *TT NOS3*, heterozygot *TG NOS3* i homozygot *GG NOS3*, także częstości występowania zmutowanego allela *T* w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej. Wyniki te różnią się znacznie od wyników uzyskanych i opublikowanych wcześniej przez tą samą grupę badaczy lecz dotyczącymi kobiet ciężarnych w populacji Japonii. Na podstawie uzyskanych danych wykazano, iż występowanie polimorfizmu *Glu298Asp NOS3* u kobiet z rejonu Bangladeszu nie może być czynnikiem predykcyjnym rozwoju stanu przedrzucawkowego (128).

Serrano i wsp. w 2004 roku opublikowali wyniki wielośrodkowego badania w Kolumbii obejmującego grupę 322 młodych kobiet ciężarnych z rozpoznaniem stanu przedrzucawkowego i grupę kontrolną w liczbie 522 zdrowych ciężarnych. Badane grupy analizowano w zakresie polimorfizmów *Glu298Asp* i *-786T>C* genu *NOS3* i ich korelacji z rozwojem preeklampsji. Udowodniono statystycznie istotną zależność pomiędzy występowaniem PE u homozygot *Asp/Asp* polimorfizmu 298 genu *NOS3* w badanych grupach. Patomechanizm występowania tego powikłania w ciąży badacze tłumaczą zmniejszeniem syntezy NO i upośledzeniem funkcji śródbłonna naczyń wśród badanych homozygot. W zaprezentowanej pracy Serrano i wsp. nie zaobserwowali korelacji pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów polimorfizmu *-786T>C* genu *NOS3*, a rozwojem stanu przedrzucawkowego w badanych grupach (99).

Zaprezentowane w powyższej pracy wyniki w zakresie polimorfizmu *-786T>C* genu *NOS3* są w pełni zgodne z wynikami uzyskanymi w prezentowanej pracy, gdzie również nie wykazano różnic statystycznie istotnych pomiędzy częstością występowania poszczególnych genotypów w grupie kobiet ciężarnych z nadciśnieniem w ciąży oraz grupie kontrolnej. Odmienne wyniki tych samych grup badawczych w różnych pracach dotyczących genetycznych uwarunkowań nadciśnienia w ciąży uwarunkowane są prawdopodobnie zmiennymi takimi jak rasa, wiek, status socjoekonomiczny i innymi mogącymi mieć wpływ na rozwój tej jednostki chorobowej w ciąży.

Hakli i wsp. przebadali pod względem polimorfizmu *Glu298Asp* genu 132 ciężarne z rozpoznaniem stanem przedrzucawkowym, a grupę kontrolną stanowiło 113 zdrowych kobiet

w ciąży. Analiza dotyczyła populacji Finlandii. Rozkład genotypów w obydwu badanych grupach był podobny ($p=0,233$). Zaobserwowano jedynie nieznaczącą przewagę występowania allele *G* w grupie z preeklampsją (74,6% vs. 67,7%, $p=0,091$, OR 1,40). Wyniki tego badania nie potwierdzają udziału polimorfizmu *Glu298Asp* w rozwoju stanu przedrzucawkowego, jakkolwiek korelacja allele *G* z ryzykiem preeklampsji będąca na pograniczu istotności statystycznej sugeruje podłoże genetyczne tej patologii (37).

Przedwczesne oddzielenie łożyska jest jednym z najpoważniejszych następstw preeklampsji. Pierwotna przyczyna tej patologii pozostaje nieznana, jednak do czynników ryzyka zalicza się nadciśnienie ciążowe, zaawansowany wiek matki, palenie papierosów i przedwczesne oddzielenie łożyska w poprzednich ciążach. Ciekawą analizę na temat tego powikłania położniczego przedstawili autorzy pracy Hillermann i wsp. Badacze rozważali wpływ polimorfizmu *Glu298Asp* (*G>T*) genu *NOS3* na ryzyko przedwczesnego oddzielenia łożyska oraz rozwoju preeklampsji. W związku z tym, że układ renina-angiotensyna moduluje ciśnienie tętnicze, homeostazę płynową ustroju i remodeling naczyń podczas ciąży uważa się, że różne warianty genetyczne angiotensynogenu (*AGT*) mają wpływ na możliwość rozwoju stanu przedrzucawkowego. Dlatego też przedmiotem badań powyższej pracy był także polimorfizm *Met235Thre* genu *AGT*. Badanie przeprowadzono w populacji Republiki Południowej Afryki. Grupę badaną stanowiło 50 ciężarnych, w pierwszej ciąży, u których przed 34 tygodniem ciąży doszło do rozwoju ciężkiego stanu przedrzucawkowego (ciśnienie rozkurczowe > 90 mmHg w dwóch niezależnych pomiarach oraz znacznego stopnia białkomocz - > 300 mg/24h) oraz 50 kobiet tuż po rozwiązaniu ciąży powikłanej przedwczesnym oddzieleniem łożyska. W obrębie obu badanych grup wydzielono podgrupę kobiet, u których współistniały obie patologie. Grupę kontrolną stanowiło 50 zdrowych ciężarnych (obecna i poprzednie ciążę o niepowikłanym przebiegu). Autorzy pracy nie stwierdzili związku polimorfizmu *Met235Thre* genu *AGT* z rozwojem stanu przedrzucawkowego i przedwczesnym oddzieleniem łożyska. Analizując polimorfizm *Glu298Asp* (*G>T*) genu *NOS3* wykazano większą częstość występowania genotypów *GT* oraz *TT* w grupie z przedwczesnym oddzieleniem łożyska (49%) w porównaniu do grupy kontrolnej (21%) (OR 3,51, $p=0,006$). Podobnie zaobserwowano częstsze występowanie allele *T* w grupie z przedwczesnym oddzieleniem łożyska (25%) w porównaniu do grupy kontrolnej (8%) (OR 2,49, $p=0,023$). Ponadto w podgrupie kobiet z preeklampsją, u których doszło do przedwczesnego oddzielenia łożyska wykazano korelację z genotypem *GT* ($p<0,0001$). W związku z tym nosicielstwo allele *T* wydaje się być ważnym czynnikiem

ryzyka przedwczesnego oddzielenia łożyska w przebiegu preeklampsji (OR 5,92, $p < 0,000$). Co ciekawe nie wykazano korelacji między badanym polimorfizmem a ryzykiem rozwoju samego stanu przedrzucawkowego (wyniki analizy genetycznej nie różniły się istotnie pomiędzy grupą z preeklampsją a grupą kontrolną) (38).

Nieco inne ujęcie problemu zaprezentowali autorzy pracy Hocher i wsp. Badacze wyszli z założenia, że polimorfizmy genu *NOS3* upośledzają dostępność tlenu azotu i w związku z tym predysponują do rozwoju preeklampsji. Celem omawianego badania była ocena związku trzech polimorfizmów genu *NOS3* (*Glu298Asp*, $-786T > C$ oraz *VNTR 4a/b*) z markerami preeklampsji (ciśnienie tętnicze krwi, białkomocz, obrzęki obwodowe) oraz z masą urodzeniową i wrodzonymi malformacjami noworodków. Analizę genetyczną pod względem polimorfizmów *Glu298Asp* oraz $-786T > C$ przeprowadzono u 1502 kobiet, natomiast *VNTR 4a/b* – u 2186 kobiet. Do grupy badanej włączono 554 noworodki, u 18 z nich stwierdzono wadę wrodzoną, która nie była wadą chromosomalną (wady przegrody przedstonkowej lub komorowej, przetrwały przewód tętniczy, deformacje stóp lub bioder, malformacje nerek). Badania były prowadzone w populacji kaukaskiej. Wśród grupy badanej stwierdzono 106 przypadków nadciśnienia ciążowego (4,8%), 36 przypadków preeklampsji (1,6%) oraz 42 przypadki preeklampsji nałożonej na przewlekłe nadciśnienie tętnicze (2,0%). Wyniki tej pracy jednoznacznie wykazały brak związku badanych polimorfizmów z markerami preeklampsji. Współwystępowanie alleli poszczególnych polimorfizmów również nie miało znaczenia dla rozwoju preeklampsji. Ponadto nie wykazano korelacji pomiędzy badanymi polimorfizmami a masą urodzeniową lub wrodzonymi malformacjami u noworodka (39).

5.1.4. IMPLIKACJE KLINICZNE POLIMORFIZMU GENU *NOS3* W STANIE PRZEDRZUCAWKOWYM

W związku z faktem, że nadciśnienie w ciąży stanowi nadal poważny problem medycyny perinatalnej dotyczy bowiem 5-10% ciąż poszukuje się skutecznych metod prewencji i/lub terapii tej jednostki chorobowej. Wobec złożonej etiopatogenezy stanu przedrzucawkowego istnieje kilka modeli leczenia tego powikłania. Wzrost oporu naczyniowego oraz brak hemodynamicznej adaptacji do zwiększonej objętości łożyska naczyniowego w okresie ciąży są jednymi z głównych mechanizmów leżących u podłoża patofizjologii nadciśnienia w ciąży prowadzącymi do obniżenia perfuzji przez narządy wraz

z następową ich dyfuzją. Mechanizm ten spowodowany jest niewątpliwie uszkodzeniem śródbłonka naczyniowego i zaburzeniem czynnościowej równowagi między czynnikami powodującymi skurcz i rozkurcz naczyń. W ciąży powikłanej stanem przedrzucawkowym obserwuje się zmniejszoną zdolność do produkcji tlenu azotu, zwiększenie poziomu trombosanu A2 i endoteliny 1, obniżenie poziomu prostacykliny, jak również niższe stężenie reniny, angiotensyny II i aldosteronu. Ponadto dochodzi do wzrostu aktywności wolnych rodników tlenowych oraz hydroperoksydazy lipidowej, które powodują lizę komórek śródbłonka, wzrost przepuszczalności naczyń oraz zaburzenie syntezy prostacykliny na korzyść płytkowego tromboksanu A2. Spadek uwalniania endogennego NO, najbardziej istotnego klinicznie czynnika wazodylatacyjnego, prowadzi niewątpliwie do rozwoju stanu przedrzucawkowego. W związku z tym podjęto próby leczenia nadciśnienia w ciąży, stanu przedrzucawkowego i zahamowania wzrastania wewnątrzmacicznego płodów (IUGR) substratami dla produkcji NO (L-arginina), czy donorami NO (nitrogliceryna).

