

P R A C E O R Y G I N A L N E
położnictwo

Warianty genetyczne śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS) w nadciśnieniu ciążowym i stanie przedrzucawkowym

Genetic variants of endothelial nitric synthase in gestational hypertension and preeclampsia

Perlik Michał¹, Seremak-Mrozikiewicz Agnieszka^{1,2}, Barlik Magdalena^{1,2},
Kurzawińska Grażyna^{1,2}, Kraśnik Witold³, Drews Krzysztof^{1,2}¹ Klinika Perinatologii i Chorób Kobięcych, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Polska² Pracownia Biologii Molekularnej, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Polska³ Studenckie Towarzystwo Naukowe przy Klinice Perinatologii i Chorób Kobięcych, Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Polska**Streszczenie**

Wstęp: W patogenezie stanu przedrzucawkowego ważną rolę pełni obniżony poziom tlenku azotu (NO – nitric oxide). Zmniejszenie stężenia NO może być spowodowane genetycznie uwarunkowanymi zaburzeniami aktywności śródbłonkowej syntazy NO (eNOS – endothelial nitric synthase).

Cel pracy: Ocena częstości występowania polimorfizmów 894G>T (Glu298Asp) oraz -786T>C genu NOS3 i ich znaczenia w rozwoju stanu przedrzucawkowego oraz nadciśnienia ciążowego.

Materiał i metody: W grupie badanej analizowano 110 kobiet z nadciśnieniem w ciąży (69 z nadciśnieniem ciążowym - GH oraz 41 ze stanem przedrzucawkowym - PE). Grupę kontrolną stanowiło 150 zdrowych ciężarnych. Częstość występowania badanych polimorfizmów oznaczano metodą reakcji łańcuchowej polimerazy oraz metody polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR/RFLP).

Wyniki: W zakresie polimorfizmu 894G>T (Glu298Asp) zaobserwowano wyższą frekwencję genotypu 894TT w grupie kontrolnej w porównaniu do całej grupy z nadciśnieniem (5,4 vs. 8,7% w grupie kontrolnej, WR=0,61, p=ns). Podobne obserwacje dotyczyły zmutowanego allele 894T (25,4 vs. 30,0% w grupie kontrolnej, WR=0,79, p=ns). Analiza polimorfizmu -786T>C genu NOS3 nie wykazała różnic statystycznie istotnych pomiędzy całą grupą z nadciśnieniem w ciąży oraz grupą kontrolną zdrowych ciężarnych. Natomiast w grupie PE odnotowano tendencję do zdecydowanie wyższego ciśnienia skurczowego u nosicielek zmutowanego genotypu -786CC (205,0±21,2 mmHg) w porównaniu do kobiet nosicielek genotypu -786TT (177,0±17,8 mmHg) oraz -786TC (173,4±13,5 mmHg) (p=ns).

Adres do korespondencji:Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz
Klinika Perinatologii i Chorób Kobięcych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
ul. Polna 33, 60-535 Poznań
tel.: 0618419613, fax: 0618474651
e-mail: asm@data.plOtrzymano: 15.01.2012
Zaakceptowano do druku: 10.08.2012

Perlik M, et al. Warianty genetyczne śródłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) w nadciśnieniu ciążowym i stanie przedrzucawkowym.

Wnioski: W przypadku polimorfizmu 894G>T (Glu298Asp) genu NOS3 obecność zmutowanego genotypu 894TT może mieć wartość ochronną w stosunku do wystąpienia stanu przedrzucawkowego. Obecność zmutowanego genotypu -786CC polimorfizmu -786T>C genu NOS3 może korelować ze wzrostem ciśnienia skurczowego w przebiegu stanu przedrzucawkowego.

Słowa kluczowe: **czynnik V Leiden / MTHFR / protrombina / trombofilia /**

Abstract

Introduction: Decreased nitric oxide (NO) plasma concentration may be involved in the development of preeclampsia. It has been suggested that genetic variants of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene may reduce NO plasma levels.

Aim of the study: To evaluate the correlation of 894G>T (Glu298Asp) and -786T>C polymorphisms of NOS3 gene with the development of preeclampsia (PE) and gestational hypertension (GH).

