

mgr Małgorzata Iwańska

**WPLYW POLIMORFIZMÓW GENU *PPARG*
NA STĘŻENIE WYBRANYCH ADIPOKIN U CIĘŻARNYCH
Z NADMIERNYM PRZYROSTEM MASY CIAŁA**

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor:

**PROF. DR HAB. N. MED. AGNIESZKA SEREMAK-MROZIKIEWICZ
KLINIKA PERINATOLOGII I CHOROÓB KOBIECYCH
UNIWERSYTET MEDYCZNY W POZNANIU**



**KOLEGIUM NAUK MEDYCZNYCH
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

Poznań 2021

Chciałabym wyrazić moją wdzięczność

*Promotor, Pani Prof. dr hab. n. med. Agnieszce Seremak-Mrozikiewicz,
za nieocenioną pomoc merytoryczną, wsparcie na każdym etapie pracy,
oraz wyrozumiałość.*

*Pani dr n. med. Grażynie Kurzawińskiej
za cenne uwagi i życzliwość.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

1. WSTĘP	7
1.1. Epidemiologia otyłości	8
1.2. Definicja i klasyfikacja otyłości	9
1.3. Etiopatogeneza otyłości	10
1.4. Przyrost masy ciała u ciężarnych	13
1.5. Nieprawidłowy przyrost masy ciała w ciąży i jego konsekwencje metaboliczne dla matki i dziecka	15
1.5.1. Nadmierny przyrost masy ciała w ciąży	15
1.5.2. Zbyt mały przyrost masy ciała w ciąży	17
1.6. Tkanka tłuszczowa, adipokiny i adipogeneza	19
1.6.1. Adipogeneza i kontrola adipogenezy przez PPAR γ	23
1.6.2. Rola rezystyny w rozwoju otyłości	24
1.6.3. Rola dipeptydylopeptydazy IV w rozwoju otyłości	25
1.7. Funkcja receptora PPARγ	27
1.7.1. Rola receptora PPAR γ w okresie ciąży i porodu	32
1.8. Polimorfizmy genu <i>PPARG</i>	34
1.8.1. Polimorfizm <i>Pro12Ala</i> (rs1801282)	34
1.8.2. Polimorfizm <i>161C>T</i> (rs3856806)	35
1.9. Hipoteza badawcza	36
2. CEL PRACY	37
3. MATERIAŁ	38
3.1. Charakterystyka pacjentek	38
3.2. Kryteria włączenia i wyłączenia pacjentek z grupy	39
4. METODY	41
4.1. Analiza genetyczna	41
4.1.1. Izolacja genomowego DNA	42
4.1.2. Amplifikacja wybranych fragmentów DNA metodą PCR/RFLP	42
4.2. Analiza immunoenzymatyczna	44
4.2.1. Oznaczanie stężenia rezystyny w surowicy krwi	45
4.2.2. Oznaczanie stężenia dipeptydylopeptydazy IV w surowicy krwi	46
4.3. Aparatura wykorzystywana w przeprowadzonych badaniach	47
4.4. Metody statystyczne	48
5. WYNIKI	50
5.1. Charakterystyka grupy badanej	50
5.2. Charakterystyka danych klinicznych pacjentek i ich noworodków	51
5.3. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów genu <i>PPARG</i>	58
5.4. Asocjacje parametrów antropometrycznych z polimorfizmami genu <i>PPARG</i>	63
5.5. Ocena stężenia adipokin w badanych grupach ciężarnych	67
5.5.1. Korelacje parametrów antropometrycznych ze stężeniami badanych	

adipokin	70
5.5.2. Asocjacja stężeń badanych adipokin z polimorfizmami genu <i>PPARG</i>	73
5.5.3. Częstość współwystępowania genotypów oraz analiza haplotypów badanych polimorfizmów genu <i>PPARG</i>	76
6. DYSKUSJA	79
6.1. Związek wartości BMI przed ciążą z przyrostem masy ciała u ciężarnych.	79
6.2. Częstość występowania polimorfizmów <i>Pro12Ala</i> oraz <i>161C>T</i> genu <i>PPARG</i> na świecie	81
6.3. Polimorfizmy <i>Pro12Ala</i> i <i>161C>T</i> genu <i>PPARG</i> a nadmierny przyrost masy ciała w ciąży	84
6.3.1. Polimorfizm <i>Pro12Ala</i> genu <i>PPARG</i>	84
6.3.2. Polimorfizm <i>161C>T</i> genu <i>PPARG</i>	87
6.4. Współwystępowanie genotypów oraz analiza haplotypów genu <i>PPARG</i>	89
6.5. Związek stężenia adipokin prozapalnych z przyrostem masy ciała w ciąży	92
6.5.1. Związek stężenia rezystyny z przyrostem masy ciała w ciąży	92
6.5.2. Związek stężenia dipeptydylopeptydazy IV z przyrostem masy ciała w ciąży	94
6.6. Związek polimorfizmów genu <i>PPARG</i> ze stężeniem rezystyny i DPP IV	96
6.7. Rola nutrigenomiki i nutrigenetyki w rozwoju otyłości	99
6.8. Implikacje kliniczne oraz możliwości terapeutycznego wykorzystania agonistów PPARy oraz inhibitorów DPP IV	101
6.9. Podsumowanie	104
7. WNIOSKI	105
8. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	106
9. SUMMARY	110
10. BIBLIOGRAFIA	114
SPIS TABEL I RYCIN	129

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACOG	Amerykańskie Towarzystwo Położników i Ginekologów (ang. <i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>)
ADAbp	białko wiążące deaminazę adenozyiny (ang. <i>adenosine deaminase binding protein</i>)
ADSF	czynn timer wydzielniczy specyficzny dla adipocytów (ang. <i>adipocyte-specific secretory factor</i>)
Ala	aminokwas alanina
BAT	tkanka tłuszczowa brązowa (ang. <i>brown adipose tissue</i>)
BDNF	neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
BMI	wskaźnik masy ciała (ang. <i>body mass index</i>)
C/EBP	białka wiążące się z sekwencją CCAAT (ang. <i>CCAAT enhancer binding proteins, CCAAT binding factor</i>)
CRP	białko C-reaktywne (ang. <i>C reactive protein</i>)
CVD	choroby układu krążenia (ang. <i>cardiovascular diseases</i>)
DBD	domena wiążąca DNA (ang. <i>DNA binding domain</i>)
DPP IV	dipeptydylopeptydaza IV (ang. <i>dipeptidyl peptidase IV</i>)
E	rzucawka (ang. <i>eclampsia</i>)
EDTA	kwas etylenodiaminotetraoctowy (ang. <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
EGWG	nadmierny ciążowy przyrost masy ciała (ang. <i>excessive gestational weight gain</i>)
ELISA	metoda immunoenzymatyczna (ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ERK	rodzina białek z grupy kinaz (ang. <i>extracellular signal-regulated kinases</i>)
FIZZ3	cząsteczka obecna w obszarach zapalenia (ang. <i>found in inflammatory zone 3</i>)
FSH	hormon folikulotropowy (ang. <i>follicle-stimulating hormone</i>)
FTO	gen podatności na otyłość (ang. <i>fat mass and obesity associated gene</i>)
GDM	cukrzyca ciążowa ciężarnych (ang. <i>gestational diabetes mellitus</i>)
GIP	hormon inkretynowy: glukozozależny peptyd insulinotropowy (ang. <i>glucose-dependent insulinotropic polypeptide</i>)
GLP-1	hormon inkretynowy: glukagonopodobny peptyd 1 (ang. <i>glucagon-like peptide-1</i>)
GWAS	badanie asocjacyjne całego genomu (ang. <i>genome-wide association studies</i>)
GWG	ciążowy przyrost masy ciała (ang. <i>gestational weight gain</i>)
hPL	ludzki laktogen łożyskowy, somatomamotropina kosmówkowa (ang. <i>human placental lactogen</i>)
HSP	białko szoku cieplnego, białka opiekuńcze (ang. <i>heat shock proteins</i>)
IGWG	zbyt mały ciążowy przyrost masy ciała (ang. <i>insufficient gestational weight gain</i>)
IL	interleukiny (ang. <i>interleukins</i>)
IOM	Instytut Medycyny Akademii Nauk (ang. <i>Institute of Medicine of the National Academy of Sciences</i>)
IR	insulinooporność (ang. <i>insulin resistance</i>)
IRS1	receptor insuliny (ang. <i>insulin receptor substrate 1</i>)
IUGR	ograniczenie wewnątrzmacicznego wzrastania płodu (ang. <i>intrauterine growth restriction</i>)

LBD	domena wiążąca ligand (ang. <i>ligand binding domain</i>)
LD	nierównowaga sprzężeń (ang. <i>linkage disequilibrium</i>)
LH	hormon luteinizujący (ang. <i>luteinizing hormone</i>)
LPS	lipopolisacharyd (ang. <i>lipopolysaccharide</i>)
MAP2K5	aktywowana mitogenem kinaza białkowa kinazy 5 (ang. <i>mitogen-activated protein kinase kinase 5 gene</i>)
MONICA	międzynarodowy program monitorujący przyczyny i uwarunkowania chorób układu krążenia (ang. <i>multinational monitoring of trends and determinants in cardiovascular diseases</i>)
NEGR1	gen kodujący neuronalny regulator wzrostu (ang. <i>neuronal growth regulator 1 gene</i>)
NGWG	prawidłowy ciążowy przyrost masy ciała (ang. <i>normal gestational weight gain</i>)
NK	naturalni zabójcy (ang. <i>natural killers</i>)
OR	iloraz szans (ang. <i>odds ratio</i>)
PAI-I	inhibitor aktywatora plazminogenu-1 (ang. <i>plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PE	stan przedrzucawkowy (ang. <i>preeclampsia</i>)
PPARγ	receptor aktywowany przez proliferatory peroksisomów γ (ang. <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>)
PPARG	gen kodujący receptor aktywowany przez proliferatory peroksisomów γ (ang. <i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene</i>)
PPRE	element odpowiedzi na proliferatory peroksisomów (ang. <i>peroxisome proliferator responsive element</i>)
Pro	aminokwas prolina
PTGiP	Polskie Towarzystwo Ginekologów i Położników (ang. <i>Polish Society of Obstetricians and Gynecologists</i>)
PU	przedział ufności (ang. <i>confidence interval</i>)
PUFA	wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. <i>polyunsaturated fatty acids</i>)
RELMs	cząsteczki podobne do rezystyny (ang. <i>resistin-like molecules</i>)
RFLP	polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. <i>restriction fragments length polymorphism</i>)
RXR	receptor retinoidowy X (ang. <i>retinoid X receptor</i>)
SD	odchylenie standardowe (ang. <i>standard deviation</i>)
SHBG	glikoproteina wiążąca hormony płciowe (ang. <i>sex hormone binding globulin</i>)
SNP	polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
TF	czynn timer tkankowy (ang. <i>tissue factor</i>)
TG	triglicerydy (ang. <i>triglycerides</i>)
TLR	receptory toll-podobne (ang. <i>toll-like receptors</i>)
TNF	czynn timer martwicy nowotworu (ang. <i>tumor necrosis factor</i>)
TZD	glitazon (tiazolidynodiony) (ang. <i>thiazolidinediones</i>)
T2DM	cukrzyca typu 2 (ang. <i>type 2 diabetes mellitus</i>)
UCP-1	termogenina, białko rozprzegające (ang. <i>uncoupling protein-1</i>)
WAT	tkanka tłuszczowa biała (ang. <i>white adipose tissue</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organization</i>)
WOBASZ	Wieloośrodkowe Ogólnopolskie Badanie Stanu Zdrowia Ludności

1. WSTĘP

Otyłość jest chorobą przewlekłą, która w chwili obecnej na całym świecie przybiera rozmiary epidemii, będąc jednocześnie przyczyną poważnych problemów zdrowotnych, społecznych oraz ekonomicznych. Globalna epidemia otyłości została ogłoszona przez Światową Organizację Zdrowia (WHO - *World Health Organization*) już w 1997 roku. Niestety od tego czasu obserwuje się systematyczne narastanie problemu. W roku 2018 nadwaga dotyczyła prawie 39% populacji dorosłych ludzi na świecie, w tym osoby otyłe stanowiły aż 13% populacji. Szacuje się, że w przypadku utrzymania się tego trendu w 2025 roku otyłość może dotyczyć nawet 21% kobiet i 18% mężczyzn.

Nadwaga lub otyłość kobiet w wieku reprodukcyjnym oraz nieprawidłowy przyrost masy ciała w ciąży stanowią duże wyzwanie dla lekarzy ginekologów i położników, ponieważ stanowią przyczynę szeregu powikłań dotyczących zarówno matki jak i dziecka, a ich liczba ma tendencje wzrostowe [Hirshberg i wsp., 2017, Kominiarek i wsp., 2019]. Przeprowadzone badania wśród kobiet w ciąży pokazują, że problem nadmiernego przyrostu masy ciała może dotyczyć ponad 40% ciężarnych [Goldstein i wsp., 2017].

Przyrost masy ciała w czasie ciąży związany jest z zapewnieniem prawidłowego dostarczania składników odżywczych i tlenu do rozwijającego się płodu oraz z przygotowaniem rezerw energetycznych matki do laktacji po porodzie. U kobiety o prawidłowej budowie ciała zalecany ciążowy przyrost masy powinien wynosić około 20%. Na ciążowy przyrost masy ciała wpływ mają czynniki genetyczne, epigenetyczne, metaboliczne i środowiskowe oraz ich wzajemne interakcje. Obecnie, dzięki dynamicznie rozwijającym się dziedzinom medycyny jak nutrigenetyka i nutrigenomika wykazano, że przyrost masy ciała może być uzależniony nie tylko od stosowanej diety, aktywności fizycznej, ale również od obecności polimorfizmów genów związanych z otyłością. Istotne jest zatem interdyscyplinarne edukowanie kobiet w zakresie uzyskania odpowiedniej masy ciała i wykształcenia prawidłowych nawyków żywieniowych już na etapie planowania ciąży.

1.1. Epidemiologia otyłości

Nadwaga i otyłość to problem, który dotyczy ludności całego świata, zarówno państw wysoko rozwiniętych, jak i rozwijających się. Wskaźniki dotyczące otyłości ulegają wzrostowi w szybkim tempie i dotyczą zarówno kobiet, mężczyzn jak i dzieci, niezależnie od przynależności etnicznej, kraju zamieszkania, jak również statusu społecznego. Koszty leczenia otyłości na całym świecie są bardzo duże i stale rosną [Chooi i wsp., 2019]. Od roku 1975 liczba dorosłych osób otyłych wzrosła niemal trzykrotnie, w roku 2016 nadwagę stwierdzono u ponad 1,9 miliarda (39%) osób całym świecie, spośród nich aż 650 milionów (13%) było otyłych. Liczba dzieci otyłych wzrosła czterokrotnie, z 4 do 18% (u dzieci poniżej 5 lat), dając liczbę 38,2 mln dzieci z nadwagą lub otyłością. Z powodu chorób wywołanych otyłością umiera rocznie co najmniej 2,8 mln osób na całym świecie [WHO, 2020].

Problem nadwagi i otyłości w największym stopniu dotyczy mieszkańców Stanów Zjednoczonych, gdzie według raportu WHO z 2016 roku u ponad 60% populacji stwierdza się nadmierny przyrost masy ciała, z czego ponad połowa spełnia kryteria otyłości. W Europie 20% osób dorosłych i 10% dzieci jest otyłych. Szacuje się również, że ponad 60% dzieci z nadwagą w okresie dzieciństwa, będzie mieć problem z nieprawidłowym nadmiernym przyrostem masy ciała w wieku dorosłym [Eurostat, 2016].

Również w Polsce od kilku dekad obserwuje się narastanie problemu otyłości w populacji kobiet i mężczyzn. Niepokojących danych dostarczyły wyniki badania przeprowadzonego w Polsce w latach 1983-1986, w ramach koordynowanego przez WHO europejskiego projektu MONICA, obejmującego 40 tysięcy osób. W badaniu tym odnotowano nadwagę u 31% kobiet i 44% mężczyzn, natomiast otyłość u 29% kobiet i 28% mężczyzn [Pająk, 1996]. Wieloośrodkowe ogólnopolskie badanie stanu zdrowia ludności WOBASZ (2003-2005) wykazało otyłość u 22,4% kobiet i 21,2% mężczyzn [Biela i wsp., 2005]. W kontynuacji projektu pod nazwą WOBASZ II (2013-2014) pokazano wzrost częstości występowania otyłości do 25% u kobiet i 24,4% u mężczyzn. Chorobliwa otyłość dotyczyła około 282 tysięcy kobiet w Polsce [Stepaniak i wsp., 2016]. Według najnowszych statystyk WHO, co druga osoba w Polsce ma nadwagę, natomiast co piąta jest otyła [WHO, 2020].

Równolegle z ogólnoświatową tendencją narastania problemu otyłości w populacji ogólnej, obserwuje się również narastanie problemu otyłości u kobiet w ciąży. Według badań przeprowadzonych w ramach europejskiego projektu Euro-

Peristat szacuje się, że około 30-37% kobiet ciężarnych w większości krajów europejskich kwalifikuje się do grupy osób z nadwagą lub otyłością, biorąc pod uwagę wartość wskaźnika masy ciała (BMI - *body mass index*) w pierwszym okresie ciąży. Wyjątkiem w tym badaniu była Polska, Francja i Słowenia, które odnotowały nieco niższe odsetki oraz Szkocja, która odnotowała wyższy odsetek kobiet z nadwagą i otyłością [MacFarlane i wsp., 2016]. Również w obszernym szwedzkim badaniu, liczącym około 163 tysiące pacjentek odnotowano, że w przypadku matek, rodzących pierwsze lub drugie dziecko w latach 1982-2010, około 33-37% z nich uzyskało nadmierny ciążowy przyrost masy ciała według klasyfikacji Instytutu Medycyny w Stanach Zjednoczonych (IOM - *Institute of Medicine*) [Holowko i wsp., 2015]. Badania przeprowadzone w roku 2015 na podstawie analizy wartości wskaźnika BMI we wczesnym okresie ciąży pokazały, że większość kobiet (44-68%) uzyskała wyniki ciążowego przyrostu masy ciała powyżej zaleceń IOM. W badaniach tych wskazano również na związek pomiędzy nadmiernym przyrostem masy ciała a zwiększoną liczbą cięć cesarskich, rozwojem nadciśnienia ciążowego, zwiększoną częstością makrosomii oraz dystocji barkowej [Johnson i wsp., 2015, Deputy i wsp., 2015].

1.2. Definicja i klasyfikacja otyłości

Otyłość zaliczana do chorób przewlekłych, o podłożu zapalnym, definiowana jest jako zaburzenie homeostazy energetycznej [Mozaffarian i wsp., 2011]. Zaburzenie to rozwija się na tle hipertrofii i/lub hiperplazji adipocytów, przy niewspółmiernie wysokiej podaży energii pochodzącej z dostarczanego pożywienia w stosunku do dziennego wydatku energetycznego [Pellegrinelli i wsp., 2016, Tsatsanis i wsp., 2015]. Klasyfikację otyłości przeprowadza się obliczając wartość wskaźnika BMI, biorąc pod uwagę jej etiopatogenezę (otyłość pierwotna lub wtórna) oraz rozmieszczenie i stopień nagromadzenia tkanki tłuszczowej (tłuszcz podskórny lub trzewny). Obecnie otyłość najczęściej określana jest na podstawie wskaźnika masy ciała BMI. Wartości wskaźnika BMI w granicach 25-29,9 kg masy ciała/m² świadczą o nadwadze, natomiast wartości powyżej 30 kg masy ciała/m² wskazują na otyłość. Prawidłowa masa tkanki tłuszczowej powinna stanowić 20-30% masy ciała u kobiet oraz 12-20% masy ciała u mężczyzn. Ze względu na plastyczność tkanki tłuszczowej masa ta jest modyfikowalna i zależy od wielu czynników, w tym kaloryczności pożywienia, wysiłku fizycznego oraz czynników środowiskowych [Murawska-Ciałowicz, 2017]. Szczegółową klasyfikację otyłości przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Klasyfikacja otyłości ze względu na wskaźnik BMI, wg WHO.

<i>BMI (kg/m²)</i>	<i>Klasyfikacja WHO</i>
<18,5	Niedowaga
18,5 - 24,9	Norma
25,0 - 29,9	Nadwaga
30,0 - 34,9	Otyłość I°
35,0 - 39,9	Otyłość II°
≥40,0	Otyłość III° (olbrzymia)

1.3. Etiopatogeneza otyłości

Etiopatogeneza otyłości uwarunkowana jest wpływem czynników genetycznych, metabolicznych i środowiskowych. Otyłość pierwotna rozwija się na skutek długotrwale utrzymującego się dodatniego bilansu energetycznego [Mozaffarian i wsp., 2011].

Dobowy wydatek energii jest sumą podstawowej przemiany materii, energii pochodzącej z procesów termogenezy (dzięki dostarczonym składnikom pokarmowym) oraz energii wykorzystanej na wzrost i aktywność fizyczną. Organizm osoby otyłej większą część spożytej energii wykorzystuje m.in. do syntezy triglicerydów, niewiele natomiast na termogenezę [Pinheiro i wsp., 2011]. Regulację ilości przyjmowanego pokarmu zapewnia centralny układ nerwowy poprzez działanie osi mózg - jelito, natomiast równowagę energetyczną zapewnia podwzgórzowy szlak leptyna - melanokortyna [Morton i wsp., 2006]. W wyniku regulacji hormonalnej i nerwowej gospodarka energetyczna organizmu utrzymywana jest na optymalnym poziomie. Na przyjmowanie odpowiednich ilości pokarmu wpływają również centralne i obwodowe bodźce neurohormonalne. Sygnały obwodowe pochodzące z tkanki tłuszczowej, trzustki, jelit i żołądka, zintegrowane w podwzgórzu uruchamiają odpowiedź w postaci sygnału głodu lub sytości. Głównymi mediatorami obwodowymi są białka wydzielane przez tkankę tłuszczową zwane adipokinami (zwłaszcza adiponektyna i leptyna), hormon żołądkowy grelina, peptyd jelitowy YY oraz insulina syntetyzowana w trzustce. Szereg nieprawidłowości na wielu etapach tego neuromechanizmu może prowadzić do zaburzenia systemu równowagi metabolicznej [Sternson i wsp., 2017]. Dodatniemu

bilansowi metabolicznemu towarzyszy zwiększona kumulacja białej tkanki tłuszczowej, spowodowana przerostem istniejących już adipocytów lub nadmiernym różnicowaniem preadipocytów w adipocyty [Dusseault i wsp., 2016].

Procesowi temu sprzyjają nieprawidłowe nawyki żywieniowe związane ze zbyt częstym spożywaniem żywności przetworzonej, nadmiernie kalorycznej i bogato tłuszczowej, stosowanie diet zaburzających metabolizm [Stice i wsp., 2005] oraz zmniejszona aktywność fizyczna [Shields i wsp., 2008]. Możliwy udział różnych czynników w etiopatogenezie otyłości przedstawiono na ryc. 1.



Rycina 1. Etiopatogeneza otyłości.

Otyłość wtórna jest efektem zaburzenia homeostazy hormonalnej i metabolicznej organizmu w korelacji ze skłonnościami genetycznymi organizmu [Hruby i wsp., 2015]. W wielu przypadkach otyłość spowodowana jest zaburzeniami endokrynologicznymi, w tym niedoczynnością tarczycy, niedoborem czynnika wzrostu, zespołem Cushinga, zespołem policystycznych jajników, cukrzycą lub uszkodzeniem podwzgórza [Lustig, 2008]. W rozwoju otyłości wskazuje się również na rolę niektórych leków m.in. antydepresyjnych oraz insuliny [Ananth i wsp., 2004].

W latach 90-tych XX wieku rozpoczęto liczne obserwacje kliniczne dotyczące rodzinnego występowania otyłości. Zauważono, że w rodzinach w których obydwie rodzice są otyli, ryzyko otyłości u dziecka jest dziesięć razy wyższe niż u dziecka rodziców szczupłych [Reilly i wsp., 2005]. Przeprowadzone badania dotyczące bliźniąt

jedno- i dwujajowych, wychowanych w rodzinach naturalnych i adopcyjnych pokazały, że czynniki genetyczne mają zasadniczy wpływ na rozwój otyłości [Haworth i wsp., 2008].

Obecnie wiadomo, że otyłość może rozwinać się na podłożu genetycznym. Otyłość monogeniczna związana z dysfunkcją tylko jednego genu jest zjawiskiem dość rzadkim i stanowi 7,3% przypadków otyłości o podłożu genetycznym [Kleinendorst i wsp., 2018, Domingue i wsp., 2014]. Znacznie częściej rozwój otyłości związany jest ze współdziałaniem wielu genów lub ich polimorfizmów [Willer i wsp., 2009]. Zsekwencjonowanie ludzkiego genomu, związane z rozpoczętym w 2003 roku programem Human Genome Project, wykorzystujące zaawansowane techniki biologii molekularnej umożliwiło przyspieszenie badań nad dziedziczeniem otyłości i zaowocowało opisaniem polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNPs - *single nucleotide polymorphisms*) uczestniczących w patogenezie otyłości. Do tej pory opisano 389 genów i 445 SNP związanych z występowaniem nadmiernej masy ciała i otyłości [Cheng i wsp., 2018]. Otyłość o podłożu genetycznym może być związana z genami zaangażowanymi w procesy neuroregulacji ośrodka głodu i sytości (*BDNF*, *NEGR1*) [Horstmann i wsp., 2013, Boender i wsp., 2012], wydzielania insuliny (*IRS1*) [Kilpeläinen i wsp., 2011] oraz adipogenezy (*PPARG*, *FTO*, *MAP2K5*) [Takenaka i wsp., 2012, Locke i wsp., 2015].

Pomimo znaczących odkryć w tej dziedzinie, wiele mechanizmów molekularnych związanych z otyłością pozostaje niewyjaśnionych i wymaga dalszych badań. Zaburzenia genetyczne umożliwiają wytłumaczenie indywidualnej osobniczej podatności na otyłość, powstałej w wyniku interakcji: środowisko-gen. Jednocześnie reakcja gen-środowisko może być związana ze zmianami epigenetycznymi [Heijmans i wsp., 2008]. Mechanizmy epigenetyczne wpływają na dziedziczną zmianę ekspresji genów związaną między innymi z metylacją DNA, modyfikacją histonów i regulacją za pośrednictwem miRNA, bez wpływu na zmianę sekwencji nukleotydów. Programowanie epigenetyczne jest zależne od wpływów środowiskowych, składników diety oraz mikroflory jelitowej [Jaenisch i wsp., 2003, Lopomo i wsp., 2016]. Wykazano również, że momentem krytycznym dla kształtowania się epigenomu płodu jest embriogeneza, a otyłość matki przed i w czasie ciąży może mieć znaczący wpływ na wystąpienie zaburzeń metabolicznych u potomstwa w późniejszym wieku [Chmurzyńska, 2010, Nogues i wsp., 2019, Martin i wsp., 2019].

Otyłość nie jest prawdopodobnie związana z jednym, pojedynczym czynnikiem sprawczym, zawsze jest to efekt wielu złożonych interakcji. W tym zakresie ciekawe obserwacje dotyczą udziału w patogenezie otyłości zaburzeń mikroflory jelitowej [Bouter i wsp., 2017], zaburzeń rytmu dobowego [Pan i wsp., 2011], niedoboru witaminy D oraz wapnia [Lagunova i wsp., 2009], jak również udziału stresu powodującego nadmierną aktywność osi podwzgórze - przysadka - kora nadnerczy [Tomiyaama, 2019].

1.4. Przyrost masy ciała u ciężarnych

Przyjmuje się, że zapotrzebowanie energetyczne kobiety w ciąży zwiększa się w pierwszym trymestrze o około 200 kcal/dzień, natomiast w drugim i w trzecim trymestrze odpowiednio 300 i 400 kcal/dziennie, zalecenia te są jednak zmienne w zależności od wartości wskaźnika BMI ciężarnej [Thomas i wsp., 2012]. W 2012 roku Polskie Towarzystwo Ginekologów i Położników (PTGiP) zarekomendowało optymalne zapotrzebowanie energetyczne dla kobiety w ciąży na 2200-2500 kcal/dobę, przy czym dla kobiet otyłych nie więcej niż 2000 kcal/dobę, z zaleceniem aktywności fizycznej przy braku medycznych przeciwwskazań. Wytyczne te nie były dotąd aktualizowane.

Prawidłowy ciążowy przyrost masy ciała obliczany powinien być w odniesieniu do masy ciała sprzed ciąży, zalecany jest również regularny pomiar aktualnej masy ciała ciężarnej podczas każdej wizyty kontrolnej [ACOG, 2013].

Znanym i rekomendowanym przez WHO jest wskaźnik masy ciała BMI, określany również jako wskaźnik Queteleta II (obliczany według wzoru $BMI = \text{masa ciała [kg]} / \text{wzrost [m]}^2$). Wzór ten stosowany jest powszechnie do określenia wskaźnika masy ciała u osób dorosłych, natomiast u dzieci otrzymaną wartość BMI analizuje się w porównaniu z danymi zawartymi w siatce centylowej [Sikorska-Wiśniewska, 2007]. Przeprowadzone badania wykazały, że wraz z wiekiem kobiety wzrasta wartość jej wskaźnika BMI, co wiązać się może ze zwiększonym przyrostem masy ciała w ciąży u kobiet, które zostały matkami w późniejszym wieku [Bebelska i wsp., 2011]. Wytyczne dotyczące prawidłowego przyrostu masy ciała opracowane przez amerykański Instytut IOM w 2009 roku i PTGiP (2005) przedstawia tabela 2.

Tabela 2. Zalecany przyrost masy ciała w ciąży w odniesieniu do wskaźnika BMI przed ciążą wg IOM (2009) i PTGiP (2005).

<i>Masa ciała przed ciążą</i>		<i>IOM</i>		<i>PTGiP</i>
<i>Kategoria</i>	<i>BMI (kg/m²)</i>	<i>Przyrost masy ciała w ciąży (kg)</i>	<i>Przyrost masy ciała w kg/tydzień dla 2 i 3 trymestru ciąży średnia (min. – max.)</i>	<i>Przyrost masy ciała w ciąży (kg)</i>
Niedowaga	<18,5	12,5 - 18	0,51 (0,44 - 0,58)	12,5 – 18
Prawidłowa masa ciała	18,5 - 24,9	11,5 - 16	0,42 (0,35 - 0,50)	11,5 – 16
Nadwaga	25,0 - 29,9	7 - 11,5	0,28 (0,23 - 0,33)	7 - 11,5
Otyłość	≥ 30	5 - 9	0,22 (0,17 - 0,27)	7

Wytyczne sformułowane przez IOM określają zalecany przyrost masy ciała w zależności od wartości wskaźnika BMI i masy ciała kobiety przed poczęciem. Zakres referencyjny jest zróżnicowany, uzależniony od wskaźnika BMI przed ciążą i określony w czterech kategoriach: dla kobiet z niedowagą, prawidłową masą ciała, nadwagą oraz zalecany dla ciężarnych otyłych. Przedstawione rekomendacje dotyczą ciąż pojedynczych. Najmniejszy przyrost masy ciała zalecany jest ciężarnym otyłym, natomiast największy ciężarnym z niedowagą. Wytyczne zakładają, że we wszystkich grupach BMI przyrost masy ciała w pierwszym trymestrze ciąży oscyluje w granicach 0,5 do 2 kg. Rekomendacje IOM z 2009 roku nie uwzględniają wskazań dla poszczególnych grup etnicznych, kobiet niepełnoletnich, bardzo niskiego wzrostu lub chorobliwie otyłych. Brak jest jednoznacznych wytycznych również dla ciąż wielopłodowych.

Według wytycznych PTGiP całkowity przyrost masy ciała podczas całej ciąży kobiety otyłej nie powinien przekroczyć 7 kg, natomiast ciężarne posiadające wskaźnik BMI powyżej 40 kg/m² powinny zadbać o zredukowanie swojej masy ciała zmieniając dietę oraz wprowadzając mało intensywny, ale regularny wysiłek fizyczny.

1.5. Nieprawidłowy przyrost masy ciała w ciąży i jego konsekwencje metaboliczne dla matki i dziecka

1.5.1. Nadmierny przyrost masy ciała w ciąży

Nadwaga i otyłość kobiet w wieku rozrodczym stanowią istotny problem w dziedzinie perinatologii. Nadmierna masa ciała prowadzi do rozwoju przewlekłego stanu zapalnego tkanki tłuszczowej, który inicjuje rozwój dalszych powikłań metabolicznych [Tsatsanis i wsp., 2015]. Tryb życia i nawyki żywieniowe ciężarnej, a także jej masa ciała wpływają na szybkość przyrostu masy ciała w ciąży. Hutcheon i wsp. [2006] zaobserwowali, że przyrost masy ciała u kobiet z nadwagą i otyłością jest nieznaczny do około 15-20 tygodnia ciąży, a następnie zwiększa się w sposób liniowy do porodu. Dwie niezależne grupy badaczy wykazały w swoich analizach, że nadmierny przyrost masy ciała ciężarnych w pierwszym trymestrze bardziej wpływał na zwiększoną masę ciała i ilość tkanki tłuszczowej noworodków niż stały i równomierny przyrost masy ciała podczas całej ciąży. Wyniki ich badań sugerują również, że im wyższy wskaźnik BMI na początku ciąży, tym większy problem z powrotem do prawidłowej masy ciała po porodzie, co zwiększa ryzyko otyłości i związanych z nią powikłań w wieku późniejszym [Davenport i wsp., 2013, Josefson i wsp., 2016].

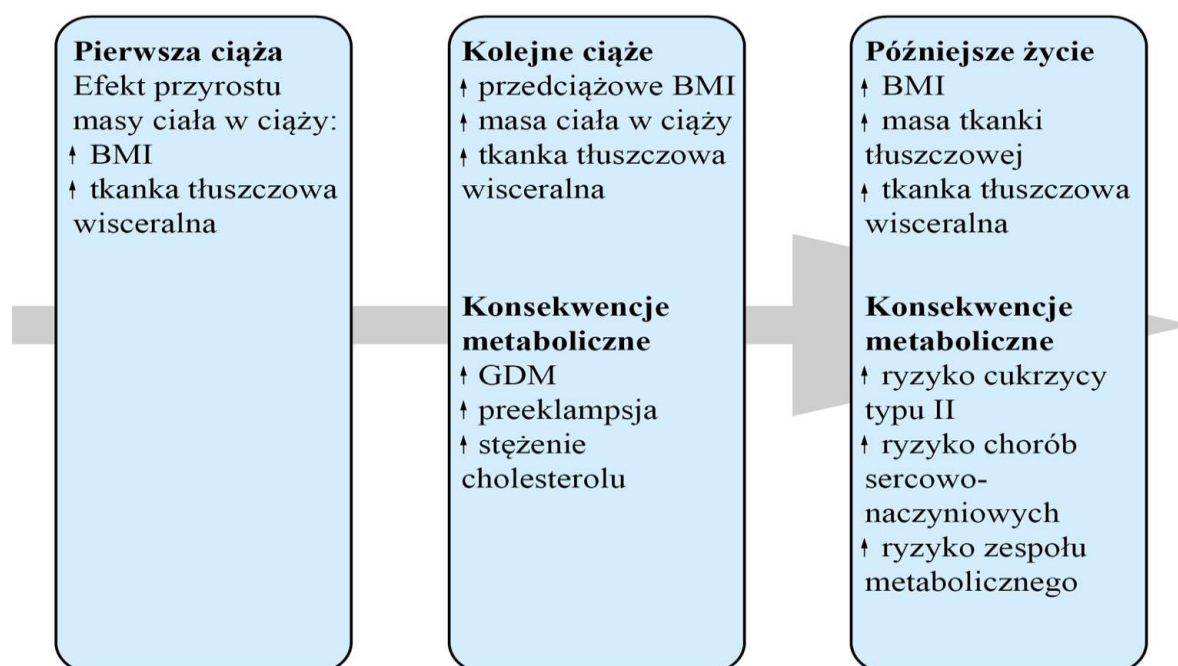
U kobiet otyłych obserwuje się zaburzone stężenie hormonów płciowych w poszczególnych fazach cyklu miesięczkowego, co utrudnia zapłodnienie oraz rozwój zarodka poprzez dysregulację występowania miesiączki i owulacji. Zmianom ulega wydzielanie hormonu folikulotropowego (FSH - *follicle-stimulating hormone*), hormonu luteinizującego (LH - *luteinizing hormone*), progesteronu oraz glikoproteiny wiążącej hormony płciowe (SHBG - *sex hormone binding globulin*). Pojawiająca się w otyłości hiperinsulinemia oraz insulinooporność prowadzą do hiperandrogenemii. Zachwiana zostaje również neuroregulacja osi podwzgórze-przysadka-jajnik [Talmor i wsp., 2015]. Oprócz zmniejszonej szansy na zapłodnienie, u kobiet otyłych obserwuje się również zwiększoną częstość poronień, zarówno w pierwszym, jak i w drugim trymestrze ciąży [Sugiura-Ogasawara, 2015, Silvestris i wsp., 2018].

Nadmierny przyrost masy ciała wywołuje zaburzenia metaboliczne w organizmie ciężarnej, jak wzrost stężenia triglicerydów (TG - *triglycerides*), cholesterolu i glukozy we krwi. Zmianie ulegają również stężenia aminokwasów w organizmie matki, ze względu na zwiększoną syntezę białek potrzebnych do rozwoju płodu i wzrostu łożyska, powodując w efekcie lipolizę [Wankhade i wsp., 2016]. Na skutek zmniejszonej wrażliwości tkanek obwodowych na insulinę pojawia się hiperinsulinemia

podwyższająca ryzyko wystąpienia cukrzycy ciążowej ciężarnych (GDM - *gestational diabetes mellitus*). Związane z otyłością zaburzenia metaboliczne powodują również uszkodzenia śródbłonna naczyniowego, co wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nadciśnienia tętniczego, powikłań zatorowo-zakrzepowych, stanu przedrzucawkowego (PE - *preeclampsia*) oraz rzucawki (E -- *eclampsia*) [Gilmore i wsp., 2015, Sharami i wsp., 2019]. Interesujących wniosków dostarczają wyniki analiz prowadzonych przez 25 lat w Australii przez Cheney i wsp. [2018]. Dane te dotyczą ponad 42 tysięcy porodów i potwierdzają wpływ otyłości u ciężarnych na możliwość wystąpienia GDM (17%), PE (23,8%) oraz makrosomii płodu (23,4%) [Cheney i wsp., 2018]. Cukrzyca ciążowa i stan przedrzucawkowy mogą również nasilać ryzyko wystąpienia w późniejszym okresie życia takich chorób jak cukrzyca typu II oraz nadciśnienie tętnicze u matki, jak również ryzyko otyłości i chorób metabolicznych u dziecka. Dodatkowo ze względu na dużą masę tkanki tłuszczowej utrudnione jest wykonanie badań diagnostycznych takich jak badanie ultrasonograficzne, amniopunkcja diagnostyczna lub genetyczna czy badania kardiokograficzne. Otyłość sprzyja również nieprawidłowościom podczas interpretacji wykonanych badań. Narastająca liczba ciężarnych z otyłością może spowodować konieczność wprowadzenia rozszerzonych badań diagnostycznych, takich jak rezonans magnetyczny płodu [Weichert i wsp, 2011]. Udowodniono także negatywny wpływ otyłości ciężarnej i nadmiernego ciążowego przyrostu masy ciała na skład mikroflory jelitowej niemowląt (zwiększenie ilości bakterii prozapalnych typu *Staphylococcus* i *Clostridium*, kosztem korzystnych dla organizmu bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*) [Collado i wsp., 2010].

Nadmierny przyrost masy ciała ciężarnych poprzez wpływ na kurczliwość macicy może skracać długość trwania ciąży a także prowadzić do obumarcia płodu [Fleischman i wsp., 2010]. Wraz ze wzrostem wskaźnika BMI podczas ciąży zmniejsza się prawdopodobieństwo porodu siłami natury, natomiast zwiększa ryzyko ukończenia ciąży cesarskim cięciem lub porodem zabiegowym [Denison i wsp., 2008]. Otyłość matki wpływa również na wzrost ryzyka wystąpienia wad wrodzonych u płodu (zwłaszcza wad serca i cewy nerwowej), urazów okołoporodowych, w tym dystocji barkowej oraz niskiej punktacji w skali Apgar [Gunatilake i wsp., 2011, Gilmore i wsp., 2015]. Wydłużeniu ulega również okres hospitalizowania położnic z otyłością ze względu na wyższy odsetek powikłań znieczulenia, krwawień i zakażeń okołoporodowych [Khan i wsp., 2017]. Zwiększenie masy ciała wiąże się także z krótszym czasem karmienia piersią [Williams i wsp., 2014, Bider-Canfield i wsp., 2017]. Rycina 2 przedstawia krótko-

i długoterminowe konsekwencje metaboliczne nadmiernego przyrostu masy ciała w ciąży dla matki.



Rycina 2. Krótko- i długoterminowe konsekwencje metaboliczne nadmiernego przyrostu masy ciała w ciąży [wg Gilmore i wsp., 2015].

1.5.2. Zbyt mały przyrost masy ciała w ciąży

Interesujących wyników dostarczyły rozpoczęte w latach 80-tych XX wieku badania profesora Davida Barkera i jego współpracowników. Badania populacyjne przeprowadzone na terenie Walii i Anglii wykazały korelację pomiędzy występowaniem hipotrofii u noworodków a rozwojem chorób sercowo-naczyniowych wśród tej populacji w wieku dorosłym. Badacze założyli, że mała masa urodzeniowa niemowląt, wywołana zaburzeniami rozwoju wewnątrzmacicznego była przyczyną epidemii chorób sercowo-naczyniowych, cukrzycy typu II, insulinooporności oraz otyłości w tej populacji w wieku dorosłym [Barker i wsp., 1986, Barker i wsp., 1993]. Hipoteza ta została potwierdzona przez wiele badań i jako teoria programowania płodowego zapoczątkowała analizy dużych populacji ludzkich na całym świecie. Hipoteza programowania wewnątrzmacicznego sugeruje, że zmiany, które następują w rozwoju wewnątrzmacicznym płodu wpływają na budowę i funkcjonowanie poszczególnych narządów w późniejszym okresie życia. Są one wyrazem adaptacji płodu do niekorzystnych warunków środowiska wewnątrzmacicznego: hipoksji, niedoboru

składników odżywczych i mogą powodować patologiczne dysfunkcje tkanek i narządów w późniejszym wieku. Jednym z badań potwierdzających tę hipotezę jest badanie populacji osób dorosłych urodzonych w okresie głodu w Nigerii (lata 1968-1970), które wykazało u nich występowanie zaburzeń tolerancji glukozy, nadciśnienia tętniczego i otyłości [Hult i wsp., 2010]. Inne badanie, dotyczące Wielkiego Głodu Chińskiego w prowincji Chongqing w latach 1959-1961 potwierdziło nadwagę i otyłość u dorosłych kobiet urodzonych w tym okresie [Wang i wsp., 2010].

Wiele teorii próbuje wyjaśnić związek chorób występujących w wieku dorosłym z programowaniem wewnątrzmacicznym. Jedną z nich jest zaproponowana przez Halesa i Barkera hipoteza oszczędnego fenotypu (*thrifty phenotype*), dotycząca etiologii cukrzycy typu II i zespołu metabolicznego. Zakłada ona, że niedobory żywieniowe podczas ciąży powodujące niedostateczne wzrastanie płodu wpływają na nierównomierny rozdział składników odżywczych pomiędzy poszczególne organy i tkanki, powodując uruchomienie mechanizmów adaptacyjnych. Mózg płodu rozwija się kosztem innych narządów, a poprzez zmniejszony wychwyt glukozy w innych tkankach i organach zmniejsza się proliferacja komórek oraz wielkość tych narządów. W ten sposób dochodzi do hipoplazji komórek β trzustki, co powoduje zaburzenia tolerancji glukozy, natomiast zmniejszenie liczby nefronów i kardiomiocytów prowadzi do wystąpienia nadciśnienia tętniczego [Hales i wsp., 2001].

Hipoteza ratowania płodu (*fetal salvage*) zakłada, że ograniczenie podaży składników odżywczych u płodu wywołuje obwodową oporność na insulinę (nie związaną z uszkodzeniem komórek β trzustki), powodującą dostarczenie odpowiedniej ilości glukozy przede wszystkim do mózgu. Dopiero w dalszej kolejności, w zmniejszonej ilości, glukoza jest przekazywana również do innych narządów, jak mięśnie szkieletowe i płuca [Hofman i wsp., 1997]. Poparciem tej teorii są wyniki badań przeprowadzone na szczurach [Simmons i wsp., 1992, Simmons i wsp., 1993].

Zgodnie z hipotezą „dogonić wzrost” (*catch-up growth*), mała masa urodzeniowa może powodować uruchomienie mechanizmów kompensacyjnych w ciągu pierwszych lat życia. Noworodki pochodzące z ciąży z ograniczeniem wewnątrzmacicznego wzrastania (IUGR - *intrauterine growth restriction*) szybko kompensują niedobór tkanki tłuszczowej wykazując zbyt duży przyrost masy ciała. Dzieci te w znacznym stopniu narażone są na wystąpienie otyłości, cukrzycy typu II, oporności na insulinę oraz chorób sercowo-naczyniowych [Ong i wsp., 2000].