W badaniach przeprowadzonych do tej pory coraz częściej wykorzystywana była L-arginina, która należy do aminokwasów częściowo (względnie) egzogennych. Synteza własna argininy w organizmie człowieka zaspokaja potrzeby związane z biosyntezą białek, jednak może być niewystarczająca w okresach zwiększonego zapotrzebowania takich jak wzrastanie organizmu, rekowalescencja czy ciąża. Produkcja NO z L-argininy stanowi drogę przemian, leżącą u podstaw szeregu czynności fizjologicznych i stanów chorobowych. Istnieje teoretycznie szereg możliwości wpływania na produkcję NO w celach terapeutycznych. Należy jednak mieć zawsze na względzie zachowanie w równowadze funkcji zarówno ochronnych jak i niszczących jakie NO pełni w układach biologicznych. Zmniejszone stężenia wolnej argininy w preeclampsji, w porównaniu do ciąży fizjologicznej, mogą mieć charakter niedoboru pierwotnego lub być wynikiem zwiększonego zużycia.

Arginina, podobnie jak inne egzogenne aminokwasy, nie jest syntetyzowana ani przez łożysko ani przez płód. W ciąży fizjologicznej stężenia większości aminokwasów w krążeniu płodowym są wyższe niż w krążeniu matki (24). Uważa się obecnie, że stężenie aminokwasów w tym L-argininy jest wynikiem dynamicznego równania między aktywnym transportem w kierunku do płodu i dyfuzji w kierunku przeciwnym (24). Ciąża jest stanem charakteryzującym się względnie niskimi stężeniami L-argininy w osoczu. Może to być między innymi wynikiem zwiększonego przekazywania aminokwasów do krążenia płodowego (28). Cetin i wsp. na podstawie przeprowadzonych badań dowodzą natomiast,

że można wykluczyć zwiększony transport aminokwasu L-argininy do płodu jako przyczynę jego niskiego stężenia u matek z preeklampsją. Niższe stężenia L-argininy w preeklampsji mogą być następstwem zwiększonego zużycia tego aminokwasu w reakcji syntezy NO (15, 16). Potwierdzają tę hipotezę badania Leszczyńskiej-Gorzela, która wykazała istotnie niższe stężenie L-argininy zarówno u matek jak i u płodów w ciążach powikłanych preeklampsją, w których stwierdzano nasilenie produkcji NO. Jeśli natomiast przyjąć hipotezę, że niższe stężenie L-argininy w preeklampsji ma charakter pierwotny, to niedobór substratu może stać się przyczyną niedostatecznej syntezy NO (55, 56, 57, 58, 59, 60).

W warunkach fizjologicznych aktywny transport L-argininy do płodu zależy przede wszystkim od sprawnego przepływu maciczno-łożyskowego i przepływu pępowinowo-łożyskowego. Mniejsze znaczenie ma stężenie aminokwasu u matki. Nie wiadomo na ile niższe stężenia L-argininy u matek z preeklampsją wpłynęły na ograniczenie aktywnego transportu tego aminokwasu do płodów, a na ile są za to odpowiedzialne czynniki łożyskowe (55, 56, 57, 58, 59, 60).

Częściowe poznanie dróg metabolizmu L-argininy nie wyjaśnia do końca mechanizmu działania układu L-arginina-NO lecz na podstawie licznych badań traktujących o wazodylatacyjnym działaniu NO pozwala sądzić, że substytucja tym aminokwasem może być jedną ze skutecznych metod nie tylko leczenia lecz również profilaktyki nadciśnienia w ciąży.

Obecnie uważa się, że zaburzenia aktywności enzymu eNOS uwarunkowane polimorfizmem tego genu można częściowo przynajmniej wyrównać poprzez zwiększoną podaż argininy. Skuteczność takiego postępowania potwierdzają wyniki badań klinicznych Seligmana dotyczących donorów tlenu azotu w leczeniu stanu przedzucawkowego (98).

Grunewald i wsp. stwierdzili, że dożylny wlew L-argininy nie obniża ciśnienia tętniczego krwi u ciężarnych z zagrażającą rzucawką, pomimo istotnego wzrostu poziomu NO w wydychanym powietrzu, jak również wzrostu poziomu cGMP w badanych próbkach krwi u ciężarnych. Wyniki te nie potwierdzają hipotezy, że jedną z zasadniczych przyczyn stanu przedzucawkowego jest obniżenie zdolności śródbłonna do produkcji tlenu azotu (35).

W 1996 roku Neri i wsp. w trzecim trymestrze ciąży podawali we wlewie dożylnym 30 g L-argininy w czasie trzydziestu minut kobietom ciężarnym z potwierdzoną w badaniu ultrasonograficznym hipotrofią płodów i obniżonym przepływem maciczno-łożyskowym (grupa B), bez obniżonego przepływu maciczno-łożyskowego (grupa A) oraz w grupie

kontrolnej. W grupie ciężarnych, których płody wykazywały cechy wewnątrzmacicznej hipotrofii połączone z zaburzeniem krążenia maciczno-łożyskowego (wysoki opór naczyniowy w łożysku – grupa B) po podaniu L-argininy stwierdzono wyraźne obniżenie oporu naczyniowego, a tym samym poprawę przepływu krwi w łożyskach (88).

Wobec zachęcających doniesień o pozytywnym wpływie tlenu azotu na dobrostan płodu u ciężarnych leczonych nitrogliceryną z powodu nadciśnienia w ciąży czy porodu przedwczesnego czynione są próby zastosowania NO w leczeniu m.in. hipotrofii wewnątrzmacicznej (119). Próby zastosowania terapii w postaci plastrów z trójazotanem glicerolu, pozostają jednak cały czas w sferze badań klinicznych i wymagają bardziej wnikliwego przeanalizowania.

W przebiegu badań z zastosowaniem L-argininy w przebiegu stanu przedrzucawkowego odnotowano różne wyniki. Niektóre z nich nie wykazały związku podawania L-argininy z wydłużeniem czasu trwania ciąży, występowaniem stanu przedrzucawkowego, czy hipotrofii płodu. Inne wręcz entuzjastyczne wskazały u kobiet z preeklampsją na spadek zgonów wewnątrzmacicznych, przedwczesnego oddzielenia łożyska, poprawę przepływów Dopplerowskich i wydłużenie czasu trwania ciąży.

Obecnie na podstawie powyższych rozważań można wnioskować, że podawanie substratów L-argininy lub donorów NO ciężarnym, które są nosicielkami genotypów zmutowanych polimorfizmu *Glu298Asp, -786T>C* oraz *VNTR 4a/b* genu *NOS3* w dziennej dawce 2-3 g powinno skutkować zapobieganiu rozwojowi preeklampsji w następnej ciąży.

Po przeanalizowaniu licznych doniesień traktujących o tym problemie wydaje się że korzyści tego typu leczenia pozwalają w znacznym stopniu poprawić stan urodzeniowy noworodków ciężarnych powikłanych nadciśnieniem w ciąży, stanem przedrzucawkowym i IUGR, a prewencyjna substytucja preparatami L-argininy w grupach ryzyka mogłaby z pewnością zmniejszyć odsetek powikłań w ciąży.

5.2. ENDOTELINA-1 (ET-1)

5.2.1. STĘŻENIE ET-1 WE KRWI KOBIET ZE STANEM PRZEDZRUCAWKOWYM

W wielu badaniach wskazano na rolę endoteliny 1 w patogenezie stanu przedrzucawkowego. Większość prac, w których dokonawano analizy porównawczej stężeń ET-1 w osoczu kobiet z preeklampsją oraz zdrowych ciężarnych potwierdziło jej istotnie statystycznie większe poziomy w grupie ciężarnych z preeklampsją. Kraayenbrink i wsp. wykazali znacznie wyższe stężenie ET-1 w krążeniu tętniczym u ciężarnych z preeklampsją (50). Wskazuje to na ciągłą produkcję ET-1 przez śródbłonek tętnic i obecność receptorów w małych tętnicach i tętniczkach (tab. 30).

Tab. 30. Stężenie ET-1 w osoczu kobiet ze stanem przedrzucawkowym.

<i>Stężenie ET-1 w osoczu kobiet z preeklampsją</i>			
<i>Autor</i>	<i>Preeklampsja (pg/ml)</i>	<i>Kontrola (pg/ml)</i>	<i>p</i>
Taylor i wsp. (110)	11,4 ± 0,9	6,1 ± 0,7	<0,01
Kamoi i wsp. (44)	1,9 ± 0,3	0,6 ± 0,1	<0,01
Nova i wsp. (90)	14,7 ± 1,2	9,6 ± 0,7	< 0,001
Otani i wsp. (92)	1,54 ± 0,44	1,42 ± 0,51	ns
Florijn i wsp. (29)	5,0 ± 2,6	2,1 ± 0,4	< 0,001
Dekker i wsp. (22)	7,06 ± 5,74	2,52 ± 0,68	0,02
Schiff i wsp. (96)	74,5 ± 32,9	49,1 ± 22,9	<0,01
Tsunoda i wsp. (113)	1,50 ± 0,07	1,04 ± 0,05	<0,01
Clark i wsp. (19)	56,3 ± 5,0	29,9 ± 2,5	< 0,005
Benigni i wsp. (11)	0,48 ± 0,53	0,40 ± 0,22	ns
Mastrogiannis i wsp. (75)	6,6 ± 3,1	5,2 ± 2,7	ns
Kraayenbrink i wsp. (50)	8,00 ± 2,18	2,28 ± 0,75	< 0,001

Niektóre analizy nie wykazały jednak korelacji między poziomem stężenia ET-1 a nasileniem stanu przedrzucawkowego i stopniem nasilenia białkomoczu u ciężarnych (18, 19, 30). Istotny jest fakt, że wzrost poziomu stężenia ET-1 stwierdza się wyłącznie w preeklampsji, natomiast nie można wykazać znaczącego wzrostu stężenia ET-1 w nadciśnieniu przewlekłym (45, 46, 112). Zarówno Nova i wsp., jak też Kraayenbrink i wsp.

stwierdzili wyższe stężenia ET-1 w preeklampsji przebiegającej z hemolizą, podwyższonym poziomem enzymów wątrobowych i niską liczbą płytek krwi (HELLP) (90, 50). U pacjentek z preeklampsją powikłaną rozszianym wykrzepianiem śródnaczyniowym stwierdza się wybitnie wysokie wartości ET-1 w osoczu (45, 46) Stan ten jest prawdopodobnie wynikiem uwalniania ET-1 indukowanym przez trombinę.