Material and methods: 110 hypertensive pregnant women (mean age 29.46±4.54 years, mean gestational age 36.88±3.50 gw., mean systolic blood pressure 167.82±16.87 mmHg, mean diastolic blood pressure 104.32±11.62 mmHg) were enrolled into the study group. The whole study group was further subdivided into two subgroups: women with gestational hypertension (GH, n=69) and with preeclampsia (PE, n=41). Gestational hypertension and preeclampsia were diagnosed according to the ACOG standards. All patients with multiple pregnancy, diabetes, vascular changes and thrombotic complications were excluded from the study. The control group consisted of 150 healthy pregnant women (mean age 28.29±4.40 years, mean gestational age 39.06±1.28 gw., mean systolic blood pressure 112.07±10.75 mmHg, mean diastolic blood pressure 70.62±9.13 mmHg). The frequency of investigated genotypes of NOS3 gene polymorphisms was examined by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR/RFLP) method.

Results: As far as the 894G>T polymorphism was concerned, a higher frequency of 894TT genotype in the control group in comparison to the whole study group was observed (8.7 vs. 5.4%; WR=0.61, p=ns). A similar observation was made about the 894T allele (25.4 vs. 30.0%, WR=0.79, p=ns). The frequency of the 894T allele was also higher in controls in comparison to the PE group (30% vs. 26.8%, p=ns) and GH group (30% vs. 24.6%, p=ns). Analyzing the -786T>C polymorphism no statistically significant differences between the whole study and the control groups was found. The frequency of the mutated -786CC genotype was similar in the entire study group and controls (13.6 vs. 15.3%, p=ns). The frequency of the mutated -786C allele was also similar in both analyzed groups (37.3 vs. 38.0%, p=ns). A statistically significant difference in the frequency of coexistence of mutated homozygotic genotypes 894TT/-786CC between the investigated groups (0.9% in the whole study group vs. 6.7% in the control group, p=0.019) was observed. Coexistence of 894GT/-786TC genotypes was noted more frequently in the control group (19,1% in the whole study group vs. 24.7% in the control group, p=ns). The frequency of other combinations of investigated genotypes coexistence did not significantly differ between the control group, the entire study group, and the PE and GH groups. In the PE group, a higher systolic blood pressure was noted in patients with -786CC genotype (205.0±21.2 mmHg) in comparison to patients with -786TT (177.0±17.8 mmHg) or -786TC (173.4±13.5 mmHg) genotypes (p=ns).

Conclusions: The presence of the 894TT genotype of the 894G>T (Glu298Asp) polymorphism may play a protective role in the development of preeclampsia. The presence of the -786CC genotype of the -786T>C polymorphism may correlate with the increase of the systolic blood pressure in pregnant women with preeclampsia.

Key words: **preeclampsia / endothelial nitric oxide synthase / genetic polymorphism /**

Wstęp

Intensywne badania dotyczące mechanizmów rozwoju stanu przedrzucawkowego u ciężarnych wskazują na dysfunkcję śródłonka tętnic spiralnych w łożysku już w czasie inwazji komórek trofoblastu do tych naczyń. Konsekwencją tego jest wzrost stężenia tromboksanu A2 oraz endoteliny 1, jak również spadek stężenia prostacykliny oraz tlenu azotu. Tromboksan A2 oraz endotelina 1 są czynnikami działającymi silnie obkurczająco na mięśniówkę naczyń krwionośnych. Dodatkowo tromboksan A2 wykazuje działanie powodujące agregację płytek krwi i wpływa na wzrost czynności skurczowej macicy. Zmiany te mające swój początek we wczesnym stadium rozwoju ciąży, nasilają się i aktywują w drugiej połowie manifestując się pojawieniem się objawów stanu przedrzucawkowego.

W licznych doniesieniach dużo uwagi poświęca się znaczeniu zaburzeń w układzie endoteliny 1 (ET-1 – *endothelin 1*) – tlenek azotu (NO – *Nitric Oxide*) [1, 2, 3].