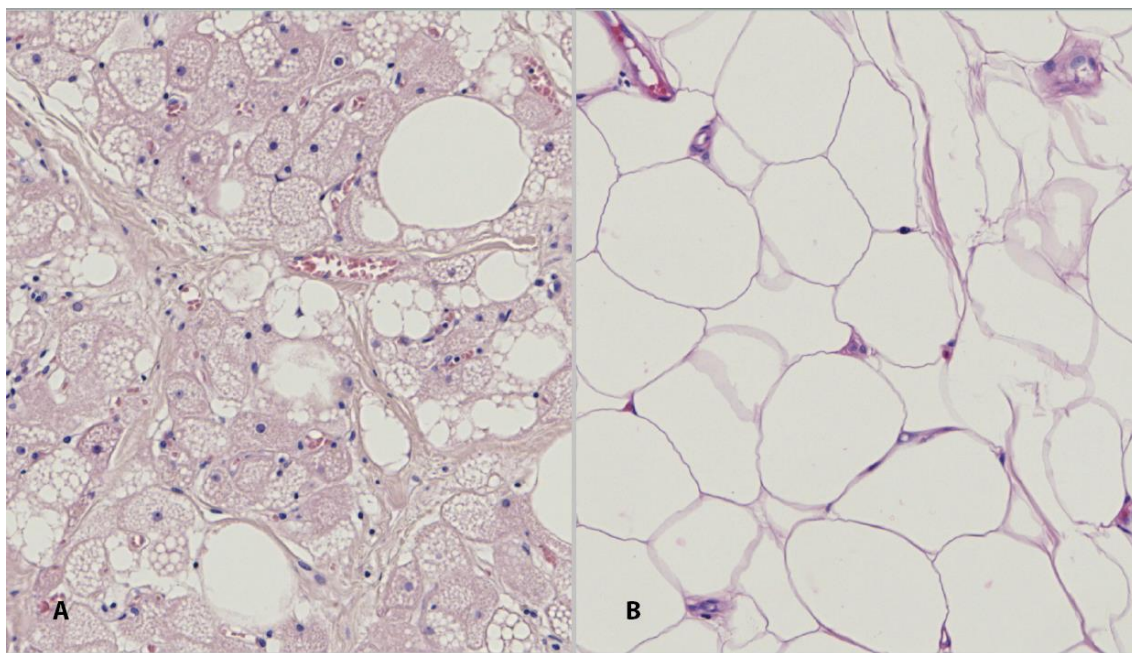
Zbyt mały przyrost masy ciała w ciąży, związany z niedoborem witamin i minerałów może powodować zaburzenia metaboliczne, niedokrwistość, awitaminozę i problemy z laktacją u ciężarnej. Wpływa negatywnie na rozwój łożyska i płodu, zwiększając ryzyko małej masy urodzeniowej, przedwczesnego porodu, zgonu okołoporodowego a także wystąpienia wad rozwojowych [Brown i wsp., 2012, Goldstein i wsp., 2017]. Niedożywienie ciężarnej powoduje nieodwracalne zmiany w mózgu płodu, w tym epigenetyczne modyfikacje ekspresji genów w podwzgórzu oraz zmianę liczby neuronów w obszarach hipokampa odpowiedzialnych za zaburzenia wielu funkcji, w tym behawioralnych i poznawczych [Krakowiak i wsp., 2012]. Przyczynia się również do uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego i wystąpienia takich chorób jak autyzm i choroba Aspergera [Surén i wsp., 2013]. Badania wykazały również, że niedostateczny przyrost masy ciała w ciąży może zwiększać u dziecka ryzyko miażdżycy [Szostak-Wegierek i wsp., 2011], obturacyjnej choroby płuc [Lopuhaä i wsp., 2000] a niedobór białka w żywieniu ciężarnej zwiększa również podatność na wystąpienie astmy oskrzelowej [Pike i wsp., 2014].

1.6. Tkanka tłuszczowa, adipokiny i adipogeneza

Histologicznie wyróżnia się dwa typy tkanki tłuszczowej: tkanka tłuszczowa biała (WAT - *white adipose tissue*) i brązową (BAT - *brown adipose tissue*), przedstawione na rycinie 3. Funkcją białej tkanki tłuszczowej jest przechowywanie tłuszczu jako zapasu energii w postaci triglicerydów, natomiast brunatna tkanka tłuszczowa wykorzystuje lipidy do wytwarzania ciepła. Obydwie tkanki niezbędne są do utrzymania homeostazy energetycznej organizmu [Pellegrinelli i wsp., 2016]. Rozmieszczenie tkanki tłuszczowej w organizmie może służyć jako jeden z ważniejszych wykładników zaburzeń metabolicznych i kardiologicznych, mających powiązanie ze wskaźnikiem BMI [Wajchenberg, 2000]. Tkankę tłuszczową budują przede wszystkim preadipocyty i adipocyty, ale istotną rolę odgrywają również komórki układu immunologicznego, pericyty oraz komórki nabłonkowe [Desruisseaux i wsp., 2007]. Początkowo sądzono, że istnieją tylko dwa rodzaje adipocytów: białe (*white*) i brązowe (*brown*), budujące odpowiednio WAT i BAT. Obecnie wiadomo, że istnieją również adipocyty różowe (*pink*) i beżowe (*beige*). Wszystkie te typy adipocytów pełnią również funkcje endokrynne wydzielając adipokiny [Zhang i wsp., 1994, Villarroya i wsp., 2013].

Brunatna tkanka tłuszczowa jest obficie unaczyniona i unerwiona, co polepsza cyrkulację ciepła w organizmie oraz zwiększa szybkość reagowania na zmiany

temperatury [Kozak i wsp., 2008]. Komórka BAT jest niewielka (25-40 μm), magazynuje w cytoplazmie tłuszcz w postaci dużych, licznych kropli, posiada centralnie umiejscowione jądro komórkowe oraz licznie występujące mitochondria z dużą ilością cytochromów nadających tkance jej charakterystyczny kolor. Ilość tkanki BAT w organizmie zależna jest od płci, wieku, pory roku, a nawet od intensywności wykonywanego wysiłku fizycznego. Największa jej ilość występuje u noworodków, co jest związane z niepełnym wykształceniem mechanizmów termogenezy, później stopniowo zanika z wiekiem, pewna jej ilość występuje również u dorosłych. Brunatna tkanka tłuszczowa wyróżnia się ekspresją w błonie mitochondrium białka rozprzegającego (UCP-1 - *uncoupling protein-1*) zwanego termogeniną, które jest markerem brunatnej tkanki tłuszczowej. Energia wytwarzana w komórkach BAT pochodzi z procesów spalania długłańcuchowych kwasów tłuszczowych a uwalniane protony zostają przenoszone przez UCP-1 wewnątrz mitochondriów, pomijając szlak fosforylacji oksydacyjnej i syntezy ATP. Efektem tego procesu jest uwolnienie wytworzonej energii w postaci ciepła, które rozbudowana sieć naczyń krwionośnych i włosowatych efektywnie rozprowadza do wszystkich tkanek [Wójcik, 2011]. Utleniając składniki odżywcze BAT zapobiega otyłości a zmniejszając ilość TG we krwi redukuje ryzyko miażdżycy [Berbée i wsp., 2015].



Rycina 3. Adipocyty tkanki tłuszczowej. Porównanie adipocytów brunatnej (A) oraz białej (B) tkanki tłuszczowej. Barwienie H+E (hematoksylina + eozyna).

Biała tkanka tłuszczowa przechowuje lipidy w postaci wolnych kwasów tłuszczowych i uwalnia je w okresach głodu. Oprócz funkcji magazynu energii WAT pełni również funkcje endokrynne, syntetyzując w adipocytach substancje biologiczne czynne o charakterze białek tzw. adipokiny. Adipokiny są niezbędne dla utrzymania prawidłowej homeostazy organizmu a ich działanie nie ogranicza się do autokrynnego i parakrynnego działania w obrębie tkanki tłuszczowej [Zhang i wsp., 1994]. Poprzez działanie hemokrynnie i endokrynnie wywierają one działanie także na odległe narządy i tkanki, uczestnicząc w wielu procesach zachodzących w organizmie na poziomach komórkowym i ośrodkowym [Trim i wsp., 2018]. Adipokiny wykazują szerokie spektrum oddziaływania, wpływając na procesy regulacji łaknienia, utrzymywanie równowagi energetycznej organizmu, metabolizm węglowodanów i lipidów, biorą udział w regulacji procesów homeostazy naczyniowej oraz procesów immunologicznych, w tym reakcji zapalnych. Zaburzona synteza adipokin przez tkankę tłuszczową w znacznym stopniu wpływa na zaburzenia metaboliczne w organizmie (zaburzona gospodarka węglowodanowa, hiperurykemia oraz dyslipoproteinemia), a także zmienia odpowiedź immunologiczną. Wydzielanie adipokin zależy nie tylko od umiejscowienia tkanki tłuszczowej, ale i od jej składu komórkowego [Jung, 2014]. Dotychczas opisano kilkadziesiąt substancji białkowych o charakterze adipokin, są wśród nich białka o charakterze cytokin, jak enzymy oraz hormony peptydowe (tab. 3).

Tabela 3. Białka syntetyzowane przez adipocyty (wg Skowrońskiej-Jóźwiak, 2009, zmodyfikowano).

<i>Rola w poszczególnych układach</i>	<i>Nazwa białka</i>
Cytokiny i białka związane z cytokinami	Leptyna TNF α , IL-6, IL-8
Białka związane z układem krzepnięcia	Inhibitor plazminogenu PAI-1 Czynnik tkankowy TF
Składowe dopełniacza i białka z nim związane	Adipsyna Adiponektyna
Białka i lipidy związane z metabolizmem lipidów	Lipaza lipoproteinowa Białko transportujące estry cholesterolu Apolipoproteina E
Enzymy związane z metabolizmem hormonów steroidowych	Aromataza zależna od cytochromu P450 Dehydrogenaza17betahydroksysteroidowa Dehydrogenaza11betahydroksysteroidowa typu 1
Białka układu renina-angiotensyna	Angiotensynogen
Pozostałe przykładowe adipokiny prozapalne i antyzapalne	Rezystyna, dipeptydylopeptydaza IV, apelina, chemeryna, waspina, wisfatyna, omentyna

Metabolizm tkanki tłuszczowej regulowany jest przez białka, hormony i autonomiczny układ nerwowy a wszelkie zaburzenia w funkcjonowaniu tego mechanizmu mogą prowadzić do otyłości. Kiedy w organizmie przedłuża się stan dodatniego bilansu energetycznego następuje reorganizacja budowy tkanki tłuszczowej. Duża ilość triglicerydów przekracza możliwości magazynujące adipocytów, co prowadzi do ich przerostu (hipertrofii). Hipertroficzne komórki tłuszczowe posiadają ekstremalną ilość lipidów i są odporne na insulinę, a w przypadku dalszego dostarczania TG następuje proces hiperplazji czyli rozrostu tkanki tłuszczowej poprzez tworzenie nowych, wrażliwszych na insulinę adipocytów. Ten mechanizm kompensacyjny jest efektywny do momentu, kiedy pozyskanie nowych adipocytów nie jest możliwe, a magazynowany tłuszcz zostaje odkładany w narządach odpowiedzialnych za metabolizm glukozy (wątrobie i mięśniach). Zjawisko to nazywane jest lipotoksycznością i indukuje szereg reakcji prowadzących do wystąpienia zaburzeń metabolicznych związanych z otyłością, m.in. stanu przewlekłego zapalenia o niskim stopniu nasilenia, insulinooporności i licznych powikłań, np. w postaci cukrzycy typu II i nefropatii cukrzycowej. Rozwijającym się zaburzeniom towarzyszy wzmożone wydzielanie adipocytokin prozapalnych, dodatkowo nasilające proces lipotoksyczności [Pellegrinelli i wsp., 2016, Reilly i wsp., 2017]. Na intensywność odpowiedzi prozapalnej w dużym stopniu wpływa dystrybucja tkanki tłuszczowej. Tkanka tłuszczowa podskórna jest bardziej wrażliwa na antylipolityczne działanie insuliny, przez co uwalnia mniejsze ilości wolnych kwasów tłuszczowych niż tkanka tłuszczowa trzewna, która wydzielając większą ilość adipocytokin zwiększa insulinooporność [Bray, 2004]. Na rozwój stanu zapalnego w otyłości wpływ mają również:

- hipoksja powiększonych adipocytów na skutek zwiększonej odległości od naczyń krwionośnych, brak możliwości różnicowania preadipocytów w adipocyty, obumieranie adipocytów w wyniku apoptozy i nekrozy, wywołujące wzmożenie odpowiedzi zapalnej i aktywację makrofagów [Boden, 2011]
- stres oksydacyjny będący skutkiem zwiększonego stężenia wolnych kwasów tłuszczowych i glukozy powodujący wzmożony napływ makrofagów do tkanki tłuszczowej oraz wytwarzanie reaktywnych form tlenu [Lin i wsp., 2005]
- stres siateczki endoplazmatycznej wynikający z nieprawidłowej modyfikacji potranslacyjnej białek [Cnop i wsp., 2012]
- osłabienie aktywności ekspresji receptorów PPAR γ [Tontonoz i wsp., 2008]
- aktywacja inflamasomów, uczestniczących w aktywacji cytokin prozapalnych [Ahmed i wsp., 2010]
- aktywacja receptorów TLR [Könnner i wsp., 2011]
- zaburzenie równowagi pomiędzy populacją limfocytów T pomocniczych CD4 $^{+}$ a populacją limfocytów T cytotoksycznych CD8 $^{+}$ [Feuerer i wsp., 2009]

- aktywacja prozapalnych makrofagów, limfocytów T oraz wytwarzanie przeciwciał IgG przez limfocyty B [Winer i wsp., 2011]
- zaburzenia flory bakteryjnej jelit [Lopomo i wsp., 2016]

Nadmierna masa tkanki tłuszczowej oraz nadekspresja prozapalnych adipokin nie jest jednak wystarczającym czynnikiem prowadzącym do rozwoju otyłości i insulinooporności. W tym skomplikowanym procesie istotną rolę odgrywają czynniki genetyczne regulujące adipogenezę i ekspresję genów związanych z metabolizmem glukozy, kwasów tłuszczowych oraz rozwojem stanu zapalnego, nazywane receptorami aktywowanymi przez proliferatory peroksysomów (PPAR γ - *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) [Vitale i wsp., 2016].

1.6.1. Adipogeneza i kontrola adipogenezy przez PPAR γ

Adipogeneza czyli proces kształtowania się i dojrzewania adipocytów jest procesem wieloetapowym, angażującym w swój przebieg wiele mediatorów oraz ścieżek sygnałowych. Poprzez wzajemne interakcje sprawują kontrolę nad ekspresją genów związanych z metabolizmem węglowodanów, lipidów oraz wydzielaniem adipokin z adipocytów. Koordynatorem przebiegu adipogenezy jest receptor PPAR γ , którego ekspresja wzrasta wraz z różnicowaniem się adipocytu. Rola PPAR γ nie jest ograniczona tylko do ich regulacji różnicowania, ale polega również na regulacji metabolizmu dojrziałych adipocytów i ich insulinooporności [Lehrke i wsp., 2005].

Adipogeneza ma swój początek w życiu płodowym. Podstawowe elementy strukturalne tkanki tłuszczowej, czyli adipocyty tworzą się już u 14-tygodniowego płodu, a w końcowym okresie ciąży ich liczba wynosi około 30 milionów. Kolejnym etapem fizjologicznego przyrostu tkanki tłuszczowej jest okres dojrzewania, w którym następuje zwiększenie liczby adipocytów [Siemińska, 2007, Giordano i wsp., 2014]. Dlatego zwłaszcza w tym okresie istotna jest prawidłowa, dobrze zbilansowana dieta, żeby nie powodować wzrostu liczby komórek tłuszczowych [Oddy, 2012].

Proces adipogenezy składa się z etapu selekcji komórek, które różnicować się będą w kierunku adipocytów oraz etapu dojrzewania, od preadipocytu do stadium dojrzałego adipocytu, z określonym immunofenotypem oraz zdolnością do metabolizmu lipidów, wrażliwością na insulinę i możliwością wydzielania adipokin. Podczas różnicowania adipocytów aktywne są izoformy PPAR γ , zarówno PPAR γ 1, jak i PPAR γ 2, ale to izoforma PPAR γ 2 jest indukowana silniej i ma decydujące znaczenie podczas przebiegu adipogenezy [Ren i wsp., 2002]. Zaburzenia adipogenezy i lipogenezy mają

często podłoże genetyczne. Nawet pojedyncze zmiany wariantów polimorficznych w genie *PPARG* mogą wiązać się z zaburzeniem różnicowania adipocytów. Stan aktywacji PPAR γ prowadzi do apoptozy olbrzymich komórek tłuszczowych, a najmniejsze upośledzenie funkcji receptora PPAR γ może zaburzyć adipogenezę na każdym jej etapie, powodując nieprawidłową proliferację i różnicowanie adipocytów oraz zaburzenia magazynowania lipidów w adipocytach. Receptor PPAR γ jest czynnikiem transkrypcyjnym, który może ulegać represji poprzez działanie cytokin prozapalnych [Hube i wsp., 1999].

1.6.2. Rola rezystyny w rozwoju otyłości

Rezystyna (108 aminokwasów, masa 12,5 kDa) jest adipokina należącą do rodziny białek bogatych w cysteinę, nazywanych cząsteczkami podobnymi do rezystyny (RELMs - *resistin-like molecules*) [Steppan i wsp., 2001]. Gen *RSTN* kodujący rezystynę znajduje się na chromosomie 19p13.2, obejmuje 1369 par zasad i składa się z czterech eksonów i trzech intronów [Wang i wsp., 2002]. Mechanizm aktywności biologicznej tej adipokiny nie jest do końca poznany i wymaga dalszych badań, jednak uważa się, że receptorem dla rezystyny może być TLR4 [Benomar i wsp., 2013].

U ludzi największą ekspresję krążącej rezystyny obserwuje się w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej oraz makrofagach i szpiku kostnym, w mniejszym stopniu natomiast w podwzgórzu, przysadce mózgowej, łożysku i macicy [Patel i wsp., 2003, Codoñer-Franch i wsp., 2015]. W warunkach fizjologicznych u osób dorosłych stężenie rezystyny oscyluje w granicach 7-12 ng/ml, ale może ono zostać obniżone w wyniku stosowania diety niskokalorycznej oraz w wyniku aktywności fizycznej [Aruna i wsp., 2008, Marcelino-Rodríguez i wsp., 2017]. Co ciekawe, przypuszcza się, że stężenie tego białka może służyć jako marker określający proces starzenia się organizmu, co związane jest z jego rolą mediatora w reakcjach zapalnych, dysfunkcji mitochondriów, apoptozie, proliferacji komórek i aktywności tkanki tłuszczowej [Cardoso i wsp., 2018].

Pleiotropowe działanie rezystyny wiąże się poprzez mechanizmy hormonalne, autokrynne i parakrynne z rozwojem stanu zapalnego i chorób o podłożu zapalnym, takich jak cukrzyca [Steppan i wsp., 2001], miażdżycy [Reilly i wsp., 2005], reumatoidalne zapalenie stawów [Migita i wsp., 2006] oraz otyłość [Owecki i wsp., 2011]. Wysoka ekspresja tej adipokiny w chorobach zapalnych koreluje z jej udziałem w syntezie i wydzielaniu cytokin prozapalnych, głównie IL-1, IL-6, IL-12, CRP oraz

TNF α . Rezystyna uczestniczy także w różnicowaniu monocytów w makrofagi, aktywowaniu układu dopełniacza, angiogenezie [Jamaluddin i wsp., 2013, Filková i wsp., 2009], stresie oksydacyjnym oraz metabolizmie lipidów i węglowodanów [Chen i wsp., 2010]. Jej ekspresja wzrasta również podczas infekcji wirusowych lub bakteryjnych, gdzie aktywatorem tego białka jest lipopolisacharyd (LPS – *lipopolysaccharide*) [Liu i wsp., 2016].

Rezystyna wykazuje bezpośredni wpływ na tkankę tłuszczową, ponieważ wydzielana jest podczas proliferacji oraz różnicowania adipocytów pod kontrolą receptora PPAR γ [Gong i wsp., 2004], a poprzez aktywację ścieżki sygnalizacyjnej ERK1/ERK2 wpływa również stymulująco na proliferację preadipocytów [Ort i wsp., 2005]. Aktywatorami ekspresji tego białka są cytokiny prozapalne i somatotropina [Kaser i wsp., 2003], natomiast inhibitorem jest receptor PPAR γ [Patel i wsp., 2003, Zhou i wsp., 2013]. Stężenie krążącej rezystyny zwiększa się wraz z przyrostem tkanki tłuszczowej indukując upośledzenie tolerancji glukozy oraz insulinooporność [Junkin i wsp., 2009].

1.6.3. Rola dipeptydylopeptydazy IV w rozwoju otyłości

Dipeptydylopeptydaza IV (DPP IV - *dipeptidyl peptidase IV*) (766 aminokwasów, masa 110 kDa) jest aminopeptydazą, adipokina z grupy proteaz serynowych, należąca do rodziny oligopeptydaz proлилowych [Hopsu-Havu i wsp., 1966]. Powstaje jako produkt ekspresji genu *DPP IV*, znajdującego się na dłuższym ramieniu chromosomu 2 w pozycji 2q24.3 [Abbott i wsp., 1994].

U ludzi enzym ten występuje w postaci homodimeru związanego z błoną komórkową przy pomocy peptydu sygnałowego (najczęściej w komórkach nabłonkowych przewodu pokarmowego, płuc, nerek i wątroby, fibroblastach) lub dimeru krążącego we krwi. Jako białko błonowe DPP IV ulega interakcjom z innymi białkami błonowymi oraz przekazuje sygnał poprzez błonę komórkową. Aktywna enzymatycznie DPP IV, pozbawiona regionów transbłonowych i wewnątrzkomórkowego ogona, uwalniana jest z błony komórkowej i funkcjonuje w postaci rozpuszczalnej w płynach ustrojowych. Adipokina ta ulega ekspresji na powierzchni limfocytów B, komórek NK (*natural killer*) aktywowanych limfocytów T, oraz na makrofagach i komórkach dendrytycznych [Gorrell i wsp., 2001, Klemann i wsp., 2016]. Badania Lamersa i wsp. [2011] wykazały, że miejscem syntezy i wydzielania DPP IV do krwi są także adipocyty tkanki tłuszczowej, a sekrecja tej adipokiny aktywuje adipogenezę, zwiększa ekspresję

receptora PPAR γ oraz zmniejsza wrażliwość na insulinę w adipocytach i mięśniach szkieletowych. [Lamers i wsp., 2011].

Stężenie DPP IV w surowicy jest dodatnio skorelowane z wartością wskaźnika BMI, ilością tkanki tłuszczowej podskórnej i trzewnej, wielkością adipocytów oraz stężeniem wielu adipocytokin, w tym leptyny [Yang, 2016]. Interesującym jest fakt, że aktywność DPP IV w surowicy krwi skorelowana jest dodatnio również z ilością leukocytów krwi obwodowej [Nargis i wsp., 2017]. Największym źródłem DPP IV we krwi są limfocyty T, a białko to jako kostymulator bierze udział w ich aktywacji oraz nasileniu zapalenia [Gorrell i wsp., 2001]. Mechanizmy molekularne dotyczące roli tej adipokiny w rozwoju otyłości nie są jednak do końca poznane i wymagają dalszych analiz.

Biologiczna aktywność DPP IV wykazuje znaczną plejotropowość i związana jest przede wszystkim z kontrolą funkcjonowania układu immunologicznego poprzez aktywność enzymatyczną proteazy oraz wiązanie deaminazy adenozy. Adipokina ta aktywnie oddziałuje także z macierzą zewnątrzkomórkową (wiązanie kolagenu i fibronektyny) oraz steruje transdukcją sygnału wewnątrz komórki, migracją i proliferacją komórek. Jest również receptorem pośredniczącym we wnikaniu wirusa do komórki [Vankadari i wsp., 2020] oraz uczestniczy w metabolizmie lipidów [Zhong i wsp., 2013].

Naturalnymi substratami dla DPP IV są liczne białka i peptydy mające aktywność hormonów, neuromodulatorów i chemokin, np. peptyd YY, jelitowe hormony inkretynowe (GLP-1, GLP-2, GIP), prokalcytonina, glukagon. Jedną z funkcji DPP IV jest kontrola uczucia sytości powodowana rozszczepianiem neuropeptydu Y (syntetyzowanego przez podwzgórze) oraz modulacja stężenia glukozy we krwi poprzez inaktywację hormonów inkretynowych GLP-1 i GIP. Hormony te uwalniają komórki jelita jako reakcję na spożycie pokarmu, powodując zwiększoną aktywność wydzielania insuliny i obniżenie stężenia glukozy we krwi. DPP IV posiada zdolność inaktywacji inkretyn przez ich hydrolizę zaledwie po około 2 minutach od czasu ich syntezy. GLP-1 posiada zdolność przenikania bariery krew-mózg a stymulując odpowiednie receptory, hamuje apetyt oraz wzmacnia uczucie sytości, wpływając na perystaltykę jelit i sekrecję soku żołądkowego [Moran, 2009, De Silva i wsp., 2012]. Wiele syntetycznych inhibitorów DPP IV, tzw. gliptyn jest już z powodzeniem stosowanych w farmakoterapii [Jackiewicz i wsp., 2018].

Trwają badania dotyczące odnalezienia funkcjonalnego receptora dla DPP IV, przyjmuje się, że może nim być PAR2 - receptor aktywowany proteazą 2 [Wronkowitz i wsp., 2014].

1.7. Funkcja receptora PPAR γ

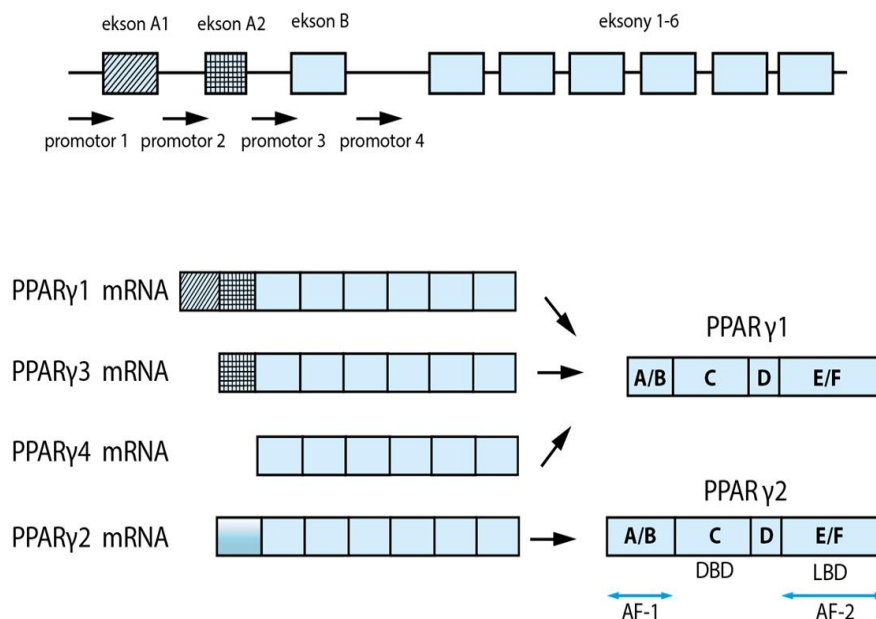
Gen receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (*PPARG* - *peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene*), należy do rodziny receptorów jądrowych hormonów aktywowanych ligandem, nadrodziny receptorów steroidowych i umiejscowiony jest na krótszym ramieniu chromosomu 3, w pozycji 3p25 [Greene i wsp., 1995]. Składa się z dziewięciu eksonów długości ponad 100 kb, a informacja o strukturze białka zawarta jest w sześciu z nich. Na skutek możliwości transkrypcji z różnych miejsc promotorowych powstają cztery różne izoformy mRNA PPAR γ (ryc. 4), mające identyczne eksony 1-6 i różniące się od siebie eksonami A1, A2 oraz B [Fajas i wsp., 1997].

W wyniku translacji, na skutek alternatywnego cięcia i składania pierwotnego transkryptu powstają tylko dwie izoformy białkowe receptorów PPAR γ , nazwane PPAR γ 1 oraz PPAR γ 2. Receptor PPAR γ 1 (powstały z cząsteczek mRNA PPAR γ 1, PPAR γ 3 i PPAR γ 4) składa się z 477 reszt aminokwasowych i ulega niewielkiej ekspresji prawie we wszystkich tkankach, głównie w tkance tłuszczowej, jelitach, makrofagach, wątrobie, mięśniach, komórkach β trzustki oraz łożysku. Receptor PPAR γ 2 (powstały z cząsteczki mRNA PPAR γ 2), jest dłuższy na N-końcu o 28-30 reszt aminokwasowych i swoisty głównie dla tkanki tłuszczowej [Fajas i wsp., 1997, Marion-Letellier i wsp., 2016]. W warunkach ekstremalnych, takich jak niedożywienie lub otyłość, PPAR γ 2 syntetyzowany jest w wątrobie i mięśniach szkieletowych. Równolegle do syntezy PPAR γ 2 następuje ektopowa akumulacja lipidów w tkankach i narządach, przy czym obydwie izoformy przyczyniają się do wychwytu glukozy i lipidów oraz warunkują ich bezpieczne odkładanie w tkance tłuszczowej, mięśniach i wątrobie [Medina-Gomez i wsp., 2005]. Modyfikacje potranslacyjne, jak acetylacja, fosforylacja, glikozylacja, ubikwitynacja oraz sumoilacja, są przyczyną nadania receptorom PPAR γ specyficzności komórkowej i tkankowej [Ahmadian i wsp., 2013].

Receptor PPAR γ , podobnie jak jego izotypy α oraz β i Δ , jest ligandozależnym czynnikiem transkrypcyjnym, należącym do rodziny jądrowych receptorów hormonów. Wszystkie trzy izotypy receptorów (nazywanych wspólnie skrótem PPARs) określane są mianem receptorów aktywowanych proliferatorami peroksysomów. Receptory PPAR,

pomimo że są produktami ekspresji różnych genów i różnią się funkcjami biologicznymi, swoistością ligandów, aktywnością oraz dystrybucją tkankową, wykazują między sobą wiele podobieństw. Opisane zostały po raz pierwszy przez Isabelle Issemann oraz Stephena Green [Isseman i wsp., 1990] podczas badań nad pochodnymi fibratów, które nazywano “proliferatorami peroksysomów”, ponieważ powodowały zwiększenie ilości peroksysomów w komórce. Badacze odkryli, że hepatokarcynogenne działanie tych związków wywołane jest receptorami, które ulegały aktywacji i pośredniczyły w efektach. Nazwano je receptorami aktywowanymi przez proliferatory peroksysomów. Dziś wiadomo, że agoniści PPAR w warunkach *in vivo* nie powodują proliferacji, ale wyłącznie wzmocnienie aktywacji peroksysomów [Cattley i wsp., 1998].

Rycina 4 przedstawia schemat budowy receptora PPAR γ . Strukturalnie jest on zbudowany z sześciu domen białkowych. Na N-terminalnym końcu białka zlokalizowana jest domena A/B. Domena ta zawiera region AF-1, który odpowiada za aktywację transkrypcji genów niezależną od liganda oraz resztę serynową 82 lub 112 (S82/S112), mogącą ulegać fosforylacji. Proces fosforylacji wpływa na aktywność wielu białek i może prowadzić do obniżenia lub utraty aktywności transkrypcyjnej receptora PPAR γ . Domena C, określana również jako domena wiążąca DNA (DBD - *DNA binding domain*) jest wysoce konserwatywna i zawiera dwa motywy palca cynkowego, które rozpoznają sekwencję nukleotydową PPRE - *peroxisome proliferator-activated receptor response element* oraz odpowiedzialne są za związanie PPAR γ z regionem promotorowym docelowego genu [Renaud i wsp., 2000]. Domena D, będąca regionem zawiasowym i odpowiadającym za zmiany konformacyjne białka, pełni funkcję łącznika między domeną C a domeną E/F.

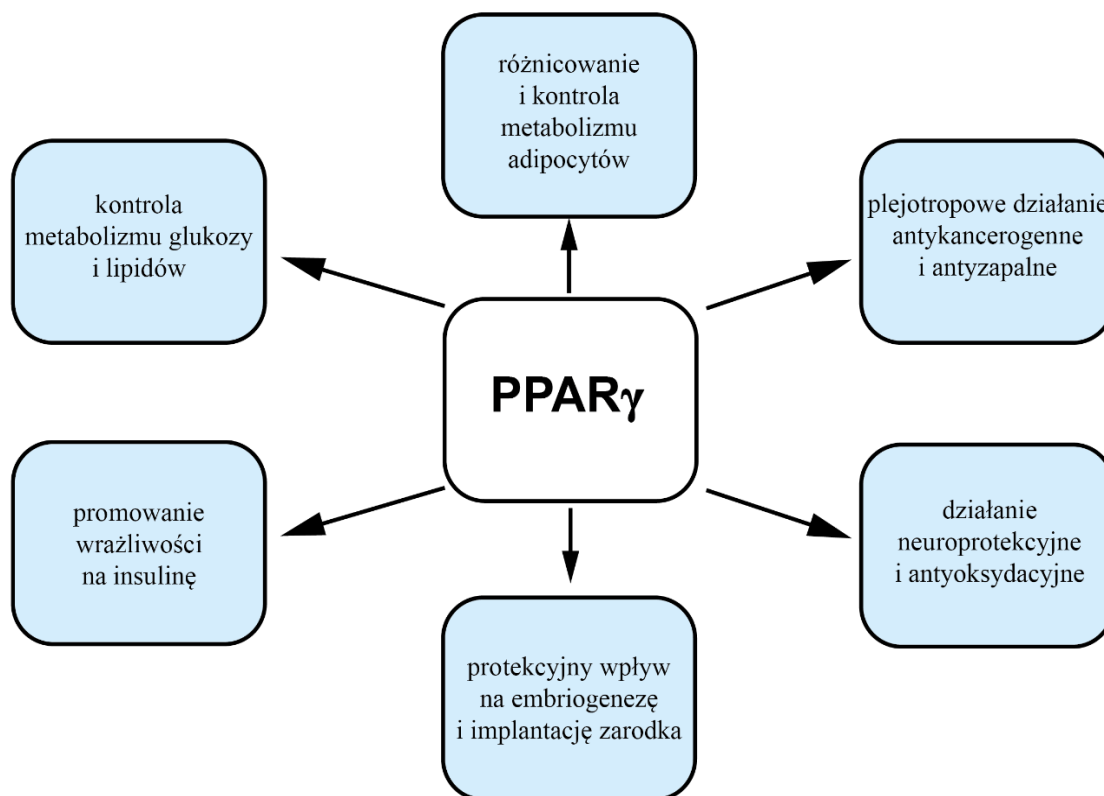


Rycina 4. Schemat domenowej budowy receptora PPAR γ .

Domena E/F stanowi C-terminalny koniec białka i odpowiada za oddziaływania z korepresorami i koaktywatorami. Ostatnia, najbardziej poznana domena zawiera dwa regiony: LBD - *ligand binding domain*, który bierze udział w wiązaniu odpowiedniego liganda, umożliwiając PPAR γ przyłączenie się do sekwencji promotorowej PPRE oraz AF-2, związany z aktywacją transkrypcji zależną od przyłączonego liganda i odpowiedzialny za dimeryzację z receptorem kwasu 9-cis-retinowego RXR [Xu i wsp., 2001]. Funkcje poszczególnych domen białka PPAR γ są nieustannie źródłem zainteresowań badaczy.

Aktywność białka PPAR γ uzależniona jest od przyłączenia naturalnego lub syntetycznego liganda. Charakterystyczną cechą receptorów PPAR jest możliwość przyłączania wielu ligandów oraz tworzenia kompleksów z białkami jądrowymi, które pełnią rolę koaktywatorów lub korepresorów. PPAR γ jako czynniki transkrypcyjne związane z ligandem, wywierają wpływ na ekspresję wielu genów odpowiadających za procesy homeostaticzne, w tym adipogenezę, metabolizm kwasów tłuszczowych, insulinooporność. Kontrolują również wydzielanie pro- i antyzapalnych adipokiny przez adipocyty tkanki tłuszczowej [Vitale i wsp., 2016]. Udowodniono, że osoby z zaburzoną ekspresją PPAR γ są bardziej narażone na wystąpienie lipodystrofii oraz insulinooporności związanej z otyłością [Lefebvre i wsp., 2010]. Od ekspresji receptorów PPAR γ uzależniony jest również proces różnicowania i dojrzewania adipocytów tkanki

tłuszczowej [Rosen i wsp., 1999], synteza triglicerydów oraz uwrażliwianie komórek na insulinę [Marion-Letellier i wsp., 2016] (ryc.5).

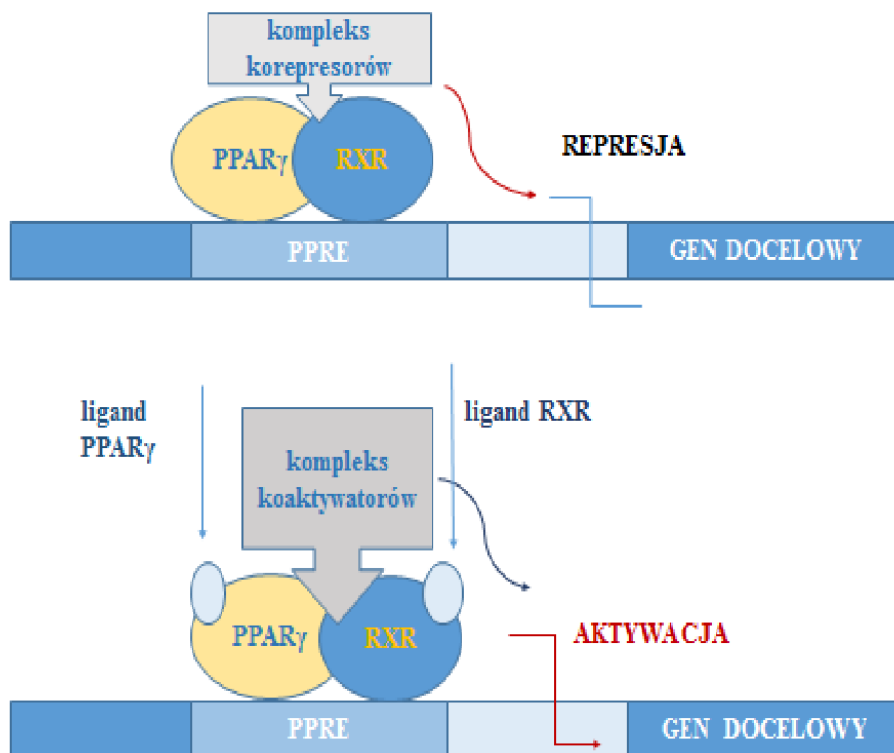


Rycina 5. Rola receptorów PPAR γ .

Receptory PPAR γ mogą działać jako swoiste czujniki lipidowe, które w połączeniu z kompatybilnym ligandem mogą przełączać wiele szlaków metabolicznych zaburzonych w otyłości, doprowadzając do homeostazy metabolicznej [Majithia i wsp., 2016]. Pełna aktywacja receptora uzależniona jest jednak nie tylko od związania się z ligandem. Mechanizm działania receptorowego PPAR γ stanowi kaskadę sygnalizacyjną (ryc. 6).

Nieaktywna forma PPAR γ po związaniu z białkiem HSP72 i fosforylacji przechodzi w formę aktywną. Następnie z kolejnym czynnikiem transkrypcyjnym, jakim jest receptor kwasu retinowego X (RXR, witamina A lub receptor kwasu 9-cis-retinowego) receptor PPAR γ tworzy dimer. Powstały heterodimer ma możliwość łączenia się z sekwencją DNA - PPRE, która znajduje się wewnątrz promotora danego genu. Sekwencja ta obecna jest w miejscach promotorowych wielu genów kodujących białka biorące udział w metabolizmie glukozy i lipidów [Feige i wsp., 2006]. W przypadku

braku agonistów PPAR dochodzi do represji kompleksu PPAR/RXR poprzez związanie z korepresorem. Obecność i związanie endo- lub egzogenego agonisty powoduje oddysocjowanie korepresora, przyłączenie koaktywatora związanego z acetylotransferazami histonów, rozrzedzenie chromatyny oraz zmiany konformacyjne w miejscu PPRE. Połączenie receptora PPAR z sekwencją PPRE, a następnie dekondensacja chromatyny inicjuje ekspresję docelowego genu [Vamecq i wsp., 1999].



Rycina 6. Mechanizm działania receptorowego PPAR γ .

Ze względu na specyficzną strukturę miejsca wiązania ligandu, agonistami PPAR γ jest wiele substancji naturalnych lub syntetycznych. Do naturalnych ligandów należą przede wszystkim kwasy tłuszczowe: linolenowy, linolowy oraz arachidonowy, które do aktywacji przyczyniają się już w stężeniach mikromolarnych [Krey i wsp., 1997], eikozanoidy (prostaglandyny, leukotrieny, prostacykliny, lipoksyny) [Marion-Letellier i wsp., 2016], a także substancje pochodzenia roślinnego (karwakrol, tymol, geranylgeraniol, kemferol, kwercetyna, imbir lekarski, żeń-szeń) [Huang i wsp., 2009, Hojka i wsp., 2011]. Wpływ na ekspresję PPAR γ mają również sirtuiny oraz białka FoxO, wzmagające swoją aktywność podczas procesu restrykcji kalorycznych [Obsil i wsp., 2008, Duszka i wsp., 2020].

Ligandami syntetycznymi receptora PPAR γ są substancje farmakologiczne, wykorzystywane w leczeniu zaburzeń metabolicznych. Są to przede wszystkim tiazolidinediony (TZD), wykazujące korzystne działanie w przypadku otyłości i insulinooporności. Aktywując PPAR γ łagodzą obwodową lipotoksyczność, magazynowanie triglicerydów oraz normalizują ekspresję adipokin w adipocytach [Yessoufou i wsp., 2010, Pellegrinelli i wsp., 2016]. TZD mogą przyczyniać się również do brązowienia adipocytów poprzez promowanie biogenezy mitochondrialnej w WAT [Qiang i wsp., 2012]. Syntetycznymi ligandami PPAR γ są także niesteroidowe leki przeciwzapalne np. ibuprofen, fenoprofen, indometacyna, piroxicam oraz kwas flufenamowy [Mrówka i wsp., 2011].

1.7.1. Rola receptora PPAR γ w okresie ciąży i porodu

Ze względu na ekspresję receptora PPAR γ głównie w tkance tłuszczowej, za główną jego rolę uważa się kontrolowanie procesu adipogenezy oraz utrzymywanie homeostazy glukozy i lipidów, w tym uwrażliwianie komórek na insulinę.

Zwrócono jednak uwagę na ważną rolę receptora PPAR γ w wielu szlakach metabolicznych i procesach zachodzących w trakcie ciąży i porodu. Receptor PPAR γ może mieć duże znaczenie w regulacji zarówno metabolizmu, jak również procesów odpornościowych u ciężarnej [Waite i wsp., 2000]. Rolę receptora PPAR γ w fizjologicznej ciąży potwierdza ponad dwukrotne zwiększenie we krwi ciężarnej stężenia krążących ligandów PPAR γ , którymi są kwasy tłuszczowe oraz pochodne lipidów. Zmiany ekspresji i aktywności receptora PPAR γ mogą wpływać na różnicowanie trofoblastu jak i na metabolizm kwasów tłuszczowych u ciężarnej, uwalnianie adipokin prozapalnych a także na indukcję stresu oksydacyjnego w niektórych powikłaniach ciąży [Kadam i wsp., 2014]. W zaawansowanej ciąży ekspresja PPAR γ zmniejsza się, będąc przyczyną insulinooporności oraz ułatwiając lipolizę u otyłych ciężarnych z GDM [Catalano i wsp., 2002]. Prawdopodobnie receptor PPAR γ odgrywa także istotną rolę w łożysku, gdzie działa przeciwzapalnie, moduluje embriogenezę i implantację zarodka, a także reguluje angiogenezę [Nadra i wsp., 2010, Gao i wsp., 2017]. Wykazano również korzystny, przeciwzapalny wpływ receptorów PPAR γ na zapobieganie przedwczesnemu porodowi. Zaburzona równowaga wydzielania przez adipocyty cytokin i adipokin przeciwzapalnych i zapalnych na korzyść prozapalnych, może być jedną z przyczyn poronień samoistnych i przedwczesnych porodów [Challis i wsp., 2009]. Zmniejszona ekspresja tego receptora w tkankach łożyska oraz surowicy krwi może przyczyniać się

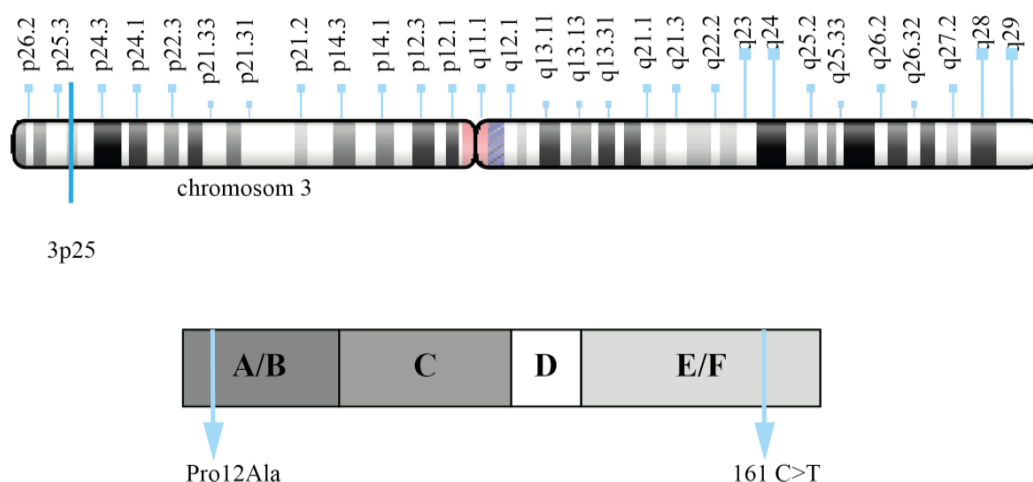
do niedotlenienia łożyska i rozwoju stanu przedrzucawkowego [Liu i wsp., 2017]. Syntetyczni agoniści receptora PPAR γ mogą stanowić zatem dużą nadzieję dla zapobiegania i leczenia wielu ciążowych powikłań, a badania dotyczące bezpieczeństwa ich stosowania w ciąży powinny zostać zintensyfikowane. Tabela 4 podsumowuje zgromadzone w ostatnich latach wyniki badań wskazujące, że nieprawidłowości w ekspresji i / lub funkcji PPAR γ przynajmniej częściowo przyczyniają się do różnych stanów patofizjologicznych ciąży.

Tabela 4. Wpływ ekspresji i/lub funkcji PPAR γ na możliwość wystąpienia komplikacji podczas ciąży (wg McCarthy 2013, zmodyfikowano).

<i>Związek z działaniem PPARγ</i>	<i>Rodzaj powikłań ciążowych</i>	<i>Autor</i>
<i>Badania na zwierzętach</i>		
Homozygotyczna delecja genu <i>PPARG</i>	śmiertelność embrionu	Kubota i wsp., 1999
↑aktywności wiązania DNA przez PPAR γ	stan przedrzucawkowy	Crews i wsp., 2000
↓ekspresji łożyskowej PPAR γ	stan przedrzucawkowy	Raso i wsp., 2008
↓ ekspresji PPAR γ w płucach płodu	IUGR	Joss-Moore i wsp., 2010
Farmakologiczny antagonizm PPAR γ	stan przedrzucawkowy	McCarthy i wsp., 2011
<i>Badania u ludzi</i>		
↓ krążących aktywatorów PPAR γ i ekspresji łożyskowej PPAR γ	stan przedrzucawkowy	Waite i wsp., 2005
↑aktywacji ekspresji PPAR γ	ograniczenie wzrastania embrionu	Fournier i wsp., 2011
Obecność polimorfizmu <i>Pro12Ala</i> genu <i>PPARG</i>	przedwczesny poród	Meirhaeghe i wsp., 2007
Obecność polimorfizmu <i>Pro12Ala</i> genu <i>PPARG</i>	nadmierny ciążowy przyrost masy ciała	Ostafiichuk i wsp., 2018, Stuebe i wsp., 2010, Tok i wsp., 2006
Obecność polimorfizmów <i>Pro12Ala</i> oraz <i>161C>T</i>	cukrzyca ciążowa	Heude i wsp., 2011
Niedobór ligandów dla łożyskowego PPAR γ	zwiększone ryzyko porodu przedwczesnego poprzez wzmożony proces zapalny w błonach płodowych	Waite i wsp., 2000

1.8. Polimorfizmy genu *PPARG*

Polimorfizmy pojedynczego genu (SNPs) należą do najczęściej występujących wariantów genetycznych w populacji i dotyczą zmiany pojedynczego nukleotydu A, C, T lub G [Lehmann i wsp., 1995]. Modyfikując sekwencję aminokwasową kodowanego białka mogą stanowić przyczynę ponad połowy zaburzeń genetycznych związanych z chorobami dziedzicznymi [Kamatani i wsp., 2004]. Wiele polimorfizmów może pełnić rolę biomarkerów w oznaczaniu predyspozycji do wystąpienia chorób [Stenson i wsp., 2009]. W obrębie genu *PPARG* część z nich związana jest z zaburzeniami metabolizmu glukozy i lipidów, czego przykładem są warianty *Pro12Ala* oraz *161C>T*, wykazujące wpływ na gromadzenie tkanki tłuszczowej, nadmierny przyrost masy ciała i wystąpienie otyłości (ryc. 7).