Taylor i wsp. zauważyli, że stężenia ET-1 w osoczu nie były podwyższone w II trymestrze ciąży u kobiet, u których w dalszym czasie trwania ciąży rozwinęła się preeklampsja. Wskazuje to, że oznaczanie poziomu stężenia ET-1 nie może być wykorzystywane w charakterze przesiewowego testu klinicznego mającego na celu przewidywanie rozwoju choroby oraz wskazuje, że ET-1 nie może samoistnie indukować rozwoju preeklampsji (109, 110). W kilku pracach nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu ET-1 w poszczególnych trymestrach ciąży, chociaż wskazano tendencję do podwyższonych jej wartości pod koniec ciąży (52, 73, 74, 75, 77).

Odmienne wyniki opublikowali Usuki i wsp., którzy badając osoczowe stężenia ET-1 u kobiet ciężarnych obserwowali narastanie poziomów wraz z trwaniem ciąży. Według tych autorów stężenie ET-1 rośnie także w trakcie czynności porodowej, natomiast w ciągu kilku dni po porodzie wraca do poziomów sprzed ciąży (114).

Wielu autorów dowiodło występowania wyższych stężeń ET-1 we krwi pępowinowej (nawet dziesięciokrotnie) w porównaniu z osoczem matki, zarówno w ciąży prawidłowej jak i powikłanej preeklampsją (45, 46). W badaniach Leszczyńskiej-Gorzelał stwierdzono u zdrowych ciężarnych 2,5 razy wyższe stężenie ET-1 we krwi pępowinowej niż matczynej. Różnica ta nie była tak wysoka w przypadku ciąż powikłanych ciężką preeklampsją, chociaż stwierdzono wówczas sześciokrotnie wyższe stężenia ET-1 u matek oraz trzykrotnie wyższe stężenie ET-1 we krwi pępowinowej. Obserwacja ta wskazuje że ET-1 jest naturalnym czynnikiem wpływającym na zamknięcie naczyń pępowiny krótko po porodzie (54). Leszczyńska-Gorzelał na podstawie badań własnych dowiodła, że w przypadku hipotrofii wewnątrzmacicznej stężenie ET-1 jest istotnie wyższe zarówno we krwi pępowinowej jak i matczynej. W tej samej pracy wykazano, że masa płodu u ciężarnych z preeklampsją koreluje ujemnie ze stężeniem ET-1 we krwi matki (58).

Cocani i Kelsey wykazali, że ET-1 może być niezbędna do zamknięcia przewodu tętniczego Bothala (20). McMahon i wsp. stwierdzili znacząco wyższe stężenia ET-1 w łożyskach, ale nie błonach płodowych czy mięśniówce macicy kobiet z preeklampsją. Badacze przypuszczają, że zwiększona miejscowa produkcja ET-1 w łożysku może

przyczyniać się do niewydolności naczyniowej tego narządu (77). Według Lindbloma i wsp. ET-1 jest odpowiedzialna za zmniejszenie przepływu maciczno-łożyskowego, ponieważ naczynia tętnicze wewnątrz mięśniówki macicy są bardzo czułe na ten peptyd, a u pacjentek z preeklampsją stwierdza się istotnie wyższe stężenia ET-1 w osoczu krwi z żył macicznych w porównaniu z grupą kontrolną (62). Hipotezę tę potwierdził również Nisell i wsp.(89). Interesujące jest odkrycie, że małe dawki ET-1 wzmacniają zwężenie naczyń w reakcji na inne substancje presyjne np. noradrenalinę, serotoninę i odwrotnie (42).

Z licznych doniesień wynika, że rola endoteliny w patogenezie preeklampsji pozostaje nadal tematem dyskusji. Bezsporne jest, że podwyższone stężenia ET-1 w krążeniu ogólnym, z pewnością można traktować jako wynik uszkodzenia śródbłonnków naczyń. Dostateczna jest liczba dowodów aby uznać, że kluczowy moment w patogenezie nadciśnienia indukowanego ciążą stanowi aktywacja i uszkodzenie komórek śródbłonna naczyniowego.

Nie ma dotąd jednolitych danych na temat stężeń ET-1 we krwi matczynej i płodowej u kobiet z preeklampsją. Oznaczane stężenia ET-1 w krążeniu ogólnym mogą jednak nie odzwierciedlać rzeczywistego, miejscowego stężenia peptydu w ścianie naczyniowej. Z uwagi na brak unerwienia autonomicznego oraz dużą gęstość receptorów dla ET-1 w krążeniu pępowinowo-łożyskowym, można sądzić, że ET-1 odgrywa w tym układzie ważną rolę w regulacji napięcia naczyniowego. W przypadku preeklampsji stwierdzono podobną gęstość i rozmieszczenie receptorów dla ET-1 jak w ciąży prawidłowej. Znamienne wysokie stężenia ET-1 w preeklampsji potwierdzają teorię, że ET-1 bierze udział w patogenezie tego schorzenia.

Słowiński i wsp. badali stężenie endoteliny-1 pomiędzy 24 a 36 tygodniem ciąży u 30 ciężarnych z rozpoznaniem stanu przedrzucawkowego, grupę kontrolną stanowiło 125 zdrowych ciężarnych. Stwierdzono znamienne wyższe stężenie endoteliny w grupie kobiet z preeklampsją (104). Podobne wyniki przytacza La Marca oraz Ariza (51, 3). Natomiast Margarit i wsp. wykazali zwiększone stężenie endoteliny w płynie owodniowym od drugiego trymestru ciąży u ciężarnych, u których później rozwinęła się preeklampsja (73).

W badaniu Asakura i wsp. badano stężenie endoteliny oraz poziom płytek krwi u 20 kobiet z preeklampsją, 25 zdrowych ciężarnych, u których ciążę rozwiązano drogą cięcia cesarskiego oraz 20 zdrowych ciężarnych, które rodziły drogą naturalną. Wyniki tej pracy wykazują wzrost stężenia endoteliny przy jednoczesnym spadku poziomu płytek krwi po cięciu cesarskim u ciężarnych z preeklampsją (4).

Jednak pytania o przyczyny wysokich stężeń ET-1 w krążeniu, w przebiegu preeklampsji oraz co do istniejących różnic w poziomie stężeń po stronie matczynej i płodowej pozostają nie rozstrzygnięte pomimo licznych hipotez i wymagają dalszych badań. Jednymi z bardziej aktualnych kierunków badań mogących z pewnością tylko w części odpowiedzieć na powyżej postawione pytania są podjęte w pracy badania wybranych polimorfizmów ET-1.

5.2.2. ZNACZENIE POLIMORFIZMU GENU *EDNI* W STANIE PRZEDRZUCAWKOWYM

Badań wiążących polimorfizmy genu *EDNI* ze stężeniem endoteliny w surowicy oraz z rozwojem stanu przedrzucawkowego jest bardzo mało. Najczęściej dotyczą one polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDNI*.

Autorzy pracy Popov *i wsp.* badali rolę polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDNI* w rozwoju nadciśnienia tętniczego, jak również we wtórnym do nadciśnienia uszkodzeniu narządów (nerki, serce, naczynia krwionośne). Grupę badaną stanowiło 400 pacjentów z nadciśnieniem tętniczym, grupę kontrolną – 150 zdrowych osób. Uzyskano następujący rozkład genotypów: 57,3% (*GG*), 41,3% (*GT*), 1,43% (*TT*) w grupie zdrowych pacjentów oraz 54,75% (*GG*), 43,0% (*GT*), 2,25% (*TT*) w grupie z nadciśnieniem. Wykazano dodatnią korelację genotypu *TT* z chorobą naczyń wieńcowych ($p=0,004$) (93).

Genetyczne tło rozwoju nadciśnienia tętniczego było również tematem pracy Barath *i wsp.* Autorzy analizy do badania włączyli młodocianych z pierwotnym nadciśnieniem tętniczym oraz z nadciśnieniem powiązaniem z otyłością ($BMI > 30$). Badano polimorfizmy genów dwóch substancji zaangażowanych w regulację ciśnienia tętniczego krwi: *G+5665T* (*Lys198Asn*) genu *EDNI*, *T-786C* oraz polimorfizm w intronie 4 genu *NOS3*. Wyniki pracy wskazują na silny związek polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDNI* z rozwojem nadciśnienia u otyłych nastolatków (6).

Celem badania Barden *i wsp.* była analiza związku polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDNI* z patogenezą stanu przedrzucawkowego. Grupę badaną stanowiło 72 ciężarnych z preeklampsją, grupę kontrolną – 81 zdrowych ciężarnych. Nie wykazano bezpośredniego udziału tego wariantu w rozwoju PE. Jednakże wskazano, że częstość występowania allele *T* korelowała z wysokością nadciśnienia tętniczego, a częstość występowania genotypu *TT* ze zwiększonym stężeniem ET-1 w surowicy krwi. Obserwacja ta sugeruje możliwą interakcję

między tym polimorfizmem a innym wariantem genetycznym i/lub czynnikami środowiskowymi i ułatwia rozwój PE w przebiegu ciąży (7). W badaniu tym nie wykazano bezpośredniego związku badanego polimorfizmu z rozwojem preeklampsji. Jednak autorzy pracy zwrócili uwagę na wyraźną dodatnią korelację allela *T* (*TT* oraz *TG*) z wyższym skurczowym ciśnieniem tętniczym w ciąży ($121,0 \pm 1,5$ mmHg vs. $116,0 \pm 1,3$ mmHg u homozygot *GG*). Ponadto u ciężarnych z genotypem *TT* stwierdzono wyższe stężenie endoteliny-1 w surowicy (5,8 pg/ml) w porównaniu do heterozygot *GT* (3,1 pg/ml) i homozygot *GG* (3,6 pg/ml). W związku z tym badacze wysunęli hipotezę o predykccyjnej roli omawianego polimorfizmu do rozwoju stanu przedrzucawkowego. Powyższa praca uzasadnia stwierdzenie, że rola substancji pierwotnie kojarzonych jedynie z regulacją napięcia ściany naczynia czy angiogenezą jest znacznie szersza i stanowi element patogenetyczny wielu częstych powikłań położniczych (7).

W przeciwieństwie do powyższych doniesień w prezentowanej pracy nie wykazano bezpośredniego wpływu polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDNI* na wzrost ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego. W całej badanej grupie kobiet z nadciśnieniem w ciąży rozkład częstości występowania genotypów oraz alleli polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDNI* był podobny w obydwu badanych grupach kobiet ciężarnych. Również analizując częstość występowania genotypów i alleli w poszczególnych podgrupach kobiet – z nadciśnieniem ciążowym (GH) i preeklampsją (PE) nie wykazano różnic statystycznie istotnych pomiędzy badanymi grupami.