W latach 90-tych pojawiły się doniesienia dotyczące fizjologicznego i patologicznego działania NO w różnych układach, jak również śródłonkowej syntazy NO. Dzisiaj tlenek azotu uważany jest za jeden z głównych neurotransmiterów w ośrodkowym układzie nerwowym, bierze udział w regulacji hemostazy w nerkach, w układzie sercowo-naczyniowym oraz jest mediatorem reakcji zapalnej. Wzrastające zainteresowanie NO spowodowało, że w 1992 roku ta prosta molekula uznana została przez czasopismo *Science* za „cząsteczkę roku”.

Perlik M, et al. Warianty genetyczne śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS) w nadciśnieniu ciążowym i stanie przedrzucawkowym.

Odkrycie funkcji śródbłonka w procesie dylatacji naczyń, określenie roli NO oraz cyklicznego GMP jako czynników odpowiedzialnych za te reakcje oraz identyfikacja enzymów odpowiedzialnych za produkcję NO doprowadziło w 1998 roku do przyznania Nagrody Nobla w zakresie medycyny (R. Furchgott, F. Murad, L. Ignarro) [4].

Tlenek azotu, endotelina oraz naczyniowy śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor*) są czynnikami w istotny sposób warunkującymi niepowikłany przebieg ciąży i optymalne wzrastanie płodu, między innymi poprzez wpływ na prawidłowy rozwój jednostki maciczo-łożyskowej, angiogenezę, napięcie mięśni macicy podczas ciąży oraz obkurczanie się naczyń pępowinowych w czasie porodu [5, 6]. Wykazano, że ważną rolę patogenetyczną w rozwoju stanu przedrzucawkowego pełni nie tylko samo zwiększone stężenie endoteliny-1, ale również obniżone stężenie NO, a tym samym zaburzona równowaga tych dwóch substancji u ciężarnych w stanie przedrzucawkowym [7, 8, 9, 10].

W ostatnich latach zasugerowano również udział genów kodujących syntezę NO oraz ET-1 w patogenezie tej jednostki, a w szczególności na możliwy związek pomiędzy polimorfizmami genetycznymi tego układu a powstawaniem stanu przedrzucawkowego. Obniżenie poziomu NO może być spowodowane m.in. genetycznie uwarunkowanymi zaburzeniami aktywności śródbłonkowej syntazy NO (eNOS – *Endothelial Nitric Oxide Synthase*). Gen *NOS3* kodujący endotelialną syntazę tlenku azotu (26 eksonów, 25 intronów) koduje 1203 aminokwasy o łącznej wielkości 133 kDa. W związku z patogenezą nadciśnienia tętniczego najczęściej badanymi polimorfizmami genu *NOS3* są zamiana guaniny (G) na tyminę (T) w pozycji 894 (ekson 7) powodująca zmianę sekwencji aminokwasowej białka enzymu (*Glu298Asp*) oraz zamiana tyminy (T) na cytozynę (C) w pozycji -786 promotora genu *NOS3* [11, 12, 13].

Cel pracy

Celem pracy była ocena częstości występowania polimorfizmów 894G>T (*Glu298Asp*) oraz -786T>C genu *NOS3* i ich znaczenia w rozwoju stanu przedrzucawkowego oraz nadciśnienia ciążowego.

Materiał i metody

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

W grupie badanej analizą objęto 110 kobiet z nadciśnieniem w ciąży (średnia wieku 29,46±4,54 lat, średnia wieku ciążowego 36,88±3,50 tyg., średnia skurczowego ciśnienia tętniczego 167,82±16,87 mmHg, średnia rozkurczowego ciśnienia tętniczego 104,32±11,62 mmHg). Grupę tą podzielono na podgrupy: ciężarne z nadciśnieniem ciążowym (GH – *gestational hypertension*, 69 osób) oraz ciężarne ze stanem przedrzucawkowym (PE – *preeclampsia*, 41 osób). Klasyfikacja kobiet do grup badanych została przeprowadzona według kryteriów zalecanych przez Amerykańskie Towarzystwo Położników i Ginekologów (ACOG – *American College of Obstetrician and Gynecologists*). W grupie GH w grupie PE wartości skurczowego ciśnienia tętniczego wynosiły ≥140/90 mmHg, potwierdzone co najmniej dwukrotnym pomiarem w sześciogodzinnym odstępie czasu, białkomocz ≥30mg% w przypadkowej próbce moczu lub ≥300mg w dobowej zbiórce moczu.