Rycina 7. Gen *PPARG* i umiejscowienie polimorfizmów *Pro12Ala* oraz *161C>T*.

1.8.1. Polimorfizm *Pro12Ala* (rs1801282)

Polimorfizm *Pro12Ala* genu *PPARG*, opisany w roku 1997, jest najczęściej badanym wariantem genu *PPARG*, spowodowanym punktową substytucją nukleotydu guaniny na cytozynę w eksonie B [Yen i wsp., 1997]. Zamiana ta jest przyczyną zastąpienia aminokwasu proliny alaniną (CCA→GCA) w łańcuchu białkowym, a lokalizacja wariantu w domenie AF-1 (domenie aktywacji niezależnej od liganda) powoduje jego znaczenie funkcjonalne. Efektem tego polimorfizmu jest obniżenie aktywności PPAR γ i zmniejszenie efektywności transkrypcji białek zależnych od PPAR γ [Helwig i wsp., 2007].

Obecność wariantu *Ala* genu *PPARG* zwiększa wrażliwość komórek na insulinę, wpływając na aktywność transkrypcyjną oraz ekspresję PPAR γ w adipocytach. Hamowana jest w ten sposób lipoliza i uwalnianie wolnych kwasów tłuszczowych, a wzmocnione działanie insuliny [Stumvoll i wsp., 2001, Stumvoll i wsp., 2002]. Liczne badania wykazały związek tego wariantu polimorficznego z zaburzeniami lipidowo-węglowodanowymi w organizmie, zmienną wartością wskaźnika BMI, insulinowrażliwością oraz otyłością [Deeb i wsp., 1998, Stuebe i wsp., 2010, Yao i wsp., 2015].

1.8.2. Polimorfizm *161C>T* (rs3856806)

Polimorfizm *161C>T* genu *PPARG* został zidentyfikowany w roku 1998 podczas badań dotyczących otyłości i zespołu metabolicznego [Meirhaeghe i wsp., 1998]. Wariant polimorficzny *161C>T* jest cichą mutacją w eksonie 6 genu *PPARG*, polegającą na zamianie cytozyny na tyminę. Znaczenie funkcjonalne tego polimorfizmu i jego wpływ na ekspresję genu *PPARG* nie jest jeszcze do końca wyjaśniony. Badania wskazują, że jest on związany z indywidualną podatnością na choroby metaboliczne, takie jak otyłość, cukrzyca typu II, zespół metaboliczny oraz choroby układu sercowo-naczyniowego [Doney i wsp., 2002]. Zaobserwowano istotny związek tego wariantu polimorficznego z ryzykiem wystąpienia choroby wieńcowej serca. Nosiciele genotypu heterozygotycznego *161CT* wykazywali korzystniejszy profil lipidowy związany ze zmniejszonym ryzykiem wystąpienia tej choroby, w porównaniu do nosicieli genotypu niezmutowanego homozygotycznego *161CC*. Obserwowane protekcyjne działanie allele *161T* nie było natomiast powiązane z otyłością [Wang i wsp., 1999]. Wyniki badań dotyczących polimorfizmu *161C>T* nie są jednak spójne, co podobnie jak w przypadku polimorfizmu *Pro12Ala* wynikać może z innych wzorców dietetycznych w populacjach oraz odmiennej częstości występowania tego polimorfizmu.

Wykazano, że warianty polimorfizmów *Pro12Ala* oraz *161C>T* uczestniczą w patomechanizmie wielu chorób metabolicznych i mogą stanowić biomarkery pozwalające wyjaśnić rolę receptora PPAR γ w ich powstawaniu. Co ciekawe, u osób bez ciężkich zaburzeń metabolicznych allele *Ala* związany był z niższą wartością wskaźnika BMI, natomiast allele *161T* z wyższą wartością wskaźnika BMI [Doney i wsp., 2002].

1.9. Hipoteza badawcza

Obecnie wiadomo, że na nadmierny przyrost masy ciała i otyłość wpływ mają czynniki genetyczne, epigenetyczne, stan metaboliczny organizmu oraz dieta. U osób otyłych aktywowane są procesy prowadzące do magazynowania energii i rozrostu tkanki tłuszczowej. Przy przedłużającym się dodatnim bilansie energetycznym następuje reorganizacja struktury tkanki tłuszczowej, a budujące ją adipocyty ulegają hipertrofii i hiperplazji. Procesy te prowadzą do wzmożonego wydzielania adipokin prozapalnych. Również u kobiet ciężarnych nadmierny przyrost masy ciała może wiązać się ze zwiększeniem stężenia prozapalnych adipokin, nasilając w tkance tłuszczowej stan zapalny i indukując dalsze zaburzenia metaboliczne. W związku z aktywnymi procesami zapalnymi w tkance tłuszczowej najczęściej analizowanymi adipokinami są leptyna i adiponektyna, nie mniejsze znaczenie wydaje się jednak mieć rezystyna oraz dipeptydylopeptydaza IV. Wiele badań skupia się również na analizie wariantów polimorficznych genów związanych z nadmiernym gromadzeniem tkanki tłuszczowej i otyłością. Wskazuje się na dużą możliwość nadmiernego przyrostu masy ciała i wystąpienia wielu powikłań metabolicznych u nosicieli niektórych wariantów polimorficznych genu *PPARG*, w tym rzadkich zmutowanych alleli *Ala* polimorfizmu *Pro12Ala* oraz *161T* polimorfizmu *161C>T*. Stąd w przedstawianej rozprawie podjęto próbę oceny wymienionych wariantów polimorficznych genu *PPARG*, jak również ocenę stężeń wybranych adipokin: rezystyny oraz dipeptydylopeptydazy IV, mogących mieć znaczenie w nadmiernym przyroście tkanki tłuszczowej i rozwoju otyłości.

2. CEL PRACY

Celem pracy była próba oceny częstości występowania wybranych polimorfizmów genu *PPARG* oraz ich związku ze stężeniem wybranych adipokin (rezystyny i dipeptydylopeptydazy IV) u kobiet ciężarnych z nadmiernym przyrostem masy ciała.

Cel ten został zrealizowany poprzez ocenę w grupach badanych kobiet ciężarnych:

1. Częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmów *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG*
2. Stężenia w surowicy krwi adipokin: rezystyny oraz dipeptydylopeptydazy IV
3. Korelacji stężenia badanych adipokin z polimorfizmami genu *PPARG*
4. Związku badanych polimorfizmów genu *PPARG* oraz stężenia adipokin z wybranymi parametrami klinicznymi ciężarnych

3. MATERIAŁ

Badania przeprowadzono wśród pacjentek Kliniki Perinatologii i Chorób Kobiących Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, w latach 2018-2020. Każda z pacjentek została poinformowana o celu badań i ich dobrowolności, a wyrażenie zgody potwierdzała własnoręcznym podpisem na formularzu świadomej zgody. Na przeprowadzenie badań została wydana zgoda Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (Uchwała nr 853/18 z dnia 06 września 2018 roku oraz Uchwała nr 646/20 z dnia 05 września 2020 roku).

3.1. Charakterystyka pacjentek

Do badania zakwalifikowano ogółem 367 kobiet ciężarnych. Całą grupę podzielono ze względu na przyrost masy ciała w ciąży (GWG – *gestational weight gain*), zgodnie z zaleceniami IOM (2009):

grupa IGWG (*insufficient gestational weight gain*):

75 pacjentek ze zbyt małym przyrostem masy ciała w ciąży

grupa NGWG (*normal gestational weight gain*):

96 pacjentek z prawidłowym przyrostem masy ciała w ciąży

grupa EGWG (*excessive gestational weight gain*):

196 pacjentek z nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży

Celem obliczenia ciążowego przyrostu masy ciała ustalono masę ciała oraz wzrost matki przed i pod koniec ciąży. Parametry te wykorzystano do obliczenia wskaźnika BMI. Zgodnie z uzyskanymi wartościami wskaźnika BMI ustalono grupę pacjentek z niedowagą (BMI <18,5 kg/m²), prawidłową masą ciała (BMI 18,5-24,9 kg/m²), nadwagą (BMI 25-29,9 kg/m²) oraz otyłością (BMI ≥30). Wskaźnik BMI obliczono przy

pomocy powszechnie wykorzystywanego wzoru: $BMI = \text{masa ciała [kg]} / \text{wzrost [m]}^2$. Całkowity ciążowy przyrost masy ciała został obliczony jako różnica między masą ciała przed porodem a masą ciała sprzed ciąży. Przydzielanie pacjentek do grup IGWG, NGWG oraz EGWG odbywało się według wytycznych ustalonych przez IOM (2009).

Polimorfizmy genu *PPARG* przeanalizowano u wszystkich 367 zakwalifikowanych ciężarnych, natomiast stężenie adipokin rezystyny oraz dipeptydylopeptydazy IV przeanalizowano u 170 pacjentek. Wszystkie pacjentki należały do rasy kaukaskiej, były narodowości polskiej i pochodziły z regionu Wielkopolski.

U każdej pacjentki oprócz masy ciała i wzrostu odnotowano szczegółowy wywiad położniczy: liczbę przebytych ciąż, tydzień zakończenia ciąży, choroby współistniejące oraz wiek. Zanotowano również wartości ciśnienia tętniczego skurczowego i rozkurczowego krwi matki, sposób zakończenia ciąży oraz dane dotyczące noworodka (masę urodzeniową ciała, stan noworodka, płeć, punktację w skali Apgar, pH tętnicze, pH żylny oraz masę łożyska). Schemat rekrutacji pacjentek do badanych grup przedstawiono na rycinie 8.

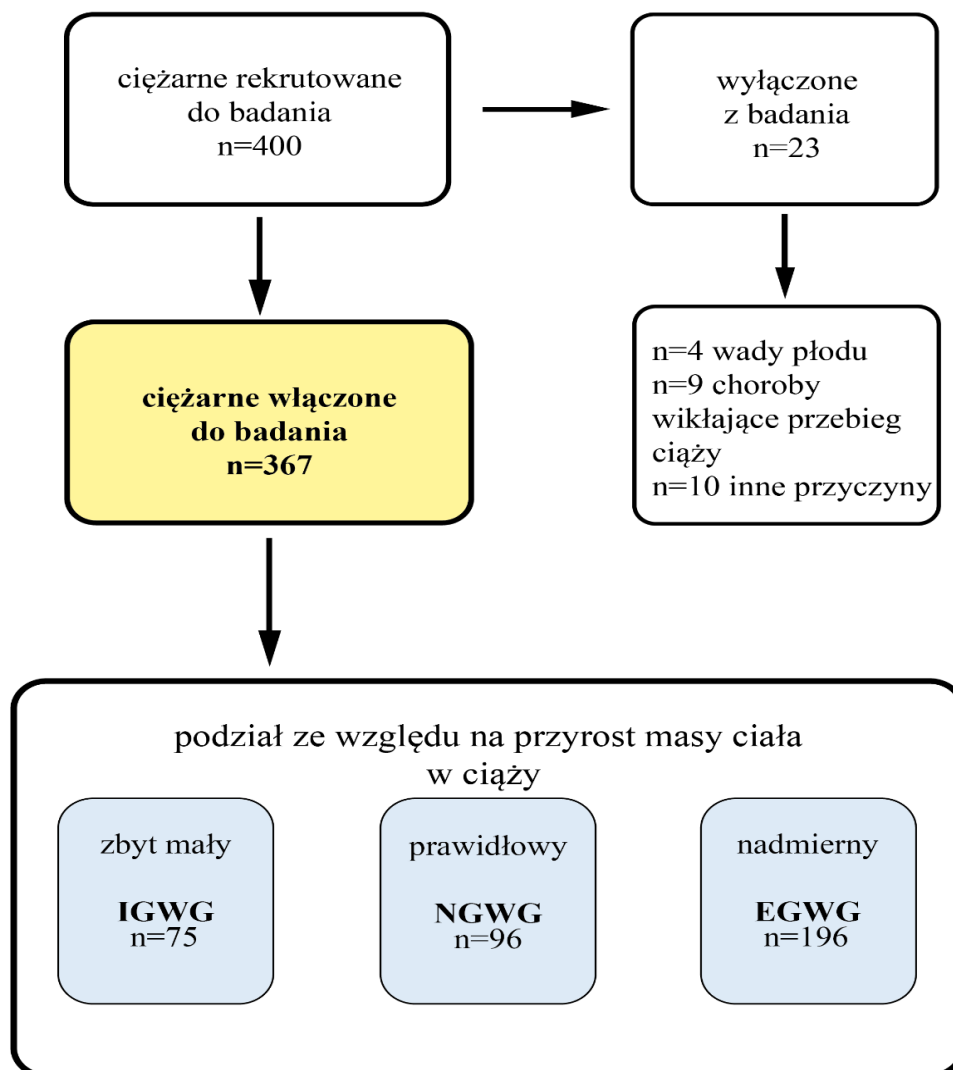
3.2. Kryteria włączenia i wyłączenia pacjentek z grupy

Kryteriami włączenia do grupy były:

- ciąża pojedyncza donoszona (zakończona po ukończeniu 37 tygodnia ciąży)
- prawidłowy przebieg ciąży
- rasa kaukaska
- narodowość polska

Kryteriami wyłączenia z grupy były:

- choroby metaboliczne mogące mieć wpływ na badane parametry
- zaburzenia chromosomalne lub wady rozwojowe płodu
- cukrzyca ciążowa i przedciążowa
- nadciśnienie tętnicze
- ciąża wielopłodowa
- rasa inna niż kaukaska
- narodowość inna niż polska



Rycina 8. Schemat rekrutacji pacjentek do badanych grup.

4. METODY

4.1. ANALIZA GENETYCZNA

W celu oznaczenia genotypów i alleli polimorfizmu *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG*, w trakcie rutynowych badań każdej pacjentce spełniającej kryteria włączenia do grupy pobrano krew w ilości około 5 ml z żyły odłokciowej do probówki typu S-Monovette (Sarstedt, Niemcy). Probówka jako antykoagulant zawierała kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA - *ethylene diamine tetraacetic acid*) o stężeniu 1,6 mg EDTA/ml krwi. Dane pacjentów zostały zakodowane w systemie numerycznym. W celu ochrony danych osobowych próbki oraz wyniki badań opisywane zostały wartościami liczbowymi.

Kolejny etap badań odbywał się w Pracowni Biologii Molekularnej Kliniki Perinatologii i Chorób Kobiecych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Probówkę z krwią do analizy genetycznej do czasu przeprowadzenia izolacji DNA przechowywano w temperaturze -20°C. Z wyizolowanego DNA oznaczono polimorfizmy *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG* (tab. 5) metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR - *polymerase chain reaction*) oraz metodą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP - *restriction fragment lenght polymorphism*).

Tabela 5. Charakterystyka wariantów polimorficznych badanych w pracy.

<i>Nazwa zwyczajowa polimorfizmu</i>	<i>Pro12Ala</i>	<i>161C>T</i>
Numer polimorfizmu	rs1801282	rs3856806
Lokalizacja	chr3:12351626 (GRCh38.p12)	chr3:12434058 (GRCh38.p12)
Allele	C>G	C>T
Funkcja	P (Pro) > A (Ala) Mutacja zmiany sensu	H (His) > H (His) Mutacja cicha

4.1.1. Izolacja genomowego DNA

Izolacja DNA z leukocytów krwi obwodowej została przeprowadzona przy pomocy zestawu do izolacji DNA QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Niemcy), z wykorzystaniem kolumnienek ze złożem krzemionkowym, wiążącym DNA w obecności wysokich stężeń soli chaotropowych. Proces izolacji DNA genomowego przeprowadzono ściśle według zaleceń producenta, zgodnie ze schematem:

- Do probówek typu Eppendorf odpipetowano 20 µl proteiny K będącej enzymem proteolitycznym, dodano 200 µl krwi pobranej na EDTA oraz 200 µl buforu oznaczonego w zestawie symbolem AL
- Probówki wytrząsano przez 15 sekund a następnie ogrzewano przez 15 minut w temperaturze 56°C
- Do probówek dodano 200 µl etanolu 96%, po czym wytrząsano przez 15 sekund na wytrząsarce typu vortex i krótko zwirowano
- Otrzymaną mieszaninę pipetą przeniesiono na kolumnienki ze złożem krzemionkowym i wirowano przy obrotach 8000 rpm przez 1 minutę
- Kolumnienki przeniesiono do nowych probówek odrzucając przesącz, po czym przemyto je buforem w ilości 500 µl oznaczonym w zestawie jako AW1 i wirowano przez 1 minutę z prędkością 8000 rpm
- Następnie kolumnienki przemyto buforem w ilości 500 µl oznaczonym w zestawie jako AW2 po czym wirowano przez 3 minuty z prędkością 14000 rpm
- Na kolumnienkę nałożono 200 µl roztworu do elucji oznaczonego w zestawie jako bufor AE, następnie po 5 minutach wirowano przez 1 minutę z prędkością 8000 rpm
- Otrzymane w ten sposób oczyszczone DNA przechowywane było w temperaturze -80°C, do czasu wykorzystania do dalszych badań

4.1.2. Amplifikacja wybranych fragmentów DNA metodą PCR/RLFP

Po uzyskaniu oczyszczonego DNA przeprowadzono namnożenie fragmentów DNA genu *PPARG* zawierających badane polimorfizmy. Do amplifikacji fragmentu genu *PPARG* zawierającego polimorfizm *Pro12Ala* wykonanej metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) wykorzystano startery występujące we wcześniejszych publikacjach [Yen i wsp., 1997, Wang i wsp., 1999], których sekwencję oraz długość uzyskiwanych produktów PCR zamieszczono w tabeli 6.

Tabela 6. Sekwencja starterów wykorzystanych do reakcji PCR dla genu *PPARG*.

Polimorfizm genu <i>PPARG</i>	Sekwencja starterów	Produkt PCR
Pro12Ala rs1801282	5' GCCAATTCAAGCCCAGTC 3' 5' GATATGTTTGCAGACAGTGTATCAGGAAGGA- ATCGCTTTC <u>C</u> G 3'	270 pz
161C>T rs3856806	5' CAAGACAACCTGCTACAAGC 3' 5' TCCTTGTAGATCTCCTGCAG 3'	200 pz

Skład mieszaniny reakcji PCR wraz z warunkami reakcji przedstawiono w tab. 7 i 8.

Tabela 7. Skład mieszaniny reakcji PCR dla badanych wariantów genu *PPARG*.

Polimorfizm <i>PPARG</i>	Pro12Ala rs1801282	161C>T rs3856806
Składnik reakcji	Objętość	Objętość
Genomowy DNA	2,0µl	2,0 µl
Woda do PCR	17,5µl	17,5 µl
10 x Bufor do PCR (z 25 mM MgCl ₂)	2,5µl	2,5µl
Roztwór dNTP [2,5 mM]	2,0 µl	2,0 µl
Starter Forward [10µM]	0,4µl	0,4 µl
Starter Reverse [10µM]	0,4µl	0,4 µl
Polimeraza DNA [5U/ µl]	0,2µl	0,2µl
Suma	25µl	25µl

Tabela 8. Warunki termiczne reakcji PCR dla badanych wariantów genu *PPARG*.

Polimorfizm <i>PPARG</i>	Etap	Ilość cykli	Czas	Tempera- tura
Pro12Ala rs1801282	Denaturacja wstępna	1	4 minut	95°C
	Denaturacja właściwa	30	30 sekund	95°C
	Wiązanie starterów		30 sekund	64°C
	Synteza		1 minuta	72°C
	Synteza końcowa	1	10 minut	72°C
	Przechowywanie	1	10 minut	4°C
161C>T rs3856806	Denaturacja wstępna	1	4 minut	95°C
	Denaturacja właściwa	30	30 sekund	95°C
	Wiązanie starterów		30 sekund	54°C
	Synteza		1 minuta	72°C
	Synteza końcowa	1	10 minut	72°C
	Przechowywanie	1	10 minut	4°C

Reakcję enzymatycznej hydrolizy produktów reakcji PCR przeprowadzono w cieplarni (Mettler, Niemcy) w temperaturach zalecanych przez producenta i przedstawionych w tabeli 9, przez okres 16 godzin. Amplifikowane fragmenty DNA zawierające wybrane polimorfizmy pojedynczego nukleotydu poddane zostały działaniu enzymów restrykcyjnych, przecinających nić DNA w specyficznych miejscach. W ten sposób określono obecność poszczególnych alleli badanych wariantów genetycznych genu *PPARG*. Po hydrolizie produktów PCR enzymami restrykcyjnymi identyfikowano poszczególne genotypy poprzez elektroforezę poziomą w 2,5% żelach agarozowych z barwnikiem Midori Green (Nippon Genetics) w buforze 1xTAE (40 mM Tris-octan, 2 mM EDTA). Wyniki rozdziału wizualizowano w świetle UV i zarchiwizowano w komputerowym systemie wizualizacji i analizy obrazu UV UVI-KS4000/Image PC (Syngen Biotech, USA). Uzyskano genotypy w zależności od obecności lub braku miejsca hydrolizy dla enzymu restrykcyjnego i otrzymania fragmentów odpowiedniej długości opisanych w tabeli 9.

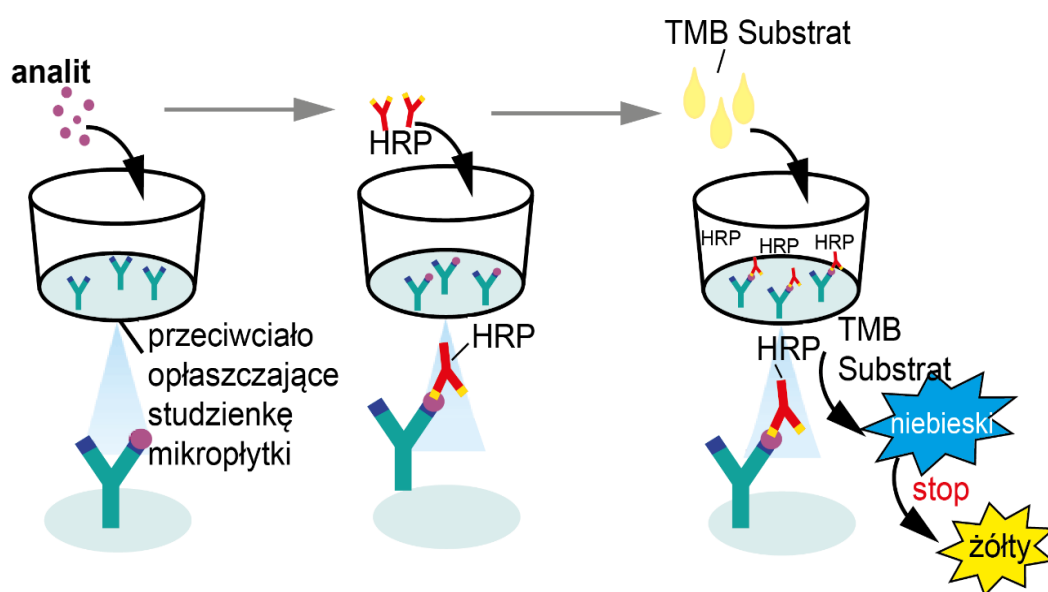
Tabela 9. Warunki hydrolizy dla badanych polimorfizmów genu *PPARG*.

Polimorfizm <i>PPARG</i>	<i>Pro12Ala</i> <i>rs1801282</i>	<i>161C>T</i> <i>rs3856806</i>
Enzym restrykcyjny (producent)	Bsh1236I (BstUI) (ThermoScientific)	Eco72I (PmlI) (ThermoScientific)
Temperatura i czas hydrolizy	37°C, 16 godzin	37°C, 16 godzin
Rozpoznana sekwencja	CG↓CG	CAC↓GTG
Fragmenty uzyskane po hydrolizie	CC 270 pz CG 270, 227, 43 pz GG 227, 43 pz	CC 120, 80 pz CT 200, 120, 80 pz TT 200 pz

4.2. ANALIZA IMMUNOENZYMATYCZNA

W celu oznaczenia stężenia białek rezystyny i dipeptydylopeptydazy IV w trakcie rutynowych badań pobrano od pacjentek zakwalifikowanych do grupy około 6 ml krwi z żyły odłokciowej do probówki typu S-Monovette (Sarstedt, Niemcy) zawierającej krzemian jako aktywator krzepnięcia i pozostawiono ją w temperaturze pokojowej w celu wystąpienia procesu krzepnięcia. Po upływie około 30 minut krew odwirowywano przez 10 minut z prędkością 3500 rpm, a uzyskaną w ten sposób surowicę do czasu zebrania całej grupy i przeprowadzenia dalszych badań przechowywano w zamrażarce w temperaturze -80°C. Pomiar stężenia badanych adipokin w surowicy krwi został wykonany ilościową metodą immunoenzymatyczną ELISA (test podwójnego wiązania

„kanapkowy” - *sandwich ELISA*), przy użyciu zestawów Quantikine Elisa Human DPP IV/CD26 oraz Quantikine Elisa Human Resistin, firmy R&D, USA. Mikropłytki testowe zawierały studzienki opłaszczane monoklonalnym przeciwciałem specyficznym odpowiednio dla ludzkiego DPP IV lub rezystyny a badany antygen był wiązany pomiędzy dwiema warstwami przeciwciał. Badania w dwóch powtórzeniach zostały przeprowadzone w Pracowni Biologii Molekularnej Kliniki Perinatologii i Chorób Kobięcych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, ściśle według zaleceń producenta (R&D, USA) (ryc. 9).



Rycina 9. Etapy detekcji stężenia białek metodą sandwich ELISA.

4.2.1. Oznaczenie stężenia rezystyny w surowicy krwi

Oznaczenie stężenia rezystyny w surowicy krwi wykonano za pomocą zestawu Quantikine Elisa Human Resistin, firmy R&D, USA. Jako próby badane wykorzystano odwirowaną surowicę pacjentek, która została przechowywana do momentu badania w temperaturze -80°C . Przygotowano odczynniki oraz roztwory standardowe zgodnie z zaleceniami producenta. W probówkach przygotowano kolejne wzorcowe rozcieńczenia standardu (wzorca) rezystyny służące do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej (10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,313 ng/ml, 0,156 ng/ml, w ostatniej probówce sam roztwór rozcieńczający).

Badanie zostało wykonane wg następującego schematu:

- Na mikropłytkach testowych oznaczono studzienki służące do próby wzorcowej oraz studzienki do prób badanych
- Za pomocą pipety umieszczono na płytkach próbki wzorcowe (kontrolne), blank oraz surowice krwi pacjentek jako próbki badane
- Do każdej studzienki dodano 100 μ l rozcieńczalnika (Assay Diluent RD1-57) a następnie 100 μ l wzorca (Human Resistin Standard), kontroli i badanych surowic
- Płytki testowe zamknięto i inkubowano 2 godziny w temperaturze 37°C w celu związania antygenów rezystyny przez przeciwciała opłaszczone na płycie testowej
- Czterokrotnie przepłukano płytkę testową buforem (Wash Buffer)
- Do każdej studzienki dodano 200 μ l przeciwciała poliklonalnego specyficznego dla ludzkiej rezystyny (Human Resistin Conjugate), znakowanego peroksydazą chrzanową (HRP)
- Płytki testową uszczelniono i inkubowano 2 godziny w temperaturze 37°C w celu wytworzenia kompleksów typu „kanapka”, w których cząsteczka rezystyny była wiązana pomiędzy dwoma warstwami przeciwciał
- Po zakończeniu inkubacji w celu usunięcia niezwiązanych przeciwciał czterokrotnie przepłukano płytkę testową buforem
- Do każdej studzienki dodano 200 μ l substratu dla peroksydazy chrzanowej, zawierającego tetrametylobenzydynę (Substrate Solution)
- Inkubowano 0,5 godziny w temperaturze 37°C, podczas inkubacji zachodziła reakcja barwna (zmiana barwy mieszaniny z niebieskiej na żółtą)
- W celu zatrzymania reakcji enzymatycznej do każdej studzienki dodano po 50 μ l roztworu kwasu siarkowego (Stop Solution)
- Za pomocą czytnika do mikropłytek w ciągu 10 minut od zahamowania reakcji odczytano absorbancję (wartość OD) każdej studzienki, przy długości fali 450 nm

Minimalna wartość czułości testu, ustalona na podstawie minimalnego wykrywalnego stężenia wynosiła 0,026 ng/ml. Analizę przeprowadzono w dwóch powtórzeniach, uzyskując średnią z dwóch pomiarów. Wyniki obliczano z zastosowaniem programu MIKROWIN 2000, wersja 4,35.

4.2.2. Oznaczenie stężenia dipeptydylopeptydazy IV w surowicy krwi

Oznaczenie stężenia DPP IV w surowicy krwi wykonano za pomocą zestawu Quantikine Human DPP IV/CD26 firmy R&D, USA. Jako próby badane wykorzystano odwirowaną surowicę pacjentek, która została przechowywana do momentu badania w temperaturze -80°C. Przygotowano odczynniki oraz roztwory standardowe zgodnie z zaleceniami producenta. W probówkach przygotowano kolejne wzorcowe rozcieńczenia standardu DPP IV służące do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej (20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml, 0,313 ng/ml, w ostatniej próbówce sam

roztwór rozcieńczający).

Badanie zostało wykonane wg następującego schematu:

- Na mikropłytkach testowych oznaczono studzienki służące do próby wzorcowej oraz studzienki do prób badanych
- Za pomocą pipety umieszczono na płytkach próbki wzorcowe (kontrolne), blank oraz surowice krwi pacjentek jako próbki badane
- Do każdej studzienki dodano 100 μ l rozcieńczalnika (Assay Diluent RD1-57) a następnie 100 μ l wzorca (Human DPP IV Standard), kontroli i badanych surowic
- Płytki testowe zamknięto i inkubowano 2 godziny w temperaturze 37°C, w celu związania antygenów DPP IV przez przeciwciała opłaszczone na płytce testowej
- Czterokrotnie przepłukano płytkę testową buforem (Wash Buffer)
- Do każdej studzienki dodano 200 μ l przeciwciała poliklonalnego specyficznego dla ludzkiej DPP IV (Human DPP IV Conjugate), znakowanego peroksydazą chrzanową (HRP)
- Płytki testową uszczelniono i inkubowano 2 godziny w temperaturze 37°C, w celu wytworzenia kompleksów typu „kanapka”, w których cząsteczka DPP IV była wiązana pomiędzy dwoma warstwami przeciwciał
- Po zakończeniu inkubacji w celu usunięcia niezwiązanych przeciwciał czterokrotnie przepłukano płytkę testową buforem
- Do każdej studzienki dodano 200 μ l substratu dla peroksydazy chrzanowej, zawierającego tetrametylobenzydynę (Substrate Solution)
- Inkubowano 0,5 godziny w temperaturze 37°C, podczas inkubacji zachodziła reakcja barwna (zmiana barwy mieszaniny z niebieskiej na żółtą)
- W celu zatrzymania reakcji enzymatycznej do każdej studzienki dodano po 50 μ l roztworu kwasu siarkowego (Stop Solution)
- Za pomocą czytnika do mikropłytek w ciągu 10 minut od zahamowania reakcji odczytano absorbancję (wartość OD) każdej studzienki, przy długości fali 450 nm

Minimalna wartość czułości testu, ustalona na podstawie minimalnego wykrywalnego stężenia wynosiła 0,016 ng/ml. Analizę przeprowadzono w dwóch powtórzeniach, uzyskując średnią z dwóch pomiarów. Wyniki obliczono z zastosowaniem programu MIKROWIN 2000, wersja 4,35.

4.3. Aparatura wykorzystywana w przeprowadzonych badaniach

Do analizy wariantów polimorficznych genu *PPARG* (izolacji genomowego DNA, pomiaru ilościowego DNA, reakcji PCR/RFLP, elektroforezy na żelu agarozowym) oraz reakcji immunoenzymatycznej ELISA wykorzystano następującą aparaturę:

- komora laminarna (UVP, USA)
- pipety z nastawialną objętością (Eppendorf, USA)
- wytrząsarka WL-1
- termomikser (Eppendorf, USA)

- termocykler Dyad (Bio-Rad, USA)
- komory do elektroforezy poziomej (Scie-Plas, Wielka Brytania)
- zasilacz do elektroforezy (Consort, Belgia)
- mieszadło magnetyczne MS11H (Wigo, Polska)
- cieplarka (Memmert, Niemcy)
- komputerowy system wizualizacji i analizy obrazu UV UVI-KS4000/Image PC (Syngen Biotech, USA)
- waga laboratoryjna (Radwag, Polska)
- lodówka (Ardo, Polska)
- kuchenka mikrofalowa D Power (Daewoo, Korea Południowa)
- wirówka 5804R (Eppendorf, USA)
- zamrażarka (Liebherr, Niemcy)
- zamrażarka niskotemperaturowa (Snijders, Holandia)
- czytnik mikropłytek BioMed Reader, MikroWin 2000, wersja 4,35
- spektrofotometr Nanodrop 2000 (ThermoScientific, USA)

4.4. Metody statystyczne

Wyniki badań laboratoryjnych oraz dane kliniczne zakwalifikowanych pacjentek i ich noworodków poddano analizie statystycznej. Obliczeń dokonano z zastosowaniem programu R (wersja 4.0.2). We wnioskowaniu zastosowano poziom istotności statystycznej $\alpha=0,05$. Wszystkie przeprowadzone testy statystyczne były obustronne. Zmienne ilościowe zostały przedstawione w postaci średnich $\pm$ odchylenie standardowe SD - *standard deviation*, mediany podając wartości minimalne oraz maksymalne. Dokonano weryfikacji zgodności rozkładu cechy z rozkładem Gaussa korzystając z testu normalności Shapiro-Wilka. W przypadku zgodności rozkładu cechy z rozkładem normalnym, do oceny zależności między daną cechą w badanych grupach stosowano jednoczynnikową analizę wariancji dla zmiennych niepowiązanych (ANOVA), a następnie aby dokonać dokładnej oceny posłużono się testem post-hoc Tukeya HSD. W przypadku braku zgodności, stosowano test nieparametryczny ANOVA Kruskala Wallisa oraz post-hoc test Dunna. Do oceny zależności pomiędzy adipokinami oraz badanymi cechami w postaci ciągłej wykorzystano macierze korelacji Spearmana. Zmienne jakościowe przedstawiono liczbowo oraz jako wartości procentowe i porównywano za pomocą testu χ^2 Pearsona bądź testu dokładnego Fishera, w zależności od liczebności wartości oczekiwanych.

Ocenę zgodności rozkładu genotypów analizowanych polimorfizmów z prawem Hardy'ego-Weinberga przeprowadzono testem χ^2 . Analizę wariantów genetycznych przeprowadzono według trzech modeli genetycznych podając współczynnik ryzyka (OR)

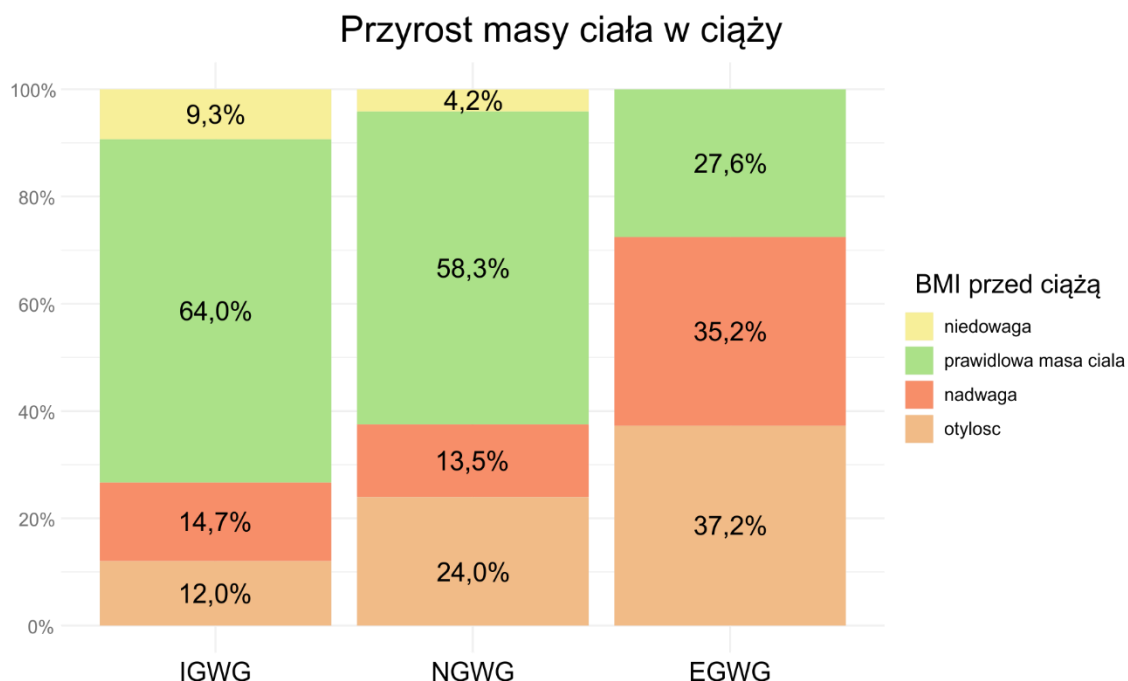
przy uwzględnieniu odpowiednich przedziałów ufności (95%PU). Nierównowagę sprzężeń polimorfizmów zlokalizowanych w obrębie genu *PPARG* oraz częstości występowania haplotypów przeprowadzono przy użyciu programu Haploview (wersja 4.2) oraz pakietu haplo.stats programu R. Analizę związku poszczególnych haplotypów z badanymi adipokinami przeprowadzono metodą regresji.

5. WYNIKI

5.1. Charakterystyka grupy badanej

Do badania zakwalifikowano 367 ciężarnych rasy kaukaskiej, narodowości polskiej, pochodzących z regionu Wielkopolski. U każdej pacjentki obliczono przyrost masy ciała w ciąży, wyrażony w kg i stanowiący różnicę masy ciała przed porodem i masy ciała przed ciążą. Następnie pacjentki podzielono na trzy grupy zgodnie z zaleceniami IOM (tabela 10).

Prawidłowy przyrost masy ciała w ciąży wykazano u 96 pacjentek (26,2%), u 75 (20,4%) stwierdzono zbyt mały, a u 196 (53,4%) nadmierny przyrost masy ciała w ciąży. Następnie analizie poddano wartość BMI przed ciążą w całej badanej grupie kobiet. U 158 kobiet (43,1%) odnotowano prawidłową wartość wskaźnika BMI przed ciążą, niedowagę odnotowano u 11 kobiet (3,0%), nadwagę u 93 kobiet (25,3%), a otyłość u 105 pacjentek (28,6%).



Rycina 10. Przedciążowe BMI w grupach wyodrębnionych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży.

Wszystkie pacjentki podzielone na podstawie przedciążowego BMI w grupach wyodrębnionych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży przedstawiono na rycinie 10.

Zbyt mały przyrost masy ciała w ciąży zaobserwowano u 7 (9,3%) kobiet z niedowagą, 48 (64,0%) z prawidłowym BMI przed ciążą, 11 (14,7%) z nadwagą oraz 9 (12,0%) z otyłością. Prawidłowy przyrost masy ciała stwierdzono u 4 (4,2%) osób z niedowagą, 56 (58,3%) z prawidłowym BMI, 13 (13,5%) z nadwagą i 23 (24,0%) z otyłością. Nadmierny przyrost masy ciała najczęściej występował u kobiet z otyłością (73 pacjentki, 37,2%), następnie u 69 kobiet (35,2%) z nadwagą oraz u 54 (27,6%) pacjentek z prawidłowym BMI przed ciążą. U żadnej ciężarnej z niedowagą nie stwierdzono nadmiernego przyrostu masy ciała w ciąży.

W kolejnym etapie porównano ciążowy przyrost masy ciała w grupie z prawidłowym BMI z innymi grupami tzn. niedowagą, nadwagą oraz otyłością. Wyniki przedstawiono w tabeli 10. U kobiet z niedowagą obserwowano 2-krotnie większe ryzyko wystąpienia zbyt małego przyrostu masy ciała w ciąży, w porównaniu z kobietami z prawidłową masą ciała przed ciążą. U kobiet z wysokim BMI przed ciążą zaobserwowano większe ryzyko nadmiernego przyrostu masy ciała w ciąży (OR=5,50 w grupie kobiet z nadwagą, $p<0,0001$; OR=3,29 w grupie kobiet z otyłością, $p=0,0001$).

Tabela 10. Związek pomiędzy przyrostem masy ciała w ciąży i przedciążowym BMI.

<i>BMI przed ciążą</i>	<i>IGWG</i>			<i>EGWG</i>		
	<i>OR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>	<i>OR</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
Prawidłowa masa	1,00	—	—	1,00	—	—
Niedowaga	2,04	0,56-7,40	0,28	—	—	—
Nadwaga	0,99	0,41- 2,41	0,98	5,50	2,73-11,09	<0,
Otyłość	0,46	0,19-1,08	0,07	3,29	1,81-5,99	0,0

5.2. Charakterystyka danych klinicznych pacjentek i ich noworodków

Następnie przeanalizowano dane kliniczne kobiet zakwalifikowanych do badanej grupy. Pacjentki były w wieku od 19 do 45 lat (średnia $30,89 \pm 4,82$ lat). Średnie ciśnienie tętnicze skurczowe i rozkurczowe wynosiło odpowiednio $114,16 \pm 12,60$ oraz $71,89 \pm 9,67$ mmHg. Masa ciała przed ciążą wynosiła od 45 do 137 kg (średnio $74,71 \pm 17,13$ kg), natomiast pod koniec ciąży od 53 do 162 kg (średnio $89,26 \pm 18,04$ kg). W całej

badanej grupie obserwowano zróżnicowane wartości BMI. Przed ciążą wynosiły od 19,13 do 35,55 kg/m² (średnia 135,10 ± 75,36 kg/m²), natomiast pod koniec ciąży od 19,13 do 57,16 kg/m² (średnia 31,60 ± 5,91 kg/m²). Różnica masy ciała pacjentek między początkiem ciąży a porodem to średnio 14,64 ± 6,46 kg, przy średniej różnicy BMI 5,19 ± 2,29 kg/m². U pięciu kobiet z przedciążowym BMI powyżej 25 kg/m² różnica BMI w okresie ciąży była mniejsza niż 1 kg/m², u jednej pacjentki nie obserwowano przyrostu masy ciała.

W analizowanej grupie 132 pacjentki (35,97%) rodziły po raz pierwszy, natomiast dla większości (64,03%) była to kolejna ciąża (średnia przebytych ciąż 2,01±1,10; zakres od 1 do 9). Samoistnie rodziło 180 kobiet (49,05%), poprzez cięcie cesarskie 176 pacjentek, natomiast inne porody operacyjne zostały przeprowadzone u 11 pacjentek (3,00%). Powyższe dane zostały zestawione w tabeli 11.

Tabela 11. Charakterystyka danych klinicznych kobiet z badanej grupy (n=367).

Dane kliniczne pacjentek	średnia ± SD	mediana	min	max	rozstęp
Wiek (lata)	30,89 ± 4,82	31,00	19,00	45,00	26,00
RR skurczowe (mmHg)	114,16 ± 12,60	113,00	80,00	180,00	100,00
RR rozkurczowe (mmHg)	71,89 ± 9,67	70,00	50,00	120,00	70,00
Wzrost (cm)	167,92 ± 6,13	168	153,00	187,00	34,00
Masa przed ciążą (kg)	74,71 ± 17,13	73,00	45,00	137,00	92,00
Masa pod koniec ciąży (kg)	89,26 ± 18,04	89,00	53,00	162,00	109,00
Liczba przebytych ciąż	2,01 ± 1,10	2,00	1,00	9,00	8,00
BMI przed ciążą (kg/m ²)	26,44 ± 5,70	25,86	16,65	35,55	18,90
BMI pod koniec ciąży (kg/m ²)	31,60 ± 5,91	31,25	19,13	57,16	38,03
Różnica BMI (kg/m ²)	5,19 ± 2,29	5,07	0,00	12,86	12,86
Różnica masy ciała (kg)	14,64 ± 6,46	14,31	0,00	39,00	39,00
Pierwiastki n (%)	132 (35,97%)				
Wieloródki	235 (64,03%)				
Sposób ukończenia ciąży n (%)	180 (49,05%)				
poród samoistny	176 (47,95%)				
cięcie cesarskie	11 (3,00%)				
inne operacyjne					

Przeprowadzono również analizę danych klinicznych noworodków kobiet z badanej grupy (tabela 12). Masa ciała noworodka wynosiła od 1695 do 4950 g (średnia $3498,66 \pm 550,76$ g), natomiast masa łożyska od 310 do 1140 g (średnia $596,90 \pm 110,07$ g). Punktacja noworodka w skali Apgar wynosiła średnio $9,63 \pm 1,03$ w 1 minucie oraz $9,88 \pm 0,66$ w 5 minucie, a pH żylny i tętniczy wynosiło średnio odpowiednio $7,30 \pm 0,08$ oraz $7,29 \pm 0,09$. Poród następował pomiędzy 37 a 42 tygodniem ciąży (średnio $39,03 \pm 1,19$ tc.). Sto osiemdziesiąt dziewięć kobiet (51,50%) urodziło noworodki płci męskiej, natomiast 178 kobiet (48,50%) urodziło noworodki płci żeńskiej. Omówione dane kliniczne zestawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Charakterystyka porównawcza noworodków z badanej grupy (n=367).

Dane kliniczne noworodków	średnia $\pm$ SD	mediana	min	max	rozstęp
Masa (g)	$3498,66 \pm 550,76$	3540,00	1695,00	4950,00	3255,00
Apgar w 1 minucie	$9,63 \pm 1,03$	10,00	2,00	10,00	8,00
Apgar w 5 minucie	$9,88 \pm 0,66$	10,00	6,00	10,00	4,00
pH żylny	$7,30 \pm 0,08$	7,31	7,00	7,54	0,54
pH tętniczy	$7,29 \pm 0,09$	7,30	7,00	7,53	0,53
Masa łożyska (g)	$596,90 \pm 110,07$	600,00	310,00	1140,00	830,00
Tydzień zakończenia ciąży (tc)	$39,03 \pm 1,19$	39,00	37,00	42,00	5,00
Płeć noworodka n (%) córnka syn	178 (48,50%) 189 (51,50%)				

Analizując dane kliniczne w grupach wyodrębnionych na podstawie przyrostu masy w ciąży, nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych dla średnich wartości wieku, ciśnienia tętniczego skurczowego oraz rozkurczowego u pacjentek. Najwyższe skurczowe ciśnienie tętnicze krwi obserwowano w grupie EGWG z nadmiernym przyrostem masy ciała ($115,70 \pm 13,30$ mmHg, $p=0,042$).