Niektórzy badacze wiążą również inne polimorfizmy genu *EDNI* z etiologią preeklampsji. Aggarwal *i wsp.* analizowali związek polimorfizmu *G5665T* genu *EDNI* z ryzykiem wystąpienia preeklampsji oraz ze stężeniem endoteliny w surowicy badanych ciężarnych. Analizą objęto 120 ciężarnych z rozpoznaniem stanu przedrzucawkowego oraz 118 kobiet z niepowikłanym przebiegiem ciąży. Ponadto pobrano do badania fragmenty łożysk od 20 ciężarnych z preeklampsją oraz od 24 zdrowych ciężarnych (za pomocą metod immunohistochemicznych oznaczano zawartość endoteliny w łożysku). Stężenie endoteliny w surowicy oznaczano za pomocą metody ELISA. W grupie kobiet z preeklampsją zaobserwowano wyższe stężenie endoteliny-1 w surowicy ($1,45 \pm 0,55$ vs. $0,91 \pm 0,42$ pg/ml; $p < 0,0001$) oraz większą częstość występowania allela *T* badanego polimorfizmu (0,43 vs. 0,28; $p = 0,04$). Ponadto zaobserwowano wyższe stężenie endoteliny u kobiet będących

nosicielkami co najmniej jednego allela *T* ($1,08 \pm 0,48$ vs. $1,31 \pm 0,59$ pg/ml; $p=0,004$). Zawartość endoteliny była niższa w łożyskach pochodzących od kobiet z preeklampsją ($p<0,001$). W stanie przedrzucawkowym ilość endoteliny uwalnianej ze śródbłonna naczyń matki jest zwiększona, natomiast ze śródbłonna łożyska zmniejszona, co może być próbą kompensacji zaburzonego przepływu maciczno-łożyskowego (1).

Analizowano także udział polimorfizmu $-231G>A$ genu receptora endoteliny ET-A w patogenezie stanu przedrzucawkowego. Autorzy tej pracy nie wykazali jednak korelacji tego wariantu genetycznego z patomechanizmem preeklampsji (63).

5.2.3. POLIMORFIZM $-134delA$ GENU *ET-1*

W powyższej rozprawie analizowano częstość występowania genotypów i alleli genu endoteliny - 1 w zakresie polimorfizmu $-134delA$ w grupie badanej kobiet z nadciśnieniem w ciąży oraz grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych. Porównując grupę kobiet z nadciśnieniem w ciąży oraz grupę kontrolną w zakresie polimorfizmu $-134delA$ genu *EDN1* pod względem częstości występowania genotypów i alleli nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych pomiędzy tymi grupami. Natomiast zwraca uwagę fakt braku obecności genotypu homozygotycznego zmutowanego $-4A/-4A$ polimorfizmu $-134delA$ genu *EDN1* zarówno w grupie kobiet z nadciśnieniem w ciąży, jak i w grupie kontrolnej. W grupie z GH w porównaniu do grupy z PE obserwowano nieco wyższą częstość występowania heterozygot $-3A/-4A$ 44,9% w porównaniu do grupy z PE 39,0%. Natomiast w grupie z PE częstość homozygot $-3A/-3A$ była odpowiednio wyższa.

Należy podkreślić, że przedstawiona w powyższej pracy analiza polimorfizmu $-134delA$ genu *EDN1* w grupie ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym jest pierwszym tego typu badaniem na świecie. Do tej pory ukazało się kilkadziesiąt prac na temat omawianego polimorfizmu i jego korelacji z różnymi patologiami, jednak żadna z nich nie poruszała problemu stanu przedrzucawkowego i nadciśnienia ciążowego. Najczęściej opisuje się wpływ powyższego wariantu genetycznego endoteliny-1 na rozwój i przebieg chorób sercowo-naczyniowych.

Spinarova i wsp. badali związek polimorfizmu *-134delA* z przewlekłą niewydolnością serca. Genotypowanie przeprowadzono u 124 pacjentów, u których zdiagnozowano stabilną przewlekłą niewydolność serca. Ponadto w całej grupie badanej oznaczono stężenie endoteliny w surowicy. Nie wykazano związku między stężeniem endoteliny w surowicy a badanym polimorfizmem. Zaobserwowano natomiast istotną różnicę w rozkładzie występowania genotypów i alleli w zakresie polimorfizmu *-134delA* w podgrupie pacjentów ze wskaźnikiem sercowo-klatkowym wynoszącym powyżej 60% z lub bez obecności zastojów w krążeniu płucnym. Częstość występowania allele *3A* była dwukrotnie wyższa u pacjentów z zastojem w krążeniu płucnym (37.8 vs. 78.1%) (107).

Związek polimorfizmu *-134delA* z patofizjologią omdlenia wazowagalnego był przedmiotem badań Sorrentino i wsp. Do badania włączono 107 pacjentów z pozytywnym wywiadem w kierunku omdleń wazowagalnych o niejasnej etiologii. U wszystkich przeprowadzono test pochyleniowy, który u 58 pacjentów (54%) był pozytywny (omdlenie). 60 (56%) pacjentów było homozygotami *3A*, natomiast 47 (44%) – heterozygotami. Częstość występowania allele *4A* była istotnie wyższa u pacjentów, u których wystąpiło omdlenie podczas wykonywania testu pochyleniowego. Autorzy pracy uważają, że allel *4A*, który jest związany ze zwiększoną ekspresją genu *EDN1* promuje wystąpienie wazodepresyjnej odpowiedzi hemodynamicznej podczas wykonywania testu pochyleniowego (105).

Vasku i wsp. badali jednocześnie dwa polimorfizmy genu *EDN1*: *G8002A* oraz *-3A/-4A* u 103 pacjentów rasy Kaukaskiej ze zdiagnozowaną przewlekłą niewydolnością serca. Wykazano znacznie rzadsze występowanie genotypu *AG3A4A* (podwójna heterozygota) u pacjentów, u których stężenie tzw. „dużej endoteliny” (bigET) w surowicy wynosiło powyżej 0,7 pmol/L. Występowanie podwójnej heterozygoty *AG3A4A* wiązało się ze znacznym zmniejszeniem ryzyka przewlekłej niewydolności serca z wysokim stężeniem bigET (115).

Nieco inny temat poruszyli Maxinerova i wsp. Autorzy tego opracowania badali wpływ trzech polimorfizmów genu *EDN1* (*K198N*, *T1370G* oraz *3A/4A*) na progresję nefropatii typu IgA. Do badania włączono 122 pacjentów z histologicznie potwierdzoną

nefropatią typu IgA oraz 132 zdrowe osoby, które stanowiły grupę kontrolną. Zaobserwowano, że współwystępowanie alleli *G198*, *G1370* oraz *4A* było istotnie wyższe w grupie badanej pacjentów z nefropatią ($p=0,0056$) (72).

Polimorfizm *-134delA* genu *EDNI* był analizowany również w aspekcie chorób nowotworowych. Vasku i wsp. badali związek polimorfizmów *-134delA* oraz *G8002A* ze skutecznością fototerapii postaci skórnej chłoniaka wywodzącego się z komórek T. Do badania włączono 77 pacjentów z histologicznie potwierdzonym rozpoznaniem postaci skórnej chłoniaka z komórek T. Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że genotypy *-4A-4A* polimorfizmu *-3A/-4A EDNI* oraz *GA* i *GG* polimorfizmu *G8002A EDNI* zwiększają prawdopodobieństwo skuteczności fototerapii u pacjentów z chłoniakiem (116).

5.3. PODSUMOWANIE

Patomechanizm rozwoju stanu przedrzucawkowego nadal pozostaje nie do końca wyjaśniony. Stąd wiele badań w ostatnich latach ogniskuje się na możliwym udziale czynników genetycznych w etiologii tego powikłania. Jedną z dróg badawczych jest analiza udziału polimorfizmów genów kandydujących matki, ale rozważa się również udział wariantów genetycznych płodowych oraz ojcowskich (21). Niewątpliwie udział matczynych genów kandydujących poparty jest największą ilością badań. Jednym z kierunków jest analiza genów związanych z układem endotelina 1 - tlenek azotu. Mimo niejednoznacznych wyników co do wskazania ścisłej korelacji polimorfizmów tego układu z rozwojem stanu przedrzucawkowego te warianty genetyczne wzbudzają duże zainteresowanie, ze względu na ich istotną rolę w wazokonstrykcji i wazodylatacji naczyń krwionośnych. Z drugiej strony analiza polimorfizmów genetycznych tego układu i wskazanie związku ze stanem przedrzucawkowym umożliwiłoby wyodrębnienie grupy kobiet narażonych na wystąpienie tego powikłania. W przyszłości w tej grupie ryzyka - kobiet nosicielek zmutowanych alleli polimorfizmów genów *NOS3* i *EDNI* sugeruje się włączenie suplementacji L-argininy lub podawanie donorów tlenu azotu.

Badania z ostatnich lat sugerują udział wielu genów kandydujących w etiologii preeklampsji zgodnie z koncepcją stanu przedrzucawkowego jako choroby uwarunkowanej wieloczynnikowo (CHD – *complex human disease*). Zgodnie z tą koncepcją należy założyć, że oprócz udziału polimorfizmów układu ET-1 – NO możliwy jest udział polimorfizmów układu renina-angiotensyna, układu krzepnięcia i fibrynolizy, układu cytokin, stresu oksydacyjnego, polimorfizmów genów biorących udział w procesie angiogenezy, czy polimorfizmów metabolizmu lipidów. Prawdopodobnie fenotyp końcowy stanu przedrzucawkowego uzależniony jest od wielu fenotypów pośrednich, które są częściami integrującymi ekspresję genów oraz efekt końcowy, jakim jest rozwój choroby u ciężarnej.

Istnieje zatem potrzeba przeprowadzenia jeszcze innych badań dotyczących tego problemu, które uwzględniałyby duże liczebnie grupy pacjentek i jednocześnie analizowałyby większą ilość polimorfizmów genetycznych możliwych genów kandydujących zaangażowanych w etiologię stanu przedrzucawkowego.

6. WNIOSKI

1. W przypadku polimorfizmu *Glu298Asp* (894G>T) genu *NOS3* obecność zmutowanego genotypu *TT* może mieć wartość ochronną w stosunku do wystąpienia stanu przedzucawkowego.
2. Obecność zmutowanego allela *-4A* polimorfizmu *-134delA* genu *EDN1* może mieć potencjalne znaczenie w rozwoju izolowanej postaci nadciśnienia ciążowego.
3. W badanej grupie kobiet z populacji polskiej polimorfizm *Lys198Asn* genu *EDN1* nie wykazuje bezpośredniego wpływu zarówno na występowanie izolowanej postaci nadciśnienia ciążowego, jak i stanu przedzucawkowego.
4. Obecność zmutowanego genotypu *CC* polimorfizmu *-786T>C* genu *NOS3* może korelować ze wzrostem ciśnienia skurczowego i rozkurczowego zarówno w przebiegu nadciśnienia ciążowego, jak i stanu przedzucawkowego.