Tabela I. Startery używane do reakcji PCR.

Gen	Polimorfizm	Sekwencja starterów
NOS3	894G>T (<i>Glu298Asp</i>)	F5' AAg gCA ggA gAC AgT ggA Tgg A 3' R5' CCC AgT CAA TCC CTT Tgg TgC TCA 3'
	-786T>C	F5' CCA CCC TgT CAT TCA gTg AC 3' R5' TCT CTg Agg TCT CgA AAT CA3'

Tabela II. Wielkości fragmentów po reakcji hydrolizy oraz stosowane enzymy restrykcyjne przy oznaczeniu badanych polimorfizmów genu *NOS3*.

Polimorfizm	Enzym restrykcyjny (producent)	Rozpoznawana sekwencja	Wielkość produktu PCR	Wielkość fragmentu po hydrolizie
894G>T	Mbol (Fermentas, Litwa)	5'...↓GATC...3' 3'...CTAG↑...5'	248 pz	GG 248pz GT 248, 158, 90 pz TT 158, 90 pz
-786T>C	PdI1 (Fermentas, Litwa)	5'...GCC↓GGC...3' 3'...CGG↑CCG...5'	296 pz	TT 296 pz TC 296, 220, 76 pz CC 220, 76 pz

Perlik M, et al. Warianty genetyczne śródblonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) w nadciśnieniu ciążowym i stanie przedrzucawkowym.

Tabela III. Częstość występowania genotypów i alleli polimorfizmu 894G>T (Glu298Asp) oraz -786T>C genu NOS3 w badanych grupach.

NOS3 894G>T	Nadciśnienie w ciąży						Grupa kontrolna n=150	
	Grupa z nadciśnieniem w ciąży n=110		Grupa GH n=69		Grupa PE n=41			
Genotypy	wartość obserw. n (%)	wartość oczekiw. (%)	wartość obserw. n (%)	wartość oczekiw. (%)	wartość obserw. n (%)	wartość oczekiw. (%)	wartość obserw. n (%)	wartość oczekiw. (%)
GG	60 (54,6)	55,6	36 (52,2)	56,8	24 (58,5)	53,5	73 (48,7)	49,0
GT	44 (40,0)	37,9	32 (46,4)	37,1	12 (29,3)	39,3	64 (42,6)	42,0
TT	6 (5,4)	6,5	1 (1,4)	6,1	5 (12,2)	7,2	13 (8,7)	9,0
Suma	110 (100,0)	100,0	69 (100,0)	100,0	41 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0
Allele								
G	164 (74,6)	-	104 (75,4)	-	60 (73,2)	-	210 (70,0)	-
T	56 (25,4)	-	34 (24,6)	-	22 (26,8)	-	90 (30,0)	-
Suma	220 (100,0)	-	138 (100,0)	-	82 (100,0)	-	300 (100,0)	-
NOS3 -786T>C								
Genotypy	wartość obserw. n (%)	wartość oczekiw. (%)	wartość obserw. n (%)	wartość oczekiw. (%)	wartość obserw. n (%)	wartość oczekiw. (%)	wartość obserw. n (%)	wartość oczekiw. (%)
TT	43(39,1)	39,4	23 (33,4)	32,8	20 (48,8)	51,7	59 (39,4)	38,4
TC	52(47,3)	46,7	33 (46,8)	48,9	19 (46,3)	40,4	68 (45,3)	47,1
CC	15(13,6)	13,9	13 (18,8)	18,3	2 (4,9)	7,9	23 (15,3)	14,5
Suma	110 (100,0)	100,0	69 (100,0)	100,0	41 (100,0)	100,0	150 (100,0)	100,0
Allele								
T	138 (62,7)	-	79 (56,5)	-	59 (72,0)	-	186 (62,0)	-
C	82 (37,3)	-	59 (43,5)	-	23 (28,0)	-	114 (38,0)	-
Suma	220 (100,0)	-	138 (100,0)	-	82 (100,0)	-	300 (100,0)	-

U wszystkich kobiet z tej grupy potwierdzono pojawienie się wyższego ciśnienia tętniczego i białkomoczu po 20 tygodniu czasu trwania ciąży. Pomiar ciśnienia tętniczego przeprowadzano po co najmniej 30 min. odpoczynku, w pozycji siedzącej lub leżącej na lewym boku. U wszystkich kobiet z grupy badanej potwierdzono ciążę pojedynczą. Z badań zostały wykluczone pacjentki z ciążą wielopłodową, cukrzycą, zmianami naczyniowymi oraz powikłaniami zakrzepowymi.