Pacjentki w grupie EGWG były średnio wyższe ($169,08 \pm 6,03$ cm) od pacjentek z grupy IGWG ($166,69 \pm 5,99$ cm) oraz pacjentek z grupy NGWG ($166,52 \pm 6,03$ cm) ($p=0,0005$). Istotne statystycznie różnice obserwowano w badanych grupach w zakresie masy ciała oraz wskaźnika BMI przed i pod koniec ciąży ($p<0,001$).

Ciekawą obserwacją było odnotowanie największej liczby porodów samoistnych

u pacjentek z grupy kobiet z prawidłowym przyrostem masy ciała w ciąży (53 kobiety, 55,21%). U ponad 50% kobiet z nadmiernym przyrostem masy ciała oraz ze zbyt małym przyrostem masy ciała ciążę ukończono na drodze cięcia cesarskiego (odpowiednio 52,55% w grupie EGWG oraz 54,67% w grupie IGWG). Najwięcej pierwiastek odnotowano w grupie z nadmiernym przyrostem masy ciała (39,80%), a najwięcej wieloródek stwierdzono w grupie kobiet z prawidłowym przyrostem masy ciała w ciąży (69,79%). Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 13.

W dalszej kolejności analizowano dane kliniczne noworodków w wyodrębnionych grupach. Odnotowano różnice statystycznie istotne w zakresie masy ciała noworodków oraz tygodnia zakończenia ciąży. Największą masę ciała wykazywały noworodki pacjentek z grupy EGWG ($3601,04 \pm 553,59$ g), najmniejszą noworodki pacjentek z grupy IGWG ($3328,72 \pm 496,69$ g) ($p=0,0003$). Pacjentki z grup ze zbyt małym oraz prawidłowym przyrostem masy ciała w ciąży rodziły średnio w 38 tygodniu (odpowiednio $38,64 \pm 0,99$ tc. oraz $38,93 \pm 1,16$ tc.), natomiast pacjentki z nadmiernym przyrostem masy ciała kończyły ciążę później - średnio w 39 tygodniu ciąży ($39,23 \pm 1,24$ tc.) ($p=0,0008$).

Nie wykazano różnic istotnych statystycznie w zakresie punktacji noworodków w skali Apgar pomiędzy badanymi grupami kobiet, natomiast w grupie kobiet EGWG obserwowano najmniejszą wartość pH tętniczego ($p=0,012$) oraz największą średnią wartość masy łożyska ($p=0,034$).

Omawiane parametry kliniczne noworodków przedstawiono w tabeli 14.

Tabela 13. Dane kliniczne pacjentek w grupach wydzielonych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży.

<i>Dane kliniczne pacjentek</i>	<i>IGWG (A) (n=75)</i>	<i>NGWG (B) (n=96)</i>	<i>EGWG (C) (n=196)</i>	<i>p (Anova)</i>	<i>p TukeyHSD</i>
Wiek (lata) średnia $\pm$ SD mediana (min – max)	30,88 $\pm$ 4,58 30,00 (19,00 – 43,00)	31,06 $\pm$ 4,48 31,00 (20,00 – 40,00)	30,81 $\pm$ 5,09 30,00 (19,00 – 45,00)	0,913	B – C 0,905 A – C 0,993 A – B 0,967
RR skurczowe (mmHg) średnia $\pm$ SD mediana (min – max)	112,21 $\pm$ 12,70 110,00 (90,00 – 150,00)	112,52 $\pm$ 10,57 110,00 (80,00 – 130,00)	115,70 $\pm$ 13,30 115,00 (80,00 – 180,00)	0,042	B – C 0,105 A – C 0,102 A – B 0,986
RR rozkurczowe (mmHg) średnia $\pm$ SD mediana (min – max)	70,00 $\pm$ 9,23 70,00 (50,00 – 97,00)	70,76 $\pm$ 8,85 70,00 (60,00 – 90,00)	72,65 $\pm$ 10,19 70,00 (50,00 – 120,00)	0,253	B – C 0,261 A – C 0,582 A – B 0,918
Wzrost (cm) średnia $\pm$ SD mediana (min – max)	166,69 $\pm$ 5,99 167,00 (153,00 – 183,00)	166,52 $\pm$ 6,03 167,00 (155,00 – 180,00)	169,08 $\pm$ 6,03 169,00 (153,00 – 187,00)	0,0005	B – C 0,002 A – C 0,011 A – B 0,981
Masa przed ciążą (kg) średnia $\pm$ SD mediana (min – max)	66,96 $\pm$ 15,52 65,00 (54,00 – 119,00)	69,94 $\pm$ 17,96 64,00 (46,00 – 118,00)	80,00 $\pm$ 15,47 80,00 (49,00 – 137,00)	< 0,001	B – C < 0,001 A – C < 0,001 A – B 0,457
Masa pod koniec ciąży (kg) średnia $\pm$ SD mediana (min – max)	73,91 $\pm$ 13,19 73,00 (53,00 – 122,00)	81,83 $\pm$ 15,18 78,00 (60,00 – 124,00)	98,77 $\pm$ 14,96 99,00 (67,00 -162,00)	< 0,001	B – C < 0,001 A – C < 0,001 A – B 0,001
BMI przed ciążą (kg/m²) średnia $\pm$ SD mediana (min – max)	24,05 $\pm$ 5,23 22,72 (16,65 – 42,32)	25,16 $\pm$ 6,05 22,76 (18,08 – 40,40)	27,98 $\pm$ 5,23 27,62 (18,56 – 52,20)	< 0,001	B – C < 0,001 A – C < 0,001 A – B 0,382
BMI pod koniec ciąży (kg/m²) średnia $\pm$ SD mediana (min – max)	26,55 $\pm$ 4,23 25,80 (19,13 – 39,86)	29,47 $\pm$ 5,00 28,00 (22,28 – 42,61)	34,57 $\pm$ 5,08 34,69 (24,51 – 57,16)	< 0,001	B – C < 0,001 A – C < 0,001 A – B 0,0004

cd. **Tabela 13.** Dane kliniczne pacjentek w grupach wydzielonych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży.

<i>Dane kliniczne pacjentek</i>	<i>IGWG (A) (n=75)</i>	<i>NGWG (B) (n=96)</i>	<i>EGWG (C) (n=196)</i>	<i>p (Anova)</i>	<i>p TukeyHSD</i>
Różnica BMI (kg/m²)				< 0,001	B – C < 0,001
średnia ± SD	2,68 ± 1,10	4,31 ± 1,31	6,59 ± 1,94		A – C < 0,001
mediana (min – max)	2,63 (0,00 – 4,93)	4,64 (1,58 – 6,81)	6,25 (3,40 – 12,86)		A – B < 0,001
Różnica masy ciała (kg)				< 0,001	B – C < 0,001
średnia ± SD	7,40 ± 2,96	11,90 ± 3,47	18,76 ± 5,31		A – C < 0,001
mediana (min – max)	7,00 (0,00 – 12,00)	13,00 (5,00 – 17,00)	18,00 (10,00 – 39,00)		A – B < 0,001
Pierwiastki	25 (33,33%)	29 (30,21%)	78 (39,80%)	0,2393*	B – C 0,122*
Wieloródki	50 (66,67%)	67 (69,79%)	118 (60,20%)		A – C 0,401*
					A – B 0,741*
Sposób ukończenia ciąży n (%)				0,3635*	B – C 0,262*
poród samoistny	34 (45,33%)	53 (55,21%)	93 (47,45%)		A – C 0,787*
porody operacyjne	41 (54,67%)	43 (44,79%)	103 (52,55%)		A – B 0,220*

*p Fisher

Tabela 14. Dane kliniczne noworodków w grupach kobiet wydzielonych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży.

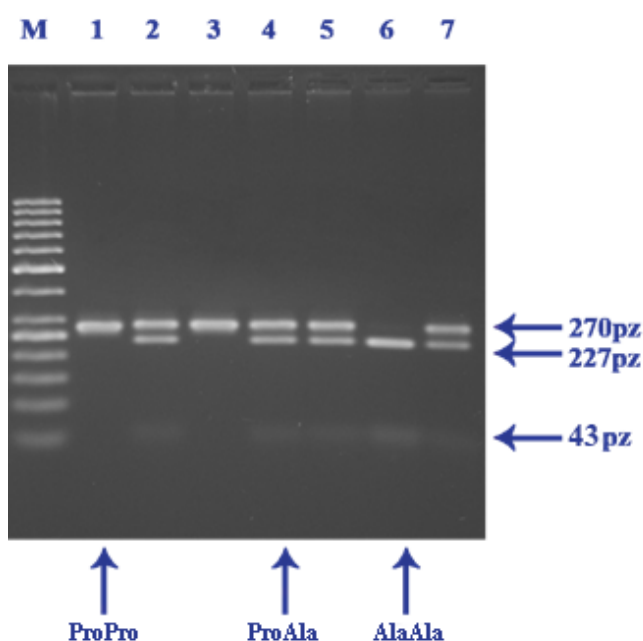
<i>Dane kliniczne</i>	<i>IGWG (A) (n=75)</i>	<i>NGWG (B) (n=96)</i>	<i>EGWG (C) (n=196)</i>	<i>p (Anova)</i>	<i>p TukeyHSD</i>
Masa (g) średnia ± SD mediana (min – max)	3328,72 ± 496,69 3295,0 (1950,0 – 4440,0)	3420,00 ± 544,61 3495,0 (1800,0 – 3150,0)	3601,04 ± 553,59 3660,0 (1695,0 – 4840,0)	0,0003	B – C 0,022 A – C 0,0007 A – B 0,522
Tydzień zakończenia ciąży średnia ± SD mediana (min – max)	38,64 ± 0,99 39,00 (37,00 – 41,00)	38,93 ± 1,16 39,00 (37,00 – 41,00)	39,23 ± 1,24 39,00 (37,00 – 42,00)	0,0008	B – C 0,103 A – C 0,0007 A – B 0,250
Apgar w 1 minucie średnia ± SD mediana (min – max)	9,73 ± 0,82 10,00 (5,00 – 10,00)	9,61 ± 1,13 10,00 (3,00 – 10 ,00)	9,61 ± 1,06 10,00 (2,00 – 10,00)	0,676	B – C 0,999 A – C 0,684 A – B 0,724
Apgar w 5 minucie minucie średnia ± SD mediana (min – max)	9,92 ± 0,40 10,00 (7,00 – 10,00)	9,86 ± 0,56 10,00 (6,00 – 10,00)	9,93 ± 0,30 10,00 (8,00 – 10,00)	0,361	B – C 0,331 A – C 0,961 A – B 0,633
pH żyłne średnia ± SD mediana (min – max)	7,30 ± 0,08 7,30 (7,09 – 7,45)	7,30 ± 0,09 7,30 (7,05 – 7,54)	7,30 ± 0,08 7,32 (7,00 – 7,51)	0,602	B – C 0,676 A – C 0,716 A – B 0,999
pH tętnicze średnia ± SD mediana (min – max)	7,30 ± 0,09 7,31 (7,11 – 7,47)	7,30 ± 0,08 7,31 (7,10 – 7,52)	7,27 ± 0,09 7,28 (7,00 – 7,53)	0,012	B – C 0,047 A – C 0,041 A – B 0,973
Masa łóżyska (g) średnia ± SD mediana (min – max)	569,86 ± 96,62 555,00 (360,00 – 890,00)	594,05 ± 111,39 590,00 (330,00 – 1100,00)	608,65 ± 112,84 600,00 (310,00 – 1140,00)	0,034	B – C 0,539 A – C 0,027 A – B 0,330
Płeć noworodka córką syn	42 (56,00%) 33 (44,00%)	48 (50,00%) 48 (50,00%)	88 (44,90%) 108 (55,10%)	0,251*	B – C 0,454* A – C 0,106* A – B 0,445*

*p Fisher

5.3. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów genu *PPARG*

W kolejnej części pracy analizowano częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmów *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG* u wszystkich 367 pacjentek zakwalifikowanych do badania.

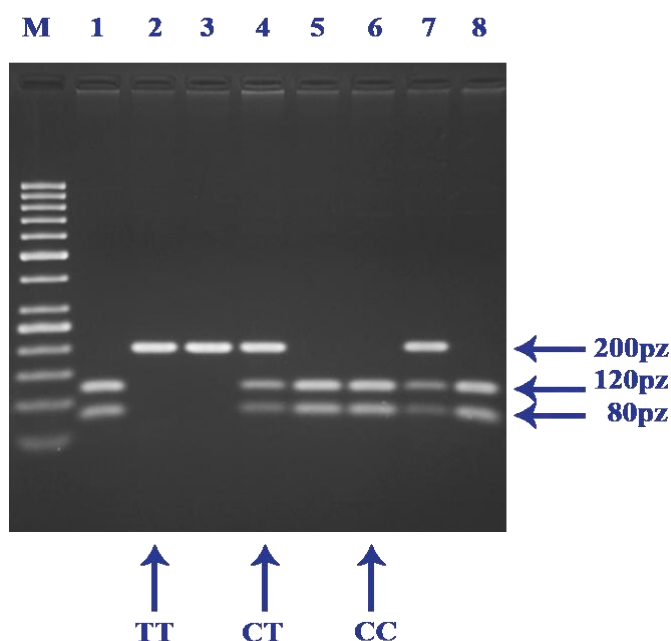
Przykładowy obraz prążków uzyskanych po rozkładzie elektroforetycznym dla poszczególnych genotypów w zakresie polimorfizmu *Pro12Ala* genu *PPARG* pokazuje rycina 11. Po hydrolizie enzymem restrykcyjnym Bsh1236I (BstUI) (ThermoScientific, USA) odczytywano uzyskiwane genotypy. Dla genotypu homozygotycznego niezmutowanego *Pro/Pro* z uwagi na brak miejsca restrykcyjnego otrzymywano jeden prążek o wielkości 270 pz. Genotyp homozygotyczny zmutowany *Ala/Ala* odczytywano na podstawie obecności dwóch prążków odpowiadających fragmentom 227 oraz 43 pz. Trzy prążki 270, 227 i 43 par zasad otrzymywano w przypadku genotypu heterozygotycznego *Pro/Ala*.



Rycina 11. Analiza genotypów polimorfizmu *Pro12Ala* genu *PPARG* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym Bsh1236I (BstUI). Tor 1 marker wielkości 50 pz, tor 1, 3 to homozygoty niezmutowane *Pro/Pro*, tor 2, 4, 5, 7, heterozygoty *Pro/Ala*, tor 6 to homozygota zmutowana *Ala/Ala*.

Do analizy polimorfizmu *161C>T* genu *PPARG* stosowano enzym restrykcyjny Eco72I (PmlI) (ThermoScientific, USA). Rycina 12 przedstawia przykładowy wynik rozkładu genotypów dla tego polimorfizmu. Przy obecności homozygotycznego genotypu niezmutowanego *161CC*, uzyskiwano na żelu dwa prążki o wielkości 120 i 80 par zasad. Heterozygotyczny genotyp *161CT* odczytywano przy obecności trzech fragmentów

o wielkościach 200, 120 i 80 par zasad. Genotyp homozygotyczny zmutowany *161TT* odczytywano przy obecności jednego prążka wielkości 200 par zasad (brak miejsca hydrolizy przez enzym restrykcyjny).



Rycina 12. Analiza genotypów polimorfizmu *161C>T* genu *PPARG* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym Eco72I (PmlI). Tor 1 marker wielkości 50 pz, tory 1, 5,6,8 to homozygoty niezmutowane *CC*, tory 4, 7, heterozygoty *CT*, tory 2,3 homozygoty zmutowane *TT*.

W zakresie polimorfizmu *Pro12Ala* genotyp typu dzikiego stwierdzono u 239 kobiet (65,12%), genotyp heterozygotyczny u 111 kobiet (30,25%) oraz genotyp homozygotyczny zmutowany u 17 (4,63%) kobiet.

Dla drugiego z badanych polimorfizmów *161C>T* genu *PPARG* genotypy występowały odpowiednio: genotyp niezmutowany *161CC* u 250 (68,12%) kobiet, genotyp heterozygotyczny *161CT* u 103 (28,07%) oraz genotyp homozygotyczny zmutowany *161TT* u 14 pacjentek (3,81%). Wartości oczekiwane i obserwowane genotypów badanych polimorfizmów spełniały założenia prawa Hardy'ego-Weinberga (HWE dla *Pro12Ala* $p=0,38$, dla *161C>T* $p=0,41$) (tabela 15).

Tabela 15. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów *PPARG* w grupie 367 kobiet.

<i>Pro12Ala (rs1801282)</i>		<i>161C>T (rs3856806)</i>	
<i>Genotypy</i>	<i>n (%)</i>	<i>Genotypy</i>	<i>n (%)</i>
<i>Pro/Pro</i>	239 (65,12%)	<i>CC</i>	250 (68,12%)
<i>Pro/Ala</i>	111 (30,25%)	<i>CT</i>	103 (28,07%)
<i>Ala/Ala</i>	17 (4,63%)	<i>TT</i>	14 (3,81%)
Suma	367 (100,00%)	Suma	367 (100,00%)
<i>Allele</i>	<i>n (%)</i>	<i>Allele</i>	<i>n (%)</i>
<i>Pro</i>	589 (80,25%)	<i>C</i>	603 (82,15%)
<i>Ala</i>	145 (19,75%)	<i>T</i>	131 (17,85%)
Suma	734 (100,00%)	Suma	734 (100,00%)
HWE $p=0,38$		HWE $p=0,41$	

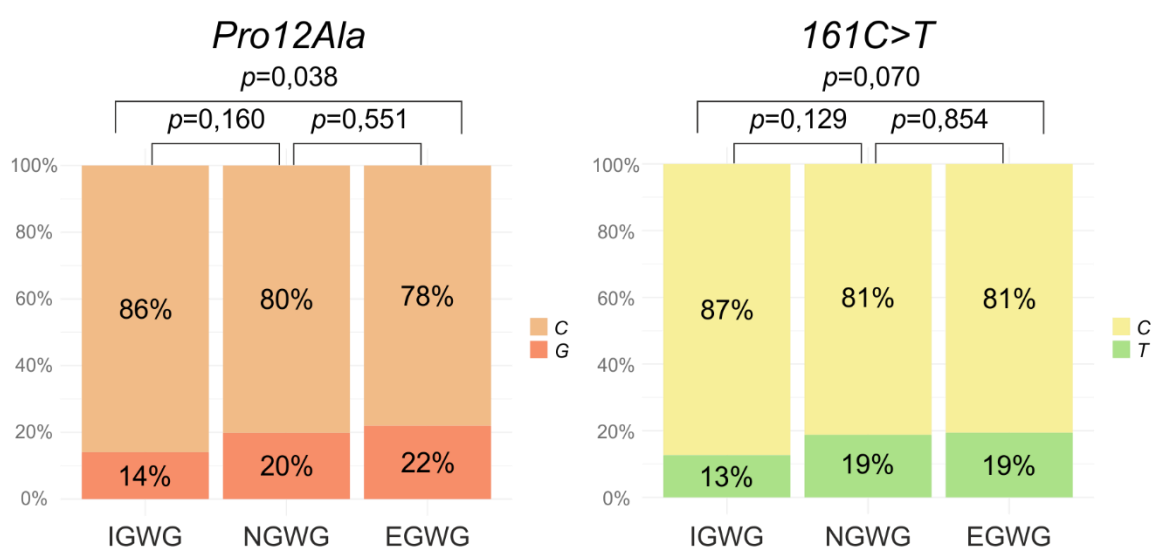
W dalszej części pracy analizowano częstości występowania genotypów i alleli badanych wariantów genetycznych w grupach wyodrębnionych ze względu na przyrost masy ciała w ciąży (tabela 16). Rozkład genotypów analizowanych polimorfizmów był zgodny z prawem Hardy-Weinberga (HWE) we wszystkich grupach kobiet ($p>0,05$).

W zakresie polimorfizmu *Pro12Ala* zaobserwowano częstsze występowanie niezmutowanego genotypu *Pro/Pro* w grupie ciężarnych ze zbyt małym przyrostem masy ciała w ciąży (56 kobiet, 74,7%) w stosunku do grupy z prawidłowym (62 pacjentki, 64,6%) oraz nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży (121 pacjentek, 61,7%). Genotypy zawierające zmutowany allel *Ala* najczęściej występowały u kobiet z nadmiernym ciążowym przyrostem masy ciała (genotyp *Pro/Ala*: 32,7% vs. 31,2% i 22,7% i genotyp *Ala/Ala*: 5,6% vs. 4,2% i 2,7% odpowiednio u kobiet z grup EGWG i IGWG). Różnice te jednak nie były statystycznie istotne.

Analizując częstość występowania allela *Pro* oraz zmutowanego allela *Ala* polimorfizmu *Pro12Ala* genu *PPARG* nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych pomiędzy grupą kobiet z prawidłowym a grupami ze zbyt małym i nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży (allel *Ala*: 19,8% w grupie NGWG vs. 14,0% u kobiet IGWG oraz 21,9% u kobiet z grupy EGWG). Natomiast różnicę statystycznie istotną zaobserwowano porównując grupę kobiet ze zbyt małym z grupą z nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży. Allel *Ala* zwiększał ryzyko nadmiernego przyrostu masy ciała w ciąży o 73% w porównaniu do grupy IGWG (OR=1,73, 95%PU 1,03-2,90, $p=0,038$). Również w modelu dominującym (*Pro/Pro*

vs. *Pro/Ala* i *Ala/Ala*) w zakresie tego polimorfizmu odnotowano różnicę statystycznie istotną (OR=1,83, 95%PU: 1,01-3,31, $p=0,042$).

Dla wariantu *161C>T* genu *PPARG* zaobserwowano, że genotyp zawierający oba zmutowane allele *161TT* występował najczęściej w grupie kobiet z nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży (5,1% vs. 4,2% u kobiet z prawidłowym, OR=0,81, 95%PU 0,25-2,69). Genotyp ten nie występował u żadnej kobiety ze zbyt małym przyrostem masy ciała w ciąży. Również w przypadku rozkładu alleli zaobserwowano częstsze występowanie zmutowanego allele *T* w grupie z nadmiernym przyrostem masy ciała (19,4%), w porównaniu do grup z prawidłowym (18,8%) oraz zbyt małym przyrostem masy ciała w ciąży (12,7%) (IGWG vs. EGWG: OR=1,72, 95%PU 0,95-3,12, $p=0,07$). Analiza przy założeniu zarówno modelu dominującego jak i recesywnego, nie wykazała związku tego wariantu ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nadmiernego przyrostu masy ciała w ciąży. Częstość występowania alleli badanych wariantów genu *PPARG* przedstawiono graficznie na ryc. 13.



Rycina 13. Częstość występowania alleli badanych wariantów genu *PPARG* w grupach wyodrębnionych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży.

Tabela 16. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów genu *PPARG* u kobiet w grupach wydzielonych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży.

SNP	Genotyp	IGWG (n=75)	NGWG (n=96)	EGWG (n=196)	IGWG vs. NGWG		EGWG vs. NGWG		IGWG vs. EGWG	
					OR (95%PU)	p	OR (95%PU)	p	OR (95%PU)	p
Pro12Ala (rs1801282)	Pro/Pro	56 (74,7)	62 (64,6)	121 (61,7)	1,00	0,360	1,00	0,821	1,00	0,112
	Pro/Ala	17 (22,7)	30 (31,3)	64 (32,7)	1,59 (0,79-3,20)		0,91 (0,54 – 1,56)		1,74 (0,94-3,24)	
	Ala/Ala	2 (2,6)	4 (4,1)	11 (5,6)	1,81 (0,32-10,24)		0,71 (0,22 – 2,32)		2,55 (0,55-11,87)	
Allele	Pro	129 (86,0)	154 (80,2)	306 (78,1)	1,00	0,160	1,00	0,551		0,038
	Ala	21 (14,0)	38 (19,8)	86 (21,9)	1,52 (0,85-2,71)		0,88 (0,57 – 1,35)		1,73 (1,03- 2,90)	
Model dominujący		19 (25,3)	34 (35,4)	75 (38,3)	1,62 (0,83-3,15)	0,155	0,88 (0,53 - 1,47)	0,636	1,83 (1,01-3,31)	0,042
Model recesywny		73 (97,3)	92 (95,8)	185 (94,4)	1,59 (0,28-8,91)	0,592	0,73 (0,23 - 2,36)	0,593	2,17 (0,47-10,03)	0,283
161C>T (rs3856806)	CC	56 (74,7)	64 (66,7)	130 (66,3)	1,00	0,171	1,00	0,937	1,00	0,105
	CT	19 (25,3)	28 (29,2)	56 (28,6)	1,29 (0,65-2,56)		1,02 (0,59 - 1,75)		1,27 (0,69-2,33)	
	TT	0 (0,0)	4 (4,1)	10 (5,1)	—		0,81 (0,25 - 2,69)		—	
Allele	C	131 (87,3)	156 (81,2)	316 (80,6)	1,00	0,129	1,00	0,854	1,00	0,070
	T	19 (12,7)	36 (18,8)	76 (19,4)	1,59 (0,87-2,91)		0,96 (0,62 – 1,49)		1,72 (0,95- 3,12)	
Model dominujący		19 (25,3)	32 (33,3)	66 (33,7)	1,47 (0,75-2,88)	0,254	0,98 (0,59 - 1,65)	0,954	1,50 (0,82-2,72)	0,180
Model recesywny		75 (100,0)	92 (95,8)	186 (94,9)	—	—	0,81 (0,25 - 2,65)	0,722	1,00	—

Pro12Ala HWE w grupach: IGWG $p=0,611$, NGWG $p=0,878$, EGWG $p=0,514$

161C>T HWE: IGWG Pearson's $p=0,209$, NGWG $p=0,675$, EGWG $p=0,229$

p Pearson

Przeanalizowano również częstość występowania genotypów badanych wariantów genu *PPARG* w grupach wyodrębnionych ze względu na przedciążową wartość wskaźnika BMI (tabela 17). Zaobserwowano, że genotypy zawierające zmutowany allel *Ala* częściej występowały u kobiet otyłych przed ciążą w porównaniu z osobami z prawidłową masą ciała przed ciążą (46,7% vs. 29,7%, OR=2,07, $p=0,006$) (tab. 17). W grupie kobiet z prawidłowym przyrostem masy ciała w ciąży oba zmutowane warianty (*Ala* i *161T*) genu *PPARG* występowały z tą samą częstością – 0,1677).

Tabela 17. Częstość występowania genotypów polimorfizmów genu *PPARG* u kobiet w grupach wydzielonych w zależności od przedciążowego wskaźnika BMI.

<i>Pro12Ala</i>	<i>Pro/Pro</i>	<i>Pro/Ala+Ala/Ala</i>	<i>OR (95%PU)</i>	<i>p</i>
Prawidłowa masa ciała (n=158)	111 (70,3%)	47 (29,7%)	1,00	—
Niedowaga (n=11)	8 (72,7%)	3 (27,3%)	0,89 (0,23-3,49)	0,862
Nadwaga (n=93)	64 (68,8%)	29 (31,2%)	1,07 (0,61-1,87)	0,811
Otyłość (n=105)	56 (53,3%)	49 (46,7%)	2,07 (1,24-3,45)	0,006
<i>161C>T</i>	<i>CC</i>	<i>CT+TT</i>	<i>OR (95%PU)</i>	<i>p</i>
Prawidłowa masa ciała (n=158)	112 (70,9%)	46 (29,1%)	1,00	—
Niedowaga (n=11)	9 (81,8%)	2 (18,2%)	0,54 (0,11-2,60)	0,443
Nadwaga (n=93)	63 (67,7%)	30 (32,3%)	1,16 (0,67-2,02)	0,600
Otyłość (n=105)	66 (62,9%)	39 (37,1%)	1,44 (0,85-2,43)	0,174

5.4. Asocjacje parametrów antropometrycznych z polimorfizmami genu *PPARG*

W tabelach 18 i 19 przedstawiono wyniki asocjacji średnich wartości parametrów klinicznych matek i ich noworodków dla poszczególnych genotypów badanych wariantów genu *PPARG* w wyodrębnionych ze względu na przyrost masy ciała w ciąży grupach kobiet. Ze względu na niską częstość występowania genotypów homozygotycznych zmutowanych dane przedstawiono tylko w modelu dominującym.

Analizując wariant *Pro12Ala* nie zaobserwowano dla średnich wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego krwi różnic statystycznie istotnych pomiędzy badanymi grupami kobiet. Średnie masy ciała kobiet oraz ich BMI przed ciążą w grupie ze zbyt małym przyrostem masy ciała nie różniły się istotnie od tych uzyskanych w grupie z prawidłowym, natomiast były statystycznie istotne w porównaniu z kobietami

nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży. Pacjentki z genotypami *Pro/Ala* i *Ala/Ala* w grupie EGWG miały statystycznie istotne wyższe średnie masy ciała i BMI przed ciążą, w porównaniu z grupą NGWG, natomiast dla nosicielek genotypu *Pro/Pro* BMI przed ciążą nie różniło się istotnie ($25,22 \pm 5,95$ w grupie NGWG vs. $26,90 \pm 4,65 \text{ kg/m}^2$ w grupie EGWG, $p=0,089$). Średnia masa ciała i wartość BMI pod koniec trwania ciąży różniły się statystycznie u kobiet z prawidłowym oraz zbyt małym przyrostem, w porównaniu z grupą z nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży ($p<0,001$). Grupy IGWG i EGWG różniły się pod względem masy ciała i wartości BMI pod koniec ciąży u pacjentek z genotypem *Pro/Pro*, natomiast nie odnotowano różnicy statystycznie istotnej u nosicielek genotypów *Pro/Ala+Ala/Ala* (dla masy ciała $p=0,099$, dla BMI $p=0,183$). Jedyne obserwowane statystycznie istotne różnice dla średniej masy urodzeniowej noworodka i masy łożyska oraz tygodnia zakończenia ciąży dotyczyły kobiet z genotypem *Pro/Pro* w grupach ze zbyt małym i nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży (odpowiednio $p=0,005$, $p=0,022$ oraz $p=0,013$).

Dla polimorfizmu *161C>T* genu *PPARG* różnice statystycznie istotne odnotowano dla średnich wartości ciśnienia skurczowego krwi u kobiet z genotypami *161CT* i *161TT* w grupie z nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży, w porównaniu z pozostałymi pacjentkami ($120,23 \pm 13,54 \text{ mmHg}$ vs. $112,21 \pm 12,39 \text{ mmHg}$ w IGWG, $p=0,037$ i $113,78 \pm 9,39 \text{ mmHg}$ w NGWG, $p=0,045$). Podobnie jak w przypadku wariantu *Pro12Ala* średnia masa ciała oraz wartość BMI przed ciążą w grupie IGWG nie różniły się istotnie od tych uzyskanych w grupie z NGWG. Statystycznie istotne były natomiast średnie tych wartości w grupie z nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży, w porównaniu z grupami NGWG i IGWG. Masa ciała i wartość BMI pod koniec trwania ciąży różniły się statystycznie u kobiet nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży i pozostałymi grupami ($p<0,001$). Wszystkie średnie różnice BMI pomiędzy badanymi grupami były również statystycznie istotne. U nosicielek genotypu homozygotycznego niezmutowanego *161CC* różnice statystycznie istotne występowały u kobiet z grup IGWG vs. NGWG (dla masy ciała $p=0,014$, dla BMI $p<0,001$). Również dla genotypu *161CC* zaobserwowano istotne różnice średnich mas noworodków ($p=0,001$) i łożysk ($p=0,007$) w grupach IGWG vs. EGWG (tab. 18, tab. 19).

Tabela 18. Średnie wartości danych klinicznych pacjentek dla poszczególnych genotypów polimorfizmu *Pro12Ala* genu *PPARG* u kobiet w grupach wydzielonych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży.

<i>Parametr</i>	<i>Genotyp</i>	<i>IGWG</i> (<i>n</i> =75)	<i>NGWG</i> (<i>n</i> =96)	<i>EGWG</i> (<i>n</i> =196)	<i>Anova</i>	<i>IGWG</i> vs. <i>NGWG</i>	<i>EGWG</i> vs. <i>NGWG</i>	<i>IGWG</i> vs. <i>EGWG</i>
		<i>średnia ± SD</i>	<i>średnia ± SD</i>	<i>średnia ± SD</i>	<i>p</i>	<i>p*</i>	<i>p*</i>	<i>p*</i>
RR skurczowe (mmHg)	<i>Pro/Pro</i>	111,50 ± 12,88	111,65 ± 10,55	113,86 ± 12,32	0,342	0,998	0,467	0,446
	<i>Pro/Ala +Ala/Ala</i>	114,32 ± 12,25	114,12 ± 10,59	118,67 ± 14,34	0,169	0,998	0,219	0,405
RR rozkurczowe (mmHg)	<i>Pro/Pro</i>	70,96 ± 9,52	68,95 ± 8,26	71,23 ± 9,59	0,272	0,466	0,257	0,983
	<i>Pro/Ala +Ala/Ala</i>	72,47 ± 8,44	74,06 ± 9,07	74,93 ± 10,76	0,624	0,846	0,907	0,607
Masa przed ciążą (kg)	<i>Pro/Pro</i>	67,25 ± 14,82	69,27 ± 16,74	76,63 ± 13,95	< 0,001	0,742	0,005	< 0,001
	<i>Pro/Ala +Ala/Ala</i>	66,11 ± 17,84	71,15 ± 20,22	85,45 ± 16,33	< 0,001	0,580	< 0,001	< 0,001
Masa pod koniec ciąży (kg)	<i>Pro/Pro</i>	74,25 ± 12,44	81,29 ± 14,01	95,84 ± 13,02	< 0,001	0,011	< 0,001	< 0,001
	<i>Pro/Ala +Ala/Ala</i>	72,89 ± 15,53	82,82 ± 17,28	103,48 ± 16,69	< 0,001	0,099	< 0,001	< 0,001
BMI przed ciążą (kg/m ²)	<i>Pro/Pro</i>	24,08 ± 4,99	25,22 ± 5,95	26,90 ± 4,65	0,002	0,447	0,089	0,002
	<i>Pro/Ala +Ala/Ala</i>	23,95 ± 6,02	25,06 ± 6,32	29,72 ± 5,65	< 0,001	0,790	< 0,001	< 0,001
BMI pod koniec ciąży (kg/m ²)	<i>Pro/Pro</i>	26,60 ± 4,01	29,61 ± 4,93	33,68 ± 4,34	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	<i>Pro/Ala +Ala/Ala</i>	26,41 ± 4,92	29,23 ± 5,17	36,01 ± 5,84	< 0,001	0,183	< 0,001	< 0,001
Różnica BMI (kg/m ²)	<i>Pro/Pro</i>	2,66 ± 1,11	4,39 ± 1,30	6,77 ± 1,97	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	<i>Pro/Ala +Ala/Ala</i>	2,72 ± 1,11	4,17 ± 1,34	6,29 ± 1,87	< 0,001	0,007	< 0,001	< 0,001
Masa noworodka (g)	<i>Pro/Pro</i>	3314,55 ± 500,47	3419,10 ± 578,32	3597,98 ± 572,18	0,005	0,570	0,105	0,005
	<i>Pro/Ala +Ala/Ala</i>	3372,78 ± 496,29	3421,82 ± 484,65	3606,05 ± 525,28	0,095	0,942	0,201	0,196
Masa łożyska (g)	<i>Pro/Pro</i>	566,07 ± 90,12	592,48 ± 121,18	614,92 ± 118,50	0,028	0,419	0,420	0,022
	<i>Pro/Ala +Ala/Ala</i>	581,67 ± 116,68	596,97 ± 92,25	598,57 ± 103,06	0,819	0,867	0,997	0,805
Tydzień zakończenia ciąży (tc)	<i>Pro/Pro</i>	38,66 ± 0,98	38,84 ± 1,17	39,20 ± 1,25	0,010	0,698	0,119	0,013
	<i>Pro/Ala +Ala/Ala</i>	38,56 ± 1,04	39,09 ± 1,13	39,27 ± 1,23	0,075	0,273	0,757	0,061

p Anova *p** test post-hoc Tukeya HSD

Tabela 19. Średnie wartości danych klinicznych pacjentek dla poszczególnych genotypów polimorfizmu *161C>T* genu *PPARG* u kobiet w grupach wydzielonych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży.

<i>Parametr</i>	<i>Genotyp</i>	<i>IGWG</i> (<i>n</i> =75)	<i>NGWG</i> (<i>n</i> =96)	<i>EGWG</i> (<i>n</i> =196)	<i>p</i>	<i>IGWG</i> vs. <i>NGWG</i>	<i>EGWG</i> vs. <i>NGWG</i>	<i>IGWG</i> vs. <i>EGWG</i>
		<i>średnia</i> ± <i>SD</i>	<i>średnia</i> ± <i>SD</i>	<i>średnia</i> ± <i>SD</i>		<i>p</i> *	<i>p</i> *	<i>p</i> *
RR skurczowe (mmHg)	<i>CC</i>	112,21 ± 12,92	111,89 ± 11,14	113,40 ± 12,62	0,678	0,989	0,702	0,819
	<i>CT + TT</i>	112,21 ± 12,39	113,78 ± 9,39	120,23 ± 13,54	0,010	0,899	0,045	0,037
RR rozkurczowe (mmHg)	<i>CC</i>	71,68 ± 9,22	69,30 ± 8,90	71,11 ± 9,47	0,315	0,341	0,409	0,922
	<i>CT + TT</i>	70,37 ± 9,42	73,69 ± 8,11	75,68 ± 10,92	0,120	0,487	0,625	0,107
Masa przed ciążą (kg)	<i>CC</i>	66,98 ± 14,81	69,41 ± 16,84	78,01 ± 14,23	< 0,001	0,654	< 0,001	< 0,001
	<i>CT + TT</i>	66,89 ± 17,88	71,00 ± 20,27	83,94 ± 17,10	< 0,001	0,715	0,004	0,001
Masa pod koniec ciąży (kg)	<i>CC</i>	74,20 ± 12,52	81,23 ± 14,01	97,18 ± 13,92	< 0,001	0,014	< 0,001	< 0,001
	<i>CT + TT</i>	73,05 ± 15,36	83,03 ± 17,45	101,89 ± 16,49	< 0,001	0,099	< 0,001	< 0,001
BMI przed ciążą (kg/m ²)	<i>CC</i>	23,96 ± 4,96	25,32 ± 5,96	27,28 ± 4,67	< 0,001	0,313	0,033	< 0,001
	<i>CT + TT</i>	24,31 ± 6,10	24,85 ± 6,31	29,36 ± 5,97	< 0,001	0,950	0,002	0,005
BMI pod koniec ciąży (kg/m ²)	<i>CC</i>	26,56 ± 4,07	29,65 ± 4,92	34,01 ± 4,54	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	<i>CT + TT</i>	26,52 ± 4,76	29,12 ± 5,21	35,67 ± 5,89	< 0,001	0,243	< 0,001	< 0,001
Różnica BMI (kg/m ²)	<i>CC</i>	2,69 ± 1,04	4,33 ± 1,34	6,73 ± 2,04	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	<i>CT + TT</i>	2,63 ± 1,30	4,27 ± 1,27	6,13 ± 1,70	< 0,001	0,001	< 0,001	< 0,001
Masa noworodka (g)	<i>CC</i>	3315,80 ± 499,86	3453,71 ± 510,05	3626,11 ± 563,61	0,001	0,346	0,096	0,001
	<i>CT + TT</i>	3368,89 ± 498,76	3354,84 ± 609,28	3552,05 ± 534,27	0,181	0,996	0,224	0,426
Masa łożyska (g)	<i>CC</i>	563,75 ± 84,39	597,44 ± 113,73	617,70 ± 117,76	0,010	0,223	0,460	0,007
	<i>CT + TT</i>	588,89 ± 128,61	587,50 ± 108,18	590,83 ± 100,96	0,989	0,999	0,989	0,997
Tydzień zakończenia ciąży (tc)	<i>CC</i>	38,75 ± 0,94	38,90 ± 1,16	39,20 ± 1,23	0,037	0,751	0,231	0,043
	<i>CT + TT</i>	38,28 ± 1,07	38,97 ± 1,18	39,29 ± 1,27	0,009	0,137	0,447	0,007

p Anova *p** testem post-hoc Tukeya HSD

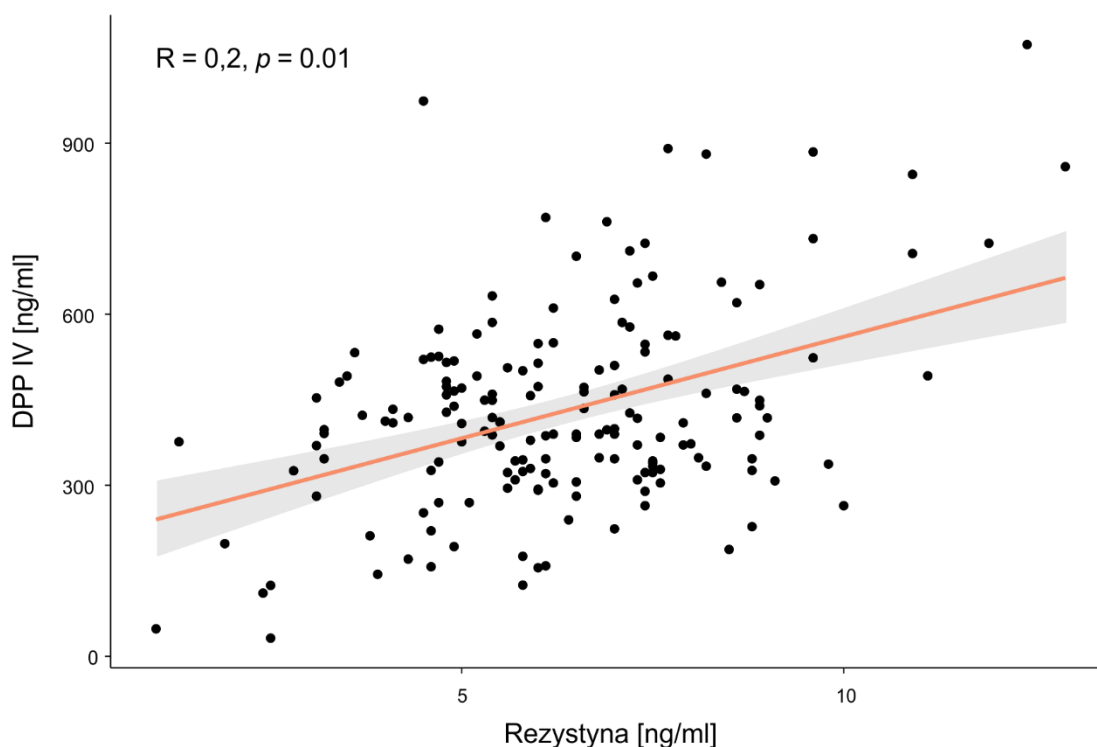
5.5. Ocena stężenia adipokin w badanych grupach ciężarnych

Zbadano stężenie dwóch wybranych adipokin: rezystyny oraz dipeptydyloopeptydazy IV w surowicy krwi u 170 pacjentek. Średnie stężenie rezystyny w całej badanej grupie wynosiło $13,60 \pm 4,86$ ng/ml, rozstęp 35,80 ng/ml, natomiast dipeptydyloopeptydazy IV $447,41 \pm 190,59$ ng/ml, rozstęp 1209,00 ng/ml (tab. 20).

Tabela 20. Wyniki oznaczeń stężeń badanych adipokin w badanej grupie kobiet (n=170).

<i>Adipokina [ng/ml]</i>	<i>średnia $\pm$ SD</i>	<i>mediana</i>	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>rozstęp</i>
Rezystyna	$13,60 \pm 4,86$	13,20	2,00	37,80	35,80
Dipeptydyloopeptydaza IV	$447,41 \pm 190,59$	418,19	31,91	1240,91	1209,00

Ponieważ wartości ocenianych adipokin nie wykazywały rozkładu normalnego w teście Shapiro-Wilka ($p < 0,001$), analizę różnic statystycznych pomiędzy grupami przeprowadzono przy użyciu testów nieparametrycznych. Badając korelację zaobserwowano wyraźną zależność pomiędzy stężeniem rezystyny i dipeptydyloopeptydazy IV w całej badanej grupie kobiet $r = 0,2$ ($p = 0,01$) (ryc.14).



Rycina 14. Korelacja stężenia rezystyny i DPP IV w badanej grupie 170 kobiet.

W dalszej części pracy analizowano stężenia wybranych adipokin w grupach wyodrębnionych ze względu na przyrost masy ciała w ciąży. Wyniki stężeń dla rezystyny i DDP IV uzyskano dla 57 kobiet z nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży, 58 z prawidłowym oraz dla 55 ze zbyt małym przyrostem masy ciała w ciąży i przedstawiono w tabeli 21.

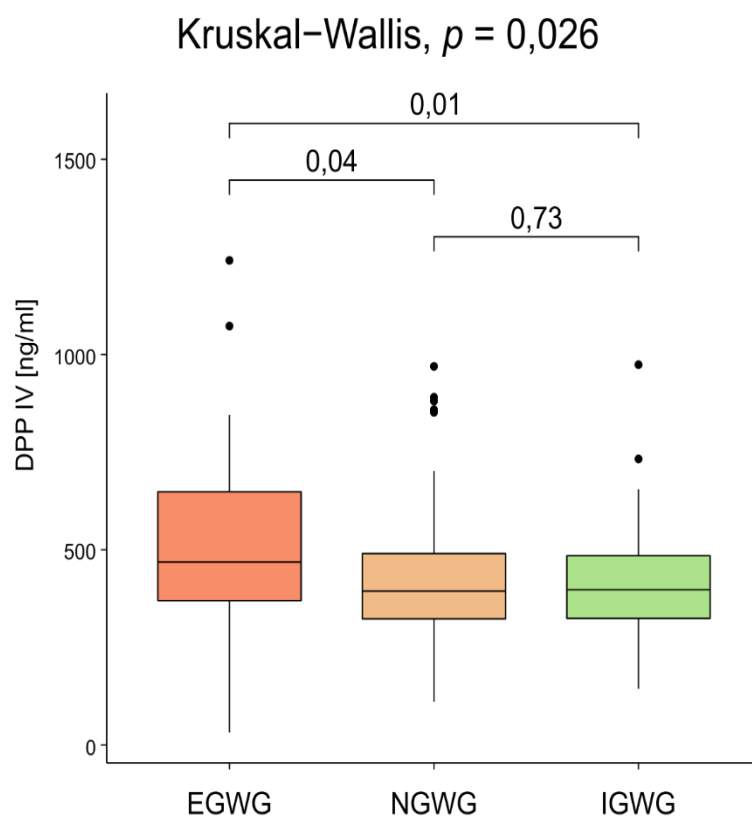
Tabela 21. Wyniki oznaczeń stężeń badanych adipokin w grupach kobiet wyodrębnionych na podstawie przyrostu masy ciała w ciąży.