7. STRESZCZENIE

Wstęp: Stan przedrzucawkowy (PE), występuje u 6-8% ogólnej populacji kobiet ciężarnych i jest uważany za główną przyczynę zachorowalności i umieralności matek, płodów i noworodków. Stąd intensywnie prowadzone są badania mające na celu wyjaśnienie etiologii PE. Genetyka i biologia molekularna dynamicznie włączyły się do badań nad patogenezą wielu powikłań położniczych, w tym stanu przedrzucawkowego jak i nadciśnienia ciężarnych (GH). Jednym z najbardziej obiecujących wyjaśnień przyczyn rozwoju tej choroby u kobiet w ciąży jest rola wariantów polimorficznych genów układu syntaza tlenku azotu - endotelina-1 (NO-ET1).

Cel: Celem pracy była ocena częstości występowania polimorfizmów genetycznych wybranych genów układu tlenek azotu (NO) - endotelina 1 (ET-1) oraz ich znaczenie w rozwoju stanu przedrzucawkowego i nadciśnienia ciążowego. Cel ten realizowany był poprzez analizę częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmów *Glu298Asp*, *-786T>C* genu syntazy tlenku azotu (*NOS3*) oraz polimorfizmów *Lys198Asn*, *-134delA* genu (*EDN1*) w badanej grupie kobiet i w grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych kobiet. Sprawdzone współwystępowanie genotypów badanych polimorfizmów w obu grupach kobiet. Analizowano również wybrane parametry biochemiczne w grupie kobiet z nadciśnieniem w ciąży, jak również ich korelację z badanymi w pracy polimorfizmami genetycznymi.

Materiał i metody: Badania przeprowadzono od stycznia 2006 do kwietnia 2009 roku w Klinice Perinatologii i Chorób Kobiety Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Do badania włączono 110 kobiet z nadciśnieniem w ciąży (41 z PE i 69 z GH) oraz 150 zdrowych ciężarnych. Klasyfikacja kobiet z nadciśnieniem tętniczym została przeprowadzona według kryteriów ACOG. Kobiety z nadciśnieniem przewlekłym w wywiadzie zostały wykluczone z badania. U każdej pacjentki analizowano częstość występowania genotypów i alleli wybranych polimorfizmów syntazy tlenku azotu (*Glu298Asp*, *-786T>C*) i endoteliny-1 (*-134delA*, *Lys198Asn*) metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) oraz polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP). Odnotowywano: wartości ciśnienia tętniczego,

wybrane parametry laboratoryjne w surowicy krwi oraz w moczu, stan urodzeniowy noworodka, dane dotyczące wywiadu położniczego oraz przebiegu ciąży i porodu.

Wyniki: Odnośnie polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* zaobserwowano częstsze występowanie w grupie kontrolnej genotypu homozygotycznego zmutowanego *TT* (1,4 vs. 8,7% w grupie kontrolnej, OR=0,16, p=0,033).

Częstość występowania zmutowanego genotypu *CC* polimorfizmu *-786T>C* genu *NOS3* wynosiła odpowiednio 18,8 vs. 4,9 vs. 15,3% (p=ns) w grupach GH, PE i kontrolnej. Częstość występowania zmutowanego allela w grupach GH, PE i kontrolnej wynosiła 43,5 vs. 28,0 vs. 38,0%, p=ns.

Częstość występowania zmutowanego genotypu *TT* polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDN1* była podobna w badanych grupach GH, PE i kontrolnej (odpowiednio 4,4% vs. 4,9% vs. 4,0%, p=ns).

Stwierdzono, że w zakresie polimorfizmu *-134delA* genu *EDN1* w grupie GH w porównaniu z grupą PE częściej występował genotyp heterozygotyczny *-3A/-4A* (44,9% vs. 39,0%, OR=1,27, p=ns). Natomiast częstość występowania homozygot *-3A/-3A* była wyższa w grupie z PE (61,0 vs. 55,1%, WR=0,78, p=ns).

Wnioski:

1. W przypadku polimorfizmu *Glu298Asp* (*894G>T*) genu *NOS3* obecność zmutowanego genotypu *TT* może mieć wartość ochronną w stosunku do wystąpienia stanu przedrzucawkowego.
2. Obecność zmutowanego allela *-4A* polimorfizmu *-134delA* genu *EDN1* może mieć potencjalne znaczenie w rozwoju izolowanej postaci nadciśnienia ciążowego.
3. W badanej grupie kobiet z populacji polskiej polimorfizm *Lys198Asn* genu *EDN1* nie wykazuje bezpośredniego wpływu zarówno na występowanie izolowanej postaci nadciśnienia ciążowego, jak i stanu przedrzucawkowego.
4. Obecność zmutowanego genotypu *CC* polimorfizmu *-786T>C* genu *NOS3* może korelować ze wzrostem ciśnienia skurczowego i rozkurczowego zarówno w przebiegu nadciśnienia ciążowego, jak i stanu przedrzucawkowego.

8. SUMMARY

Introduction: Preeclampsia (PE) concerns 6-8% of general population of pregnant women and is believed to be the main cause of morbidity and mortality of mothers, fetuses and newborns. Thus researches concerning PE etiology are being conducted. Genetics and molecular biology are the areas that dynamically enter the research on pathogenesis of many obstetric complications including preeclampsia, as well as gestational hypertension (GH). One of the most promising approach to explain the reasons of developing this condition in pregnant women is the role of polymorphisms of nitric oxide and endothelin-1 (NO-ET1) gene system.

Objective: The aim of this study was to evaluate the frequency of genetic polymorphisms of selected genes of the nitric oxide (NO) – endothelin 1 (ET-1) system and their significance in preeclampsia and gestational hypertension development.

The aim of the study was achieved by the analysis of the prevalence of genotypes and alleles of the nitric oxide synthase (*NOS3*) gene polymorphisms *Glu298Asp* and *-786T>C* in a study group of women with hypertension in pregnancy and in a control group of healthy pregnant women. Also the analysis of the prevalence of genotypes and alleles of the endothelin-1 (*EDN1*) gene polymorphisms *Lys198Asn* and *-134delA* in a study group and in a control group of healthy pregnant women was conducted. There have been also analysed the coexistence of particular genotypes in the study group of women with hypertension in pregnancy and in a control group of healthy pregnant. Selected biochemical parameters in group of women with hypertension in pregnancy as well as the correlation of genetic polymorphisms studied in this research with biochemical parameters of women with hypertension in pregnancy were analysed.

Material and methods: The study was conducted between January 2006 and April 2009 in Division of Perinatology and Women's Diseases Poznan University of Medical Sciences. 110 pregnant women with symptoms of hypertension (41 with PE and 69 with GH) and 150

healthy pregnant women were included into the study. Hypertensive women were enrolled into the study group according to ACOG criteria. Women with chronic hypertension in the medical history were excluded from the study. For each patient genotypes and alleles frequency of selected polymorphisms of nitric oxide synthase (*Glu298Asp*, $-786T>C$) and endothelin 1 ($-134delA$, *Lys198Asn*) genes were analysed using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). Blood pressure, results of selected laboratory parameters in serum and urine, postpartum newborn condition, data on obstetric history and the course of pregnancy and childbirth were recorded.

Results: Connecting to *Glu298Asp* polymorphism of *NOS3* gene the overrepresentation of homozygotic *TT* genotype in the control group (1,4 vs. 8,7% in control group, OR=0,16, $p=0,033$) has been observed.

The frequency of mutated *CC* genotype of $-786T>C$ polymorphism of *NOS3* gene was 18,8 vs. 4,9 vs. 15,3% ($p=ns$) relatively in GH, PE and control group. The frequency of mutated allele in GH, PE and control group was 43,5 vs. 28,0 vs. 38,0%, $p=ns$.

The frequency of mutated *TT* genotype of *Lys198Asn* polymorphism of *EDN1* gene was not differ in GH, PE and control groups (4,4% vs. 4,9% vs. 4,0%, relatively, $p=ns$).

Concerning the $-134delA$ polymorphism of *EDN1* gene in GH group in comparison to PE group the frequency of $-3A/-4A$ heterozygote was higher (44,9% vs. 39,0%, %, OR=1,27, $p=ns$). And the frequency of $-3A/-3A$ homozygote was higher in the PE group (61,0 vs. 55,1%, OR=0,78, $p=ns$).

Conclusions:

1. The mutated *TT* genotype of *Glu298Asp* ($894G>T$) polymorphism of *NOS3* gene may have protective role as to the risk of preeclampsia development.
2. The results of the study suggest that the presence of mutated $-4A$ allele of $-134delA$ polymorphism of *EDN1* gene may be involved in the gestational hypertension development.
3. In the study group of polish women *Lys198Asn* polymorphism of *EDN1* gene is not directly related with gestational hypertension and preeclampsia.
4. The analysis of the obtained results suggests that the presence of mutated *CC* genotype of $-786T>C$ polymorphism of *NOS3* gene may correlate with the increase of systolic and diastolic pressure in course of preeclampsia and gestational hypertension.