W grupie badanej odnotowywano: wartości ciśnienia tętniczego, oznaczenia laboratoryjne w surowicy krwi (wartość mocznika, kwasu moczowego, azotu mocznikowego – BUN, białka całkowitego, poziomu elektrolitów: sodu, potasu, chloru), wartości białka w moczu, wzrost masę ciała i wskaźnik masy ciała (BMI – body mass index).

Jako grupę kontrolną przeanalizowano 150 zdrowych kobiet ciężarnych (średni wiek 28,29±4,40 lat, średnia wieku ciążowego 39,06±1,28 tyg., średnia ciśnienia skurczowego 112,07±10,75 mmHg, średnia rozkurczowego ciśnienia tętniczego 70,62±9,13 mmHg). Do grupy kontrolnej kwalifikowano kobiety z prawidłowym ciśnieniem tętniczym <140/90 mmHg, bez obecności chorób internistycznych, nieprawidłowości chromosomalnych lub wad wrodzonych u płodu, z potwierdzoną ciążą pojedynczą. W grupie kontrolnej odnotowywano: wartości ciśnienia tętniczego, wzrost i masę ciała, wskaźnik masy ciała.

Metody: Częstość występowania polimorfizmów genu NOS3 (894G>T (Glu298Asp) oraz -786T>C) oznaczano metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR – polymerase chain reaction) oraz metodą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych

Tabela IV. Współwystępowanie genotypów badanych polimorfizmów 894G>T(Glu298Asp) oraz -786T>C genu NOS3 pomiędzy badanymi grupami kobiet.

			NOS3 894G>T (Glu298Asp)			Ogółem
			GG	GT	TT	
Nadciśnienie w ciąży	NOS3 -786T>C	TT	27 (24,5)	14 (12,7)	2 (1,9)	43 (39,1)
		TC	28 (25,5)	21 (19,1)	3 (2,7)	52 (47,3)
		CC	5 (4,5)	9 (8,2)	1 (0,9)*	15 (13,6)
		suma	60 (54,5)	44 (40,0)	6 (5,5)	110 (100,0)
GH	NOS3 -786T>C	TT	13 (18,8)	10 (14,5)	0 (0,0)	23 (33,3)
		TC	19 (27,5)	14 (20,3)	0 (0,0)	33 (47,8)
		CC	4 (5,8)	8 (11,6)	1 (1,5)	13 (18,9)
		suma	36 (52,1)	32 (46,4)	1 (1,5)	69 (100,0)
PE	NOS3 -786T>C	TT	14 (34,1)	4 (9,8)	2 (4,9)	20 (48,8)
		TC	9 (22,0)	7 (17,1)	3 (7,3)	19 (46,4)
		CC	1 (2,4)	1 (2,4)	0 (0,0)	2 (4,8)
		suma	24 (58,5)	12 (29,3)	5 (12,2)	41 (100,0)
Grupa kontrolna	NOS3 -786T>C	TT	39 (26,0)	19 (12,7)	1 (0,7)	59 (39,4)
		TC	29 (19,3)	37 (24,7)	2 (1,3)	68 (45,3)
		CC	5 (3,3)	8 (5,3)	10 (6,7)*	23 (15,3)
		suma	73 (48,6)	64 (42,7)	13 (8,7)	150 (100,0)

*p=0,019

(RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism). Sekwencje starterów używanych w reakcjach PCR, wielkości fragmentów po reakcji hydrolizy oraz stosowane enzymy restrykcyjne przy oznaczeniu polimorfizmów przedstawiono w tabeli I oraz II.