<i>Adipokina [ng/ml]</i>	<i>IGWG n=55</i>	<i>NGWG n=58</i>	<i>EGWG n=57</i>
Rezystyna	13,39 ± 4,30	13,93 ± 5,79	13,45 ± 4,37
Dipeptydylopeptydaza IV	406,31 ± 148,93	434,45 ± 186,20	500,25 ± 219,71

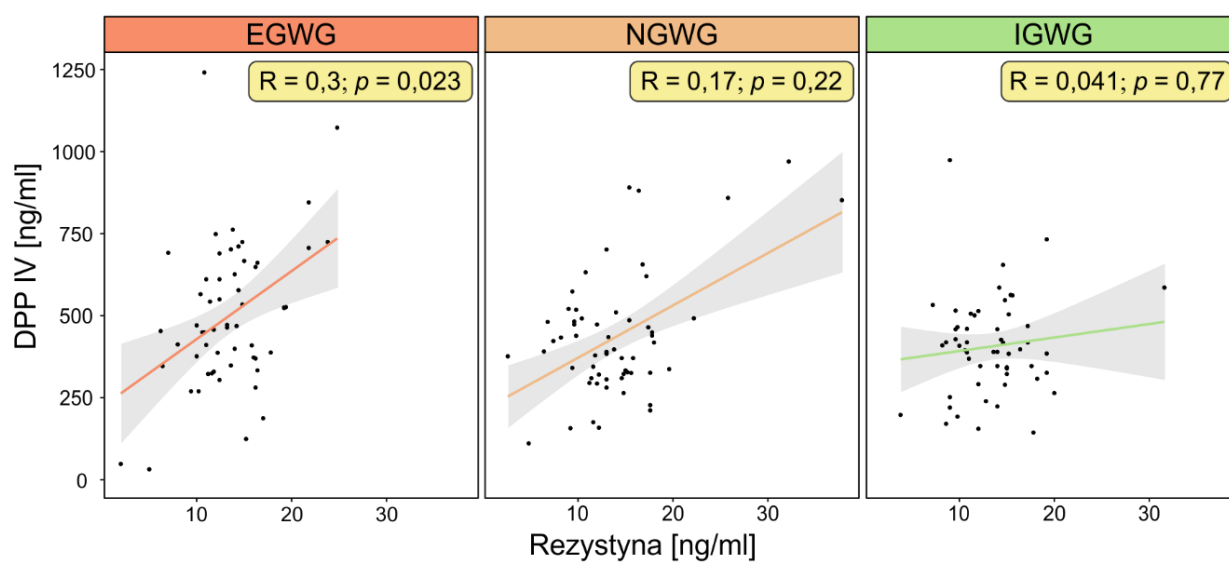
Stężenie rezystyny w grupie kobiet z prawidłowym przyrostem masy ciała w ciąży wynosiło 13,93 ± 5,79 ng/ml, w grupie ze zbyt małym przyrostem masy ciała 13,39 ± 4,30 ng/ml ($p=0,74$), natomiast w grupie z nadmiernym przyrostem masy ciała 13,45 ± 4,37 ng/ml ($p=0,78$). Nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych pomiędzy średnimi wartościami uzyskanymi dla rezystyny w poszczególnych grupach ($p=0,938$).

Natomiast średnie wartości dipeptydylopeptydazy IV wykazywały statystycznie istotne różnice w badanych grupach ($p=0,026$). Najwyższe wartości odnotowano w grupie kobiet z nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży 500,25 ± 219,71 ng/ml vs. 434,45 ± 186,20 ng/ml w grupie z prawidłowym ($p=0,04$) oraz 406,31 ± 148,93 ng/ml u kobiet ze zbyt małym przyrostem masy ciała w ciąży ($p=0,01$). Różnica pomiędzy średnimi uzyskanymi w grupach IGWG oraz NGWG nie była statystycznie istotna ($p=0,73$) (ryc. 15).

Zaobserwowano również, że korelacja pomiędzy stężeniem rezystyny i dipeptydylopeptydazy IV była najsilniejsza w grupie kobiet z nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży ($r=0,3$, $p=0,023$), słabsza w grupie NGWG ($r=0,17$, $p=0,22$) i najsłabsza w grupie IGWG ($r=0,041$, $p=0,77$). Korelację stężenia rezystyny i DPP IV w grupach kobiet wyodrębnionych na podstawie przyrostu masy ciała w ciąży przedstawia ryc. 16.



Rycina 15. Stężenia DPP IV w grupach kobiet wyodrębnionych na podstawie przyrostu masy ciała w ciąży.



Rycina 16. Korelacja stężenia rezystyny i DPP IV w grupach kobiet wyodrębnionych na podstawie przyrostu masy ciała w ciąży.

5.5.1. Korelacje parametrów antropometrycznych ze stężeniami badanych adipokin

W grupie 170 kobiet, u których zbadano stężenia rezystyny i dipeptydylopeptydazy IV w surowicy krwi, analizowano korelacje parametrów antropometrycznych ze stężeniami badanych adipokin.

W całej grupie badanej oraz w grupie kobiet z nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży żaden z badanych parametrów klinicznych matek oraz ich noworodków nie wykazywał statystycznie istotnej korelacji z rezystyną. W grupie kobiet z prawidłowym przyrostem masy ciała w ciąży zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem rezystyny w surowicy a masą ciała pacjentki przed ciążą ($r=0,27$, $p=0,0442$) oraz ujemną z różnicą BMI w przebiegu ciąży ($r=-0,26$, $p=0,0461$). Rezystyna wykazywała także dodatnie korelacje z pH żylnym i tętnicznym noworodka w grupie kobiet, których przyrost masy ciała w ciąży był mniejszy od zalecanego (pH żylny: $r=0,48$, $p=0,0002$, pH tętnicze: $r=0,31$, $p=0,0226$).

Dla dipeptydylopeptydazy IV wykazano w całej grupie badanej istotną statystycznie korelację z tygodniem zakończenia ciąży ($r=0,20$, $p=0,0108$). Po podziale pacjentek na analizowane grupy, korelacja ta powtórzyła się w grupie kobiet z nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży ($r=0,29$, $p=0,0315$). W grupie tej zaobserwowano jeszcze dodatnią korelację DPP IV z masą noworodka ($r=0,26$, $p=0,0543$) oraz ujemną z punktacją noworodka w skali Apgar w 1 minucie ($r=-0,29$, $p=0,0312$). Nie wykazano natomiast istotnych statystycznie zależności pomiędzy parametrami antropometrycznymi matek i noworodków ze stężeniem DPP IV w grupach kobiet z prawidłowym oraz zbyt małym przyrostem masy ciała w ciąży. Omawiane zależności przedstawiono w tabelach 22 i 23.

Tabela 22. Korelacje danych klinicznych ciężarnych i ich noworodków ze stężeniem rezystyny [ng/ml].

<i>Parametr</i>	<i>Cała grupa (n=170)</i>		<i>EGWG (n=57)</i>		<i>NGWG (n=58)</i>		<i>IGWG (n=55)</i>	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Wiek (lata)	0,05	0,5411	-0,001	0,9934	0,05	0,7151	0,10	0,4572
RR skurczowe (mmHg)	-0,07	0,3553	-0,06	0,6624	-0,12	0,3771	0,003	0,9846
RR rozkurczowe (mmHg)	0,03	0,7072	-0,04	0,7916	-0,01	0,9287	0,14	0,3004
Wzrost (cm)	0,05	0,5118	-0,02	0,8549	0,04	0,7821	0,14	0,3115
Masa przed ciążą (kg)	0,13	0,1001	0,01	0,9271	0,27	0,0442	0,06	0,6679
Masa pod koniec ciąży (kg)	0,10	0,2030	0,00	0,9740	0,20	0,1376	0,09	0,5046
Masa noworodka (g)	0,02	0,7874	0,10	0,4455	0,02	0,8901	-0,07	0,6371
Apgar w 1 min.	-0,10	0,2133	-0,13	0,3411	-0,05	0,7082	-0,12	0,3991
Apgar w 5 min.	0,01	0,9168	-0,21	0,1220	0,11	0,4232	0,01	0,9418
pH żylny	0,14	0,0735	-0,07	0,5973	0,01	0,9290	0,48	0,0002
pH tętnicze	0,13	0,0883	0,07	0,6061	0,05	0,6994	0,31	0,0226
Masa łożyska (g)	-0,005	0,9529	-0,13	0,3293	0,12	0,3540	-0,04	0,7885
Tydz. zakończenia ciąży (tc)	0,05	0,5121	0,10	0,4489	0,10	0,4492	-0,11	0,4394
BMI przed ciążą (kg/m ²)	0,11	0,1589	0,05	0,6874	0,21	0,1113	-0,02	0,8727
BMI pod koniec ciąży (kg/m ²)	0,08	0,3127	0,08	0,5616	0,17	0,1891	-0,02	0,8970
Różnica BMI (kg/m ²)	-0,01	0,8852	0,12	0,3764	-0,26	0,0461	0,05	0,7121

Tabela 23. Korelacje danych klinicznych pacjentek i ich noworodków ze stężeniem DPP IV [ng/ml].

<i>Parametr</i>	<i>Cała grupa (n=170)</i>		<i>EGWG (n=57)</i>		<i>NGWG (n=58)</i>		<i>IGWG (n=55)</i>	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Wiek (lata)	0,11	0,1686	0,16	0,2366	0,03	0,8483	0,13	0,3316
RR skurczowe (mmHg)	-0,06	0,4111	-0,14	0,2938	-0,03	0,8310	-0,18	0,1955
RR rozkurczowe (mmHg)	-0,06	0,4684	-0,08	0,5401	-0,02	0,9074	-0,18	0,1798
Wzrost (cm)	0,01	0,8550	0,02	0,8584	0,07	0,5818	-0,09	0,5103
Masa przed ciążą (kg)	0,004	0,9621	0,02	0,8770	-0,14	0,2831	-0,08	0,5831
Masa pod koniec ciąży (kg)	0,09	0,2341	-0,03	0,8429	-0,14	0,3071	0,03	0,8103
Masa noworodka (g)	0,04	0,5750	0,26	0,0543	-0,15	0,2754	-0,06	0,6881
Apgar w 1 minucie	-0,04	0,6463	-0,29	0,0312	0,09	0,4875	-0,06	0,6953
Apgar w 5 minucie	0,03	0,6987	-0,16	0,2273	0,05	0,7080	-0,06	0,6577
pH żylny	-0,001	0,9873	0,04	0,7924	-0,14	0,3070	0,15	0,2893
pH tętniczy	0,10	0,2102	0,16	0,2333	0,03	0,8450	0,11	0,4461
Masa łożyska (g)	-0,06	0,4652	0,05	0,7224	-0,18	0,1784	-0,10	0,4582
Tydzień zakończenia ciąży (tc)	0,20	0,0108	0,29	0,0315	0,18	0,1734	-0,01	0,9241
BMI przed ciążą (kg/m ²)	0,002	0,9830	0,003	0,9829	-0,14	0,2877	-0,07	0,6330
BMI pod koniec ciąży (kg/m ²)	0,10	0,1927	-0,03	0,7985	-0,18	0,1703	0,09	0,5147
Różnica BMI (kg/m ²)	0,14	0,0605	-0,19	0,1510	-0,06	0,6712	0,23	0,0933

5.5.2. Asocjacja stężeń badanych adipokin z polimorfizmami genu *PPARG*

Porównując średnie stężenia rezystyny wśród pacjentek z całej grupy badanej dla poszczególnych genotypów analizowanych polimorfizmów zaobserwowano, że najwyższe stężenia występowały u nosicielek genotypu homozygotycznego niezmutowanego dla obydwu badanych polimorfizmów *Pro12Ala* oraz *161C>T* (*Pro/Pro*: $13,80 \pm 4,58$ ng/ml; *161CC*: $13,78 \pm 4,56$ ng/ml), a najniższe u kobiet z obydwo zmutowanymi allelami (*Ala/Ala*: $11,40 \pm 2,80$ ng/ml; *161TT*: $12,57 \pm 2,15$ ng/ml). Odwrotną zależność natomiast stwierdzono dla DPP IV, gdzie najwyższe stężenia występowały u nosicielek genotypów zmutowanych *Ala/Ala* i *161TT* (odpowiednio $563,66 \pm 166,07$ ng/ml oraz $521,73 \pm 154,36$ ng/ml). Obserwowane różnice nie były istotne statystycznie.

Wyniki analizy asocjacyjnej średnich wartości stężeń rezystyny i dipeptydylopeptydazy IV we krwi kobiet z podziałem na poszczególne genotypy analizowanych wariantów genu *PPARG* przedstawiono w tabeli 24.

Tabela 24. Asocjacja genotypów ze stężeniami badanych adipokin w badanej grupie kobiet (n=170).

SNP	Genotyp	Rezystyna [ng/ml]			DPP IV [ng/ml]	
		n	średnia $\pm$ SD	p	średnia $\pm$ SD	p
<i>Pro12Ala</i>	<i>Pro/Pro</i>	119	$13,80 \pm 4,58$	0,50	$444,40 \pm 187,84$	0,39
	<i>Pro/Ala</i>	46	$13,31 \pm 5,67$		$442,56 \pm 199,75$	
	<i>Ala/Ala</i>	5	$11,40 \pm 2,80$		$563,66 \pm 166,07$	
	model dominujący	51	$13,12 \pm 5,46$	0,41	$454,43 \pm 198,59$	0,75
	model recesywny	165	$13,66 \pm 4,90$	0,31	$443,89 \pm 190,62$	0,17
<i>161C>T</i>	<i>CC</i>	124	$13,78 \pm 4,56$	0,70	$436,60 \pm 190,98$	0,40
	<i>CT</i>	40	$13,19 \pm 5,97$		$469,78 \pm 193,88$	
	<i>TT</i>	6	$12,57 \pm 2,15$		$521,73 \pm 154,36$	
	model dominujący	46	$13,10 \pm 5,61$	0,42	$476,56 \pm 188,51$	0,23
	model recesywny	164	$13,63 \pm 4,93$	0,60	$444,69 \pm 191,63$	0,33

Analizowano także średnie wartości badanych adipokin dla poszczególnych genotypów obu polimorfizmów genu *PPARG* u kobiet w grupach wydzielonych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży. Dla rezystyny nie zaobserwowano żadnych różnic statystycznie istotnych pomiędzy średnimi w zakresie obu badanych wariantów genu *PPARG*. Natomiast dla dipeptydylopeptydazy IV zaobserwowano statystycznie istotną

różnicę pomiędzy średnimi stężeniami DPP IV u nosicielek genotypów homozygotycznych niezmutowanych *Pro/Pro* oraz *161CC* wariantu *161C>T* w grupach kobiet z prawidłowym oraz nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży. Średnia dla kobiet z genotypem *Pro/Pro* była znacząco wyższa u kobiet z nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży i wynosiła $504,49 \pm 207,30$ ng/ml vs. $402,55 \pm 188,25$ ng/ml u kobiet z grupy NGWG, $p=0,042$. Podobnie dla wariantu *161C>T* średnie stężenie DPP IV u kobiet z genotypem *161CC* była znacząco wyższa u kobiet z grupy EGWG i wynosiła $498,97 \pm 214,65$ ng/ml vs. $397,89 \pm 185,82$ ng/ml u kobiet z NGWG, $p=0,043$. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 25.

Tabela 25. Średnie wartości adipokin dla poszczególnych genotypów badanych polimorfizmów genu *PPARG* u kobiet w grupach wydzielonych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży.

<i>Adipokina</i>	<i>SNP</i>	<i>Genotyp</i>	<i>IGWG</i> (<i>n</i> =55)	<i>NGWG</i> (<i>n</i> =58)	<i>EGWG</i> (<i>n</i> =57)	<i>p</i>	<i>IGWG</i> vs. <i>NGWG</i>	<i>EGWG</i> vs. <i>NGWG</i>	<i>IGWG</i> vs. <i>EGWG</i>
			<i>n</i> (średnia ± <i>SD</i>)	<i>n</i> (średnia ± <i>SD</i>)	<i>n</i> (średnia ± <i>SD</i>)		<i>p</i> *	<i>p</i> *	<i>p</i> *
Rezystyna [ng/ml]	<i>Pro12Ala</i>	<i>Pro/Pro</i>	41 (13,96 ± 4,29)	38 (14,01 ± 5,20)	40 (13,44 ± 4,34)	0,828	0,999	0,846	0,865
		<i>Pro/Ala</i>	13 (12,00 ± 4,07)	19 (14,01 ± 7,03)	14 (13,57 ± 5,00)	0,612	0,597	0,974	0,758
		<i>Ala/Ala</i>	1 (8,20 ± 0,00)	1 (9,60 ± 0,00)	3 (13,07 ± 2,19)	0,306	0,899	0,493	0,331
	<i>161C>T</i>	<i>CC</i>	43 (13,60 ± 4,52)	39 (13,98 ± 5,13)	42 (13,77 ± 4,13)	0,932	0,926	0,975	0,986
		<i>CT</i>	12 (12,63 ± 3,48)	17 (14,02 ± 7,46)	11 (12,49 ± 5,89)	0,756	0,818	0,793	0,998
		<i>TT</i>	—	2 (12,20 ± 3,68)	4 (12,75 ± 1,75)	0,803	—	0,803	—
DPP IV [ng/ml]	<i>Pro12Ala</i>	<i>Pro/Pro</i>	41 (424,57 ± 154,03)	38 (402,55 ± 188,25)	40 (504,49 ± 207,30)	0,039	0,856	0,042	0,129
		<i>Pro/Ala</i>	13 (348,50 ± 126,35)	19 (496,23 ± 175,15)	14 (457,06 ± 260,04)	0,114	0,099	0,835	0,324
		<i>Ala/Ala</i>	1 (409,46 ± 0,00)	1 (473,05 ± 0,00)	3 (645,26 ± 170,81)	0,529	0,963	0,705	0,560
	<i>161C>T</i>	<i>CC</i>	43 (410,78 ± 156,94)	39 (397,89 ± 185,82)	42 (498,97 ± 214,65)	0,031	0,948	0,043	0,080
		<i>CT</i>	12 (390,29 ± 120,31)	17 (522,67 ± 170,57)	11 (474,77 ± 267,87)	0,196	0,170	0,794	0,543
		<i>TT</i>	—	2 (397,70 ± 106,57)	4 (583,74 ± 143,33)	0,187	—	0,187	—

p test Kruskala-Wallisa, *p** test Dunna

5.5.3. Częstość współwystępowania genotypów oraz analiza haplotypów badanych polimorfizmów genu *PPARG*

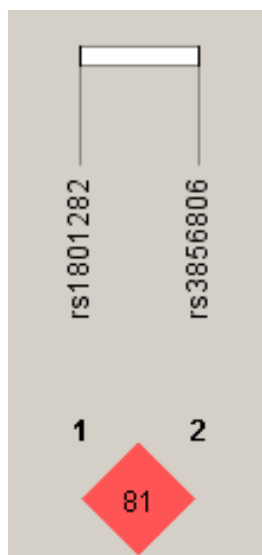
Podczas analizy współwystępowania genotypów wariantów genu *PPARG* zaobserwowano, że najczęściej w badanej grupie kobiet występowała kombinacja genotypów homozygotycznych niezmutowanych *ProPro/CC* (61,0%). Genotypy takie występowały u 70,7% kobiet ze zbyt małym przyrostem masy ciała w ciąży, a najrzadziej, bo u 57,7% w grupie z nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży (IGWG vs. NGWG: OR=1,57, $p=0,197$, EGWG vs. NGW: OR=0,89, $p=0,705$, IGWG vs. EGWG: OR=1,77, $p=0,052$). W całej badanej grupie 367 kobiet nie stwierdzono występowania kombinacji genotypów homozygotycznych niezmutowanych *Pro/Pro* z homozygotycznymi zmutowanymi *161TT* (tab. 26).

Tabela 26. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG* w badanych grupach kobiet.

Genotypy (<i>Pro12Ala/161C>T</i>)	Cała grupa n (%)	IGWG n (%)	NGWG n (%)	EGWG n (%)
<i>ProPro/CC</i>	224 (61,0)	53 (70,7)	58 (60,4)	113 (57,7)
<i>ProAla/CC</i>	24 (6,5)	3 (4,0)	6 (6,3)	15 (7,7)
<i>AlaAla/CC</i>	2 (0,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,0)
<i>ProPro/CT</i>	15 (4,1)	3 (4,0)	4 (4,2)	8 (4,1)
<i>ProAla/CT</i>	83 (22,6)	14 (18,7)	23 (24,0)	46 (23,5)
<i>AlaAla/CT</i>	5 (1,4)	2 (2,6)	1 (1,0)	2 (1,0)
<i>ProPro/TT</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>ProAla/TT</i>	4 (1,1)	0 (0,0)	1 (1,0)	3 (1,5)
<i>AlaAla/TT</i>	10 (2,7)	0 (0,0)	3 (3,1)	7 (3,6)
Suma	367 (100,0)	75 (100,0)	96 (100,0)	196 (100,0)

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono analizę nierównowagi sprzężeń (LD - *linkage disequilibrium*) i częstości występowania haplotypów badanych wariantów genu *PPARG*.

Wykorzystując program Haploview 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) stwierdzono w całej badanej grupie kobiet silną nierównowagę sprzężeń pomiędzy tymi wariantami $D'=0,811$, $r^2=0,581$ (ryc. 17). Warianty *Pro12Ala* (rs1801282) i *161C>T* (rs3856806) oddalone są od siebie o 82432 par zasad.



Rycina 17. Wartość D' nierównowagi sprzężeń pomiędzy badaniami wariantami w obrębie genu *PPARG*.

Analizowano również frekwencje wszystkich czterech możliwych do uzyskania haplotypów w badanych grupach kobiet. Wyniki przedstawia tabela 28, a litery oznaczają odpowiednio: pierwsza - allel polimorfizmu *Pro12Ala*, druga - polimorfizmu *161C>T*. Zawierający niezmutowane warianty haplotyp *ProC* był najczęściej obserwowanym we wszystkich grupach, jednak jego frekwencja była najwyższa w grupie kobiet ze zbyt małym przyrostem masy ciała w ciąży (0,840% vs. 0,776% w grupie NGWG i 0,752% w grupie EGWG). Natomiast haplotypy zawierające zmutowane allele częściej występowały w grupie kobiet z nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży (odpowiednio: *ProT* 0,128%, *AlaT* 0,165% oraz *AlaC* 0,053%). Jedyną statystycznie istotną obserwacją w częstości występowania poszczególnych haplotypów była różnica w częstości występowania haplotypu *ProC* pomiędzy grupami kobiet ze zbyt małym oraz nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży OR=0,579; 95%PU: 0,353-0,948, $p=0,028$. (tab. 27).

W tabeli 28 przedstawiono wyniki analizy związku poszczególnych haplotypów genu *PPARG* z badanymi adipokinami metodą regresji w całej grupie 170 kobiet. Najczęściej występujący haplotyp *ProC* został przyjęty jako referencyjny. Z przeprowadzonych analiz wynika, że nosicielstwo pojedynczej kopii haplotypu *ProT* występujące u mniej niż 2% badanych kobiet zwiększa stężenie dipeptydylopeptydazy IV o 30,17 ng/ml ($p<0,001$) w porównaniu z osobą z dwoma kopiami referencyjnego haplotypu *ProC* (tab. 28).

Tabela 27. Częstość występowania haplotypów badanych wariantów genu *PPARG* w grupach wyodrębnionych na podstawie przyrostu masy ciała w ciąży (n=367).

<i>Haplotyp*</i>	<i>Grupa (frekwencja)</i>			<i>IGWG vs. NGWG</i>		<i>EGWG vs. NGWG</i>		<i>IGWG vs. EGWG</i>	
	<i>IGWG</i>	<i>NGWG</i>	<i>EGWG</i>	<i>p</i>	<i>OR (95% PU)</i>	<i>p</i>	<i>OR (95% PU)</i>	<i>p</i>	<i>OR (95% PU)</i>
<i>ProC</i>	0,840	0,776	0,752	0,169	1,515 (0,871-2,633)	0,606	0,877 (0,582-1,321)	0,028	0,579 (0,353-0,948)
<i>ProT</i>	0,020	0,026	0,028	0,999	0,763 (0,179-3,246)	0,999	1,079 (0,369-3,152)	0,766	1,414 (0,389-5,143)
<i>AlaT</i>	0,106	0,161	0,165	0,157	0,620 (0,325-1,182)	0,999	1,032 (0,646-1,647)	0,105	1,664 (0,929-2,981)
<i>AlaC</i>	0,033	0,036	0,053	0,999	0,911 (0,283-2,93)	0,416	1,495 (0,624-3,582)	0,377	1,641 (0,607-4,435)

*pierwszy wariant *Pro12Ala* (rs1801282), drugi *161C>T* (rs3856806), *p* Fisher

Tabela 28. Wyniki analizy związku poszczególnych haplotypów z badanymi adipokinami metodą regresji w grupie badanej (n=170).

<i>Haplotyp*</i>	<i>Frekwencja</i>	<i>Rezystyna</i>			<i>DPP IV</i>		
		<i>Różnica</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>	<i>Różnica</i>	<i>95%PU</i>	<i>p</i>
<i>ProC</i>	0,8171	13,86	Ref.	-	439,37	Ref.	-
<i>ProT</i>	0,0182	-0,68	-4,69 - 3,33	0,7414	30,17	23,94 - 36,41	<0,001
<i>AlaC</i>	0,0299	-1,06	-3,91 - 1,78	0,4646	-46,82	-157,66 - 64,02	0,4077
<i>AlaT</i>	0,1348	-0,64	-2,17 - 0,90	0,4178	36,18	-23,61 - 95,96	0,2356

*pierwszy wariant *Pro12Ala* (rs1801282), drugi *161C>T* (rs385680)

6. DYSKUSJA

6.1. Związek wartości BMI przed ciążą z przyrostem masy ciała u ciężarnych

W badaniach własnych zalecenia dotyczące przyrostu masy ciała przekroczyła ponad połowa ciężarnych (53,4%) a ciążowy przyrost masy ciała największy był u kobiet z przedciążową nadwagą (35,2%) oraz otyłością (37,2%).

Wyniki dotyczące nadmiernego ciążowego przyrostu masy ciała uzyskane w prezentowanej rozprawie zgodne są z wynikami uzyskanymi przez Goldstein i wsp., gdzie przeanalizowano parametry kliniczne dotyczące ponad miliona kobiet i ich noworodków na trzech różnych kontynentach. W pracy tej wykazano przedciążową nadwagę lub otyłość u ponad 42% pacjentek w Stanach Zjednoczonych, 30% w Europie i 10% w Azji oraz przedciążową niedowagę odpowiednio u 5%, 3% oraz 17% kobiet. Zaobserwowano taki sam odsetek kobiet osiągających ciążowy przyrost masy ciała powyżej wytycznych w Europie oraz w Stanach Zjednoczonych (51% ciężarnych, $p=1,0$) oraz niższy w Azji (37%, $p<0,0001$). Po przeanalizowaniu danych wszystkich pacjentek stwierdzono częstszy ciążowy przyrost masy ciała poniżej wytycznych (43%) u kobiet z niedowagą przed ciążą, natomiast nadmierny ciążowy przyrost masy ciała częściej stwierdzany był u kobiet z przedciążową nadwagą (64%) oraz otyłością (60%). Odsetek pacjentek u których stwierdzono niedostateczny ciążowy przyrost masy ciała najniższy był w Azji (31%), w porównaniu do Stanów Zjednoczonych (21%) oraz Europy (18%) [Goldstein i wsp., 2018]. W dalszej kolejności australijscy badacze sprawdzili wpływ wartości BMI matki przed ciążą oraz ciążowego przyrostu masy na parametry urodzeniowe noworodków oraz sposób ukończenia ciąży. Jako makrosomię noworodka przyjęto wagę powyżej 4000 g. Masę ciała noworodków klasyfikowano według siatek centylowych odpowiednich dla płci w stosunku do wieku ciążowego, przyjmując kryteria „zbyt mały do wieku ciążowego” (SGA – *small for gestational age*) oraz „zbyt duży do wieku ciążowego” (LGA – *large for gestational age*), odpowiednio poniżej 10 i powyżej 90 centyla. Zaobserwowano, że wyższe ryzyko SGA występowało u kobiet ze Stanów Zjednoczonych/Europy (OR=1,51) oraz Azjatek (OR=1,63) z ciążowym przyrostem masy ciała poniżej zalecanych wytycznych. Natomiast niższe ryzyko SGA dotyczyło ciężarnych przekraczających zalecany przyrost masy ciała (Stany Zjednoczone/Europa OR=0,65 oraz Azja OR=0,69). Analogicznie

w przypadku LGA, ciążowy przyrost masy ciała poniżej wytycznych wiązał się z niższym ryzykiem LGA wśród mieszanek Stanów Zjednoczonych/Europy (OR=0,62), jak i Azji (OR=0,42). Wyższe ryzyko LGA wiązało się natomiast z ciążowym przyrostem masy ciała powyżej wytycznych w grupie pochodzącej ze Stanów Zjednoczonych/Europy (OR=1,93) oraz w Azji (OR=1,68). Metaanaliza pokazała także, że nadmierny ciążowy przyrost masy ciała związany był z większą ilością cięć cesarskich wśród ciężarnych ze Stanów Zjednoczonych/Europy (OR=1,87) i Azji (OR=2,18). Co ciekawe, u Azjatek największe ryzyko cesarskiego cięcia związane było z przedciążową niedowagą (OR=1,51) [Goldstein i wsp., 2018].

Problem nadmiernej ciążowej masy ciała rozpatrywała również Rogozińska i wsp. [2019], analizując dane kobiet z 16 krajów Europy, Bliskiego Wschodu, Ameryki Północnej, Południowej oraz Australii. Przeanalizowano 33 badania dotyczące 4429 ciężarnych i ich noworodków. Większość (91,3%) pacjentek była rasy kaukaskiej. Tylko 36,6% kobiet rozpoczynało ciążę z prawidłowym wskaźnikiem BMI, natomiast 63,4% z wskaźnikiem BMI zbyt wysokim. Podobne wyniki w zakresie nadmiernej masy ciała uzyskano w prezentowanej rozprawie. Zarówno w wynikach własnych, jak i w cytowanej metaanalizie pacjentki z nadmierną przedciążową masą ciała stanowiły przeważającą większość badanej grupy (odpowiednio 53,9% oraz 63,4%), ponadto w grupie ciężarnych wykazujących nadmierną masę ciała przed ciążą więcej było kobiet otyłych (odpowiednio 28,6% oraz 35,3%) niż z nadwagą (odpowiednio 25,3% oraz 28,1%). Żadna z pacjentek nie wykazała przedciążowej niedowagi, podczas gdy w badaniach własnych pacjentki takie stanowiły 3% grupy. Również w zakresie ciążowego przyrostu masy ciała badacze uzyskali odmienne wyniki, wykazując nadmierny ciążowy przyrost masy ciała u 36,6% pacjentek (w prezentowanej rozprawie 53,9%). Nadmierny ciążowy przyrost masy ciała wykazano w ponad połowie przypadków ciężarnych z nadwagą i u 45% ciężarnych z otyłością przed ciążą (w badaniach własnych odpowiednio 35% oraz 37,1%) [Rogozińska i wsp., 2019].

W analizie Rogozińskiej i wsp. nadmierny ciążowy przyrost masy ciała wiązał się z 50% wyższym (OR=1,50) prawdopodobieństwem cięcia cesarskiego w porównaniu do przyrostu zalecanego, we wszystkich kategoriach BMI (prawidłowa wartość wskaźnika BMI OR=1,58, nadwaga OR=1,68, otyłość OR=1,44). Ryzyko LGA w tej grupie zwiększyło się dwukrotnie (OR=2,00). W przypadku ciążowego przyrostu masy ciała poniżej zaleceń nie wykazano statystycznie istotnego związku z ryzykiem cesarskiego cięcia, zaobserwowano natomiast 52% większe prawdopodobieństwo SGA (OR=1,52) [Rogozińska i wsp., 2019].

Ciekawych obserwacji, w znacznym stopniu zbieżnych z wynikami prezentowanej dysertacji dokonano w pracy Wierzejskiej i wsp. [2011], gdzie analizowano przyrost masy ciała ciężarnych i jego zależność od przedciążowej wartości wskaźnika BMI u 471 polskich kobiet. Autorzy wykazali, że zalecane wartości GWG przekroczyło aż 48% ciężarnych, ciążowy przyrost masy ciała zgodny z zaleceniami stwierdzono u 37,8% pacjentek, natomiast przyrost niedostateczny u 14,2% badanych kobiet. Nieco odmienne wartości procentowe uzyskano w niniejszej rozprawie (odpowiednio 53,4%, 26,2% oraz 20,4%). Co ciekawe, w badaniach własnych żadna z pacjentek wykazujących przedciążową niedowagę nie osiągnęła nadmiernego ciążowego przyrostu masy ciała, podczas gdy Autorzy metaanalizy wykazali nadmierny GWG aż u jednej trzeciej pacjentek (36,2%). W obydwu badaniach zaobserwowano istotną statystycznie korelację ($p < 0,01$) dotyczącą wartości przedciążowego wskaźnika BMI oraz ciążowego przyrostu masy ciała. W kolejnym etapie pracy badacze analizowali częstość narodzin noworodków z makrosomią w poszczególnych grupach kobiet. Najwięcej noworodków z makrosomią (19,5%) rodziły matki z nadmiernym ciążowym przyrostem masy ciała w porównaniu do kobiet z przyrostem prawidłowym (6,2%) oraz niedostatecznym (3%). Podobnie, badania własne wykazały, że noworodki z największą masą ciała rodziły ciężarne z grupy z największym ciążowym przyrostem masy ciała. Kobiety te najrzadziej również rodziły siłami natury (47,45%), podczas gdy w cytowanej pracy poród siłami natury u pacjentek z ciążowym przyrostem masy ciała większym niż zalecany występował aż w 83,2% przypadków [Wierzejska i wsp., 2011].

Badania własne prezentowane w niniejszej rozprawie wykazały, że zwiększone ryzyko nadmiernego ciążowego przyrostu masy ciała związane jest z wysoką wartością wskaźnika BMI przed ciążą (dla ciężarnych z nadwagą $OR=5,31$, $p < 0,0001$, z otyłością $OR=3,17$, $p=0,0001$).

6.2 Częstość występowania polimorfizmów *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG* na świecie

Na podstawie bazy danych „1000Genomes” Project NCBI (www.internationalgenome.org) a także dostępnej literatury w bazie PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), przeanalizowano częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmów *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG* w różnych populacjach na całym świecie. Następnie częstości te zostały porównane z uzyskanymi w prezentowanej rozprawie.

Polimorfizm *Pro12Ala* genu *PPARG*

Najczęściej w badaniach uwaga skupia się na częstościach występowania genotypu zmutowanego *Ala/Ala* i zmutowanego allela *Ala*, ponieważ nosicielstwo tego wariantu związane jest ze zmienną wartością wskaźnika BMI oraz insulinowrażliwością [Deeb i wsp., 1998].

Według baz danych projektu „1000Genomes” częstość występowania zmutowanego allela *Ala* polimorfizmu *Pro12Ala* w populacji ogólnoswiatowej osób zdrowych określono na 0,0703. Allel ten najczęściej obserwowany był wśród populacji europejskiej (0,1203), najrzadziej wśród mieszkańców Afryki (0,0053). W zakresie częstości występowania allela *Ala* znacznie różniły się między sobą populacje azjatyckie (0,0258 - 0,120). W Stanach Zjednoczonych częstość tę oszacowano na 0,117.

W wynikach prezentowanej rozprawy doktorskiej, wśród polskich ciężarnych z prawidłowym przedciążowym BMI uzyskano większą (0,1677) częstość występowania zmutowanego allela *Ala* porównaniu do częstości wykazanej wśród mieszkańców Europy w ramach Projektu „1000Genomes” (0,1203). Częstość ta jest jednak porównywalna z częstością występowania allela *Ala* w grupach kontrolnych w innych badaniach dotyczących populacji polskiej: 0,1677 vs. 0,18 w badaniu Grygiel-Górniak i wsp. [2018] oraz 0,155 w badaniu Małeckiego i wsp. [2003].

Częstość występowania zmutowanego allela *Ala* omawianego polimorfizmu w populacjach na świecie przedstawia ryc. 18.



Rycina 18. Częstość występowania zmutowanego allelela *Ala* polimorfizmu *Pro12Ala* genu *PPARG* (na podstawie bazy danych „1000genomes Project” NCBI).

Polimorfizm *161C>T* genu *PPARG*

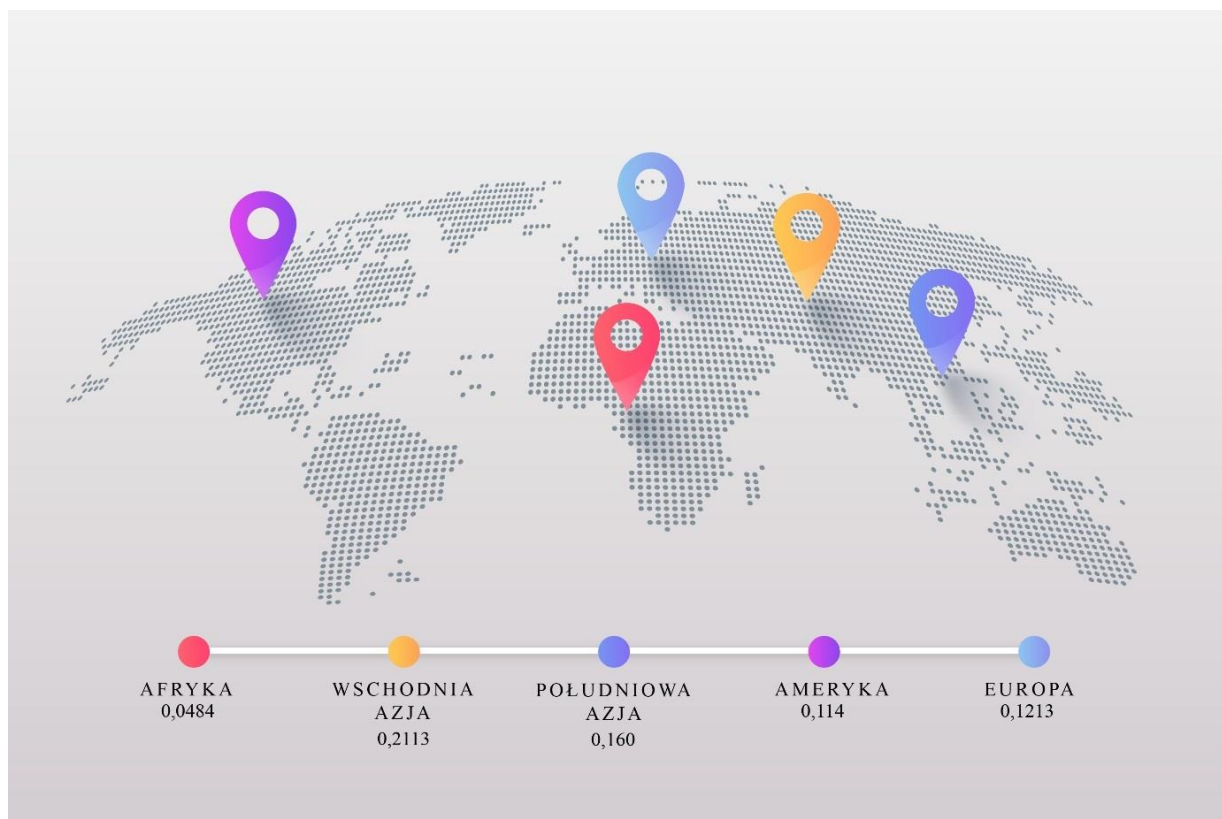
Zainteresowanie badaczy najczęściej wzbudzają dane dotyczące częstości występowania w populacjach zmutowanego genotypu *161TT* oraz allelela *161T* genu *PPARG*, co związane jest z zaburzeniami metabolicznymi takimi jak otyłość, cukrzyca typu II, zespół metaboliczny lub choroby układu krążenia [Doney i wsp., 2002, 2004].

Na podstawie bazy danych „1000Genomes Project” częstość występowania zmutowanego allelela *161T* w populacji ogólnej na świecie szacuje się na 0,1266. Najczęściej allelel ten występuje w populacjach azjatyckich (częstość 0,2113 w Azji Wschodniej oraz 0,160 w Azji Południowej), natomiast najrzadziej w Afryce. W populacji europejskiej oraz w Stanach Zjednoczonych częstość występowania zmutowanego allelela *161T* wynosi odpowiednio 0,1213 oraz 0,114.

W wynikach prezentowanej dysertacji częstość występowania zmutowanego allelela *161T* w grupie ciężarnych z prawidłowym przedciążowym BMI wynosiła 0,1677% i była większa w porównaniu do częstości występowania tego allelela wśród mieszkańców Europy wykazanej w ramach Projektu „1000Genomes” (0,1213). Częstość zmutowanego allelela

161T była jednak zbliżona do częstości obserwowanej wśród osób z grupy kontrolnej populacji polskiej: 0,1677 vs. 0,1840 wykazanej w pracy Grygiel-Górniak [2018].

Częstość zmutowanego allelela 161T polimorfizmu 161C>T *PPARG* w populacjach na świecie przedstawia ryc. 19.



Rycina 19. Częstość występowania zmutowanego allelela 161T polimorfizmu 161C>T genu *PPARG* (na podstawie bazy danych „1000genomes Project” NCBI).

6.3. Polimorfizmy *Pro12Ala* i 161C>T genu *PPARG* a nadmierny przyrost masy ciała w ciąży

Temat wpływu wariantów *Pro12Ala* oraz 161C>T genu *PPARG* na ciążowy przyrost masy ciała podejmują tylko nieliczne prace (Ostafichuk i wsp., 2018, Stuebe i wsp., 2010, Tok i wsp., 2006). Zdecydowanie więcej badań dotyczy wpływu wariantów *Pro12Ala* oraz 161C>T genu *PPARG* na przyrost masy ciała w populacji ogólnej kobiet i mężczyzn.

6.3.1. Polimorfizm *Pro12Ala* genu *PPARG*

Przeprowadzona na podstawie 25 badań klinicznych metaanaliza Yao i wsp., potwierdziła, że wariant zmutowany *Ala* związany jest z ryzykiem rozwoju otyłości

w populacji kobiet i mężczyzn (*Ala* vs. *Pro*: OR=1,55). Analizując grupy różnego pochodzenia etnicznego zaobserwowano, że istnieje związek tego polimorfizmu z ryzykiem wystąpienia otyłości zarówno w populacji kaukaskiej, azjatyckiej, jak i mieszanej [Yao i wsp., 2015].

W analizie Beamer i wsp., pochodzącej ze Stanów Zjednoczonych, przebadano grupę 517 zdrowych pacjentów kobiet i mężczyzn z prawidłową masą ciała i z lekką nadwagą (średnia wartość BMI $26,5 \text{ kg/m}^2$) oraz 169 osób ze znaczną otyłością (średnia wartość BMI $36,5 \text{ kg/m}^2$). W obydwu grupach badanych pacjenci z genotypami zawierającymi co najmniej jeden allel *Ala* (*Pro/Ala*, *Ala/Ala*) wykazywali wyższą zarówno średnią masę ciała ($122,3 \pm 5,2$ vs. $101,2 \pm 2,3 \text{ kg}$, $p < 0,001$) jak i średnią wartość BMI ($41,5 \pm 1,6$ vs. $35,3 \pm 0,7 \text{ kg/m}^2$, $p < 0,001$) w porównaniu do nosicieli genotypu niezmutowanego *Pro/Pro*. Różnice te były jeszcze bardziej widoczne u kobiet, gdy grupa badana podzielona została ze względu na płeć [Beamer i wsp. 1998].

Interesujące wyniki uzyskano również analizując genotypy wariantu *Pro12Ala* genu *PPARG* w populacji fińskiej. Nieciążarne otyłe nosicielki zmutowanego genotypu *Ala/Ala* wykazywały wyższy wskaźnik BMI ($106,2 \pm 13,0 \text{ kg/m}^2$) w porównaniu do otyłych nosicielek genotypu homozygotycznego niezmutowanego *Pro/Pro* ($92,0 \pm 11,2 \text{ kg/m}^2$) [Valve i wsp., 1999]. Wyniki potwierdzają również spostrzeżenia duńskich badaczy, którzy wykazali, że obecność zmutowanego allela *Ala* jest skorelowana z większą wartością BMI tylko u osób z ewidentną otyłością, natomiast nie wykazano takiej korelacji dla grupy osób szczupłych [Ek i wsp., 2001].

Niektórzy autorzy nie odnaleźli jednak związku polimorfizmu *Pro12Ala* genu *PPARG* z rozwojem otyłości. W populacji tureckiej analizowano wpływ wariantu *Pro12Ala* na występowanie otyłości. Częstość występowania zmutowanego allela *Ala* określono w nim na 25,31% w grupie otyłych oraz 24,64% w grupie z prawidłową masą ciała. Analiza obejmowała 160 pacjentów z otyłością (średnia wartość BMI $34,12 \pm 6,84 \text{ kg/m}^2$, średni wiek $39,6 \pm 9,63$ lat) i 140 pacjentów bez otyłości (średnia wartość BMI $21,56 \pm 4,65 \text{ kg/m}^2$, średni wiek $39,6 \pm 9,63$ lat). Nie wykazano różnicy statystycznie istotnej w częstości występowania genotypu niezmutowanego *Pro/Pro* (61,25 vs. 57,86%), genotypu heterozygotycznego *Pro/Ala* (26,87 vs. 35,00%) oraz homozygotycznego zmutowanego *Ala/Ala* (11,87 vs. 7,14%) ($p=0,17$) pomiędzy grupą osób otyłych oraz osób z prawidłową masą ciała [Becer i wsp., 2017].

Powyższe wyniki sugerować mogą, że wariant *Pro12Ala* wywiera zróżnicowany wpływ na BMI prawdopodobnie poprzez wpływ również innych czynników takich jak dieta,

aktywność fizyczna i tryb życia. Badania przeprowadzone przez Luan i wsp. [2001] dowiodły znaczenia interakcji środowisko-gen i wykazały że dieta, w której stosunek wielonienasyconych do nasyconych kwasów tłuszczowych w diecie jest niski, wiąże się u nosicieli allele zmutowanego *Ala* z większą wartością wskaźnika BMI w porównaniu do nosicieli wariantu homozygotycznego *Pro/Pro*. Przy odwrotnym stosunku kwasów tłuszczowych u nosicieli zmutowanego allele *Ala* obserwowano niższą wartość BMI [Luan i wsp., 2001].