9. PIŚMIENNICTWO

1. Aggarwal PK, Jain V, Srinivasan R, Jha V. Maternal EDN1 G5665T polymorphism influences circulating endothelin-1 levels and plays a role in determination of preeclampsia phenotype. *J Hypertens.* 2009, 27, 2044-2050.
2. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* 2001, 357, 593-615.
3. Ariza AC, Bobadilla NA, Halhali A. Endothelin 1 and angiotensin II in preeclampsia. *Rev Invest Clin.* 2007, 59, 48-56.
4. Asakura H, Nakai A, Takeshita T. Changes in plasma endothelin-1 after elective cesarean section in women with preeclampsia and the relationship to thrombocytopenia. *J Nippon Med Sch.* 2003, 70, 480-489.
5. Baksu B, Davas I, Baksu A, Akyol A, Gulbaba G. Plasma nitric oxide, endothelin-1 and urinary nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate levels in hypertensive pregnant women. *Int J Gynaecol Obstet.* 2005, 90, 112-117.
6. Baráth A, Endreffy E, Bereczki C, Gellén B, Szücs B, Németh I, Túri S. Endothelin-1 gene and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in adolescents with juvenile and obesity-associated hypertension. *Acta Physiol Hung.* 2007, 94, 49-66.
7. Barden AE, Herbison CE, Beilin LJ, Michael CA, Walters BN, Van Bockxmeer FM. Association between the endothelin-1 gene Lys198Asn polymorphism blood pressure and plasma endothelin-1 levels in normal and pre-eclamptic pregnancy. *J Hypertens.* 2001, 19, 1775-1782.
8. Baumert M, Szamańska-Toczek Z, Paprotny M, Popiołek J, Sypniewska A. Stężenie endoteliny i metabolitów tlenu azotu noworodków donoszonych. *Post. Neonatol.* 2004, 1, 70-73.
9. Belhassen L, Feron O, Kaye DM, Michel T, Kelly RA. Regulation by cAMP of post-translational processing and subcellular targeting of endothelial nitric-oxide synthase (type 3) in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1997, 272, 11198-11204.
10. Benedetti T J, Cotton D B, Read J C. Hemodynamic observations in severe pre-eclampsia with a flow-directed pulmonary artery catheter. *Am J Obstet Gynecol.* 1980, 136, 465-470.
11. Benigni A, Orisio S, Gaspari F, Frusca T, Amuso G, Remuzzi G. Evidence against a pathogenetic role for endothelin in pre-eclampsia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1992, 99, 798-802.
12. Bryl W., Pupek-Musialik D. Wpływ terapii ACE-inhibitorem na stężenie endoteliny i wybrane parametry metaboliczne u młodych osób z nadciśnieniem tętniczym. *Pol. Merk. Lek.,* 2006, 122, 174-176.
13. Buhimschi IA, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. *Hum Reprod Update.* 1998, 4, 25-42.
14. Cameron IT, van Papendorp CL, Palmer RMJ, Smith SK, Moncada S. Relationship between nitric oxide synthesis and increase in systolic blood pressure in women with hypertension in pregnancy. *Hypertension in Pregnancy.* 1993, 12, 85-92.

15. Cetin I, Marconi AM, Bozzetti P, Sereni LP, Corbetta C, Pardi G, Battaglia FC. Umbilical amino acid concentrations in appropriate and small for gestational age infants: A biochemical difference present in utero. *Am J Obstet Gynecol.* 1988, 158, 120-126.
16. Cetin I, Marconi AM., Corbetta C Baggiani AM, Battaglia FC Pardi G. Fetal–maternal amino acid relationships in normal and intrauterine growth retarded (IUGR) pregnancies. *Trophoblast Res.* 1993, 7, 11-23.
17. Cheng J, Liu J, Li X, Yu L, Peng J, Zhang R, Geng Y, Nie S. Effect of polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase on ischemic stroke: a case-control study in a Chinese population. *Clin Chim Acta.* 2008, 392, 46-51.
18. Clark BA, Halvorson L, Sachs B, Epstein FH. Plasma endothelin levels in preeclampsia: elevation and correlation with uric acid levels and renal impairment. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1992, 166, 962-968.
19. Clark SL, Cotton DB, Lee W, Bishop C, Hill T, Southwick J, Pivarnik J, Spillman T, DeVore GR, Phelan J. Central hemodynamic assessment of normal term pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1989, 161, 1439-1442.
20. Cocceani E, Kelsey L. Endothelin-1 release from lamb ductus arteriosus: relevance to postnatal closure of the vessel. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1991, 69: 218-221.
21. Dekker G, Robillard PY, Roberts C. The etiology of preeclampsia: the role of the father. *J Reprod Immunol.* 2011, 89, 126-132.
22. Dekker GA, Kraayenbrink AA, Zeeman GG, van Kamp GJ. Increased plasma levels of the novel vasoconstrictor peptide endothelin in severe pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1991, 40, 215-220.
23. Desjardins F, Lobysheva I, Pelat M, Gallez B, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Control of blood pressure variability in caveolin-1-deficient mice: role of nitric oxide identified in vivo through spectral analysis. *Cardiovasc Res.* 2008, 79, 527-536.
24. Domenech M, Gruppuso PA, Nishino VT, Susa JB, Schwartz R. Preserved fetal plasma amino acid concentration in presence of maternal hypoaminoacidemia. *Pediatr. Res.* 1986, 20, 1071-1076.
25. Durán WN, Breslin JW, Sánchez FA. The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. *Cardiovasc Res.* 2010, 87, 254-261.
26. Emori T, Hirata Y, Marumo F. Specific receptors for endothelin-3 in cultured bovine endothelial cells and its cellular mechanism of action. *FEBS Lett.* 1990, 263, 261-264.
27. Escudero C, Puebla C, Westermeier F, Sobrevia L. Potential cell signalling mechanisms involved in differential placental angiogenesis in mild and severe pre-eclampsia. *Curr Vasc Pharmacol.* 2009, 7, 475-485.
28. Escudero C, Sobrevia L. A hypothesis for preeclampsia: adenosine and inducible nitric oxide synthase in human placental microvascular endothelium. *Placenta.* 2008, 29, 469-483.
29. Florijn KW, Derkx FH, Visser W, Hofman HJ, Rosmalen FM, Wallenburg HC, Schalekamp MA. Elevated plasma levels of endothelin in pre-eclampsia. *J Hypertens.* 1991, 9, 166-167.
30. Florijn KW, Derkx FH, Visser W, Hofman JA, Rosmalen FM, Wallenburg HC, Schalekamp MA. Plasma immunoreactive endothelin-1 in pregnant women with and without pre-eclampsia. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991, 17, 446-448.
31. Garnarczyk A., Jurzak M., Gojniczek K. Charakterystyka endogennych peptydów – endotelin i ich rola w procesach chorobowych przebiegających z włóknieniem tkanek. *Wiadomości Lekarskie* 2008, 61, 4-6.

32. George S. J., Johnson J. *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms*. Wiley-vch Verlag GmbH 2010, 34-35.
33. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008, 294, 541-550.
34. Giles TD. Aspects of nitric oxide in health and disease: a focus on hypertension and cardiovascular disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2006, 8, 2-16.
35. Grunewald C, Kublickas M, Carlström K, Lunell NO, Nisell H. Effects of nitroglycerin on the uterine and umbilical circulation in severe preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 1995, 86, 600-604.
36. Häkkinen LM, Vuolteenaho OJ, Leppäluoto JP, Laatikainen TJ. Endothelin in maternal and umbilical cord blood in spontaneous labor and at elective cesarean delivery. *Obstet Gynecol*. 1992, 80, 72-75.
37. Häkli T, Romppanen EL, Hiltunen M, Helisalmi S, Punnonen K, Heinonen S. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism in preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig*. 2003, 10, 154-157.
38. Hillerman R, Carelse K, Gebhardt GS. The Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an increased risk for abruptio placentae in preeclampsia. *J Hum Genet*. 2005, 50, 415-419.
39. Hocher B, Chen YP, Hügle S, Repey J, Krause K, Slowinski T, Godes M, Schaeffeler E, Guthmann F, Wauer R, Halle H, Gossing G, Pfab T. Impact of maternal endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on blood pressure, protein excretion and fetal outcome in pregnancy. *J Hum Hypertens*. 2008, 22, 641-647.
40. Hyndman ME, Parsons HG, Verma S, Bridge PJ, Edworthy S, Jones C, Lonn E, Charbonneau F, Anderson TJ. The T-786-C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. *Hypertension*. 2002, 39, 919-922.
41. Ihara M, Noguchi K, Saeki T, Fukuroda T, Tsuchida S, Kimura S, Fukami T, Ishikawa K, Nishikibe M, Yano M. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci*. 1992, 50, 247-255.
42. Ihara Y, Sagawa N, Hasegawa M, Okagaki A, Li XM, Inamori K, Itoh H, Mori T, Saito Y, Shirakami G. Concentrations of endothelin-1 in maternal and umbilical cord blood at various stages of pregnancy. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991, 17, 443-445.
43. Irzmański R, Serwa-Stępień E, Barylski M, Banach M, Kowalski J, Pawlicki L. Zaburzenia równowagi śródbłonkowej w nadciśnieniu tętniczym. Rola peptydów natriuretycznych i endoteliny. *Kardiologia Pol*. 2005, 63, 457-461.
44. Kamoi K, Sudo N, Ishibashi M, Yamaji T. Plasma endothelin-1 levels in patients with pregnancy-induced hypertension. *N Engl J Med*. 1990, 323, 1486-1487.
45. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod*. 2003, 69, 1-7.
46. Khetsuriani T, Chabashvili N, Sanikidze T. Role of endothelin-1 and nitric oxide level in pathogenesis preeclampsia. *Georgian Med News*. 2006, 141, 17-21.
47. Khimji AK, Rockey DC. Endothelin--biology and disease. *Cell Signal*. 2010, 22, 1615-1625.
48. Kim YJ, Park HS, Lee HY, Ha EH, Suh SH, Oh SK, Yoo HS. Reduced L-arginine level and decreased placental eNOS activity in preeclampsia. *Placenta*. 2006, 27, 438-444.
49. Kobzik L. Translating NO biology into clinical advances: still searching for the right dictionary? *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009, 41, 9-13.