Uzyskane w pracy wyniki częstości występowania genotypów i alleli badanych genów analizowano stosując oprogramowanie do statystycznej analizy danych SPSS 14.0 PL dla Windows. Do analizy statystycznej użyto pakietu SigmaStat 3.5. Analizę rozkładu uzyskanych pomiarów danej cechy przeprowadzono w oparciu o test Kolmogorowa-Smirnova.

Do analizy istotności statystycznej różnic cech ilościowych grupy badanej i grupy kontrolnej zastosowano test t-Studenta dla cech o rozkładzie normalnym oraz test Manna-Witney'a.

Za statystycznie istotną przyjęto wartość $p < 0,05$. Do przeprowadzenia analizy częstości występowania haplotypów badanych w pracy polimorfizmów zastosowano program PHASE wersja 2.1.

Wyniki

Analiza danych klinicznych i laboratoryjnych: Wiek badanych ciężarnych nie różnił się statystycznie istotnie pomiędzy grupami ($p=ns$). W czasie analizy danych klinicznych i laboratoryjnych wskazano na różnice statystycznie istotne w wartości

ciśnienia skurczowego i rozkurczowego pomiędzy badanymi grupami. Zaobserwowano również wyższą masę ciała przed i w trakcie ciąży u pacjentek z nadciśnieniem w ciąży w porównaniu do zdrowych ciężarnych. W grupie badanej średnia masy ciała przed ciążą wynosiła $68,44 \pm 14,86$ kg, po ciąży natomiast $85,11 \pm 16,35$ kg, w grupie kontrolnej odpowiednio $59,71 \pm 8,86$ kg oraz $75,74 \pm 10,92$ kg. Porównując te wartości wykazano istotność statystyczną ($p < 0,001$).

Średnia wartości BMI przed i w trakcie ciąży kobiet z grupy badanej wynosiła odpowiednio $24,87 \pm 5,01$ kg/m² oraz $30,91 \pm 5,26$ kg/m², a w grupie kontrolnej $21,53 \pm 3,03$ kg/m² oraz $27,34 \pm 3,9$ kg/m². Odnotowane różnice były istotne statystycznie ($p < 0,001$).

Analiza polimorfizmu genu NOS3: W czasie analizy polimorfizmu 894G>T (Glu298Asp) zaobserwowano nieznacznie wyższą frekwencję zmutowanego genotypu 894TT w grupie kontrolnej 8,7% w porównaniu do całej grupy kobiet z nadciśnieniem 5,4% (WR=0,61, $p=ns$). Podobne obserwacje dotyczyły zmutowanego allele 894T (25,4% w grupie z nadciśnieniem vs. 30,0% w grupie kontrolnej, WR=0,79, $p=ns$). Również częstość występowania zmutowanego allele 894T była wyższa w grupie kontrolnej (30%) w porównaniu do grupy PE (26,8%, $p=ns$) oraz w porównaniu do grupy GH (24,6%, $p=ns$). (Tabela III).

Perlik M, et al. Warianty genetyczne śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) w nadciśnieniu ciążowym i stanie przedzucawkowym.

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

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

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

Analiza polimorfizmu -786T>C genu NOS3 w całej grupie z nadciśnieniem w ciąży oraz w grupie kontrolnej zdrowych ciężarnych nie wykazała różnic statystycznie istotnych pomiędzy tymi grupami w częstości występowania badanych wariantów genetycznych. W pracy odnotowano podobną częstość występowania genotypu zmutowanego -786CC w obydwu grupach kobiet z nadciśnieniem i kontrolnej (13,6 vs. 15,3%, $p=ns$), jak również zmutowanego allela -786C (37,3 vs. 38,0%, $p=ns$). Porównując badane podgrupy GH oraz PE nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w częstości występowania badanych genotypów. (Tabela III).

W następnym etapie analizowano współwystępowanie genotypów obydwu polimorfizmów 894G>T oraz -786T>C genu NOS3. Zaobserwowano porównywalną częstość współwystępowania genotypów homozygotycznych niezmutowanych 894GG/-786TT w grupie kobiet z nadciśnieniem oraz w grupie kontrolnej (24,5 vs. 26,0%, $p=ns$).