W grupie 100 kobiet ciężarnych z populacji ukraińskiej z prawidłową masą ciała przed ciążą (średnia masa ciała 55,2 kg, średnia wartość BMI 20,3 kg/m²) stwierdzono nadmierny, zalecany oraz zbyt mały ciążowy przyrost masy ciała odpowiednio u 46,4%, 34,0% oraz 19,6% pacjentek. W całej grupie odnotowano częstość występowania zmutowanego allele *Ala* równą 0,28. Badanie to udowodniło związek zmutowanego allele *Ala* z nadmiernym przyrostem masy ciała u ciężarnych i wykazało, że przyrost ten jest 1,6 razy większy u nosicielek genotypów zawierających co najmniej jeden allel *Ala* w porównaniu do kobiet z genotypem *Pro/Pro* (19,5 vs. 12,1 kg, $p<0,05$). Wykazano również, że allel *Ala* występował 2,6 razy częściej w grupie pacjentek z nadmiernym GWG (OR=3,2, $p<0,05$) w porównaniu do pacjentek z przyrostem zalecanym. Autorzy sugerują, że obecność tego wariantu genu *PPARG* nie tylko wpływa na zwiększony ciążowy przyrost masy ciała, ale może służyć również jako marker określający predyspozycje do rozwoju chorób metabolicznych u kobiet późniejszym wieku. Co ciekawe, również badania przeprowadzone rok po porodzie dowiodły, że obecność wariantów zmutowanych polimorfizmu *Pro12Ala* wiązała się z wyższą masą ciała i wyższym wskaźnikiem BMI u nosicielek allele *Ala*, w porównaniu do kobiet z genotypem homozygotycznym *Pro/Pro* (odpowiednio 72,3 vs. 56,6 kg, $p<0,05$ oraz BMI 24,5 vs. 19,9 kg/m², $p<0,05$) [Ostafiichuk i wsp., 2018].

W przeciwieństwie do cytowanej powyżej pracy, w prezentowanej rozprawie do badanej grupy ciężarnych zakwalifikowano nie tylko kobiety z prawidłowym przedciążowym wskaźnikiem BMI, ale też z niedowagą, nadwagą oraz otyłością (średnia BMI $26,44 \pm 5,70$ kg/m²). Pacjentki z prawidłową przedciążową masą ciała stanowiły 43,1% badanej grupy. Częstość występowania zmutowanego allele *Ala* wynosiła 16,77% w grupie osób z prawidłową przedciążową masą ciała i 22,47% wśród ciężarnych z nadwagą i otyłością przed ciążą. Wśród wszystkich pacjentek genotyp heterozygotyczny *Pro/Ala* polimorfizmu *Pro12Ala* stwierdzono u 30,25% kobiet, natomiast 4,63% kobiet było nosicielkami genotypu homozygotycznego zmutowanego *Ala/Ala*. Różnice istotne

statystycznie stwierdzono porównując grupę z ciążowym przyrostem zbyt małym do grupy z przyrostem nadmiernym. Kobiety wykazujące nadmierną masę ciała częściej też były nosicielkami genotypu homozygotycznego zmutowanego (5,55%) niż pacjentki szczupłe (3,80%). Zaobserwowano także, że allel *Ala* powodował zwiększenie ryzyka nadmiernego przyrostu masy ciała w ciąży o 73% w porównaniu do grupy z przyrostem niedostatecznym (OR=1,73, $p=0,038$). Różnicę statystycznie istotną odnotowano również w modelu dominującym (*CC* vs. *CG* i *GG*) (OR=1,83, $p=0,042$).

Zbliżone wyniki uzyskali w swojej pracy Stuebe i wsp., analizując 27 wariantów polimorficznych genów związanych z cukrzycą i otyłością u 960 amerykańskich ciężarnych. Do badania zakwalifikowano 628 pacjentek rasy kaukaskiej oraz 332 kobiety rasy negroidalnej. Nadmierny ciążowy przyrost masy ciała uzyskało odpowiednio 65,5% oraz 58,4% kobiet. Żadna z badanych pacjentek rasy afrykańskiej nie była nosicielką genotypu *Ala/Ala*. Wśród pacjentek rasy kaukaskiej zaobserwowano większy przyrost masy ciała w ciąży u kobiet z genotypem *Ala/Ala* (średnia $21,7 \pm 9,5$ kg) w porównaniu z genotypem *Pro/Pro* (średnia $15,4 \pm 6,2$ kg). Autorzy wskazują jednak, że ich badanie może być obciążone błędem, ponieważ liczba pacjentek z genotypem *Ala/Ala* była niewielka ($n=7$) i u dwóch z nich przyrosty masy ciała w ciąży wynosiły aż 28 i 40 kg [Stuebe i wsp., 2010].

W opozycji do powyższych doniesień prezentują się wyniki tureckiego badania, analizującego związek ciążowego przyrostu masy z polimorfizmem *Pro12Ala* u 62 kobiet z GDM i 100 zdrowych ciężarnych. Autorzy badania nie odnaleźli związku zmutowanego allela *Ala* z przedciążowym BMI w żadnej z badanych grup, zaobserwowali jednak znaczący wzrost ciążowej masy ciała u nosicielek allela *Ala* z rozpoznaną cukrzycą ciążową [Tok i wsp., 2006].

6.3.2. Polimorfizm *161C>T* genu *PPARG*

Analiza piśmiennictwa wykazuje sprzeczne doniesienia dotyczące wpływu zmutowanego allela *161T* na rozwój otyłości. We włoskiej populacji kilkuset osób (mężczyzn i kobiet) nie wykazano związku polimorfizmu *161C>T* genu *PPARG* z występowaniem nadmiernego przyrostu masy ciała i otyłości. Największą częstość występowania zmutowanego allela *161T* obserwowano w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy pacjentów otyłych (0,13 vs. 0,07, $p=0,008$) [Costa i wsp., 2009]. W 2017 roku ukazała się praca, oceniająca związek zmutowanego allela *161T* z masą ciała w populacji irańskiej. W badaniu uczestniczyły osoby otyłe oraz zdrowe, których średnie wartości wskaźnika BMI wynosiły odpowiednio $32,71 \text{ kg/m}^2$ oraz $26,14 \text{ kg/m}^2$. Również to badanie

nie potwierdziło związku wariantu *161C>T* genu *PPARG* z otyłością, wykazując częstość zmutowanego allelela *161T* na podobnym poziomie w grupie osób z otyłością i w grupie kontrolnej (częstości odpowiednio 0,110 vs. 0,127) [Mehrad-Majd i wsp., 2017].

Niektórzy autorzy potwierdzali jednak związek zmutowanego allelela *161T* z wyższymi wartościami wskaźnika BMI. Wpływ ten został wykazany zarówno wśród dorosłych [Valve i wsp., 1999, Tai i wsp., 2004,], jak i wśród dzieci [Lagou i wsp., 2008].

W roku 1999 grupa badaczy z Finlandii zbadała genotyp grupy osób otyłych ze średnim BMI 35,7 kg/m². Wykazano, że częstości zmutowanego allelela *161T* nie różniły się pomiędzy otyłymi a grupą kontrolną (0,19 vs. 0,21). Na możliwy związek tego polimorfizmu ze zwiększonym BMI wskazują natomiast częstości występowania genotypów zawierających jeden zmutowany allelel *161T* (34,5%) oraz obydwa zmutowane allelele *161TT* (37,7%), $p=0,046$. Ponadto wykazano, że nosiciele genotypu homozygotycznego zmutowanego *161TT* wykazywali większą otyłość niż pacjenci z genotypem niezmutowanym *CC* (40,6 kg/m² vs. 34,4 kg/m², $p=0,005$) [Valve i wsp., 1999].

Podobnie interesujące wyniki uzyskano w populacji azjatyckiej. Badacze z Singapuru analizowali wpływ wariantu *161C>T* genu *PPARG* na parametry metaboliczne w populacji Hindusów, Malajów oraz Chińczyków. Wykazano, że obecność zmutowanego allelela *161T* wpływała na wyższe wartości BMI we wszystkich trzech grupach etnicznych [Tai i wsp., 2004].

Ciekawe badanie populacyjne przeprowadzono w Grecji wśród około dwóch tysięcy kilkuletnich dzieci, u których analizowano stan odżywienia, ogólny rozwój fizyczny, jak również polimorfizmy *161C>T* oraz *Pro12Ala* genu *PPARG*. Stwierdzono, że haplotyp *AlaT* wykazywał większy związek z otyłością w porównaniu do haplotypu *ProT* oraz *AlaC* [Lagou i wsp., 2008].

Pomimo udokumentowanego związku polimorfizmu *161C>T* genu *PPARG* z ryzykiem otyłości i zaburzeniami metabolizmu [Valve i sp.1999, Tai i wsp., 2004], brak jest w dostępnej światowej literaturze badań analizujących wpływ tego wariantu na nadmierny przyrost masy ciała w ciąży. Badania własne przedstawione w prezentowanej rozprawie, są prawdopodobnie pierwszą próbą oceny związku wariantu *161C>T* genu *PPARG* z przyrostem masy ciała w ciąży. Wśród ciężarnych z prawidłową wartością wskaźnika BMI przed ciążą częstość występowania zmutowanego allelela *161T* wyniosła 0,1677. Odnotowano również częstsze występowanie genotypu zawierającego obydwa zmutowane allelele *161T* w grupie kobiet z nadmiernym ciążowym przyrostem masy ciała

w porównaniu do kobiet z przyrostem prawidłowym (5,1% vs. 4,2%, OR=0,81). Genotyp ten nie występował u żadnej kobiety ze zbyt małym przyrostem masy ciała w ciąży. W prezentowanej pracy nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w częstości występowania zmutowanego allelela *161T* pomiędzy badanymi grupami.

Wyniki badań własnych wykazały częstsze występowanie genotypów zawierających co najmniej jeden zmutowany allel (*161CT* i *161TT*) u kobiet z nadwagą (32,3%) oraz otyłością (37,1%) przed ciążą w porównaniu do pacjentek z prawidłową przedciążową masą ciała (29,1%).

6.4. Współwystępowanie genotypów oraz analiza haplotypów genu *PPARG*

W pracy analizowano częstość współwystępowania genotypów oraz frekwencję haplotypów genu *PPARG*. Bardzo zbliżone do występujących u przebadanych kobiet częstości współwystępowania genotypów obserwowano w szkockiej populacji 1107 osób z cukrzycą typu II pochodzącej z regionu Tayside. Kombinacja genotypów homozygotycznych niezmutowanych *ProPro/CC*, która występowała najczęściej w prezentowanej dysertacji (61,0% badanych ciężarnych) przeważała również u pacjentów z cukrzycą w populacji szkockiej (71,6%). Badacze ze Szkocji podobnie jak w populacji ciężarnych w prezentowanej rozprawie nie zaobserwowali u żadnego pacjenta współwystępowania genotypów homozygotycznych niezmutowanych *Pro/Pro* z homozygotycznymi zmutowanymi *161TT* [Doney i wsp., 2002]. Dwa lata później ci sami Autorzy zaprezentowali wyniki badań asocjacyjnych wariantów *Pro12Ala* i *161C>T* genu *PPARG* u 1997 osób z cukrzycą oraz u 2444 dzieci i 1061 osób dorosłych w średnim wieku z tego samego regionu Szkocji. W tych populacjach nadal nie obserwowano współwystępowania genotypów homozygotycznych niezmutowanych *Pro/Pro* z homozygotycznymi zmutowanymi *161TT* w grupie osób z cukrzycą, natomiast takie połączenie genotypów występowało u 4 dzieci oraz 3 dorosłych z grupy kontrolnej [Doney i wsp., 2004].

Badania asocjacyjne analizujące związek polimorfizmów *Pro12Ala* i *161C>T* genu *PPARG* z ryzykiem występowania otyłości w różnych populacjach są często niespójne. Te niekiedy wręcz sprzeczne wyniki mogą być związane ze stopniem nierównowagi sprzężeń (D') między tymi dwoma polimorfizmami w różnych populacjach, które w zależności od rasy i pochodzenia etnicznego wahają się od słabych do ścisłych. Ciekawą pracę przedstawiającą różnice w częstości występowania tych wariantów genu *PPARG* w populacji azjatyckiej zaprezentował Tai i wsp. [2004] badając populację 4038 osób

z Singapuru (1869 mężczyzn i 2169 kobiet w wieku od 18 do 69 lat). Ponieważ jest to państwo bardzo zróżnicowane pod względem etnicznym, pacjentów podzielono na grupy (2730 Chińczyków, 740 Malajów i 568 Hindusów). Najrzadziej zmutowany allel *Ala* występował u Malajów (0,032) i Chińczyków (0,037), natomiast najczęściej u Hindusów (0,119) (częstość występowania podobna do częstości obserwowanych w populacjach północnoeuropejskich). Odwrotnie w przypadku polimorfizmu *161C>T* genu *PPARG* Hindusi prezentowali najniższą częstość allelela *161T* (0,169) w porównaniu z Malajami (0,220) i Chińczykami (0,252). Analiza haplotypów wykazała, że te warianty *PPARG* były najsilniej sprzężone w populacji hinduskiej ($D'=0,799$); następnie malajskiej ($D'=0,572$) i chińskiej ($D'=0,555$).

Stosunkowo niska nierównowaga sprzężeń obserwowana jest w populacjach irańskich np.: $D'=0,381$ w grupie 175 osób z zespołem metabolicznym oraz $D'=0,372$ w 165 osobowej grupie kontrolnej [Rooki i wsp., 2014] lub $D'=0,332$ w grupie 150 kontroli (BMI $<30 \text{ kg/m}^2$) z Meshhed w północno-wschodnim Iranie [Mehrad-Majd i wsp., 2017].

Najwyższe wartości nierównowagi sprzężeń uzyskiwane są w badaniach europejskich. W Słowenii dla 667 osób w podeszłym wieku: $D'=0,71$ [Dragojević i wsp., 2011], w Szkocji $D'=0,697$ [Doney i wsp., 2002], na Węgrzech $D'=0,673$ [Penyige i wsp. 2010], w północnych Niemczech (Lubeka) $D'=0,64$ [Wieczorek i wsp., 2009], $D'=0,5877$ na południu Niemiec w Bawarii [Folwaczny i wsp., 2010] lub we Francji $D'=0,68$ u 1708 kobiet z Nancy i Poitiers ($D'=0,67$ u pacjentek bez GDM oraz $D'=0,92$ z cukrzycą ciążową) [Heude i wsp., 2011].

Wśród badanych w prezentowanej pracy kobiet uzyskano silną nierównowagę sprzężeń $D'=0,811$, niestety brakuje publikacji na ten temat w populacjach polskich. Można porównać prezentowane wyniki do Grygiel-Górniak i wsp. (2020), gdzie Autorzy analizowali obydwa warianty genu *PPARG*. Dla grupy kontrolnej ($n=103$) uzyskano następujące częstości występowania alleli: *Pro* 0,82, *Ala* 0,18, *161C* 0,82 oraz *161T* 0,18 [Grygiel-Górniak i wsp., 2020]. Wartości te są podobne do wartości uzyskanych dla ciężarnych w prezentowanej rozprawie, u których przed ciążą stwierdzano prawidłową masę ciała ($n=158$): *Pro* 0,83, *Ala* 0,17, *161C* 0,83 oraz *161T* 0,17. W grupie kobiet z prawidłowym przyrostem masy ciała w ciąży ($n=96$) otrzymano zbliżone częstości występowania alleli badanych polimorfizmów genu *PPARG*: *Pro* 0,80, *Ala* 0,20, *161C* 0,81 oraz *161T* 0,19. W badaniach dotyczących populacji polskiej podkreśla się, że zmutowany allel *Ala* wariantu *Pro12Ala* występuje znacznie częściej niż w innych populacjach europejskich. W Europie allel *Ala* średnio

występuje u 12% badanych, natomiast w populacji polskiej częstość występowania allele *Ala* wynosi 0,198 [Ardlie i wsp., 2002].

Ze względu na ważną rolę jaką gen *PPARG* odgrywa w adipogenezie, homeostazie energii oraz wrażliwości na insulinę, pojawiły się doniesienia, że allele *Ala* może być „nieoszczędnym allele” genu *PPARG* i w przeszłości podlegał negatywnej selekcji [Ruiz-Narvaez, 2005]. Hipotezę oszczędnego genotypu (ang. *thrifty genotype*) zaproponował w 1962 roku Jeemes V. Neel. Hipoteza zakłada, że przeżycie osobnika w warunkach długotrwałego niedoboru żywności zależy od zdolności gromadzenia energii w postaci zapasów. W toku doboru naturalnego genotypy ułatwiające gromadzenie energii byłyby faworyzowane i mogłyby przetrwać do dzisiejszych czasów. Ten ewolucyjnie korzystny dla przetrwania mechanizm, przy dzisiejszym nieograniczonym dostępie do żywności może jednak skutkować rozwojem otyłości [Neel, 1962]. Negatywna selekcja zmutowanego allele *Ala* wariantu *Pro12Ala* w czasie ewolucji człowieka pozostaje dotychczas z braku dowodów hipotezą. Innym ciekawym spostrzeżeniem jest oddziaływanie przeciwstawnych fenotypów spowodowane wzajemnym wpływem będących w nierównowadze sprzężeń wariantów *Pro12Ala* oraz *161C>T*, jak na przykład ochronne działanie zmutowanego allele *Ala* przed rozwojem cukrzycy słabnie przy jednoczesnej obecności allele *161T*. Brak jednoznacznych wyników w badaniach asocjacyjnych spowodowany jest często wpływem czynników etnicznych, środowiskowych i genetycznych. Ponadto, ze względu na nierównowagę sprzężeń między tymi polimorfizmami, określenie względnego udziału każdego polimorfizmu w uzyskanym fenotypie jest dość trudne.

Jedno badanie łączy stężenie rezystyny z haplotypami badanych w pracy wariantów genu *PPARG*. U 599 osób z południowych rejonów Indii przebadano stężenie rezystyny w połączeniu z obecnością wariantów *Pro12Ala* i *161C>T* genu *PPARG*. Następnie podzielono grupę na trzy podgrupy w zależności od uzyskanego stężenia rezystyny i zaobserwowano, że haplotyp *ProC* występował częściej w grupach z niższymi stężeniami rezystyny, natomiast haplotypy *ProT* oraz *AlaT* częściej występowały w grupach z wyższymi stężeniami rezystyny [Haseeb i wsp., 2009]. W przeciwieństwie do tej pracy, w prezentowanej rozprawie doktorskiej, w badanych grupach ciężarnych nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych pomiędzy stężeniami rezystyny dla poszczególnych haplotypów.

6.5. Związek stężenia adipokin prozapalnych z przyrostem masy ciała w ciąży

6.5.1. Związek stężenia rezystyny z przyrostem masy ciała w ciąży

Ekspresja rezystyny oraz jej stężenie we krwi wykazują zmienność związaną ze stanem metabolicznym i hormonalnym organizmu. U osób zdrowych stężenie rezystyny we krwi powinno oscylować w granicach 7-12 ng/ml, ale może ulec zmniejszeniu poprzez niskokaloryczną dietę oraz aktywność fizyczną [Aruna i wsp., 2008, Marcelino-Rodríguez i wsp., 2017]. Podwyższone stężenie tej adipokiny obserwuje się również po posiłku, w stanach hiperglikemii, w otyłości, w ostatnim trymestrze ciąży oraz po zastosowaniu leków TZD [Steppan i wsp., 2001, Rajala i wsp., 2004, Guelfi i wsp., 2017].

Wiele badań wskazuje, że stężenie krążącej rezystyny jest dodatnio skorelowane z wartością BMI i ulega zmniejszeniu po redukcji masy ciała. Arica i wsp. [2018] przeprowadzili analizę stężeń tego białka u pacjentów ze znaczną otyłością (średnia wartość BMI 48,73 kg/m²), poddanych operacji bariatrycznej. Wartości te porównywano do stężeń rezystyny we krwi osób z prawidłową masą ciała (średnia wartość BMI 22,87 kg/m²). Pacjentom otyłym oznaczono stężenie rezystyny w surowicy krwi tuż przed zabiegiem oraz po 1 i 6 miesiącach po zabiegu usunięcia nadmiernej masy ciała. Stężenie rezystyny w osoczu krwi przed interwencją chirurgiczną było nieporównywalnie większe u osób otyłych w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio 8,75 ng/ml vs. 4,95 ng/ml, $p < 0,001$). W pierwszym miesiącu po operacji u otyłych zmniejszyła się nie tylko masa ciała i BMI, ale także stężenie rezystyny (średnie stężenie 7,29 ng/ml, $p < 0,01$). Największy spadek powyższych parametrów odnotowano jednak pół roku po zabiegu bariatrycznym (średnie stężenie rezystyny 5,68 ng/ml $\pm$ 0,95 ng/ml) [Arica i wsp., 2018]. Udział rezystyny w patogenezie otyłości potwierdza również większość wyników badań analizowanych w obszernej metaanalizie [Su i wsp., 2019].

Niektórzy badacze nie zaobserwowali tej zależności. Analizy przeprowadzone wśród diabetyków i osób zdrowych w populacji niemieckiej wykazały wysokie jednak zbliżone stężenia rezystyny w obydwu grupach (38,7 ng/ml oraz 38,78 ng/ml) [Fehmann i wsp., 2002].

Polskie badanie, obejmujące ciężarne z nadwagą i otyłością oraz kobiety w ciąży z prawidłową przedciążową masą ciała również nie wykazało statystycznie istotnej różnicy pomiędzy stężeniami tej adipokiny w badanych grupach (17,39 vs. 15,76 ng/ml), pomimo istotnej statystycznie różnicy w wartości wskaźnika BMI (odpowiednio 32,68 vs. 21,07 kg/m², $p < 0,001$) [Poniedziałek-Czajkowska i wsp., 2018].

Brak jest spójnych doniesień na temat zależności pomiędzy stężeniem rezystyny we krwi a wartością wskaźnika BMI u kobiet w ciąży. Kilka badań raportowało, że stężenie rezystyny wzrasta wraz z postępem ciąży. Nien i wsp. [2007] przeanalizowali stężenie tego białka u 441 pacjentek, w tym ciężarnych z prawidłową masą ciała i nadwagą oraz szczupłych kobiet nieciężarnych. Masa ciała kobiet oceniana była na podstawie wskaźnika BMI w poszczególnych tygodniach ciąży. Wykazano dodatnią korelację stężenia rezystyny w osoczu z wiekiem ciążowym ($r=0,22$, $p<0,01$). Najniższe stężenia rezystyny w surowicy krwi zaobserwowano u kobiet nieciężarnych (10,3 ng/ml), natomiast wyższe u ciężarnych z nadwagą oraz otyłością (odpowiednio 14,1 ng/ml oraz 14,8 ng/ml). Nie zaobserwowano natomiast różnic stężenia rezystyny pomiędzy ciężarnymi z prawidłową masą ciała a nadwagą w różnych tygodniach ciąży, co sugeruje brak związku stężenia tej adipokiny z masą ciała oraz z BMI pacjentek. Autorzy przypuszczają, że wpływ na zwiększone stężenie rezystyny zwłaszcza w ostatnim trymestrze ciąży może mieć zwiększona kumulacja trzewnej tkanki tłuszczowej ciężarnych oraz łożysko, jako dodatkowy rezerwuar tego białka [Nien i wsp., 2007].

Wyższe stężenia rezystyny u ciężarnych potwierdzają badania przeprowadzone w populacji kaukaskiej, gdzie średnie stężenia tego białka wśród ciężarnych w III trymestrze wynosiły 13,7 ng/ml, natomiast u zdrowych kobiet niebędących w ciąży 6,3 ng/ml [Cortelazzi i wsp., 2007]. Autorzy wnioskują, że może to mieć związek ze zmniejszoną wrażliwością na insulinę w ostatnim trymestrze ciąży, jak również z rolą łożyska jako dodatkowego źródła rezystyny [Costa, 2016].

Badacze nie są zgodni natomiast, co do roli stężenia rezystyny w surowicy krwi w patogenezie GDM. Niektórzy, jak Megia i wsp. [2008] sugerowali, że wzrost stężenia rezystyny we krwi może być czynnikiem ochronnym przed GDM. Inne badania wskazywały natomiast brak korelacji [Lobo i wsp., 2019, Guelfi i wsp., 2017] lub jej obecność [Hu i wsp., 2019].

W kolejnym doniesieniu, badacze z Meksyku, gdzie otyłość w wieku prokreacyjnym sięga aż 73% kobiet, wykazali na podstawie wartości BMI, że tylko 29,4% pacjentek rozpoczyna ciążę z prawidłową masą ciała. Wśród badanych pacjentek aż 36,8% wykazywało przedciążową nadwagę, natomiast 32,4% otyłość. W badaniu tym najwyższe stężenia rezystyny zaobserwowano u kobiet z otyłością przed ciążą (15,0 ng/ml), najniższe u pacjentek z prawidłową masą ciała (14,1 ng/ml). Pacjentki otyłe wykazywały jednak mniejszy ciążowy przyrost masy ciała w porównaniu do pacjentek szczupłych (GWG odpowiednio 5,7 ng/ml vs. 12,4 ng/ml). Podobnie jak w prezentowanej rozprawie, najwyższe

średnie stężenia rezystyny uzyskano w grupie z prawidłowym przyrostem masy ciała w porównaniu do grupy z przyrostem nadmiernym oraz zbyt małym (15,5 ng/ml vs. 13,7 ng/ml oraz 14,4 ng/ml, w badaniach własnych odpowiednio 13,93 ng/ml vs. 13,45 ng/ml oraz 13,39 ng/ml). Najniższe wartości meksykańscy badacze odnotowali u ciężarnych z przyrostem ciążowym nadmiernym (13,7 ng/ml, $p<0,05$) [Solis-Paredes i wsp., 2016]. Wyniki własne nie wykazały jednak istotnych statystycznie różnic stężeń tej adipokiny w badanych grupach.

Ciekawe wyniki uzyskała w grupie ciężarnych badaczka z Ukrainy, analizując wyniki stężenia rezystyny w osoczu, wartości BMI przed ciążą oraz ciążowy przyrost masy ciała. Wśród badanych pacjentek nadmierny ciążowy przyrost masy ciała uzyskało 45,4% badanych kobiet. Analizując przedciążową wartość BMI, 29,4% kobiet wykazywało nadmierną a 11% niedostateczną masę ciała, natomiast 59,5% ciężarnych z prawidłową masą ciała stanowiło grupę kontrolną. U ciężarnych wykazujących nadmierną przedciążową wartość BMI stężenie rezystyny w osoczu krwi w ostatnim trymestrze ciąży okazało się 1,2-krotnie wyższe ($p<0,05$) w grupie pacjentek z nadmiernym GWG w porównaniu do pacjentek z GWG zgodnym z zaleceniami. Udokumentowano również dodatnią korelację pomiędzy stężeniem rezystyny w trzecim trymestrze ciąży a ciążowym przyrostem masy ciała ($r=0,89$, $p<0,001$). Najwyższy przyrost stężenia rezystyny wykazano u ciężarnych w ostatnim trymestrze ciąży. U ciężarnych z prawidłowym przedciążowym BMI, ale nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży stężenie rezystyny było wyższe w porównaniu do grupy z nadmierną wartością wskaźnika BMI przed ciążą [Ostafiichuk, 2019].

6.5.2. Związek stężenia dipeptydylopeptydazy IV z przyrostem masy ciała w ciąży

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że stężenie krążącej DPP IV u zdrowych ludzi oscyluje w granicach 200-600 ng/ml. Zaobserwowano również, że aktywność i stężenie krążącego białka DPP IV izolowanego zarówno z adipocytów, makrofagów tkanki tłuszczowej jak i z surowicy krwi jest dodatnio skorelowane z wartością wskaźnika BMI ($r=0,38$, $p=0,02$), rozmiarem adipocytów tkanki podskórnej, trzewnej oraz stężeniem leptyny.

W badaniu w populacji koreańskiej (600 pacjentów, średnia wartość BMI 23,15 kg/m², średnie stężenie DPP IV w surowicy krwi $2,69 \pm 0,11$ ng/ml), wykazano istotną statystycznie dodatnią korelację z masą ciała ($r=0,227$, $p<0,001$), wartością wskaźnika BMI ($r=0,133$, $p=0,005$) we wszystkich badanych grupach (masa ciała prawidłowa, nadwaga oraz otyłość). Różnicę statystycznie istotną zaobserwowano pomiędzy grupą z prawidłową masą

ciała a grupą pacjentów otyłych (log. stężenia DPP IV odpowiednio 2,67 ng/ml vs. 2,71, $p<0,009$). Podobne zależności zaobserwowano pomiędzy grupą z prawidłową masą ciała a grupą z otyłością pod względem wartości wskaźnika BMI (20,78 kg/m² vs. 27,27 kg/m², $p<0,001$) [Lee i wsp., 2017].

Interesujące wyniki przedstawił zespół niemieckich naukowców, wykazując wyższe stężenie DPP IV u otyłych pacjentów w stosunku do osób z prawidłową masą ciała oraz pacjentów z anoreksją (+50%, $p<0,05$) co było powodem dodatniej korelacji z BMI ($r=0,34$, $p=0,004$) [Stengel i wsp., 2014].

Oceny stężenia DPP IV we wczesnym stadium otyłości podjęli się również polscy badacze, analizując średnie stężenia tej adipokiny we krwi osób z prawidłową i nadmierną masą ciała, bez towarzyszących chorób metabolicznych. Uzyskano istotnie wyższe ($p=0,016$) stężenia DPP IV w surowicy krwi u osób z nadmierną masą ciała w porównaniu do pacjentów wykazujących prawidłową masę ciała, a stężenie DPP IV w surowicy krwi było dodatnio skorelowane zarówno z wartością wskaźnika BMI ($r=0,33$, $p=0,004$), jak i z masą ciała ($r=0,27$, $p=0,024$). Badania te pokazują, że już we wczesnym stadium otyłości rozwija się stan zapalny tkanki tłuszczowej o niskim stopniu nasilenia, powodując wzrost stężenia DPP IV i związane z nim zaburzenia metaboliczne [Olejnik i wsp., 2018].

Nie wszystkie prace potwierdzają związek stężenia DPP IV z podwyższoną wartością wskaźnika BMI. Badania przeprowadzone na grupie 124 koreańskich pacjentek po menopauzie nie wykazały istotnych różnic w stężeniu DPP IV pomiędzy grupą kobiet z prawidłową masą ciała a grupą kobiet z nadwagą (623,6 vs. 607,1 ng/ml, $p=0,479$) [Kim i wsp., 2016]. Podobne wyniki uzyskano w innej populacji azjatyckiej, w grupie diabetyków u których wykluczono choroby sercowo-naczyniowe. Średnia wartość DPP IV wśród tych pacjentów wynosiła 645 ± 152 ng/ml i nie wykazywała związku ani z wartością BMI, ani z obwodem talii [Cho i wsp., 2019].

Istnieje niewiele badań wykazujących rolę DPP IV w ciąży. Japońscy badacze udowodnili obecność tego białka w łożysku i błonach płodowych [Imai i wsp., 1994]. Kolejne prace wykazały, że znaczenie tej adipokiny w łożysku związane jest z regulacją wewnątrzmacicznego rozwoju płodu [Nishikawa i wsp., 2005]. Udowodniono również spadek aktywności tej adipokiny w pierwszych miesiącach ciąży i powrót do wartości sprzed ciąży tuż po porodzie [Krepela i wsp., 1983]. Jedno z badań, analizujące rolę DPP IV jako białka związanego z immunoregulacją w populacji chińskiej wykazało również znaczącą ekspresję CD26 na limfocytach T kobiet ciężarnych. Badane pacjentki zostały podzielone na trzy grupy: grupę 45 kobiet nieciężarnych, grupę 55 zdrowych ciężarnych w I trymestrze

cięży oraz grupę 25 zdrowych ciężarnych w III trymestrze ciąży. Wykazano znaczne różnice stężenia DPP IV w osoczu krwi (wyrażanej jako antygen CD26) w poszczególnych grupach ciężarnych, w tym wyższe stężenie w grupach kobiet ciężarnych w porównaniu do kobiet nieciężarnych ($p < 0,001$). Wyższe stężenie dipeptydylopeptydazy IV wykazano również porównując ciężarne w III trymestrze do ciężarnych w trymestrze I ($p = 0,014$) [Zhao i wsp., 2012].

W dostępnym piśmiennictwie brak jest wyników badań analizujących wpływ DPP IV na nadmierny przyrost masy ciała w ciąży. Prezentowana rozprawa jest prawdopodobnie pierwszą próbą określenia takiej korelacji. Uzyskane wyniki wykazały statystycznie istotne różnice ($p = 0,026$) pomiędzy badanymi grupami z prawidłowym, niedostatecznym oraz nadmiernym przyrostem masy ciała. Najwyższe stężenia tej adipokiny wykazywały ciężarne z nadmiernym przyrostem masy ciała w ciąży ($500,25 \pm 219,71$ ng/ml) w porównaniu do grupy z prawidłowym ($434,45 \pm 186,20$ ng/ml, $p = 0,04$) oraz zbyt małym ($406,31 \pm 148,93$ ng/ml, $p = 0,01$). Powyższe wyniki sugerują potencjalny udział dipeptydylopeptydazy IV w patogenezie nadmiernego przyrostu masy ciała u ciężarnych.

6.6. Związek polimorfizmów genu *PPARG* ze stężeniem rezystyny i DPP IV

Opublikowano niewiele doniesień dotyczących wpływu poszczególnych polimorfizmów na stężenie adipokin prozapalnych, a ich wyniki są niejednoznaczne.

W roku 2017 Becer i wsp., analizowali wpływ polimorfizmu *Pro12Ala* genu *PPARG* na ekspresję adipokin: rezystyny, adiponektyny, leptyny oraz chemeryny. Pacjentów podzielono pod względem wartości BMI na grupy z nadmierną oraz prawidłową masą ciała. Oszacowano, że stężenie rezystyny u nosicieli zmutowanego allele Ala było istotnie statystycznie wyższe w grupie pacjentów otyłych w porównaniu do osób z prawidłową masą ciała ($8,59$ vs. $5,28$ ng/ml, $p < 0,001$). Częstość genotypu homozygotycznego zmutowanego *Ala/Ala* również była wyższa w grupie otyłych ($0,118$) w porównaniu do grupy z prawidłową wartością wskaźnika BMI ($0,071$). W grupie osób otyłych stężenie rezystyny wykazywało statystycznie niższe wartości u otyłych nosicieli allele *Pro* (genotyp *Pro/Pro* $6,74$ ng/ml oraz *Pro/Ala* $8,8$ ng/ml) w porównaniu do otyłych pacjentów z genotypem *Ala/Ala* ($9,89$ ng/ml), $p < 0,001$ [Becer i wsp., 2017].

Kolejne badanie, przeprowadzone przez hinduskich badaczy analizowało wpływ dwóch polimorfizmów: *Pro12Ala* oraz *161 C>T* genu *PPARG* na stężenie rezystyny w osoczu krwi. Przebadano grupę 599 pacjentów obserwując niższe stężenie rezystyny u nosicieli genotypu niezmutowanego w zakresie obydwu polimorfizmów (odpowiednio

Pro/Pro 11,62 ng/ml oraz *161CC* 11,37 ng/ml). W przypadku genotypu zawierającego co najmniej jeden zmutowany allel (*Pro/Ala* oraz *Ala/Ala* i *161CT* oraz *161TT*) stężenia te wynosiły odpowiednio 12,42 ng/ml i 12,99 ng/ml [Haseeb i wsp., 2009]. W prezentowanej rozprawie wykazano odwrotną zależność. Kobiety ciężarne, nosicielki niezmutowanego genotypu w przypadku obydwu polimorfizmów wykazywały wyższe stężenie rezystyny (odpowiednio *Pro/Pro* $13,80 \pm 4,58$ ng/ml oraz *161CC* $13,78 \pm 4,56$ ng/ml), natomiast nosicielki genotypu zawierającego co najmniej jeden zmutowany allel wykazywały niższe stężenie rezystyny (odpowiednio *Pro/Ala* $13,31 \pm 5,67$ ng/ml oraz *Ala/Ala* $11,40 \pm 2,80$ ng/ml i *161CT* $13,19 \pm 5,97$ ng/ml oraz *161TT* $12,57 \pm 2,15$ ng/ml).

Zbliżone wyniki do rezultatów otrzymanych w prezentowanej rozprawie uzyskano w populacji japońskiej, gdzie wyższe stężenie rezystyny w osoczu krwi wykazywali pacjenci z genotypem niezmutowanym *Pro/Pro* polimorfizmu *Pro12Ala* w porównaniu do nosicieli genotypów *Pro/Ala* i *Ala/Ala* (odpowiednio 11,6 vs. 10,4 µg/l [Osawa i wsp., 2009].

W badaniu Grygiel Górniak i wsp. [2016], w grupie pacjentek z PCOS analizowano polimorfizm *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG* oraz stężenie rezystyny u kobiet w wieku pomenopauzalnym. Autorzy przedstawili niewielkie, nieistotne statystycznie różnice stężenia rezystyny (wartości zlogarytmowane) w surowicy krwi (2,72 vs. 3,23 ng/ml) pomiędzy pacjentkami z nadmierną masą ciała (BMI <30 kg/m²), a kobietami otyłymi (BMI>30). W całej badanej grupie nosicielki genotypu niezmutowanego *Pro/Pro* wykazywały stężenie rezystyny niższe niż nosicielki genotypu zawierającego co najmniej jeden zmutowany allel (2,74 vs. 3,63 ng/ml), różnica nie była jednak istotna statystycznie ($p=0,133$). Podobnie w przypadku polimorfizmu *161C>T*, nosicielki genotypu *161CC* wykazywały stężenie rezystyny niższe niż kobiety nosicielki genotypu zawierającego zmutowany allel *161T* (2,79 vs. 3,64 ng/ml), $p=0,16$ [Grygiel-Górniak i wsp., 2016].

Pomimo, że wiele raportów podkreśla rolę rezystyny jako markera otyłości, w badaniach pochodzących z Meksyku nie znaleziono korelacji pomiędzy polimorfizmem *Pro12Ala* a stężeniem rezystyny w grupach z nadmierną masą oraz prawidłową masą ciała w zakresie wartości BMI. W badaniu tym średnie wartości rezystyny były niższe u osób z prawidłową wartością wskaźnika BMI w porównaniu do pacjentów z nadwagą oraz pacjentów z otyłością (8,4 vs. 9,7 i 10,5 ng/ml). Wartości te w poszczególnych grupach nie były jednak zależne od żadnego z genotypów polimorfizmu *Pro12Ala* [Vazquez-Del Mercado i wsp., 2015].

Wpływ wariantów polimorficznych genu *PPARG* na stężenie rezystyny modyfikowany jest przez czynniki środowiskowe, potwierdzając istotną rolę zależności gen-środowisko. Interesujące wyniki w tym zakresie przedstawiono analizując związek polimorfizmu *Pro12Ala* z fenotypem adipocytów modulowanym poprzez suplementację kwasu DHA w zróżnicowanej dawce. Powszechnie wiadomo, że wiele adipokin, w tym rezystyna, adiponektyna oraz TNF α znajdują się pod kontrolą transkrypcyjną PPAR γ , który ulega ekspresji w tkance tłuszczowej. Wykazano, że nadekspresja PPAR γ zmniejsza ekspresję prozapalnej rezystyny oraz TNF α , zwiększając przy tym syntezę przeciwzapalnej adiponektyny. Obecność niektórych wariantów polimorfizmu *Pro12Ala* korelowała z osłabieniem tych efektów, co więcej wpływ tego polimorfizmu na ekspresję adipokin uzależniony był od ilości dostarczonego DHA. Zaobserwowano, że zwiększenie dawki DHA niwelowało wpływ polimorfizmu *Pro12Ala* na akumulację lipidów [Wan i wsp., 2019].

Interesujące doniesienia pokazują również, że związku polimorfizmu *Pro12Ala* z otyłością nie należy oceniać poprzez pryzmat masy ciała definiowanej tylko jako wskaźnik BMI, ponieważ nie uwzględnia on różnic w masie tkanki tłuszczowej trzewnej i podskórnej. Definiując masę tkanki tłuszczowej tylko jako wartość wskaźnika BMI, łatwo pominąć takie aspekty jak odmienne proporcje tkanki trzewnej i podskórnej charakterystyczne dla poszczególnych grup etnicznych. Większą ekspresję prozapalnych adipokin wykazuje tkanka tłuszczowa trzewna, dlatego stężenie prozapalnych adipokin, w tym rezystyny będzie tym samym większe u osób z dominującą tkanką tłuszczową trzewną w porównaniu do osób z dominującą tkanką tłuszczową podskórną. Rodzaj dominującej tkanki tłuszczowej oraz ilość i jakość spożywanych w diecie tłuszczów może tłumaczyć różnice w doniesieniach naukowych dotyczące związku polimorfizmu *Pro12Ala* z otyłością oraz ze stężeniem rezystyny [Aguayo-Armendáriz i wsp., 2018]. Stwierdzona większa zdolność kumulacji PUFA w tkance tłuszczowej u nosicieli zmutowanego allela *Ala* [Stumvoll i wsp., 2001] oraz większa podatność na utratę nadmiernej masy ciała u nosicieli niezmutowanego allela *Pro* [Lapice i wsp., 2014] dowodzi, jak istotną rolę odgrywają w przypadku tego polimorfizmu czynniki środowiskowe, typu dieta i tryb życia.

Dostępne światowe piśmiennictwo nie pokazuje związku pomiędzy stężeniem prozapalnej dipeptydylopeptydazy IV we krwi a polimorfizmami *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG*. Wyniki przedstawione w prezentowanej pracy są prawdopodobnie pierwszą próbą oceny tych powiązań. DPP IV ulega ekspresji w wielu tkankach i narządach, w tym w tkance tłuszczowej, macicy oraz łożysku, jednak jej znaczenie jako prozapalnej adipokiny jest jeszcze mało poznane. Udowodniono, że ekspresja DPP IV zwiększa się w adipocytach

na wielu etapach ich różnicowania się, wpływając na wzrost ekspresji PPAR γ . Powoduje to nasilenie adipogenezy i wzmożoną kumulację tkanki tłuszczowej [Rosmaninho-Salgado i wsp., 2012]. Wykazano również związek podwyższonego stężenia DPP IV w osoczu i surowicy krwi u pacjentów z nadmierną masą ciała [Lamers i wsp., 2011, Lee i wsp., 2017].

Badania przeprowadzone w ramach prezentowanej rozprawy doktorskiej analizowały związek stężenia DPP IV z polimorfizmem *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG*. W całej badanej grupie pacjentek największe stężenia tej adipokiny zaobserwowano u nosicieli genotypu homozygotycznego zmutowanego obydwu badanych polimorfizmów (odpowiednio *Ala/Ala* $563,66 \pm 166,07$ ng/ml i *161TT* $521,73 \pm 154,36$ ng/ml) w porównaniu do nosicieli genotypu niezmutowanego tego wariantu genu (odpowiednio *Pro/Pro* $444,40 \pm 187,84$ ng/ml oraz *161CC* $436,60 \pm 190,98$ ng/ml). W zakresie polimorfizmu *Pro12Ala*, interesujące, istotne statystycznie różnice zaobserwowano porównując stężenia DPP IV w grupie z nadmiernym ciążowym przyrostem masy ciała ($504,49 \pm 207,30$) do stężeń tego białka w grupie z niedostatecznym przyrostem masy ciała w ciąży ($424,57 \pm 154,03$ ng/ml, $p=0,042$). Analizując stężenie DPP IV w korelacji z polimorfizmem *161C>T* uzyskano różnicę statystycznie istotną $p=0,043$ w analogicznych grupach. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na prawdopodobny związek stężeń DPP IV z wystąpieniem nadmiernego przyrostu masy ciała, zarówno w przypadku polimorfizmu *Pro12Ala*, jak i *161C>T* genu *PPARG*.

6.7. Rola nutrigenomiki i nutrigenetyki w rozwoju otyłości

Szybki postęp technik biologii molekularnej i genetyki otworzył nowe możliwości skutecznej walki z epidemią otyłości. Nutrigenomika i nutrigenetyka to obiecujące, intensywnie rozwijające się dziedziny nauki. Podczas gdy nutrigenomika analizuje wpływ składników diety na ekspresję i regulację genów, nutrigenetyka zajmuje się uwarunkowaniami genetycznymi indywidualnej reakcji organizmu na składniki diety i korzysta z najnowszych osiągnięć w zakresie badań asocjacyjnych genomu. Celem nutrigenetyki jest identyfikacja genów oraz poszczególnych wariantów polimorficznych odpowiedzialnych za indywidualną reakcję organizmu na składniki pokarmowe dostarczane z dietą [Sharma i wsp., 2017].

Brak możliwości skutecznej prewencji i leczenia otyłości oraz chorób metabolicznych z nią związanych sprawia, że duże nadzieje wiąże się obecnie z dietetyką spersonalizowaną, biorącą pod uwagę szereg czynników wpływających na kształtowanie fenotypów metabolicznych [Grabowski i wsp., 2020]. Wpływ bioaktywnych składników

zawartych w diecie na ekspresję genów został wielokrotnie udowodniony, jednak mechanizmy molekularne pomiędzy wariantami polimorficznymi genów a predyspozycją do poszczególnych chorób cywilizacyjnych nie są jeszcze w pełni poznane [Horne i wsp., 2019].

Gen *PPARG* jest jednym z obiecujących genów, którego warianty polimorficzne mogą zostać wykorzystane w personalizacji diety u osób z nadwagą i otyłością. Ponieważ naturalnymi ligandami receptora PPAR γ są kwasy tłuszczowe, a sam receptor pełni rolę czujnika lipidowego, stosowana dieta może mieć zasadniczy wpływ na modulowanie funkcji tego receptora u nosicieli poszczególnych wariantów polimorficznych tego genu. Większość badań wykazuje, że dieta wysokotłuszczowa, wysokoenergetyczna i wysokowęglowodanowa częściej powoduje rozwój otyłości u nosicieli zmutowanego allele *Ala* genu *PPARG*. Wpływ niewłaściwej diety związany z wartością wskaźnika BMI, składem tkanki tłuszczowej oraz parametrami metabolicznymi jest większy w przypadku nosicieli genotypów zawierających przynajmniej jeden allel *Ala*. Wykazano też, że nosiciele niezmutowanych alleli *Pro* są bardziej podatni na utratę nadmiernej masy ciała w przypadku utrzymywania aktywności fizycznej i przestrzegania zdrowej diety [Lapice i wsp., 2014]. Jednocześnie badanie brazylijskie analizujące związek wariantów polimorficznych *Pro12Ala* genu *PPARG* z suplementacją wielonienasyconymi kwasami pokazało, że ich spożywanie wpływa na zmniejszenia odkładania tkanki tłuszczowej u nosicieli zmutowanego allele *Ala* [Rodrigues i wsp., 2018].

Interesujące wyniki, wykazujące wpływ wariantu polimorficznego *Pro12Ala* genu *PPARG* na efektywność stosowanej diety, przedstawiono w pracy polskich badaczy z Poznania. W badaniu uczestniczyły 144 kobiety po menopauzie z otyłością centralną, które przez 16 tygodni stosowały losowo jedną z niskokalorycznych diet – śródziemnomorską lub środkowoeuropejską. W całej badanej grupie nosicielki zmutowanego allele *Ala* wykazywały wyższy procent tłuszczu brzuszego w porównaniu do kobiet z genotypem niezmutowanym *Pro/Pro*, $p < 0,05$. Co ciekawe, po zakończeniu badania, pacjentki z genotypem *Pro/Ala* lub *Ala/Ala* wykazywały większą niż pacjentki z genotypem *Pro/Pro* utratę masy ciała w przypadku zastosowania diety środkowoeuropejskiej, lub większą redukcję tłuszczu brzuszego i obwodu talii w przypadku diety śródziemnomorskiej [Chmurzyńska i wsp., 2019].