50. Kraayenbrink AA, Dekker GA, van Kamp GJ, van Geijn HP. Endothelial vasoactive mediators in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1993,169, 160-165.
51. LaMarca BD, Alexander BT, Gilbert JS, Ryan MJ, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension in response to placental ischemia during pregnancy: a central role for endothelin? *Gend Med.* 2008, 5, 133-138.
52. Łapiński R. Rola endoteliny w fizjologii i patologii nerek. *Adv Clin Exp Med.* 2003, 12, 81-86.
53. Lee CN, Chang SW, Cho NH, Cho SH. Nitrous oxide synthase expression in placenta of preeclampsia. *J Korean Med Sci.* 1997, 12, 532-538.
54. Lee HH, Hong SH, Shin SJ, Ko JJ, Oh D, Kim NK. Association study of vascular endothelial growth factor polymorphisms with the risk of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril.* 2010, 93, 1244-1247.
55. Leszczyńska-Gorzela B. The role of nitric oxide in pathogenesis of preeclampsia. *Arch Perinat Med.* 1997, 3, 61-71.
56. Leszczyńska-Gorzela B, Kamiński K, Oleszczuk J. Endothelin-1 production by cultured endothelial cells derived from human placental veins. Abstract Book of 27th International Congress on Pathophysiology of Pregnancy, Manila, Philippines, 1995, 101.
57. Leszczyńska-Gorzela B, Kamiński K, Oleszczuk J. Produkcja ET-1 w hodowli endoteliocytów łożyskowych w gestozie EPH powikłanej wewnątrzmacicznym opóźnieniem wzrostu płodu. *Klin Perinatol Ginekol.* 1995, 12(1), 19-21.
58. Leszczyńska-Gorzela B, Kamiński K, Szymula D, Sawulicka-Oleszczuk H, Oleszczuk J. Serum level of endothelin-1 and -2 in pregnancies complicated by EPH gestosis. *Gynecol Obstet Invest.* 1997, 43, 37-40.
59. Leszczyńska-Gorzela B, Kamiński K, Szymula D, Oleszczuk J. Participation of nitric oxide in maintenance of vascular tension in human placenta. Third World Congress of Perinatal Medicine, San Francisco. Abstract book 1996, 69.
60. Leszczyńska-Gorzela B, Oleszczuk J, Kamiński. Wartość kliniczna oznaczania fibronektyny surowiczej w gestozie EPH. *Ginekol. Pol.* 1994, (1) 37-41.
61. Lin LH. Glutamatergic neurons say NO in the nucleus tractus solitarii. *J Chem Neuroanat.* 2009, 38, 154-165.
62. Lindblom B, Lundberg JM, Lunell NO, Nisell H, Norén H, Wolff K. Endothelin - a potent constrictor of small myometrial arteries of term pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1991, 70, 267-270.
63. Lisi V, Paternoster DM, Stecca A, Micciché F, Fantinato S, Leon A, Damante G, Fabbro D, Clementi M. Investigation of endothelin-1 type A receptor gene polymorphism (-231 G>A) in preeclampsia susceptibility. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2007, 20, 145-149.
64. Liu Q, Gross SS. Binding sites of nitric oxide synthases. *Methods Enzymol.* 1996, 268, 311-324.
65. López-Jaramillo P, Arenas WD, García RG, Rincon MY, López M. The role of the L-arginine-nitric oxide pathway in preeclampsia. *Ther Adv Cardiovasc Dis.* 2008, 2, 261-275.
66. López-Jaramillo P, Casas JP, Serrano N. Preeclampsia: from epidemiological observations to molecular mechanisms. *Braz J Med Biol Res.* 2001, 34, 1227-1235.
67. Luscher T. E, Raj L., Yanhoutte P M. Effect of hypertension and its reversal on endothelium-dependent relaxations in the rat aorta. *J Hypertens.* 1987, 5; 153-155.
68. Luscher T. E: Importance of endothelium-derived relaxing and contracting factors: A new concept of hypertension? *Am J Hypertens.* 1990, 3, 317-330.

69. Lüscher TF, Seo BG, Bühler FR. Potential role of endothelin in hypertension. Controversy on endothelin in hypertension. *Hypertension*. 1993, 21, 752-757.
70. Lüscher TF, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1986, 8, 344-348.
71. Lüscher TF, Yang Z, Tschudi M, von Segesser L, Stulz P, Boulanger C, Siebenmann R, Turina M, Bühler FR. Interaction between endothelin-1 and endothelin-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ. Res.* 1990, 60, 1088-1094.
72. Maixnerová D, Merta M, Reiterová J, Stekrová J, Rysavá R, Obeidová H, Viklický O, Potmesil P, Tesar V. The influence of three endothelin-1 polymorphisms on the progression of IgA nephropathy. *Folia Biologica (Praha)*. 2007, 53, 27-32.
73. Margarit L, Griffiths A, Tsapanos V, Decavalas G, Gumenos D. Second trimester amniotic fluid endothelin concentration. A possible predictor for pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol*. 2005, 25, 18-20.
74. Masaki T. Endothelins: homeostatic and compensatory actions in the circulatory and endocrine systems. *Endocrinol Rev*. 1993, 14, 256-268.
75. Mastrogiannis DS, Kalter CS, O'Brien WF, Carlan SJ, Reece EA. Effect of magnesium sulfate on plasma endothelin-1 levels in normal and preeclamptic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 1992, 167, 1554-1559.
76. Mata-Greenwood E, Chen DB. Racial differences in nitric oxide-dependent vasorelaxation. *Reprod Sci*. 2008, 15, 9-25.
77. McMahan LP, Redman CW, Firth JD. Expression of the three endothelin genes and plasma levels of endothelin in pre-eclamptic and normal gestations. *Clin Sci*. 1993, 85, 417-424.
78. Meher S, Duley L. Nitric oxide for preventing pre-eclampsia and its complications. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007, 18: CD006490.
79. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*. 1998, 32, 3-8.
80. Mohaupt M. Molecular aspects of preeclampsia. *Mol Aspects Med*. 2007, 28, 169-91.
81. Molnár M, Sütö T, Tóth T, Hertelendy F. Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol*. 1994, 170, 1458-1466.
82. Müller U, Hildebrandt H. The nitric oxide/cGMP system in the antennal lobe of *Apis mellifera* is implicated in integrative processing of chemosensory stimuli. *Eur J Neurosci*. 1995, 7, 2240-2248.
83. Myatt L, Webster RP. Vascular biology of preeclampsia. *J Thromb Haemost*. 2009, 7, 375-384.
84. Myatt L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta*. 2010, 31, 66-69.
85. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K. T-786-C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*. 1999, 99, 2864-2870.
86. Nasreen S, Nabika T, Shibata H, Moriyama H, Yamashita K, Masuda J, Kobayashi S. T-786C polymorphism in endothelial NO synthase gene affects cerebral circulation in smokers: possible gene-environmental interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002, 22, 605-610.

87. Nejatizadeh A, Stobdan T, Malhotra N, Pasha MA. The genetic aspects of pre-eclampsia: achievements and limitations. *Biochem Genet.* 2008, 46, 451-479.
88. Neri I, Mazza V, Galassi MC, Volpe A, Facchinetti F. Effects of L-arginine on utero-placental circulation in growth-retarded fetuses. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1996, 75, 208-212.
89. Nisell H, Hemsén A, Lunell NO, Wolff K, Lundberg MJ. Maternal and fetal levels of a novel polypeptide, endothelin: evidence for release during pregnancy and delivery. *Gynecol Obstet Invest.* 1990, 30, 129-132.
90. Nova A, Sibai BM, Barton JR, Mercer BM, Mitchell MD. Maternal plasma level of endothelin is increased in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1991, 165, 724-727.
91. Ogawa Y, Nakao K, Arai H, Nakagawa O, Hosoda K, Suga S, Nakanishi S, Imura H. Molecular cloning of a non-isopeptide-selective human endothelin receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991, 178, 248-255.
92. Otani S., Usuki S., Saitoh T: Comparison of endothelin-1 concentrations in normal and complicated pregnancies. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991, 17, 308-312.
93. Popov AF, Schulz EG, Hinz J, Schmitto JD, Seipelt R, Koziolk MJ, Rosenberger A, Schoendube FA, Müller GA. Impact of endothelin-1 Lys198Asn polymorphism on coronary artery disease and endorgan damage in hypertensives. *Coron Artery Dis.* 2008, 19, 429-434.
94. Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol.* 2001, 64, 51-68.
95. Roggensack AM, Zhang Y, Davidge ST. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension.* 1999, 33, 83-89.
96. Schiff E, Ben-Baruch G, Peleg E, Rosenthal T, Alcalay M, Devir M, Mashiach S. Immunoreactive circulating endothelin-1 in normal and hypertensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 1992, 166, 624-628.
97. Schneider MC, Landau R, Mörtl MG. New insights in hypertensive disorders of pregnancy. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2001, 14, 291-297.
98. Seligman SP, Buyon JP, Clancy RM, Young BK, Abramson SB. The role of nitric oxide in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1994, 171, 944-948.
99. Serrano NC, Casas JP, Díaz LA. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study. *Hypertension.* 2004, 44, 702-707.
100. Sheppard SJ, Khalil RA. Risk factors and mediators of the vascular dysfunction associated with hypertension in pregnancy. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2010, 10, 33-52.
101. Shimasaki Y, Yasue H, Yoshimura M, Nakayama M, Kugiyama K, Ogawa H, Harada E, Masuda T, Koyama W, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Nakao K. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1998, 31, 1506-1510.
102. Shoji M, Tsutaya S, Saito R, Takamatu H, Yasujima M. Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan. *Life Sci.* 2000, 66, 2557-2562.
103. Sibley CP, Boyd RDH. Mechanisms of transfer across the human placenta. W: *Fetal and Neonatal Physiology.* Red. Polin RA, Fox WW, Saunders WB. Company. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo 1992, 1, 62-73.
104. Slowinski T, Neumayer HH, Stolze T, Gossing G, Halle H, Hocher B. Endothelin system in normal and hypertensive pregnancy. *Clin Sci (Lond).* 2002, 103, 446-449.

105. Sorrentino S, Forleo C, Iacoviello M, Guida P, D'Andria V, Favale S. Endothelin system polymorphisms in tilt test-induced vasovagal syncope. *Clin Auton Res.* 2009, 19, 347-354.
106. Souza-Costa DC, Belo VA, Silva PS, Sertorio JT, Metzger IF, Lanna CM, Machado MA, Tanus-Santos JE. eNOS haplotype associated with hypertension in obese children and adolescents. *Int J Obes (Lond).* 2011, 35, 387-392.
107. Spinarová L, Spinar J, Vasků A, Goldbergová M, Ludka O, Toman J, Vítovec J, Tomandlová M, Tomandl J. Big endothelin in chronic heart failure: marker of disease severity or genetic determination? *Int J Cardiol.* 2004, 93, 63-68.
108. Tanbe AF, Khalil RA. Circulating and Vascular Bioactive Factors during Hypertension in Pregnancy. *Curr Bioact Compd.* 2010, 6, 60-75.
109. Taylor RN, Crombleholme WR, Friedman SA, Jones LA, Casal DC, Roberts JM. High plasma cellular fibronectin levels correlate with biochemical and clinical features of preeclampsia but cannot be attributed to hypertension alone. *Am J Obstet Gynecol.* 1991, 165, 895-901.
110. Taylor RN, Varma M, Teng NN, Roberts JM. Women with preeclampsia have higher plasma endothelin levels than women with normal pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990, 71, 1675-1677.
111. Tepliakov AT, Shilov SN, Berezikova EN, Iakovleva NF, Maianskaia SD, Popova AA, Luksha EB, Voronina EN, Torim IuIu, Karpov RS. Polymorphism of eNOS and iNOS Genes and Chronic Heart Failure in Patients With Ischemic Heart Disease. *Kardiol.* 2010, 50, 23-30.
112. Török J. Participation of nitric oxide in different models of experimental hypertension. *Physiol Res.* 2008, 57, 813-825.
113. Tsunoda K, Abe K, Yoshinaga K, Furuhashi N, Kimura H, Tsujiei M, Yajima A. Maternal and umbilical venous levels of endothelin in women with pre-eclampsia. *J Hum Hypertens.* 1992, 6, 61-64.
114. Usuki S, Saitoh T, Sawamura T, Suzuki N, Shigemitsu S, Yanagisawa M, Goto K, Onda H, Fujino M, Masaki T. Increased maternal plasma concentration of endothelin-1 during labor pain or an delivery and the existence of a large amount of endothelin-1 in amniotic fluid. *Gynecol Endocrinol.* 1990, 4, 85-97.
115. Vasků A, Spinarová L, Goldbergová M, Muzik J, Spinar J, Vítovec J, Toman J, Vácha J. The double heterozygote of two endothelin-1 gene polymorphisms (G8002A and -3A/-4A) is related to big endothelin levels in chronic heart failure. *Exp Mol Pathol.* 2002, 73, 230-233.
116. Vasků V, Bienertová-Vasků J, Pávková-Goldbergová M, Semrádová V, Vasků A. Association of polymorphic variants in endothelin-1 (EDN1) genes with the therapy of patients with cutaneous T-cell lymphomas. *Cas Lek Cesk.* 2006;145, 144-147.
117. Velloso MW, Pereira SB, Gouveia L, Chermont S, Tardin OM, Gonçalves R, Camacho V, Contarato Lde F, Quintao M, Oliveira e Alves T, Pessoa LP, Brito Júnior A, Ribeiro GS, Mesquita ET. *Nitric Oxide.* 2010, 22, 220-225.
118. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology (Bethesda).* 2009, 24, 147-58.
119. Wimalawansa SJ. Nitric oxide: new evidence for novel therapeutic indications. *Expert Opin Pharmacother.* 2008, 9, 1935-1954.
120. Wulff C, Weigand M, Kreienberg R, Fraser HM. Angiogenesis during primate placentation in health and disease. *Reproduction.* 2003, 126, 569-577.