Jednoczesne występowanie genotypów heterozygotycznych 894GT/-786TC częściej obserwowano w grupie kontrolnej (19,1% u kobiet z nadciśnieniem vs. 24,7% w grupie kontrolnej, $p=ns$). Istotnie różniła się również częstość współwystępowania genotypów homozygotycznych zmutowanych 894TT/-786CC pomiędzy tymi grupami (0,9% w całej grupie 110 kobiet z nadciśnieniem vs. 6,7% w grupie kontrolnej, $p=0,019$). Częstość występowania pozostałych kombinacji genotypów badanych polimorfizmów genu NOS3 nie różniła się statystycznie istotnie pomiędzy grupą kontrolną, całą grupą z nadciśnieniem oraz podgrupami PE i GH. (Tabela IV).

Analiza wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w zależności od badanych polimorfizmów genów NOS3: Przy porównywaniu średnich wartości ciśnienia skurczowego i rozkurczowego w podgrupach GH oraz PE w zależności od rozkładu genotypów badanych polimorfizmu 894G>T genu NOS3 nie zaobserwowano istotnych zależności tej badanej zmiennej od poszczególnych wariantów genetycznych. Ciekawą natomiast obserwacją było odnotowanie w grupie PE tendencji do zdecydowanie wyższego ciśnienia skurczowego (205,0±21,2 mmHg) u kobiet z genotypem homozygotycznym zmutowanym -786CC polimorfizmu -786T>C genu NOS3 w porównaniu do kobiet nosicielek genotypu homozygotycznego niezmutowanego -786TT (177,0±17,8 mmHg) oraz heterozygotycznego -786TC (173,4±13,5 mmHg) ($p=ns$).

Analiza częstości występowania haplotypów: W pracy analizowano również częstość występowania haplotypów badanych polimorfizmów genu NOS3. Dla badanych polimorfizmów genu NOS3 stwierdzono występowanie następujących haplotypów: TG, CG, CT, TT (pierwsza litera polimorfizm -786T>C, druga 894G>T). Zaobserwowano nieco częstsze występowanie haplotypu CG w całej grupie badanej (0,234892 vs. 0,184909 w grupie kontrolnej, $p=ns$), natomiast haplotypu CT w grupie kontrolnej (0,137836 vs. 0,195091 w grupie kontrolnej, $p=ns$). (Tabela V).

Dyskusja

Od kilku lat wiadomo, że dostępność śródbłonkowego NO jest regulowana głównie na poziomie jego syntezy, stąd w patogenezie chorób układu krążenia sugeruje się udział polimorfizmów genu NOS3. Warianty genetyczne eNOS mają wpływ na rozwój chorób sercowo-naczyniowych, w tym nadciśnienia tętniczego, niewydolności krążenia i zawału serca, czy udaru mózgu. Prawdopodobnie zwiększają również ryzyko powikłań naczyniowych w przebiegu cukrzycy [14, 15, 16, 17, 18]. Obserwacje te znalazły również odzwierciedlenie w analizach korelacji polimorfizmu genu NOS3 z rozwojem stanu przedzucawkowego. Doniesienia dotyczące tego problemu nie są jednak spójne i jednoznaczne.

Serrano i wsp. w 2004 roku opublikowali wyniki wieloosrodkowego badania w Kolumbii obejmującego grupę 322 młodych kobiet ciężarnych z rozpoznaniem stanu przedzucawkowego i grupę kontrolną 522 zdrowych ciężarnych. Analizowano polimorfizm Glu298Asp oraz -786T>C genu NOS3 i ich korelację z rozwojem preeklampsji. Udowodniono statystycznie istotną zależność pomiędzy występowaniem PE u homozygot zmutowanych Asp/Asp NOS3 w badanych grupach. Patomechanizm występowania tego powikłania w ciąży badacze tłumaczyli zmniejszeniem syntezy NO i upośledzeniem funkcji śródbłonka naczyń wśród nosicieli genotypu homozygotycznego zmutowanego. W zaprezentowanej pracy Serrano i wsp. nie zaobserwowali korelacji pomiędzy polimorfizmem -786T>C genu NOS3, a rozwojem stanu przedzucawkowego w badanych grupach [19].