Duńska analiza sprawdzająca wpływ kwasów wielonienasyconych zawartych w tłuszczu rybim na ciążowy przyrost masy ciała u około 1000 otyłych ciężarnych oraz 1200 szczupłych kobiet w ciąży, nie potwierdziła natomiast istotnej statystycznie zależności

między spożywaniem kwasów wielonienasyconych, wariantami polimorficznymi *Pro12Ala* oraz ciążowym przyrostem masy ciała [Larsen i wsp., 2016].

Ciekawą obserwacją wydaje się fakt, że polimorfizmy genów związanych z magazynowaniem energii, w tym warianty genu *PPARG*, podlegają ewolucyjnej selekcji w populacjach. Scacchi i wsp. [2007] pokazuje częstość występowania zmutowanego allele *Ala* genu *PPARG* na przykładzie poszczególnych populacji europejskich. Największa częstość zmutowanego allele *Ala* (0,169), predysponująca do odkładania tkanki tłuszczowej, obserwowana jest w populacjach fińskich, żyjących w zimnym klimacie Europy Północnej. Najmniejsza natomiast częstość występowania allele *Ala* obserwowana jest w krajach śródziemnomorskich - na Sardynii (0,046) i na południu Włoch (0,054).

6.8. Implikacje kliniczne oraz możliwości terapeutycznego wykorzystania agonistów PPAR γ oraz inhibitorów DPP IV

Jedną z możliwości wykorzystania terapeutycznego właściwości receptora PPAR γ jest zastosowanie agonistów receptorów PPAR γ u pacjentów z cukrzycą, nadciśnieniem oraz zespołem metabolicznym. Jednymi z pierwszych opisanych egzogennych ligandów receptorów PPAR γ wykazujących właściwości terapeutyczne były tiazolidynediony (TZD) (glitazony), odkryte podczas badań dotyczących leków stabilizujących poziom lipidów w osoczu. Zaobserwowano, że wykazują one również działanie hipoglikemizujące spowodowane zdolnością uwrażliwiania komórek na insulinę. Ze względu na udział receptora PPAR γ w regulacji metabolizmu glukozy i procesów odpornościowych syntetyczne ligandy PPAR γ mają duży potencjał w leczeniu cukrzycy typu I, która jest chorobą ujawniającą się na tle immunologicznym [Choi i wsp., 2012].

Zauważono, że nosicielstwo niektórych wariantów polimorfizmu *Pro12Ala* związane jest z obniżeniem ekspresji receptora PPAR γ i może wywierać korzystne efekty przeciwzapalne [Helwig i wsp., 2007]. Szeroko udokumentowane działanie przeciwzapalne PPAR γ powoduje pozytywne efekty lecznicze np. we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego, chorobie Leśnowskiego-Crohna [Wada i wsp., 2001]. Najnowsze badania wskazują, że ze względu na swoje możliwości antyzapalne oraz ekspresję w śródbłonku i nabłonku płucnym receptory PPAR γ mają szansę być wykorzystane również w leczeniu astmy oskrzelowej [Kytikova i wsp., 2020]. Istnieje wiele doniesień na temat skuteczności prób leczenia agonistami PPAR γ chorób neurodegeneracyjnych o podłożu zapalnym [Skerrett i wsp., 2014, Iglesias i wsp., 2017].

Podsumowując, agoniści PPAR γ stanowią atrakcyjny cel terapeutyczny nie tylko w przypadku chorób wywołujących zespół metaboliczny, ale dzięki swoim właściwościom antyzapalnym dają duże nadzieje na ukierunkowane, celowane leczenie chorób autoimmunologicznych, sercowo-naczyniowych, neurologicznych a w przyszłości być może również powikłań położniczych.

Inhibitory DPP IV wydają się być kolejną, interesującą opcją terapeutyczną. Dipeptydylopeptydaza IV poprzez swoją aktywność enzymatyczną, wykazuje zdolność wybiórczej degradacji jelitowych hormonów inkretynowych GLP-1 oraz GIP, odpowiadających za poposiłkowe wydzielanie insuliny. Zastosowanie więc syntetycznych inhibitorów tego enzymu, tzw. gliptyn skutecznie zapobiega hiperglikemii przedłużając insulinotropowe działanie inkretyn [Bae, 2016].

Zastosowanie ukierunkowanych inhibitorów DPP IV wykazywało nie tylko zwiększenie insulinowrażliwości ale i protekcyjne działanie na mięsień sercowy i układ krążenia [Pala i wsp., 2013]. Istnieją również doniesienia, że ochronne działanie na układ sercowo-naczyniowy inhibitorów DPP IV może następować poprzez redukcję wolnych rodników tlenowych w szlaku niezależnym od insuliny [Drucker, 2013]. Trwają badania oceniające skuteczność i bezpieczeństwo zastosowania inhibitorów DPP IV w cukrzycy ciążowej oraz zespole policystycznych jajników [Öztürk i wsp., 2019]. Jak dotąd, w Europie zarejestrowano kilka gliptyn (sitagliptyna, saksagliptyna, wildagliptyna, alogliptyna, linagliptyna).

Jednocześnie zróżnicowane uwalnianie DPP IV z tkanek obserwowane jest w wielu stanach patologicznych i może być przydatnym biomarkerem wystąpienia i postępu niektórych chorób. Zwiększenie stężenia tej adipokiny w surowicy lub osoczu krwi obserwowane jest m.in. w otyłości, [Lamers i wsp., 2011], niealkoholowym stłuszczeniu wątroby indukowanym dietą [Iwasaki i wsp., 2011], wirusowym zapaleniu wątroby typu C, astmie oskrzelowej [Cordero i wsp., 2009] oraz osteoporozie [Gotoh i wsp., 1997]. Zmniejszone stężenie DPP IV zaobserwowano natomiast w reumatoidalnym zapaleniu stawów [Hagihara i wsp., 1987] i na początku ciąży [Krepela i wsp., 1983]. Wykorzystanie DPP IV jako biomarkera wielu chorób jest obecnie przedmiotem badań.

Korzystne, modulowane przez przyłączanie ligandów, działanie receptorów PPAR γ oraz duży potencjał terapeutyczny inhibitorów DPP IV zasługują na dalsze intensywne badanie ich szlaków sygnałowych. Badania w tym zakresie pozwolą na wskazanie nowych, skuteczniejszych strategii diagnostycznych i leczniczych diabetologii, immunologii,

kardiologii i onkologii, a być może również w przyszłości w ginekologii i perinatologii [Chandra i wsp., 2008, Bae, 2016, Yazbeck i wsp., 2018].

6.9. Podsumowanie

Otyłość jest jedną z najpoważniejszych chorób cywilizacyjnych XXI wieku. Nadmierna masa ciała kobiet w wieku rozrodczym stanowi znaczący problem zwłaszcza w dziedzinie perinatologii, wiążąc się z gorszymi efektami leczenia niepłodności, utrudniając diagnostykę prenatalną oraz wywołując wiele powikłań ciążowych i okołoporodowych zarówno u matki, jak i u potomstwa.

Opisanie roli receptora PPAR γ jako najważniejszego regulatora adipogenezy spowodowało duże zainteresowanie badaczy tkanką tłuszczową jako aktywnym narządem endokrynnym, wydzielającym anty-i prozapalne adipokiny. Różnicowanie adipocytów jest złożonym szlakiem kontrolowanym przez ekspresję wielu genów regulatorowych oraz czynników transkrypcyjnych. Głównym i kluczowym genem regulującym adipogenezę a także homeostazę węglowodanów i lipidów jest analizowany w prezentowanej pracy gen *PPARG*. Należy on do tzw. oszczędnych genów (*thrifty gene*), zapewniających kumulowanie tłuszczu jako rezerwy energetycznej, możliwej do wykorzystania w niesprzyjających warunkach.

Szeroko pojęta edukacja kobiet w zakresie zmiany stylu życia, unormowania parametrów metabolicznych i uzyskania prawidłowej masy ciała jeszcze w okresie planowania ciąży wydaje się mieć kluczową rolę w zapobieganiu jej powikłań. Ze względu na ograniczone możliwości skutecznego leczenia otyłości i związanych z nią zaburzeń duże nadzieje wiąże się ostatnio z żywieniem precyzyjnym, dostosowanym do indywidualnych predyspozycji genetycznych i epigenetycznych. Ciążowy przyrost masy ciała jest potencjalnie modyfikowalnym czynnikiem, a jego prawidłowy zakres może w znacznym stopniu zapobiegać powikłaniom towarzyszącym gromadzeniu się nadmiernej masy tkanki tłuszczowej. Stąd wydaje się, że stosowanie odpowiedniej diety może mieć duży wpływ na przyrost masy w ciąży, jak również na modulowanie funkcji receptora PPAR γ w zależności od obecności poszczególnych wariantów polimorficznych. Jednocześnie adipokiny prozapalne, w tym rezystyna i dipeptydylopeptydaza IV mogą stanowić miarodajny, nieinwazyjny biomarker zaburzeń metabolicznych.

Interesującą kwestią jest również skorzystanie z zindywidualizowanej opieki prenatalnej dotyczącej poradnictwa w zakresie genetyki oraz nutrigenetyki. Intensywny rozwój stosunkowo nowych obszarów nauki jakimi są nutrigenomika i nutrigenetyka ma szansę złagodzić negatywne skutki i obniżyć rosnącą gwałtownie już od wielu lat częstość występowania otyłości i chorób metabolicznych u ciężarnych, dzięki wykorzystaniu wiedzy o wpływie polimorfizmów genów związanych z otyłością na przebieg ciąży.

7. WNIOSKI

1. Wysoka wartość wskaźnika BMI przed ciążą związana jest z ryzykiem nadmiernego przyrostu masy ciała w ciąży.
2. Analiza obydwu badanych polimorfizmów *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG* nie wskazuje na bezpośredni związek tych wariantów z etiologią nadmiernego przyrostu masy ciała.
3. Analiza częstości występowania haplotypów wskazuje, że warianty zawierające zmutowane allele obydwu badanych polimorfizmów *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG* mogą być związane z patogenezą nadmiernego przyrostu masy ciała u ciężarnych.
4. Obserwowane wyższe stężenie dipeptydylopeptydazy IV w surowicy krwi u ciężarnych z nadmiernym przyrostem masy ciała sugeruje możliwy udział tej adipokiny w etiologii tego powikłania.
5. Asocjacja genotypów homozygotycznych niezmutowanych *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG* z wyższymi stężeniami dipeptydylopeptydazy IV u ciężarnych z nadmiernym przyrostem masy ciała wskazuje na możliwy wpływ tych wariantów na poziom DPP IV.

8. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Otyłość jest jedną z najpoważniejszych chorób cywilizacyjnych XXI wieku. Nadmierna masa ciała i otyłość u kobiet ciężarnych może być przyczyną licznych powikłań zarówno w przebiegu ciąży, jak i powikłań okołoporodowych dotyczących matki i dziecka. Nadmierny przyrost masy ciała w ciąży związany jest z hipertrofią i hiperplazją adipocytów, pod wpływem czynników genetycznych, metabolicznych lub środowiskowych. Głównym genem regulującym adipogenezę jest gen *PPARG* a niektóre z jego wariantów polimorficznych mają związek z nadmiernym przyrostem tkanki tłuszczowej oraz zaburzeniem homeostazy energetycznej organizmu.

Celem pracy była próba oceny częstości występowania wybranych polimorfizmów genu *PPARG* oraz ich związek ze stężeniem adipokin: rezystyny i dipeptydylopeptydazy IV u kobiet ciężarnych z nadmiernym przyrostem masy ciała. Cel ten zrealizowano poprzez ocenę częstości występowania genotypów i alleli polimorfizmów *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG* oraz ocenę stężeń rezystyny i dipeptydylopeptydazy IV w surowicy krwi pacjentek. Analizie poddano również korelację stężenia badanych adipokin z polimorfizmami genu *PPARG*. Ponadto przeanalizowano związek badanych polimorfizmów genu *PPARG* oraz stężenia adipokin z wybranymi parametrami klinicznymi ciężarnych.

Material i metody: Do badania zakwalifikowano 367 kobiet (średni wiek 30,89 lat, średni czas zakończenia ciąży 39,03 tydzień, średnia masa ciała przed ciążą 74,71 kg, średnia masa ciała pod koniec ciąży 89,26 kg), będących pacjentkami Kliniki Perinatologii i Chorób Kobietych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (2018-2020). Wszystkie pacjentki należały do rasy kaukaskiej i były narodowości polskiej, z potwierdzoną pojedynczą, donoszona ciążą o prawidłowym przebiegu. U każdej ciężarnej odnotowano szczegółowy wywiad położniczy oraz parametry kliniczne. Dla każdej pacjentki obliczono również wskaźnik BMI oraz podzielono je na trzy grupy ze względu na ciążowy przyrost masy ciała: niedostateczny (grupa IGWG), prawidłowy (grupa NGWG) oraz nadmierny (grupa EGWG). Oceniono częstość występowania polimorfizmów *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG* z wykorzystaniem metody reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) oraz polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) (367 ciężarnych). Metodą immunoenzymatyczną ELISA oznaczono stężenia białek w surowicy krwi (170 ciężarnych). Analizę statystyczną uzyskanych w pracy wyników wykonano z zastosowaniem oprogramowania R (wersja 4.0.2), programu Haploview (wersja 4.2) oraz pakietu haplo.stats programu R.

Wyniki: podczas analizy prawidłowy przyrost masy ciała w ciąży wykazano u 26,2% pacjentek (grupa NGWG), u 20,4% zbyt mały (grupa IGWG), a u 53,4% nadmierny (grupa EGWG). Prawidłową wartość wskaźnika BMI przed ciążą odnotowano u 43,1% kobiet, niedowagę u 3,0%, nadwagę u 25,3%, a otyłość u 28,6% pacjentek. Nadmierny przyrost masy ciała najczęściej występował u kobiet z otyłością (37,2%), następnie z nadwagą (35,2%) oraz u 27,6% z prawidłowym BMI przed ciążą. U żadnej pacjentki z niedowagą nie stwierdzono nadmiernego przyrostu masy ciała w ciąży. U kobiet z wysokim wskaźnikiem BMI przed ciążą zaobserwowano większe ryzyko nadmiernego przyrostu masy ciała w ciąży (OR=5,50 w grupie kobiet z nadwagą, $p<0,0001$; OR=3,29 w grupie kobiet z otyłością, $p=0,0001$).

Analizując dane kliniczne pacjentek w badanej grupie, istotne statystycznie różnice obserwowano w badanych grupach w zakresie masy ciała oraz wskaźnika BMI przed i pod koniec ciąży ($p<0,001$). Ciekawą obserwacją było odnotowanie największej liczby porodów samoistnych u pacjentek z grupy NGWG (55,21%). U ponad 52,55% kobiet z grupy EGWG oraz 54,67% kobiet z grupy IGWG ciążę ukończono na drodze cięcia cesarskiego. Analiza danych klinicznych noworodków wykazała największą masę ciała u noworodków pacjentek z grupy EGWG ($3601,04 \pm 553,59$ g), najmniejszą u noworodków pacjentek z grupy IGWG ($3328,72 \pm 496,69$ g) ($p=0,0003$).

W zakresie polimorfizmu *Pro12Ala* genu *PPARG* genotyp typu dzikiego odnotowano u 65,12% pacjentek, genotyp heterozygotyczny u 30,25% oraz genotyp homozygotyczny zmutowany u 4,63% kobiet. Dla polimorfizmu *161C>T* genu *PPARG* genotypy występowały odpowiednio: genotyp niezmutowany *161CC* u 68,12% ciężarnych, genotyp heterozygotyczny *161CT* u 28,07% oraz genotyp homozygotyczny zmutowany *161TT* u 3,81% ciężarnych.

W zakresie polimorfizmu *Pro12Ala* zaobserwowano częstsze występowanie genotypów zawierających zmutowany allel *Ala* w grupie EGWG (genotyp *Pro/Ala*: 32,7% vs. 31,2% i 22,7% i genotyp *Ala/Ala*: 5,6% vs. 4,2% i 2,7% odpowiednio u kobiet z grup EGWG i IGWG). Różnice te jednak nie były statystycznie istotne. Allel *Ala* zwiększał ryzyko nadmiernego przyrostu masy ciała w ciąży o 73% u ciężarnych z EGWG w porównaniu do grupy IGWG (OR=1,73, $p=0,038$). Również w modelu dominującym (*Pro/Pro* vs. *Pro/Ala* i *Ala/Ala*) w zakresie tego polimorfizmu odnotowano różnicę statystycznie istotną pomiędzy grupami IGWG i EGWG (OR=1,83, $p=0,042$).

Dla wariantu *161C>T* genu *PPARG* zaobserwowano częstsze występowanie genotypu zawierającego obydwa zmutowane allele *161TT* w grupie kobiet EGWG (5,1% vs. 4,1%

w grupie NGWG, $OR=0,81$, $p=0,937$). Podobnie zaobserwowano częstsze występowanie zmutowanego allele *161T* w grupie EGWG (19,4%), w porównaniu do grupy NGWG (18,8%) oraz IGWG (12,7%) (IGWG vs. EGWG: $OR=1,72$, $p=0,07$). Zaobserwowano także, że genotyp zawierający zmutowany allel *Ala* (*Pro/Ala* i *Ala/Ala*) częściej występował u kobiet otyłych przed ciążą, w porównaniu z osobami z prawidłową masą ciała przed ciążą (46,7% vs. 29,7%, $OR=2,07$, $p=0,006$).

Średnie stężenie rezystyny w całej grupie 170 kobiet wynosiło $13,60 \pm 4,86$ ng/ml, natomiast DPP IV $447,41 \pm 190,59$ ng/ml. Nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych pomiędzy średnimi wartościami uzyskanymi dla rezystyny w poszczególnych grupach kobiet z EGWG, NGWG oraz IGWG ($p=0,938$). Natomiast średnie wartości DPP IV różniły się statystycznie istotnie w badanych grupach ($p=0,026$), i były najwyższe w grupie kobiet z EGWG $500,25 \pm 219,71$ ng/ml vs. $434,45 \pm 186,20$ ng/ml w grupie NGWG ($p=0,04$) oraz $406,31 \pm 148,93$ ng/ml w grupie IGWG ($p=0,01$). Zaobserwowano także, że korelacja pomiędzy stężeniem rezystyny i DPP IV była najsilniejsza w grupie EGWG ($r=0,3$, $p=0,023$), słabsza w grupie NGWG ($r=0,17$, $p=0,22$) i najslabsza w grupie IGWG ($r=0,041$, $p=0,77$).

Najwyższe stężenie rezystyny odnotowano u nosicielek genotypu homozygotycznego niezmutowanego dla obydwu badanych polimorfizmów *Pro12Ala* oraz *161C>T* (*Pro/Pro*: $13,80 \pm 4,58$ ng/ml oraz *161CC*: $13,78 \pm 4,56$ ng/ml), a najniższe u nosicielek obydwu zmutowanych alleli (*Ala/Ala*: $11,40 \pm 2,80$ ng/ml; *161TT*: $12,57 \pm 2,15$ ng/ml). Odwrotną zależność natomiast stwierdzono dla DPP IV, gdzie najwyższe stężenia występowały u nosicielek genotypu zmutowanego *Ala/Ala* i *161TT* (odpowiednio $563,66 \pm 166,07$ ng/ml oraz $521,73 \pm 154,36$ ng/ml). Obserwowane różnice nie były istotne statystycznie.

Natomiast dla DPP IV zaobserwowano statystycznie istotną różnicę pomiędzy średnim stężeniem tej adipokiny u nosicielek genotypów homozygotycznych niezmutowanych *Pro/Pro* oraz *161CC* wariantu *161C>T* pomiędzy grupami NGWG oraz EGWG. Średnia dla kobiet z genotypem *Pro/Pro* była znacząco wyższa u kobiet z grupy EGWG i wynosiła $504,49 \pm 207,30$ ng/ml vs. $402,55 \pm 188,25$ ng/ml u kobiet z grupy NGWG, $p=0,042$. Podobnie dla wariantu *161C>T* średnie stężenie DPP IV u kobiet z genotypem *161CC* było znacząco wyższe u kobiet z grupy EGWG i wynosiło $498,97 \pm 214,65$ ng/ml vs. $397,89 \pm 185,82$ ng/ml u kobiet z NGWG, $p=0,043$.

Podczas analizy współwystępowania genotypów wariantów genu *PPARG* zaobserwowano, że najczęściej w badanej grupie kobiet występowała kombinacja genotypów homozygotycznych niezmutowanych *ProPro/CC* (61,0%).

Analizując frekwencje wszystkich czterech możliwych do uzyskania haplotypów w badanych grupach kobiet zaobserwowano statystycznie istotną różnicę w częstości występowania haplotypu *ProC* pomiędzy grupami kobiet IGWG oraz EGWG (OR=0,579, $p=0,028$). Wykazano również, że nosicielstwo pojedynczej kopii haplotypu *ProT* występujące u mniej niż 2% badanych kobiet zwiększa stężenie dipeptydylopeptydazy IV o 30,17 ng/ml ($p<0,001$), w porównaniu z nosicielstwem dwóch kopii referencyjnego haplotypu *ProC*.

Wnioski:

1. Wysoka wartość wskaźnika BMI przed ciążą związana jest z ryzykiem nadmiernego przyrostu masy ciała w ciąży.
2. Analiza obydwu badanych polimorfizmów *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG* nie wskazuje na bezpośredni związek tych wariantów z etiologią nadmiernego przyrostu masy ciała.
3. Analiza częstości występowania haplotypów wskazuje, że warianty zawierające zmutowane allele obydwu badanych polimorfizmów *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG* mogą być związane z patogenezą nadmiernego przyrostu masy ciała u ciężarnych.
4. Obserwowane wyższe stężenie dipeptydylopeptydazy IV w surowicy krwi u ciężarnych z nadmiernym przyrostem masy ciała sugeruje możliwy udział tej adipokiny w etiologii badanego powikłania.
5. Asocjacja genotypów homozygotycznych niezmutowanych *Pro12Ala* oraz *161C>T* genu *PPARG* z wyższymi stężeniami dipeptydylopeptydazy IV u ciężarnych z nadmiernym przyrostem masy ciała wskazuje na możliwy wpływ tych wariantów na poziom DPP IV.

9. SUMMARY

Obesity is one of the most serious diseases of civilization of the 21st century. Excess body weight and obesity in pregnant women can cause numerous complications, during the pregnancy, and perinatal complications for both the mother and child. Excessive weight gain in pregnancy is associated with hypertrophy and hyperplasia of the adipocytes, under the influence of genetic, metabolic, and environmental factors. The main gene regulating adipogenesis is the *PPARG* gene, and some of its polymorphic variants are associated with excessive adipose tissue gain and disturbances to energy homeostasis.

The aim of the study was an attempt to assess the frequency of selected polymorphisms of the *PPARG* gene and their relationship with the concentration of the adipokines: resistin and dipeptidyl peptidase IV in pregnant women with excessive weight gain. This goal was achieved by assessing the frequency of genotypes and alleles of the *Pro12Ala* and *161C>T* polymorphisms of the *PPARG* gene, and by assessing the concentrations of resistin and dipeptidyl peptidase IV in the blood serum of patients. The correlation between the concentration of adipokines and *PPARG* gene polymorphisms was also analysed. Moreover, the relationship between the *PPARG* gene polymorphisms and the concentration of adipokines with selected clinical parameters of pregnant women was analysed.

Material and methods: The study included 367 women who were patients of the Division of Perinatology and Women's Diseases of the University of Medical Sciences in Poznan between 2018 and 2020 (mean age 30.89 years, average pregnancy length 39.03 weeks, average body weight before pregnancy 74.71 kg, average body weight at the end of pregnancy 89.26 kg). All patients were Caucasian of Polish origin, with a confirmed single, reported pregnancy of normal course. In each case, a detailed obstetric history was obtained, together with clinical parameters. For each patient, the BMI was calculated, and the patients were divided into three groups based on gestational weight gain: insufficient (IGWG group), normal (NGWG group) and excessive (EGWG group). The incidence of *Pro12Ala* and *161C>T* polymorphisms of the *PPARG* gene were assessed using the polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) (in 367 pregnancies). The ELISA immunoenzymatic method was used to determine serum protein concentrations (in 170 pregnancies). Statistical analysis was carried out using R software (version 4.0.2), Haploview (version 4.2) and the haplo.stats R package.

Results: normal pregnancy related weight gain was determined in 26.2% of patients (NGWG group), insufficient weight gain was shown in 20.4% (IGWG group), and excessive weight gain was demonstrated in 53.4% (EGWG group). Normal pre-pregnancy BMI was reported in 43.1% of women, 3.0% were found to be underweight, 25.3% were overweight, and obesity was diagnosed in 28.6% of patients. Excessive weight gain was most commonly observed in women with obesity (37.2%), followed by those who were overweight (35.2%), and then in those with normal pre-pregnancy BMI (27.6%). Excessive weight gain was not observed in any of the patients primarily classified as underweight. Women with a high BMI prior to pregnancy, had a greater risk of excessive weight gain during pregnancy (OR=5.50 in overweight women, $p<0.0001$; OR=3.29 in obese women, $p=0.0001$).

When analysing patient clinical data, statistically significant differences were observed in the studied groups in terms of body weight and BMI before and after pregnancy ($p<0.001$). An interesting observation was that the highest number of spontaneous births was recorded in NGWG patients (55.21%). More than 52.55% of EGWG women and 54.67% of IGWG women had a caesarean section. An analysis of clinical data from newborns showed that the highest body weight for newborns was observed among EGWG mothers (3601.04 ± 553.59 g), the lowest body weight for newborn patients was seen in the IGWG group (3328.72 ± 496.69 g) ($p=0.0003$).

In the case of *Pro12Ala* polymorphisms of *PPARG*, the wild-type genotype was determined in 65.12% of patients, 30.25% were heterozygotic, and 4.63% of the women were homozygous for the mutated genotype. For the *161C>T* polymorphism of the *PPARG* gene, the genotypes were as follows: the unmutated *161CC* genotype was noted in 68.12% of pregnant women, the heterozygotic phenotype was seen in 28.07%, and the homozygotic mutated *161TT* genotype was detected in 3.81% of pregnancies.

In the case of *Pro12Ala* polymorphism, patients in the EGWG had a higher incidence of genotypes containing the mutant *Ala* allele (*Pro/Ala* genotype: 32.7% vs. 31.2% and 22.7%, and *Ala/Ala* genotype: 5.6% vs. 4.2% and 2.7% in EGWG and IGWG women, respectively). These differences were not, however, statistically significant. The *Ala* allele increased the risk of excessive weight gain by 73% in patients from the EGWG group, in comparison to those from the IGWG group (OR=1.73, $p=0.038$). In the dominant model (*Pro/Pro* vs. *Pro/Ala* and *Ala/Ala*) in terms of this polymorphism, a statistically significant difference was noted between the IGWG and EGWG groups (OR = 1.83, $p=0.042$).

For variant *161C>T* of the *PPARG* gene, a higher incidence of the genotype containing both mutant *161TT* alleles was observed in the EGWG women's group (5.1% vs. 4.1% in the

NGWG group, OR=0.81, $p=0.937$). Similarly, a higher incidence of the mutant *161T* allele was observed in the EGWG group (19.4%), when compared with the NGWG group (18.8%) and the IGWG (12.7%) (IGWG vs. EGWG: OR=1.72, $p=0.07$). It was also observed that genotypes containing the mutant *Ala* allele (*Pro/Ala* and *Ala/Ala*) was more common in obese women prior to pregnancy, compared with those with normal body weight before pregnancy (46.7% vs. 29.7%, OR=2.07, $p=0.006$).

The mean resistin concentration across the whole group of 170 women was 13.60 ± 4.86 ng/ml, and DPP IV 447.41 ± 190.59 ng/ml. There were no statistically significant differences between the mean values obtained for resistin in individual groups of women with EGWG, NGWG and IGWG ($p=0.938$). Meanwhile, mean values of DPP IV differed significantly in the studied groups ($p=0.026$) and were the highest in the group of women with EGWG 500.25 ± 219.71 ng/ml vs. 434.45 ± 186.20 ng/ml in the NGWG group ($p=0.04$) and 406.31 ± 148.93 ng/ml in the IGWG group ($p=0.01$). It was also observed that the correlation between the concentration of resistin and DPP IV was the strongest in the EGWG group ($r=0.3$, $p=0.023$), weaker in the NGWG group ($r=0.17$, $p=0.22$) and the weakest in the IGWG group ($r=0.041$, $p=0.77$).

The highest concentration of resistin was recorded in carriers of the homozygous non-mutated genotype for both tested polymorphisms *Pro12Ala* and *161C>T* (*Pro/Pro*: 13.80 ± 4.58 ng/ml and *161CC*: 13.78 ± 4.56 ng/ml), and the lowest in carriers of both mutant alleles (*Ala/Ala*: 11.40 ± 2.80 ng/ml; *161TT*: 12.57 ± 2.15 ng/ml). An inverse relationship was found for DPP IV however, where the highest concentrations were found in carriers of the mutant *Ala/Ala* genotype and *161TT* (563.66 ± 166.07 ng/ml and 521.73 ± 154.36 ng/ml, respectively). The observed differences were not statistically significant. For DPP IV, a statistically significant difference was observed between the mean concentration of this adipokine in carriers of the homozygous non-mutated *Pro/Pro* genotypes and *161CC* of the *161C>T* variant between the NGWG and EGWG groups. The average concentration for women with the *Pro/Pro* genotype was significantly higher in patients from the EGWG group and amounted to 504.49 ± 207.30 ng/ml vs. 402.55 ± 188.25 ng/ml among women from the NGWG group, $p=0.042$. Similarly, for the *161C>T* variant, the mean concentration of DPP IV in women with the *161CC* genotype was significantly higher in women from the EGWG group and amounted to 498.97 ± 214.65 ng/ml vs. 397.89 ± 185.82 ng/ml in women with NGWG, $p=0.043$.

When analysing the coexistence of genotypes of *PPARG* gene variants, it was observed that, for the group of women studied, the most common was a combination of homozygous non-mutated *ProPro/CC* genotypes (61.0%).

When analysing the frequency of all four achievable haplotypes in the studied groups of women, a statistically significant difference was observed in the frequency of the *ProC* haplotype between the IGWG and EGWG groups of women (OR=0.579, $p=0.028$). It was also shown that carriage of a single copy of haplotype *ProT* occurred in less than 2% of women and increases the concentration of dipeptidyl peptidase IV of 30.17 ng/ml ($p<0.001$), compared with the reference state.

Conclusions:

1. High pre-pregnancy BMI is associated with increased risk of excessive weight gain during pregnancy.
2. An analysis of the *Pro12Ala* and *161C>T* polymorphisms of the *PPARG* gene showed no direct link between those variants and excessive weight gain.
3. A haplotype analysis showed that variants containing mutated alleles of either the *Pro12Ala* or the *161C>T* polymorphisms may be involved in the pathogenesis of excessive weight gain during pregnancy.
4. The observation of increased serum concentrations of dipeptidyl peptidase IV in pregnant women with excessive weight gain may suggest the involvement of these adipokines in the aetiology of the studied condition.
5. The association between unmutated homozygous genotypes *Pro12Ala* and *161C>T* of the *PPARG* gene, and higher concentrations of dipeptidyl peptidase IV in pregnant women with excessive weight gain suggests the potential influence of these variants on the DPP IV level.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Abbott CA, McCaughan GW, Baker E, Sutherland GR. Genomic organization, exact localization, and tissue expression of the human CD26 (dipeptidyl peptidase IV) gene. *Immun.* 1994;40(5):331-338.
2. Aguayo-Armendáriz J, Montalvo-Corral M, González-Martínez KA, Grijalva-Haro MI et al. Central obesity and body fat, but not body mass index, are associated with the Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor γ gene in a population with a high consumption of saturated and trans-fatty acids. *Nutr Res.* 2018;57:28-35.
3. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med.* 2013;19(5):557-566.
4. Ahmed M, Gaffen SL. IL-17 in obesity and adipogenesis. *Cyt Growth Factor Rev.* 2010;21(6):449-453.
5. American College of Obstetricians and Gynecologists. ACOG Committee opinion no.548: weight gain during pregnancy. *Obst Gyn.* 2013;121(1):210-212.
6. Ananth J, Venkatesh R, Burgoyne K. Atypical antipsychotic weight gain: pathophysiology and management. *Ann Clin Psych.* 2004;16(2):75-85.
7. Ardlie KG, Lunetta KL, Seielstad M. Testing for population subdivision and association in four case-control studies. *Am J Hum Gen.* 2002;71(2):304-311.
8. Arica PC, Aydin S, Zengin U, Kocael A et al. The effects on obesity related peptides of laparoscopic gastric band applications in morbidly obese patients. *J Inv Surg.* 2018;31(2):89-95.
9. Aruna B, Islam A, Ghosh S, Singh AK et al. Biophysical analyses of human resistin: oligomer formation suggests novel biological function. *Bioch.* 2008;47:12457-12466.
10. Bae EJ. DPP-4 inhibitors in diabetic complications: role of DPP-4 beyond glucose control. *Arch Pharm Res.* 2016;39(8):1114-1128.
11. Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diab.* 1993;36(1):62-67.
12. Barker DJP, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet.* 1986;8489(327):1077-1081.
13. Beamer BA, Yen CJ, Andersen RE, Muller D et al. Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diab.* 1998;47(11):1806-1808.
14. Bebelska KP, Ehmke vel Emczyńska E, Gmoch-Gajzlerska E. Otyłość jako czynnik zaburzający procesy rozrodcze. *Now. Lek.* 2011;80(6):499-507.
15. Becer E, Çirakoğlu A. Effect of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 gene on lipid profile and adipokines levels in obese subjects. *Bal J Med Gen.* 2017;20(1):71-80.
16. Benomar Y, Gertler A, De Lacy P, Crépin D et al. Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4. *Diab.* 2013;62(1):102-114.
17. Berbée JFP, Boon MR, Khedoe PSJ, Bartelt A et al. Brown fat activation reduces hypercholesterolaemia and protects from atherosclerosis development. *Nat. Com.* 2015;6(1):1-11.

18. Bider-Canfield Z, Martinez MP, Wang X, Yu W et al. Maternal obesity, gestational diabetes, breastfeeding and childhood overweight at age 2 years. *Ped Obes.* 2017;12(2):171-178.
19. Biela U, Pająk A, Kaczmarczyk-Chałas K, Głuszek J et al. Incidence of overweight and obesity in women and men between the ages of 20-74. Results of the WOBASZ program. *Kard Pol.* 2005;63(6supp4):632-635.
20. Boden G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Op End Diab Obes.* 2011;18(2):139-143.
21. Boender AJ, Van Rozen AJ, Adan RA. Nutritional state affects the expression of the obesity-associated genes *Etv5*, *Faim2*, *Fto*, and *Negr1*. *Obes.* 2012;20(12):2420-2425.
22. Bouter KE, van Raalte DH, Groen AK, Nieuwdorp M. Role of the gut microbiome in the pathogenesis of obesity and obesity-related metabolic dysfunction. *Gastroent.* 2017;152(7):1671-1678.
23. Bray GA. Medical consequences of obesity. *J Clin End Metab.* 2004;89(6):2583-2589.
24. Brown A, Avery A. Healthy weight management during pregnancy: what advice and information is being provided. *Hum Nutr Diet.* 2012;25(4):378–387.
25. Cardoso AL, Fernandes A, Aguilar-Pimentel JA, de Angelis MH et al. Towards frailty biomarkers: candidates from genes and pathways regulated in aging and age-related diseases. *Age Res Rev.* 2018, 47:214-277.
26. Catalano PM, Nizielski SE, Shao J, Preston L et al. Downregulated IRS-1 and PPAR γ in obese women with gestational diabetes: relationship to FFA during pregnancy. *Am J Phys End Met.* 2002;282(3):522-533.
27. Cattley RC, DeLuca J, Elcombe C, Fenner-Crisp P et al. Do peroxisome proliferating compounds pose a hepatocarcinogenic hazard to humans? *Reg Toxic Pharm.* 1998;27(1):47-60.
28. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE et al. Inflammation and pregnancy. *Repr Sc.* 2009;16(2):206-15.
29. Chandra V, Huang P, Hamuro Y, Raghuram S et al. Structure of the intact PPAR- γ -RXR- α nuclear receptor complex on DNA. *Nature.* 2008;7220(456):350-356.
30. Chen C, Jiang J, Lü JM, Chai H et al. Resistin decreases expression of endothelial nitric oxide synthase through oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Am J Phys Heart Circ Phys.* 2010;299(1):193-201.
31. Cheney K, Farber R, Barratt AL, McGeechan K et al. Population attributable fractions of perinatal outcomes for nulliparous women associated with overweight and obesity, 1990-2014. *Med J Austr.* 2018;208(3):119-125.
32. Cheng M, Mei B, Zhou Q, Zhang M et al Computational analyses of obesity associated loci generated by genome-wide association studies. *PloS One.* 2018;13(7):0199987.
33. Chmurzyńska A. Fetal programming: link between early nutrition, DNA methylation, and complex diseases. *Nutr Rev.* 2010;68(2):87-98.
34. Chmurzyńska A, Muzsik A, Krzyżanowska-Jankowska P, Mądry E et al. PPARG and FTO polymorphism can modulate the outcomes of a central European diet and a Mediterranean diet in centrally obese postmenopausal women. *Nutr Res.* 2019;69:94-100.
35. Cho EH, Kim SW. Soluble dipeptidyl peptidase-4 levels are associated with decreased renal function in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diab Met J.* 2019;43(1):97-104.
36. Choi JM, Bothwell AL. The nuclear receptor PPARs as important regulators of T-cell functions and autoimmune diseases. *Mol Cells.* 2012;33(3):217-222.
37. Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Met.* 2019;92:6-10.
38. Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med.* 2012;18(1):59-68.

39. Codoñer-Franch P, Alonso-Iglesias E. Resistin:insulin resistance to malignancy. *Clin Chim Act.* 2015;438:46-54.
40. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Effect of mother's weight on infant's microbiota acquisition, composition, and activity during early infancy: a prospective follow-up study initiated in early pregnancy. *Am J Clin Nutr.* 2010;92(5):1023-1030.
41. Cordero OJ, Salgado FJ, Nogueira M. On the origin of serum CD26 and its altered concentration in cancer patients. *Canc Imm Immunoth.* 2009;58(11):1723-1747.
42. Cortelazzi D, Corbetta S, Ronzoni S, Pelle F et al. Maternal and foetal resistin and adiponectin concentrations in normal and complicated pregnancies. *Clin End.* 2007;66(3):447-453.
43. Costa MA. The endocrine function of human placenta: an overview. *Repr Biom.* 2016;32(1):14-43.
44. Costa V, Casamassimi A, Esposito K, Villani A et al. Characterization of a novel polymorphism in PPARG regulatory region associated with type 2 diabetes and diabetic retinopathy in Italy. *J Biom Biot.* 2009:126917.
45. Crews JK, Herrington JN, Granger JP, Khalil RA. Decreased endothelium-dependent vascular relaxation during reduction of uterine perfusion pressure in pregnant rat. *Hypert.* 2000;35(1):367-372.
46. Davenport MH, Ruchat SM, Giroux I, Sopper MM, Mottola MF. Timing of excessive pregnancy-related weight gain and offspring adiposity at birth. *Obst Gyn.* 2013;122(2):255-261.
47. De Silva A, Bloom SR. Gut hormones and appetite control: a focus on PYY and GLP-1 as therapeutic targets in obesity. *Gut Liver.* 2012;6(1):10-20.
48. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki et al. Pro12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat. Gen.* 1998;20(3):284-287.
49. Denison F, Price J, Graham C, Wild S, Liston W. Maternal obesity, length of gestation, risk of postdates pregnancy and spontaneous onset of labour at term. *BJOG.* 2008;115(6):720-725.
50. Deputy NP, Sharma AJ, Kim SY, Hinkle SN. Prevalence and characteristics associated with gestational weight gain adequacy. *Obst Gyn.* 2015;125(4):773-81.
51. Desruisseaux MS, Trujillo ME, Tanowitz HB, Scherer PE. Adipocyte, adipose tissue, and infectious disease. *Infect Immun.* 2007;75(3):1066-1078.
52. Domingue BW, Fletcher J, Conley D, Boardman JD. Genetic and educational assortative mating among US adults. *Proc Nat Ac Sc.* 2014;111(22):7996-8000.
53. Doney A, Fischer B, Cecil JE, Boylan K et al. Association of the Pro12Ala and C1431T variants of PPARG and their haplotypes with susceptibility to Type 2 diabetes. *Diab.* 2004;47(3):555-568.
54. Doney A, Fischer B, Frew D, Cumming A et al. Haplotype analysis of the PPARGgamma Pro12Ala and C1431T variants reveals opposing associations with body weight. *BMC Genet.* 2002;3(1):1-8.
55. Dragojevič J, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, Komadina R. PPARG gene promoter polymorphism is associated with non-traumatic hip fracture risk in the elderly Slovenian population: a pilot study. *Clin Bioch.* 2011;44(13):1085-1089.
56. Drucker DJ. Incretin action in the pancreas: potential promise, possible perils, and pathological pitfalls. *Diab.* 2013;62(10):3316-3323.
57. Dusseault J, Li B, Haider N, Goyette MA et al. Nck2 deficiency in mice results in increased adiposity associated with adipocyte hypertrophy and enhanced adipogenesis. *Diab.* 2016;65(9):2652-2666.

58. Duszka K, Gregor A, Guillou H, König J, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors and caloric restriction-common pathways affecting metabolism, health, and longevity. *Cells*. 2020;9(7):1708-1783.
59. Ek J, Anderse G, Urhammer SA, Hansen L et al. Studies of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 (PPAR- γ 2) gene in relation to insulin sensitivity among glucose tolerant Caucasians. *Diab*. 2001;44(9):1170-1176.
60. Europeristat: Euro-Peristat Project. European perinatal health report. Core indicators of the health and care of pregnant women and babies in Europe in 2015:<https://openaccess.city.ac.uk/id/eprint/21162/1/>.
61. Eurostat:https://ec.europa.eu/eurostat/statisticsexplained/index.php/Overweight_and_obesity_-_BMI_statistics.
62. Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J Biol Chem*. 1997;272(30):18779-18789.
63. Fehmann HC, Heyn J. Plasma resistin levels in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and in healthy controls. *Horm Metab Res*. 2002;34(11/12):671-673.
64. Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lip Res*. 2006;45(2):120-59.
65. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med*. 2009;15(8):930-939.
66. Filková M, Haluzík M, Gay S, Šenolt L. The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clin Immun*. 2009;133(2):157-170.
67. Fleischman AR, Oinuma M, Clark SL. Rethinking the definition of “term pregnancy”. *Obst Gyn*. 2010;116(1):36–39.
68. Folwaczny M, Manolis V, Markus C, Glas J. Variants of the human PPARG locus and the susceptibility to chronic periodontitis. *Inn Immun*. 2011;17(6):541-547.
69. Fournier T, Guibourdenche J, Handschuh K, Tsatsaris V et al. PPAR γ and human trophoblast differentiation. *J Repr Imm*. 2011;90(1):41-49.
70. Gao F, Hu W, Li Y, Shen H, Hu J. Mono-2-ethylhexyl phthalate inhibits human extravillous trophoblast invasion via the PPAR γ pathway. *Tox App Pharm*. 2017;327:23-29.
71. Gilmore LA, Klempel-Donchenko M, Redman LM. Pregnancy as a window to future health: Excessive gestational weight gain and obesity. *Sem Perin*. 2015;39(4):296–303.
72. Giordano A, Smorlesi A, Frontini A, Barbatelli G, Cinti S. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur J End*. 2014;170(5):159-171.
73. Goldstein R, Abell S, Ranasinha S, Misso M et al. Gestational weight gain across continents and ethnicity: systematic review and meta-analysis of maternal and infant outcomes in more than one million women. *BMC Med*. 2018;16(1):1-14.
74. Goldstein R, Abell SK, Ranasinha S, Misso M et al. Association of gestational weight gain with maternal and infant outcomes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2017;317(21):2207–2225.
75. Gong H, Ni Y, Guo X, Fei L et al. Resistin promotes 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J End*. 2004;150(6):885-892.
76. Gorrell MD, Gysbers V, McCaughan GW. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Sc J Immun*. 2001;54(3):249-264.

77. Gotoh H, Hagihara M, Nagatsu T, Iwata H, Miura T. Activity of dipeptidyl peptidase IV and post-proline cleaving enzyme in sera from osteoporotic patients. *Clin Chem.* 1997;34(12):2499-2501.
78. Grabowski M, Barski J, Liśkiewicz D. Fenotypowanie metaboliczne w rozwoju dietyki spersonalizowanej. *Post Bioch.* 2020;66(2):125-133.
79. Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF et al. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Exp J Liver Res.* 1995;4(4-5):281-299.
80. Grygiel-Górniak B, Kaczmarek E, Mosor M, Przysławski J, Bogacz A. Genetic background, adipocytokines, and metabolic disorders in postmenopausal overweight and obese women. *Bioch Gen.* 2016;54(5):636-652.
81. Grygiel-Górniak B, Ziółkowska-Suchanek I, Kaczmarek E, Mosor M et al. PPARgamma-2 and ADRB3 polymorphisms in connective tissue diseases and lipid disorders. *Clin Int Ag.* 2018;13:463-472.
82. Grygiel-Górniak B, Ziółkowska-Suchanek I, Kaczmarek E, Puszczewicz M, Rozwadowska N. Genetic background of hypertension in connective tissue diseases. *J Immun Res.* 2020;7509608-7509608.
83. Guelfi KJ, Ong MJ, Li S, Wallman KE et al. Maternal circulating adipokine profile and insulin resistance in women at high risk of developing gestational diabetes mellitus. *Metab.* 2017;75:54-60.
84. Gunatilake RP, Perlow JH. Obesity and pregnancy: clinical management of the obese gravida. *Am J Obst Gyn.* 2011;204(2):106–119.
85. Hagihara M, Ohhashi M, Nagatsu T. Activities of dipeptidyl peptidase II and dipeptidyl peptidase IV in mice with lupus erythematosus-like syndrome and in patients with lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Clin Chem.* 1987;33(8):1463-1465.
86. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis: Type 2 diabetes. *Brit Med Bul.* 2001;60(1):5-20.
87. Haseeb A, Iliyas M, Chakrabart S, Farooqui AA et al. Single-nucleotide polymorphisms in peroxisome proliferator-activated receptor γ and their association with plasma levels of resistin and the metabolic syndrome in a South Indian population. *J Biosc.* 2009;34(3):405-414.
88. Haworth CM, Plomin R, Carnell S, Wardle J. Childhood obesity: genetic and environmental overlap with normal range BMI. *Obes.* 2008;16(7):1585-1590.
89. Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Nat Ac Sc.* 2008;105(44):17046-17049.
90. Helwig U, Rubin D, Kiosz J, Schreiber S et al. The minor allele of the PPARg2 Pro12Ala polymorphism is associated with lower postprandial TAG and insulin levels in non-obese healthy men. *Brit J Nutr.* 2007;97(5):847-854.
91. Heude B, Pelloux V, Forhan A, Bedel JF et al. EDEN Mother-Child Cohort Study Group. Associations of the Pro12Ala and C1431T variants of PPARgamma and their haplotypes with susceptibility to gestational diabetes. *J Clin End Metab.* 2011;96(10):1656-1660.
92. Hirshberg A, Srinivas SK. Epidemiology of maternal morbidity and mortality. *Semin Perinat.* 2017;41(6):332–337.
93. Hofman PL, Cutfield WS, Robinson EM, Bergman et al. Insulin resistance in short children with intrauterine growth retardation. *J Clin End Metab.* 1997;82(2):402-406.
94. Hojka A, Rapak A. Receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów (PPAR). Właściwości antyproliferacyjne. *PHMD.* 2011;65:404-413.