121. Yallampalli C, Garfield RE. Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1993, 169, 1316-1320.
122. Yallampalli C., Izumi H., Byam-Smith M, Garfield RE. An L-arginine — nitric oxide — cyclic guanosine monophosphate system exists in the uterus and inhibits contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1994, 170, 175-185.
123. Yang D, Lang U, Greenberg SG, Myatt L, Clark KE. Elevation of nitrate levels in pregnant ewes and their fetuses. *Am J Obstet Gynecol.* 1996, 174, 573-577.
124. Yang ZH, Richard V, von Segesser L, Bauer E, Stulz P, Turina M, Lüscher TF. Threshold concentrations of endothelin-1 potentiate contractions to norepinephrine and serotonin in human arteries: A new mechanism of vasospasm? *Circulation* 1990, 82, 188-195.
125. Yoshimoto S, Ishizaki Y, Mori A, Sasaki T, Takakura K, Murota S. The role of cerebral microvessel endothelium in regulation of cerebral blood flow through production of endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991, 17, 260-263.
126. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, Kugiyama K, Ogawa H, Ogawa Y, Saito Y, Miyamoto Y, Nakao K. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet.* 1998, 103, 65-69.
127. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, Saito Y, Miyamoto Y, Ogawa Y, Kaneshige T, Hiramatsu H, Yoshioka T, Kamitani S, Teraoka H, Nakao K. Genetic risk factors for coronary artery spasm: significance of endothelial nitric oxide synthase gene T-786-C and missense Glu298Asp variants. *J Invest Med.* 2000, 48, 367-337.
128. Yoshimura T, Chowdhury FA, Yoshimura M. Genetic and environmental contributions to severe preeclampsia: lack of association with the endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp variant in a developing country. *Gynecol Obstet Invest.* 2003, 56, 10-13.
129. Zhou L, Bai R, Tian J, Liu X, Lu D, Zhu P, Liu Y, Zeng L, Luo W, Zhang Y, Wang A. Bioinformatic comparisons and tissue expression of the neuronal nitric oxide synthase (nNOS) gene from the red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish Shellfish Immunol.* 2009, 27, 577-584.

10. SPIS TABEL, RYCIN I FOTOGRAFII

SPIS TABEL

Tab. 1. Dane kliniczne pacjentek z grupy badanej i kontrolnej.

Tab. 2. Charakterystyka polimorfizmów badanych w pracy.

Tab. 3. Startery użyte do reakcji PCR.

Tab. 4. Wielkości fragmentów po reakcji hydrolizy oraz stosowane enzymy restrykcyjne przy oznaczeniu polimorfizmów genetycznych badanych genów.

Tab. 5. Porównanie danych klinicznych, ciśnienia tętniczego, masy ciała oraz wskaźnika BMI pomiędzy badanymi grupami.

Tab. 6. Parametry biochemiczne w grupie kobiet z nadciśnieniem w ciąży.

Tab. 7. Parametry urodzeniowe noworodków z badanych grup.

Tab. 8. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 9. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* w podgrupie GH oraz PE oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 10. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-786T>C* genu *NOS3* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 11. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-786T>C* genu *NOS3* w podgrupie GH, PE oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 12. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDN1* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 13. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDN1* w podgrupie GH, PE oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 14. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-134delA* genu *EDN1* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej

Tab. 15. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu *-134delA* genu *EDN1* w grupie badanej oraz w grupie kontrolnej.

Tab. 16. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *Glu298Asp* oraz *-786T>C* genu *NOS3* pomiędzy badanymi grupami kobiet.

Tab. 17. Współwystępowanie genotypów *Lys198Asn* oraz *-134delA* genu *EDN1* między całą grupą badaną kobiet z nadciśnieniem w ciąży oraz grupą kontrolną.

Tab. 18. Wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w badanych podgrupach GH oraz PE w zależności od polimorfizmów genu *NOS3*.

Tab. 19. Wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w badanych podgrupach GH oraz PE w zależności od polimorfizmów genu *EDN1*.

Tab. 20. Wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w grupie kobiet z GH w zależności od współwystępowania polimorfizmów genu *NOS3*.

Tab. 21. Wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w grupie kobiet z PE w zależności od współwystępowania polimorfizmów genu *NOS3*.

Tab. 22. Wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w grupie GH w zależności od współwystępowania polimorfizmów genu *EDN1*.

Tab. 23. Wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w grupie PE w zależności od współwystępowania polimorfizmów genu *EDN1*.

Tab. 24. Analiza porównawcza parametrów klinicznych i biochemicznych w całej grupie badanej pacjentek z nadciśnieniem w ciąży (n=110) w zależności od poszczególnych genotypów polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3*.

Tab. 25. Analiza porównawcza parametrów klinicznych i biochemicznych w całej grupie badanej pacjentek z nadciśnieniem w ciąży (n=110) w zależności od poszczególnych genotypów polimorfizmu *-786T>C* genu *NOS3*.

Tab. 26. Analiza porównawcza parametrów klinicznych i biochemicznych w całej grupie badanej pacjentek z nadciśnieniem w ciąży (n=110) w zależności od poszczególnych genotypów polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDN1*.

Tab. 27. Analiza porównawcza parametrów klinicznych i biochemicznych w całej grupie badanej pacjentek z nadciśnieniem w ciąży (n=110) w zależności od poszczególnych genotypów polimorfizmu *-134delA* genu *EDN1*.

Tab. 28. Częstość występowania poszczególnych haplotypów badanych polimorfizmów genu *NOS3* oszacowana za pomocą programu PHASE.

Tab. 29. Częstość występowania poszczególnych haplotypów badanych polimorfizmów genu *EDN1* oszacowana za pomocą programu PHASE.

Tab. 30. Stężenie ET-1 w osoczu kobiet ze stanem przedzrzucawkowym.

SPIS RYCIN

Ryc. 1. Reakcja powstawania NO z L-argininy.

Ryc. 2. Mechanizm regulacji syntezy eNOS. A) w warunkach optymalnych oraz B) przy niedoborze BH₄ (wg George and Johnson 2010).

Ryc. 3. Schemat budowy oraz lokalizacja badanych w pracy polimorfizmów genu *NOS3*.

Ryc. 4. Schemat relaksacji komórek mięśniowych pod wpływem działania NO.

Ryc. 5. Schemat działania układu NO-ET-1.

Ryc. 6. Schemat budowy oraz lokalizacja badanych w pracy polimorfizmów genu *EDN1*.

Ryc. 7. Stężenie mocznika w grupie kobiet z preeklampsją (PE) oraz nadciśnieniem izolowanym (GH).

Ryc. 8. Stężenie kwasu moczowego w grupie kobiet z preeklampsją (PE) oraz nadciśnieniem izolowanym (GH).

Ryc. 9. Poziom białka w surowicy krwi w grupie kobiet z preeklampsją (PE) oraz nadciśnieniem izolowanym (GH).

Ryc. 10. Poziom białkomoczu w grupie kobiet z preeklampsją (PE) oraz nadciśnieniem izolowanym (GH).

Ryc. 11. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* w grupie kontrolnej (%).

Ryc. 12. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* w podgrupie PE (%).

Ryc. 13. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* w podgrupie GH (%).

Ryc. 14. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *-786T>C* genu *NOS3* w grupie kontrolnej (%).

Ryc. 15. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *-786T>C* genu *NOS3* w podgrupie PE (%).

Ryc. 16. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *-786T>C* genu *NOS3* w podgrupie GH (%).

Ryc. 17. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDN1* w grupie kontrolnej (%).

Ryc. 18. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDN1* w podgrupie PE (%).

Ryc. 19. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *Lys198Asn* genu *EDN1* w podgrupie GH (%).

Ryc. 20. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *-134delA* genu *EDN1* w grupie kontrolnej (%).

Ryc. 21. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *-134delA* genu *EDN1* w podgrupie PE (%).

Ryc. 22. Częstość występowania genotypów polimorfizmu *-134delA* genu *EDN1* w podgrupie GH (%).

SPIS FOTOGRAFII

Fot. 1. Na zdjęciu przedstawiono fragmenty hydrolizy enzymem *MboI* produktu PCR genu *NOS3* dla polimorfizmu *Glu298Asp*.

Fot. 2. Na zdjęciu przedstawiono fragmenty hydrolizy enzymem *MspI* produktu PCR genu *NOS3* dla polimorfizmu *-786T>C*.

Fot. 3. Na zdjęciu przedstawiono fragmenty hydrolizy enzymem *NheI* produktu PCR genu *EDNI* dla polimorfizmu *Lys198Asn*.

Fot. 4. Na zdjęciu przedstawiono fragmenty po hydrolizie enzymem *BsII* produktu PCR genu *EDNI* dla polimorfizmu *-134delA*.