95. Holowko N, Chaparro MP, Nilsson K, Ivarsson A et al. Social inequality in pre-pregnancy BMI and gestational weight gain in the first and second pregnancy among women in Sweden. *J Epid Com Health*. 2015;69(12):1154-1161.
96. Hopsu-Havu VK, Glenner GG. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochem*. 1966;7(3):197-201.
97. Horne J, Gilliland J, O'Connor C, Seabrook J et al. Study protocol of a pragmatic randomized controlled trial incorporated into the Group Lifestyle Balance™ program: the nutrigenomics, overweight/obesity and weight management trial (the NOW trial). *BMC Pub Health*. 2019;19(1):1-10.
98. Horstmann A, Kovacs P, Kabisch S, Boettcher Y et al. Common genetic variation near MC4R has a sex-specific impact on human brain structure and eating behavior. *PloS One*. 2013;9(8):74362.
99. Hruby A, Hu FB. The epidemiology of obesity: a big picture. *Pharm*. 2015;33(7):673-689.
100. Hu SM, Chen MS, Tan HZ. Maternal serum level of resistin is associated with risk for gestational diabetes mellitus: A meta-analysis. *World J Clin Cas*. 2019;7(5):585-599.
101. Huang THW, Teoh AW, Lin BL, Lin TSH et al. The role of herbal PPAR modulators in the treatment of cardiometabolic syndrome. *Pharm Res*. 2009;60(3):195-206.
102. Hube F, Hauner H. The role of TNF- α in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance? *Horm Met Res*. 1999;31(12):626-631.
103. Hult M, Tornhammar P, Ueda P, Chima C et al. Hypertension, diabetes and overweight: Looming legacies of the Biafran famine. *PLoS One*. 2010;10(5):13582.
104. Hutcheon J, Platt R, Meltzer S, Egeland G. Is birth weight modified during pregnancy? Using sibling differences to understand the impact of blood glucose, obesity, and maternal weight gain in gestational diabetes. *Am J Obst Gyn*. 2006;195(2):488-494.
105. Iglesias J, Morales L, Barreto GE. Metabolic and inflammatory adaptation of reactive astrocytes: role of PPARs. *Mol Neur*. 2017;54(4):2518-2538.
106. Imai K, Kanzaki H, Fujiwara H, Maeda M et al. Expression and localization of aminopeptidase N, neutral endopeptidase, and dipeptidyl peptidase IV in the human placenta and fetal membranes. *Am J Obst Gyn*. 1994;170(4):1163-1168.
107. Institute of Medicine (US) and National Research Council (US) Committee to Reexamine IOM Pregnancy Weight Guidelines: Weight gain during pregnancy: Reexamining the Guidelines. Rasmussen KM, Yaktine AL, Washington DC: Nat Ac Press; 2009.
108. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990;6294(347):645-650.
109. Iwasaki T, Yoneda M, Inamori M, Shirakawa J et al. Sitagliptin as a novel treatment agent for non-alcoholic Fatty liver disease patients with type 2 diabetes mellitus. *Hep Gastr*. 2011;112(58):2103-2105.
110. Jackiewicz A, Katarzyńska J. Dipeptydylopeptydaza IV-atrakcyjny cel do opracowywania skutecznych strategii terapeutycznych i diagnostycznych. *Adv Hyg Exp Med*. 2018;72:417-441.
111. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003;33(3)Suppl:245-254.
112. Jamaluddin MS, Yan S, Lü J, Liang Z et al. Resistin increases monolayer permeability of human coronary artery endothelial cells. *PloS One*. 2013;12(8):84576.
113. Johnson JL, Farr SL, Dietz PM, Sharma AJ et al. Trends in gestational weight gain: the pregnancy risk assessment monitoring system, 2000-2009. *Am J Obst Gyn*. 2015;212(6):806-814.

114. Josefson JL, Simons H, Zeiss DM, Metzger BE. Excessive gestational weight gain in the first trimester among women with normal glucose tolerance and resulting neonatal adiposity. *J Perinat.* 2016;36(12):1034-1038.
115. Joss-Moore LA, Wang Y, Baack ML, Yao J et al. IUGR decreases PPAR γ and SETD8 Expression in neonatal rat lung and these effects are ameliorated by maternal DHA supplementation. *E Hum Dev.* 2010;86(12):785-791.
116. Jung UJ, Choi MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sc.* 2014;15(4):6184-6223.
117. Junkin KA, Dyck DJ, Mullen KL, Chabowski A, Thrush AB. Resistin acutely impairs insulin – stimulated glucose transport in rodent muscle in the presence, but not absence, of palmitate. *AM J Ph Reg Int Comp Ph.* 2009;296(4):994-951.
118. Kadam L, Kohan-Ghadr HR, Drewlo S. The balancing act - PPAR- γ 's roles at the maternal-fetal interface. *Syst Biol Repr Med.* 2015;61(2):65-71.
119. Kamatani N, Sekine A, Kitamoto T, Iida A et al. Large-scale single-nucleotide polymorphism (SNP) and haplotype analyses, using dense SNP Maps, of 199 drug-related genes in 752 subjects: the analysis of the association between uncommon SNPs within haplotype blocks and the haplotypes constructed with haplotype-tagging SNPs. *Am J Hum Gen.* 2004;75(2):190-203.
120. Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, Ebenbichler CF et al. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Bioch Bioph Res Com.* 2003;309(2):286-290.
121. Khan MN, Rahman MM, Shariff AA, Rahman MS, Rahman MA. Maternal undernutrition and excessive body weight and risk of birth and health outcomes. *Arch Pub Health.* 2017;75(1):1-10.
122. Kilpeläinen TO, Zillikens MC, Stančáková A, Finucane FM et al. Genetic variation near IRS1 associates with reduced adiposity and an impaired metabolic profile. *Nat Gen.* 2011;43(8):753-760.
123. Kim SW, Cho EH. High levels of serum DPP-4 activity are associated with low bone mineral density in obese postmenopausal women. *End Met.* 2016;31(1):93–99.
124. Kleinendorst L, Massink MP, Cooman MI, Savas M et al. Genetic obesity: next-generation sequencing results of 1230 patients with obesity. *J Med Gen.* 2018;55(9):578-586.
125. Klemann C, Wagner L, Stephan M, von Hörsten S. Cut to the chase: a review of CD26/dipeptidyl peptidase-4's (DPP4) entanglement in the immune system. *Clin Exp Im.* 2016;185(1):1–21.
126. Kominiarek MA, Lewkowitz AK, Carter E, Fowler SA, Simon M. Gestational weight gain and group prenatal care: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pregn Childb.* 2019;19(1):18-26.
127. Könner AC, Brüning JC. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. *Trends End Met.* 2011;22(1):16-23.
128. Kozak LP, Anunciado-Koza R. UCP1: its involvement and utility in obesity. *Int J Obes.* 2008;32(7):32-38.
129. Krakowiak P, Walker CK, Bremer AA, Baker AS. Maternal metabolic conditions and risk for autism and other neurodevelopmental disorders. *Pediat.* 2012;129(5):1121-1128.
130. Krepela E, Kasafirek E, Vicar J, Kraml J. An assay of dipeptidyl peptidase IV activity in human serum and serum of pregnant women with glycyl-L-proline-1-naphthylamide and other glycyl-L-proline-arylamides as substrates. *Phys Boh.* 1983;32(4):334-345.

131. Krey G, Braissant OL, Horset F, Kalkhoven E et al. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol End.* 1997;11(6):779-791.
132. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H et al. PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell.* 1999;4(4):597-609.
133. Kytikova OY, Perelman JM, Novgorodtseva TP, Denisenko YK et al. Peroxisome proliferator-activated receptors as a therapeutic target in asthma. *PPAR Res.* 2020;8906968.
134. Lagou V, Scott RA, Manios Y, Chen TL et al. Impact of peroxisome proliferator-activated receptors γ and δ on adiposity in toddlers and preschoolers in the GENESIS study. *Obes.* 2008;16(4):913-918.
135. Lagunova Z, Porojnicu AC, Lindberg F, Hexeberg S, Moan J. The dependency of vitamin D status on body mass index, gender, age and season. *Anticanc Res.* 2009;29(9):3713-3720.
136. Lamers D, Famulla S, Wronkowitz N, Hartwig S et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diab.* 2011;60(7):1917-1925.
137. Lapice E, Vaccaro O. Interaction between Pro12Ala polymorphism of PPAR γ 2 and diet on adiposity phenotypes. *Cur Ather Rep.* 2014;16(12):462-470.
138. Larsen SC, Ängquist L, Laurin C, Morgen CS et al. Association between maternal fish consumption and gestational weight gain: influence of molecular genetic predisposition to obesity. *PloS One.* 2016;11(3):0150105.
139. Lee JY, Jang BK, Song MK, Kim HS, Kim MK. Association between serum dipeptidyl peptidase-4 concentration and obesity-related factors in health screen examinees. *J Obes Met Syndr.* 2017;26(3):188-196.
140. Lefebvre B, Benomar Y, Guédin A, Langlois A et al. Proteasomal degradation of retinoid X receptor alpha reprograms transcriptional activity of PPAR γ in obese mice and humans. *J Clin Inv.* 2010;120(5):1454–1468.
141. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO et al. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J Biol Chem.* 1995;270(2):12953-12956.
142. Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPAR γ . *Cell.* 2005;123(6):993-999.
143. Lin Y, Berg AH, Iyengar P, Lam TK et al. The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2005;280(6):4617-4626.
144. Liu KT, Liu YH, Lin CY, Tsai MJ et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin and resistin are associated with dengue infection in adults. *BMC Inf Dis.* 2016;16(1):1-7.
145. Liu L, Zhuang X, Jiang M, Guan F et al. ANGPTL4 mediates the protective role of PPAR γ activators in the pathogenesis of preeclampsia. *Cell Dis.* 2017;9(8):3054-3063.
146. Lobo TF, Torloni MR, Mattar R, Nakamura MU et al. Adipokine levels in overweight women with early-onset gestational diabetes mellitus. *J End Inv.* 2019;42(2):149-156.
147. Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nat.* 2015;7538(518):197–206.
148. Lopomo A, Burgio E, Migliore L. Epigenetics of Obesity. *PMBTS.* 2016;140:151–184.
149. Lopoahä C, Roseboom T, Osmond C, Barker DJP. Atopy, lung function, and obstructive airways disease after prenatal exposure to famine. *Thorax.* 2000;55(7):555-561.
150. Luan J, Browne PO, Harding AH, Halsall DJ et al. Evidence for gene-nutrient interaction at the PPAR γ locus. *Diab.* 2001;50(3):686-689.
151. Lustig RH. Hypothalamic obesity: causes, consequences, treatment. *Ped End Rev: PER.* 2008;6(2):220-227.

152. MacFarlane AJ, Blondel B, Mohangoo AD, Cuttini M et al. Wide differences in mode of delivery within Europe: risk stratified analyses of aggregated routine data from the Euro-Peristat study. *BJOG*. 2016;123(4):559-568.
153. Majithia AR, Tsuda B, Agostini M, Gnanapradeepan K et al. Prospective functional classification of all possible missense variants in PPARG. *Nat Gen*. 2016;48(12):1570–1575.
154. Małecki MT, Frey J, Klupa T, Skupien J et al. The Pro12Ala polymorphism of PPARGgamma2 gene and susceptibility to type 2 diabetes mellitus in a Polish population. *Diab Res Clin Pract*. 2003;62(2):105-111.
155. Marcelino-Rodríguez I, Almeida Gonzalez D, Alemán-Sánchez JJ, Brito Díaz B et al. Inverse association of resistin with physical activity in the general population. *PLoS One*. 2017;12(8):0182493.
156. Marion-Letellier R, Savoye G, Ghosh S. Fatty acids, eicosanoids and PPAR gamma. *Eur J Pharm*. 2016;785:44-49.
157. Martin CL, Jima D, Sharp GC, McCullough LE et al. Maternal pre-pregnancy obesity, offspring cord blood DNA methylation, and offspring cardiometabolic health in early childhood: An epigenome-wide association study. *Epig*. 2019;14(4):325–340.
158. McCarthy FP, Delany AC, Kenny LC, Walsh SK. PPAR- γ –a possible drug target for complicated pregnancies. *Brit J Pharm*. 2013;168(5):1074-1085.
159. McCarthy FP, Drewlo S, English FA, Kingdom J et al. Evidence implicating peroxisome proliferator-activated receptor- γ in the pathogenesis of preeclampsia. *Hypert*. 2011;58(5):882-887.
160. Medina-Gomez G, Virtue S, Lelliott C, Boiani R et al. The link between nutritional status and insulin sensitivity is dependent on the adipocyte-specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 isoform. *Diab*. 2005;54(6):1706–1716.
161. Megia A, Vendrell J, Gutierrez C, Sabaté M et al. Insulin sensitivity and resistin levels in gestational diabetes mellitus and after parturition. *Eur J End*. 2008;158(2):173-178.
162. Mehrad-Majd H, Ghayour-Mobarhan M, Zali MR. Effect of two common variants in PPAR- γ 2 gene on susceptibility to obesity. *Biom Res*. 2017;28:1-7.
163. Meirhaeghe A, Boreham CA, Murray LJ, Richard F et al. A possible role for the PPARG Pro12Ala polymorphism in preterm birth. *Diab*. 2007;56(2):494-498.
164. Meirhaeghe A, Fajas L, Helbecque N, Cottel D et al. A genetic polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene influences plasma leptin levels in obese humans. *Hum Mol Gen*. 1998;7(3):435–440.
165. Migita K, Maeda Y, Miyashita T, Kimura H et al. The serum levels of resistin in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rh*. 2006;24(6):698-701.
166. Moran TH. Gut peptides in the control of food intake. *Int J Obes*. 2009;33(1):7-10.
167. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006;7109(443):289–295.
168. Mozaffarian D, Hao T, Rimm EB, Willett WC, Hu FB. Changes in diet and lifestyle a long - term weight gain in women and men. *N Engl J Med*. 2011;364(25):2392-2404.
169. Mrówka M, Głodkowska-Mrówka E. Struktura, działanie i rola receptora-gamma peroksysomów aktywowanego przez proliferatory-PPAR γ . *Post Biol Kom*. 2011;38(4):629-652.
170. Murawska-Ciałowicz E. Tkanka tłuszczowa-charakterystyka morfologiczna i biochemiczna różnych depozytów. *PHMD*. 2017;71:466-484.
171. Nadra K, Quignodon L, Sardella C, Joye E et al. PPAR γ in placental angiogenesis. *Endoc*. 2010;151(10):4969-4981.
172. Nargis T, Kumar K, Ghosh AR, Sharma A. KLK5 induces shedding of DPP4 from circulatory Th17 cells in type 2 diabetes. *Mol Met*. 2017;11(6):1529-1539.

173. Neel JV. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Gen.* 1962;14(4):353-62.
174. Nien JK, Mazaki-Tovi S, Romero R, Kusanovic JP et al. Resistin: a hormone which induces insulin resistance is increased in normal pregnancy. *J Perinat Med.* 2007;35(6):513-521.
175. Nishikawa M, Itakura A, Ito M, Takeuchi M et al. Changes in placental dipeptidyl peptidase IV in preeclampsia with intrauterine growth restriction. *Horm Met Res.* 2005;37(7):408-413.
176. Nogues P, Dos Santos E, Jammes H, Berveiller P et al. Maternal obesity influences expression and DNA methylation of the adiponectin and leptin systems in human third-trimester placenta. *Clin Epig.* 2019;11(1):1-18.
177. Obesity and Overweight: World Health Organization: www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight.
178. Obsil T, Obsilova V. Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Onc.* 2008;27(16):2263-2275.
179. Oddy WH. Infant feeding and obesity risk in the child. *Breast Rev.* 2012;20(2):7-12.
180. Olejnik A, Bil-Lula I, Kozera Ł, Krzywonos-Zawadzka A. Wysokie stężenie dipeptydylopeptydazy 4 w surowicy we wczesnym stadium otyłości - badanie wstępne. *Diag. Lab.* 2018;54(4):233-240.
181. Ong K, Ahmed M, Dunger D, Emmett P, Preece MA. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *BMJ.* 2000;7240(320):967-971.
182. Ort T, Arjona AA, MacDougall J.R, Nelson PJ et al. Recombinant human FIZZ3/resistin stimulates lipolysis in cultured human adipocytes, mouse adipose explants, and normal mice. *End.* 2005;146(5):2200-2209.
183. Osawa H, Tabara Y, Kawamoto R, Ohashi J et al. PPAR γ Pro12Ala Pro/Pro and resistin SNP-420 G/G genotypes are synergistically associated with plasma resistin in the Japanese general population. *Clin End.* 2009;71(3):341-345.
184. Ostafiichuk S, Henyk N, Rossokha Z. The role of Pro12Ala polymorphism of the PPARG gene in the genesis of the gestational weight gain. *Georg Med News.* 2018;285:86-92.
185. Ostafiichuk S. The role of resistin in the genesis of metabolic disorders in pathological pregnancy. *Ukr Bioch J.* 2019;91(5):55-62.
186. Owecki M, Miczke A, Nikisch E, Pupek-Musialik D, Sowiński J. Serum resistin concentrations are higher in human obesity but independent from insulin resistance. *Exp Clin End Diab.* 2011;119(2):117-121.
187. Öztürk B, Gürbüz A, Durak Z, Öztürk H. Dipeptidyl peptidase-4 and adenosine deaminase enzyme levels in polycystic ovary syndrome. *Gyn End.* 2019;35(2):138-141.
188. Pająk A. Pol-MONICA. *Przegl Lek.* 1996;53(10):703-846.
189. Pakiet Haplo.stats programu R: Sinnwell JP, Schaid DJ. Haplo.stats: Statistical analysis of haplotypes with Traits and Covariates when linkage Phase is Ambiguous. R package version 1.8.6. 2020: <https://CRAN.R-project.org/package=haplo.stats>
190. Pala L, Rotella CM. The role of DPP4 activity in cardiovascular districts: in vivo and in vitro evidence. *J Diab Res.* 2013;2013:590456.
191. Pan A, Schernhammer ES, Sun Q, Hu FB. Rotating night shift work and risk of type 2 diabetes: two prospective cohort studies in women. *PLoS Med.* 2011;12(8):1001141.
192. Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR γ activators. *Bioch Bioph Res Com.* 2003;300(2):472-476.
193. Pellegrinelli V, Carobbio S, Vidal-Puig A. Adipose tissue plasticity: How fat depots respond differently to pathophysiological cues. *Diab.* 2016;59(6):1075-1088.

194. Penyige A, Poliska S, Csanky E, Scholt B et al. Analyses of association between PPAR gamma and EPHX1 polymorphisms and susceptibility to COPD in a Hungarian cohort, a case-control study. *BMC Med Gen.* 2010;11(1):1-9.
195. Pike KC, Davis SA, Collins SA, Lucas JS. Prenatal development is linked to bronchial reactivity: epidemiological and animal model evidence. *Sc Rep.* 2014;4(1):1-7.
196. Pinheiro VAC, de Oliveira FC, Duarte Moreira Alves R, Esteves EA et al. Energy expenditure: components and evaluation methods. *Nutr. Hosp.* 2011;26(3):430-440.
197. Poniedziałek-Czajkowska E, Mierzyński R, Ślodzińska M, Dłuski D, Leszczyńska-Gorzelak B. Adipokines and C-peptide in overweight and obese pregnant women. *Gin Pol.* 2018;89(8):442-48.
198. Program Haploview 4.2 (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>)
199. Project NCBI „1000Genomes” (www.internationalgenome.org)
200. PubMed Baza Danych (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)
201. Qiang L, Wang L, Kon N, Zhao W et al. Brown remodeling of white adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Ppar γ . *Cell.* 2012;150(3):620–632.
202. Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N et al. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diab.* 2004;53(7):1671-1679.
203. Raso GM, Bianco G, Esposito E, Iacono A et al. Evaluation of placental protein modifications in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Plac.* 2008;29(5):429-435.
204. RC Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2020: <https://www.R-project.org/>
205. Reilly JJ, Armstrong J, Dorosty AR, Emmett PM et al. Avon Longitudinal Study of Parents and Children Study Team. Early life risk factors for obesity in childhood: cohort study. *BMJ.* 2005;7504(330):1357-1366.
206. Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A et al. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circ.* 2005;111(7):932-939.
207. Reilly SM, Saltiel AR. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nat. Rev. End.* 2017;13(11):633–643.
208. Rekomendacje Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego Opieka położnicza nad ciężarną otyłą. *Gin Pol.* 2012;83(10):795-799.
209. Ren D, Collingwood TN, Rebar EJ, Wolffe AP, Camp HS. PPAR γ knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPAR γ 2 but not PPAR γ 1 reactivates adipogenesis. *Gen Develop.* 2002;16(1):27-32.
210. Renaud JP, Moras D. Structural studies on nuclear receptors. *Cell Mol Life Sc.* 2000;57(12):1748-1769.
211. Rodrigues AP, Rosa LP, Silveira EA. PPARG2 Pro12Ala polymorphism influences body composition changes in severely obese patients consuming extra virgin olive oil: a randomized clinical trial. *Nutr Met.* 2018;15(1):1-13.
212. Rogozińska E, Zamora J, Marlin N, Betrán AP et al. Gestational weight gain outside the Institute of Medicine recommendations and adverse pregnancy outcomes: analysis using individual participant data from randomised trials. *BMC Pregn Child.* 2019;19(1):322-330.
213. Rooki H, Haerian MS, Azimzadeh P, Mirhafez R. Associations between C1431T and Pro12Ala variants of PPAR γ gene and their haplotypes with susceptibility to metabolic syndrome in an Iranian population. *Mol Biol Rep.* 2014;41(5):3127-3133.
214. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G. PPAR γ is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell.* 1999;4(4):611-617.

215. Rosmaninho-Salgado J, Marques AP, Estrada M, Santana M et al. Dipeptidyl-peptidase-IV by cleaving neuropeptide Y induces lipid accumulation and PPAR-gamma expression. *Peptid.* 2012;37(1):49–54.
216. Ruiz-Narvaez E. Is the Ala12 variant of the PPARG gene an “unthrifty allele”? *J Med Gen.* 2005;42(7):547-550.
217. Scacchi R, Pinto A, Rickards O, Pacella et al. An analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma2) Pro12Ala polymorphism distribution and prevalence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) in world populations in relation to dietary habits. *Nutr Met Card Dis.* 2007;17(9):632–641.
218. Sharami SH, Ranjbar ZA, Alizadeh F, Kazemnejad E. The relationship of hyperlipidemia with maternal and neonatal outcomes in pregnancy: A cross-sectional study. *Int J Rep BioMed.* 2019;17(10):739-748.
219. Sharma P, Dwivedi S. Nutrigenomics and nutrigenetics: new insight in disease prevention and cure. *New Insight in Disease Prevention and Cure.* In *J Clin Bioch.* 2017;32(4):371-373.
220. Shields M, Tremblay MS. Sedentary behaviour and obesity. *H Rep.* 2008;19(2):1-13.
221. Siemińska L. Tkanka tłuszczowa. Patofizjologia, rozmieszczenie, różnice płciowe oraz znaczenie w procesach zapalnych i nowotworowych. *End.* 2007;58(4):330-342.
222. Sikorska-Wiśniewska G. Nadwaga i otyłość u dzieci i młodzieży. *ŻNTJ.* 2007;55(6):71–80.
223. Silvestris E, de Pergola G, Rosania R, Loverro G. Obesity as disruptor of the female fertility. *Rep Biol End.* 2018;16(1):1-13.
224. Simmons RA, Flozak AS, Ogata ES. The effect of insulin and insulin-like growth factor-I on glucose transport in normal and small for gestational age fetal rats. *End.* 1993;133(3):1361–1368.
225. Simmons RA, Gounis AS, Bangalore SA, Ogata ES. Intrauterine growth retardation: fetal glucose transport is diminished in lung but spared in brain. *Ped Res.* 1992;31(1):59–63.
226. Skerrett R, Malm T, Landreth G. Nuclear receptors in neurodegenerative diseases. *Neur Dis.* 2014;72(A):104-116.
227. Skowrońska-Jóźwiak E. Otyłość a ciąża w praktyce lekarza endokrynologa. *Per Neonat Gin.* 2009;3(2):215-217.
228. Solis-Paredes M, Sosa SE, Estrada-Gutierrez G, Nava-Salazar S et al. Maternal and fetal lipid and adipokine profiles and their association with Obesity. *Int J End.* 2016;2016: 7015626.
229. Stengel A, Goebel-Stengel M, Teuffel P, Hofmann T et al. Obese patients have higher circulating protein levels of dipeptidyl peptidase IV. *Pept.* 2014;61:75-82.
230. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Howells K et al. The Human Gene Mutation Database: 2008 update. *Gen Med.* 2009;1(1):13-18.
231. Stepaniak U, Micek A, Waśkiewicz A, Bielecki W et al. Prevalence of general and abdominal obesity and overweight among adults in Poland. Results of the WOBASZ II study (2013-2014) and comparison with the WOBASZ study (2003-2005). *Pol Arch Med Wewn.* 2016;126(9):662-671.
232. Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S et al. A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Nat Ac Sc.* 2001;98(2):502-506.
233. Sternson SM, Eiselt AK. Three pillars for the neural control of appetite. *An Rev Phys.* 2017;79(10):401–423.
234. Stice E, Presnell K., Shaw H, Rohde P. Psychological and behavioral risk factors for obesity onset in adolescent girls: a prospective study. *J C Clin Ps.* 2005;73(2):195-202.

235. Stuebe AM, Lyon H, Herring AH, Ghosh J et al. Obesity and diabetes genetic variants associated with gestational weight gain. *Am J Obst Gyn.* 2010;203(3):283-292.
236. Stumvoll M, Haring H. Reduced lipolysis as possible cause for greater weight gain in subjects with the Pro12Ala polymorphism in PPAR γ 2. *Diab.* 2001;45(1):152–153.
237. Stumvoll M, Haring H. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ 2 Pro12Ala polymorphism. *Diabet.* 2002;51(8):2341–2347.
238. Su KZ, Li YR, Di Zhang JHY, Zhang CS et al. Relation of circulating resistin to insulin resistance in type 2 diabetes and obesity: a systematic review and meta-analysis. *F Phys.* 2019;10:1399-1415.
239. Sugiura-Ogasawara M. Recurrent pregnancy loss and obesity. *Best Pract Res Clin Obst Gyn.* 2015;29(4):489-497.
240. Surén P, Stoltenberg C, Bresnahan M, Hirtz, D et al. Early growth patterns in children with autism. *Epid.* 2013;24(5):660-670.
241. Szostak-Wegierek D, Szmotulska K. Fetal development and risk of cardiovascular diseases and diabetes type 2 in adult life. *Med W Rozw.* 2011;15(3):203–215.
242. Tai ES, Corella D, Deurenberg-Yap M, Adiconis X et al. Differential effects of the C1431T and Pro12Ala PPAR γ gene variants on plasma lipids and diabetes risk in an Asian population. *J Lipid Res.* 2004;45(4):674-685.
243. Takenaka A, Nakamura S, Mitsunaga F, Inoue-Murayama M et al. Human-specific SNP in obesity genes, adrenergic receptor beta2 (ADRB2), Beta3 (ADRB3), and PPAR γ 2 (PPARG), during primate evolution. *PLoS One.* 2012;8(7):43461.
244. Talmor A, Dunphy B. Female obesity and infertility. *BPRC Obstet Gyn.* 2015;29(4):498–506.
245. Thomas DM, Navarro-Barrientos JE, Rivera DE, Heymsfield SB et al. Dynamic energy-balance model predicting gestational weight gain. *Am J Clin Nutr.* 2012;95(1):115-122.
246. Tok EC, Ertunc D, Bilgin O, Erdal EM et al. PPAR- γ 2 Pro12Ala polymorphism is associated with weight gain in women with gestational diabetes mellitus. *Eur J Obst Gyn Repr Biol.* 2006;129(1):25-30.
247. Tomiyama AJ. Stress and obesity. *Ann Rev Psych.* 2019;70:703-718.
248. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPAR γ . *Ann Rev Bioch.* 2008;77:289-312.
249. Trim W, Turner JE, Thompson D. Parallels in immunometabolic adipose tissue dysfunction with ageing and obesity. *Fr Immun.* 2018;9:169-191.
250. Tsatsanis C, Dermitzaki E, Avgoustinaki P, Malliaraki N et al. The impact of adipose tissue-derived factors on the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. *Horm.* 2015;14(4):549–62.
251. Valve R, Sivenius K, Miettinen R, Pihlajamäki J et al. Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene are associated with severe overweight among obese women. *J Clin End Met.* 1999;84(10):3708-3712.
252. Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet.* 1999;9173(354):141–148.
253. Vankadari N, Wilce JA. Emerging COVID-19 coronavirus: glycan shield and structure prediction of spike glycoprotein and its interaction with human CD26. *Em Micr Inf.* 2020(9):601-604.
254. Vazquez-Del Mercado M, Guzman-Ornelas MO, Meraz FI, Rios-Ibarra CP et al. The 482Ser of PPARGC1A and 12Pro of PPARG2 alleles are associated with reduction of metabolic risk factors even obesity in a Mexican-Mestizo population. *BioMed Res Int.* 2015;2015:285491.

255. Villarroya J, Cereijo R, Villarroya F. An endocrine role for brown adipose tissue? *Am J Phys End Metab.* 2013;305(5):567-572.
256. Vitale SG, Laganà AS, Nigro A, La Rosa VL et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Modulation during Metabolic Diseases and Cancers: Master and Minions. *PPAR Res.* 2016;2016:6517313.
257. Wada K, Nakajima A, Blumberg RS. PPAR γ and inflammatory bowel disease: a new therapeutic target for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Trends Mol Med.* 2001;8(7):329-331.
258. Waite LL, Louie RE, Taylor RN. Circulating activators of peroxisome proliferator-activated receptors are reduced in preeclamptic pregnancy. *J Clin End Met.* 2005;90(2):620-626.
259. Waite LL, Person EC, Zhou Y, Lim KH et al. Placental peroxisome proliferator-activated receptor- γ is up-regulated by pregnancy serum. *J Clin End Metab.* 2000;85(10):3808-3814.
260. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *End Rev.* 2000;21(6):697-738.
261. Wan R, Ding Z, Xia S, Zheng L, Lu J. Effects of PPAR γ 2 Pro12Ala variant on adipocyte phenotype dependent of DHA. *DMS Obes.* 2019;12:2273-2279.
262. Wang H, Chu WS, Hemphill C, Elbein SC. Human resistin gene: molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin End Met.* 2002;87(6):2520-2524.
263. Wang XL, Oosterhof J, Duarte N. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma C161>T Polymorphism and Coronary Artery Disease. *Card Res.* 1999;44(3):588-594.
264. Wang Y, Wang X, Kong Y, Zhang JH, Zeng Q. The Great Chinese Famine leads to shorter and overweight females in Chongqing Chinese population after 50 years. *Obes.* 2010;18(3):588-592.
265. Wankhade UD, Thakali KM, Shankar K. Persistent influence of maternal obesity on offspring health: Mechanisms from animal models and clinical studies. *Mol Cell End.* 2016;435:7-19.
266. Weichert J, Hartge DR. Obstetrical sonography in obese women: a review. *J Clin Ultr.* 2011;39(4):209-16.
267. WHO 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
268. WHO MONICA Project: Risk Factors. *Int J Ep.* 1989;18(1):46-55.
269. Wiecek S, Knaup S, Gross WL, Epplen JT. Genetic variability of RXRB, PPARA, and PPARG in Wegener's granulomatosis. *PPAR Res.* 2009;2009:786781-786781.
270. Wierzejska R, Jarosz M, Stelmachów J, Sawicki W, Siuba M. Gestational weight gain by pre-pregnancy BMI Przyrost masy ciała kobiet ciężarnych w zależności od wartości BMI w okresie przedkoncepcyjnym. *PNM.* 2011;24:718-723.
271. Willer CJ, Speliotes E, Loos RJ, Li S et al. Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Gen.* 2009;41(1):25-34.
272. Williams CB, Mackenzie KC, Gahagan S. The Effect of Maternal Obesity on the Offspring. *Clin Obst Gyn.* 2014;57(3):508-515.
273. Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP et al. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat. Med.* 2011;17(5):610-617.
274. Wójcik B. Brunatna tkanka tłuszczowa u dorosłego człowieka: występowanie i funkcja. *EOZP Mat.* 2011;7(1):34-40.

275. World Health Organization. Obesity. Preventing and managing the global epidemic. World Health Organization. 1998;Geneva.
276. Wronkowitz N, Görgens SW, Romacho T, Villalobos LA et al. Soluble DPP4 induces inflammation and proliferation of human smooth muscle cells via protease-activated receptor. *BBA Mol Bas Dis*. 2014;1842(9):1613-1621.
277. Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Plunket KD et al. Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors. *Pr Nat Ac Sc*. 2001;98(24):13919-13924.
278. Yang G, Li Y, Cui L, Jiang H et al. Increased plasma dipeptidyl peptidase-4 activities in patients with coronary artery disease. *PloS One*. 2016;11(9):0163027.
279. Yao YS, Li J, Jin YL, Chen Y, He LP. Association between PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphism and obesity: A meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2015;42(6):1029-1038.
280. Yazbeck R, Jaenisch SE, Abbott CA. Potential disease biomarkers: dipeptidyl peptidase 4 and fibroblast activation protein. *Prot*. 2018;255(1):375-386.
281. Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K et al. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor γ (hPPAR γ) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR γ 2 missense mutation. *Bioch Bioph Res Com*. 1997;241(2):270–274.
282. Yessoufou A, Wahli W. Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Med W*. 2010;140:13071.
283. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-432.
284. Zhao S, Song M, Fan Y, Chang Q et al. Elevation of plasma soluble CD26 levels during pregnancy. *J Obst Gyn Res*. 2012;38(1):272-279.
285. Zhong J, Rao X, Rajagopalan S. An emerging role of dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) beyond glucose control: potential implications in cardiovascular disease. *Ath*. 2013;226(2):305-314.
286. Zhou L, Yu X, Meng Q, Li H, Niu C. Resistin reduces mitochondria and induces hepatic steatosis in mice by the protein kinase C/protein kinase G/p65/PPAR gamma coactivator 1 alpha pathway. *Hepat*. 2013;57(4):1384-1393.

SPIS TABEL

Tabela 1. Klasyfikacja otyłości ze względu na wskaźnik BMI, wg WHO.

Tabela 2. Zalecany przyrost masy ciała w ciąży w odniesieniu do wskaźnika BMI przed ciążą wg. IOM (2009) i PTGiP (2005).

Tabela 3. Białka syntetyzowane przez adipocyty (wg Skowrońskiej-Józwiak, 2009, zmodyfikowano).

Tabela 4. Wpływ ekspresji i/lub funkcji PPAR γ na możliwość wystąpienia komplikacji podczas ciąży (wg McCarthy 2013, zmodyfikowano).

Tabela 5. Charakterystyka wariantów polimorficznych badanych w pracy.

Tabela 6. Sekwencja starterów wykorzystanych do reakcji PCR dla genu *PPARG*.

Tabela 7. Skład mieszaniny reakcji PCR dla badanych wariantów genu *PPARG*.

Tabela 8. Warunki termiczne reakcji PCR dla badanych wariantów genu *PPARG*.

Tabela 9. Warunki hydrolizy dla badanych polimorfizmów genu *PPARG*.

Tabela 10. Związek pomiędzy przyrostem masy ciała w ciąży i przedciążowym BMI.

Tabela 11. Charakterystyka danych klinicznych kobiet z badanej grupy (n=367).

Tabela 12. Charakterystyka porównawcza noworodków z badanej grupy (n=367).

Tabela 13. Dane kliniczne pacjentek w grupach wydzielonych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży.

Tabela 14. Dane kliniczne noworodków w grupach kobiet wydzielonych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży.

Tabela 15. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów *PPARG* w grupie 367 kobiet.

Tabela 16. Częstość występowania genotypów i alleli badanych polimorfizmów genu *PPARG* u kobiet w grupach wydzielonych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży.

Tabela 17. Częstość występowania genotypów polimorfizmów genu *PPARG* u kobiet w grupach wydzielonych w zależności od przedciążowego wskaźnika BMI.

Tabela 18. Średnie wartości danych klinicznych pacjentek dla poszczególnych genotypów polimorfizmu *Pro12Ala* genu *PPARG* u kobiet w grupach wydzielonych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży.

Tabela 19. Średnie wartości danych klinicznych pacjentek dla poszczególnych genotypów polimorfizmu *161C>T* genu *PPARG* u kobiet w grupach wydzielonych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży.

Tabela 20. Wyniki oznaczeń stężeń badanych adipokin w całej badanej grupie kobiet (n=170).

Tabela 21. Wyniki oznaczeń stężeń badanych adipokin w grupach kobiet wyodrębnionych na podstawie przyrostu masy ciała w ciąży.

Tabela 22. Korelacje danych klinicznych ciężarnych i ich noworodków ze stężeniem rezystyny [ng/ml].

Tabela 23. Korelacje danych klinicznych pacjentek i ich noworodków ze stężeniem DPP IV [ng/ml].

Tabela 24. Asocjacja genotypów ze stężeniami badanych adipokin w badanej grupie kobiet (n=170).

Tabela 25. Średnie wartości adipokin dla poszczególnych genotypów badanych polimorfizmów genu *PPARG* u kobiet w grupach wydzielonych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży.

Tabela 26. Współwystępowanie genotypów polimorfizmów *Pro12Ala* oraz *161C<T* genu *PPARG* w badanych grupach kobiet.

Tabela 27. Częstość występowania haplotypów badanych wariantów genu *PPARG* w grupach wyodrębnionych na podstawie przyrostu masy ciała w ciąży (n=367).

Tabela 28. Wyniki analizy związku poszczególnych haplotypów z badanymi adipokinami metodą regresji w grupie badanej (n=170).

SPIS RYCIN

Rycina 1. Etiopatogeneza otyłości.

Rycina 2. Krótko- i długoterminowe konsekwencje metaboliczne nadmiernego przyrostu masy ciała w ciąży [wg Gilmore i wsp., 2015].

Rycina 3. Adipocyty tkanki tłuszczowej. Porównanie adipocytów brunatnej (A) oraz białej (B) tkanki tłuszczowej. Barwienie H+E (hematoksylina + eozyna).

Rycina 4. Schemat domenowej budowy receptora PPAR γ .

Rycina 5. Rola receptorów PPAR γ .

Rycina 6. Mechanizm działania receptorowego PPAR γ .

Rycina 7. Gen *PPARG* i umiejscowienie polimorfizmów *Pro12Ala* oraz *161C>T*.

Rycina 8. Schemat rekrutacji pacjentek do badanych grup.

Rycina 9. Etapy detekcji stężenia białek metodą sandwich ELISA.

Rycina 10. Przedciążowe BMI w grupach wyodrębnionych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży.

Rycina 11. Analiza genotypów polimorfizmu *Pro12Ala* genu *PPARG* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym Bsh1236I (BstUI).

Rycina 12. Analiza genotypów polimorfizmu *161C>T* genu *PPARG* po hydrolizie enzymem restrykcyjnym Eco72I (PmlI).

Rycina 13. Częstość występowania alleli badanych wariantów genu *PPARG* w grupach wyodrębnionych w zależności od przyrostu masy ciała w ciąży.

Rycina 14. Korelacja stężenia rezystyny i DPP IV w badanej grupie 170 kobiet.

Rycina 15. Stężenia dipeptydylopeptydazy IV w grupach kobiet wyodrębnionych na podstawie przyrostu masy ciała w ciąży.

Rycina 16. Korelacja stężenia rezystyny i DPP IV w grupach kobiet wyodrębnionych na podstawie przyrostu masy ciała w ciąży.

Rycina 17. Wartość D' nierównowagi sprzężeń pomiędzy badaniami wariantami w obrębie genu *PPARG*.

Rycina 18. Częstość występowania zmutowanego allela *Ala* polimorfizmu *Pro12Ala* genu *PPARG* (na podstawie bazy danych „1000genomes Project” NCBI).

Rycina 19. Częstość występowania zmutowanego allela *161T* polimorfizmu *161C>T* genu *PPARG* (na podstawie bazy danych „1000genomes Project” NCBI).



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

KOMISJA BIOETYCZNA PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM
IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 853/18

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarzy i lekarzy dentysty (t.j. Dz. U. z 2017, poz. 123 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2016, poz. 2142 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. 2004 Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. I w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017r. poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 06 września 2018 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu: prof. dr hab. Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz

Miejsce prowadzenia badań:

**Klinika Perinatologii i Chorób Kobietych
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz: mgr Małgorzata Maciejewska

Członkowie zespołu

**badawczego: prof. dr hab. Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz
dr n. med. Grażyna Kurzawińska**

Temat badań:

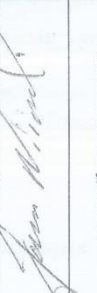
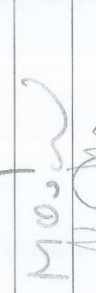
„Wpływ polimorfizmów genu PPARG na poziom wybranych adipokin u ciężarnych z nadmiernym przyrostem masy ciała”.

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Przewodniczący Komisji


prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

Podpisy członków Komisji Bioetycznej podejmujących Uchwałę nr 853/18 z dnia 06.09.2018r.

Lp.	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy	Podpis
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UMP, ZOZ MSWiA, ul. Dojazd 34, 60-631 Poznań.	
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, 61-614 Poznań.	
3.	prof. dr hab. Zygmunt Adamski	dermatologia i wenerologia	Katedra i Klinika Dermatologii UMP, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań	
4.	dr Krystyna Babiak	prawnik	Kancelaria Rady Prawnego, dr Krystyna Babiak, ul. Czartoria 1/2, 61-102 Poznań.	
5.	ks. prof. UAM dr hab. Andrzej Bohdanowicz	teologia	Wydział Teologiczny Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Wieżowa 2/4, Poznań	
6.	prof. dr hab. Maciej Krawczyński	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
7.	mgr Jolanta Łojko-Kołodziejczak	pielęgniarka	Pielęgniarka Oddziałowa Izby Przyjęć Pediatrii Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
8.	mgr Krystyna Malinger	farmaceuta	Apteka Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
9.	prof. dr hab. Andrzej Marszałek	patomorfologia	Katedra i Zakład Patologii i Profilaktyki Nowotworów UMP, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań.	
10.	prof. dr hab. Maciej Owecki	choroby wewnętrzne, endokrynologia	Zakład Zdrowia Publicznego UMP, ul. Dąbrowskiego 79, 60-529 Poznań.	
11.	prof. dr hab. Wojciech Służewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
12.	prof. dr hab. Robert Spaczyński	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
13.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UMP, ul. Szamarzewskiego 82/84, 60-569 Poznań.	
14.	prof. dr hab. Joanna Twarowska- Hauser	psychiatria	Klinika Psychiatrii Dorosłych, Zakład Genetyki w Psychiatrii UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
15.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Wyższa Szkoła Pedagogiki i Administracji im. Mieszka I w Poznaniu, ul. Bułgarska 55, 60-320 Poznań.	



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 646/20

Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarzy i lekarzy dentysty (t.j. Dz. U. z 2018 r., poz. 617 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. z 1999 r., Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 2211 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2004 r., Nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005 r. zmieniającego rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. z 2004 r., Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie sposobu prowadzenia badań klinicznych z udziałem małoletnich (Dz. U. z 2004 r., Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004 r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. z 2004 r., Nr 104, poz. 1107); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. z 2010 r., Nr 194, poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012 r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. z 2012 r., poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 12 października 2018 r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. z 2018 r., poz. 1994); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 09 września 2020 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownik projektu: prof. dr hab. Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz

Miejsce prowadzenia badań:

**Klinika Perinatologii i Chorób Kobietych
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu**

Główny badacz: mgr Małgorzata Iwańska

Członkowie zespołu

**badawczego: prof. dr hab. Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz
dr n. med. Grażyna Kurzawińska**

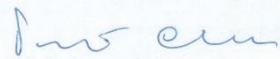
Temat badań:

„Wpływ polimorfizmów genu PPARG na stężenie wybranych adipokin u ciężarnych z nadmiernym przyrostem masy ciała”.

Komisja podjęła Uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu poprawek wprowadzonych do protokołu powyższego badania, polegających na przerehabrowaniu tematu na powyższy, zgodnie z Aneks nr 1 z dnia 09.09.2020r. do Uchwały Komisji Bioetycznej nr 853/18 z dnia 06.09.2018r.

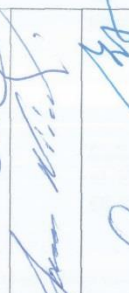
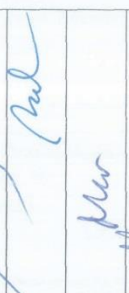
Metodyka pozostaje bez zmian.

Przewodniczący Komisji


prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

Podpisy członków Komisji Bioetycznej podejmujących Uchwałę nr z dnia 09.09.2020r.

646/20

Lp.	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy	Podpis
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UMP, ZOZ MSWiA, ul. Dojazd 34, 60-631 Poznań.	
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, 61-614 Poznań.	
3.	prof. dr hab. Zygmunt Adamski	dermatologia i wenerologia	Katedra i Klinika Dermatologii UMP, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań	
4.	dr Krystyna Babiak	prawnik	Kancelaria Rady Prawnego, dr Krystyna Babiak, ul. Czartoria 1/2, 61-102 Poznań.	
5.	ks. prof. UAM dr hab. Andrzej Bohdanowicz	teologia	Wydział Teologiczny Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul. Wieżowa 2/4, Poznań	
6.	prof. dr hab. Maciej Krawczyński	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
7.	mgr Jolanta Łojko-Kołodziejczak	pielęgniarka	Pielęgniarka Oddziałowa Izby Przyjęć Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
8.	mgr Krystyna Malingier	farmaceuta	Apteka Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
9.	prof. dr hab. Andrzej Marszałek	patomorfologia	Katedra i Zakład Patologii i Profilaktyki Nowotworów UMP, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań.	
10.	prof. dr hab. Maciej Owecki	choroby wewnętrzne, endokrynologia	Katedra Medycyny Społecznej UMP, ul. Rokietnicka 4, 60-806 Poznań.	
11.	prof. dr hab. Wojciech Służewski	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
12.	prof. dr hab. Robert Spaczyński	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
13.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UMP, ul. Szamarzewskiego 82/84, 60-569 Poznań.	
14.	prof. dr hab. Joanna Twarowska-Hauser	psychiatria	Klinika Psychiatrii Dorosłych, Zakład Genetyki w Psychiatrii UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
15.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Wyższa Szkoła Pedagogiki i Administracji im. Mieszka I w Poznaniu, ul. Bułgarska 55, 60-320 Poznań.	