W grupie 152 kobiet japońskich spełniających kryteria stanu przedzucawkowego analizowano polimorfizm Glu298Asp genu NOS3. Wykazano częstsze występowanie heterozygotycznego genotypu Glu/Asp NOS3 (27,5%) oraz zmutowanego allela

Perlik M, et al. Warianty genetyczne śródblukowej syntazy tlenu azotu (eNOS) w nadciśnieniu ciążowym i stanie przedrzucawkowym.

298Asp (15,0%) w grupie kobiet z ciężką postacią stanu przedrzucawkowego (12,9%) w stosunku do grupy kontrolnej (7,6%). Zaobserwowano również korelację pomiędzy występowaniem polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* a powikłaniami jakimi są wcześniactwo i niska masa urodzeniowa noworodków [20].

Ta sama grupa badaczy Yoshimura i wsp. w 2003 r. przedstawiła wyniki pracy dotyczącej analizy częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* w grupie 112 kobiet ciężarnych ze stanem przedrzucawkowym z rejonu Bangladeszu (grupa kontrolna 119 zdrowych ciężarnych). Uzyskano zaskakujące wyniki, w których wykazano brak istotnych statystycznie różnic w częstości występowania homozygot zmutowanych *Asp/Asp NOS3*, heterozygot *Glu/Asp NOS3* i homozygot niezmutowanych *Glu/Glu NOS3*, także częstości występowania zmutowanego allela *298Asp NOS3* w grupie badanej w stosunku do grupy kontrolnej. Zaproponowano, że polimorfizm *Glu298Asp NOS3* u kobiet z rejonu Bangladeszu nie może być czynnikiem predykcyjnym rozwoju stanu przedrzucawkowego [21].

Polimorfizm *Glu298Asp* genu *NOS3* analizowano również u 132 ciężarnych z Finlandii z rozpoznaniem stanu przedrzucawkowego (grupa kontrolna 113 zdrowych ciężarnych). Rozkład genotypów w obydwu badanych grupach był podobny ($p=0,233$). Zaobserwowano jedynie nieznaczną przewagę występowania allela *G* w grupie z preeklampsją (74,6% vs. 67,7%, $p=0,091$, OR 1,40). Wyniki tego badania nie wskazują znacznego udziału polimorfizmu *Glu298Asp* w rozwoju stanu przedrzucawkowego [11].

Hoher i wsp. wskazali, że polimorfizmy genu *NOS3* upośledzają dostępność tlenu azotu i w związku z tym predysponują do rozwoju preeklampsji. Celem badania była ocena związku trzech polimorfizmów genu *NOS3* (*Glu298Asp*, *-786T>C* oraz *VNTR 4a/b*) z markerami preeklampsji (ciśnienie tętnicze krwi, białkomocz, obrzęki obwodowe) oraz z masą urodzeniową i wrodzonymi malformacjami noworodków. Analizę genetyczną pod względem polimorfizmów *Glu298Asp* oraz *-786T>C* przeprowadzono u 1502 kobiet, natomiast *VNTR 4a/b* – u 2186 kobiet z rasy kaukaskiej. Wśród grupy badanej stwierdzono 106 przypadków nadciśnienia ciążowego (4,8%), 36 przypadków preeklampsji (1,6%) oraz 42 przypadki preeklampsji nałożonej na przewlekłe nadciśnienie tętnicze (2,0%). Wyniki tej pracy jednoznacznie wykazały brak związku badanych polimorfizmów z markerami preeklampsji. Współwystępowanie alleli poszczególnych polimorfizmów również nie miało znaczenia dla rozwoju preeklampsji. Ponadto nie wykazano korelacji pomiędzy badanymi polimorfizmami a masą urodzeniową lub wrodzonymi malformacjami u noworodka [12].

Ciekawą analizę przedstawili autorzy pracy Hillermann i wsp. rozważając wpływ polimorfizmu *Glu298Asp* genu *NOS3* na ryzyko rozwoju preeklampsji i przedwczesnego oddzielenia łożyska. Dodatkowo przedmiotem badań był także polimorfizm *Met235Thre* genu *AGT*, który uważany jest za element modulujący ciśnienie tętnicze i remodeling naczyń podczas ciąży. Grupę badaną stanowiło 50 ciężarnych, w pierwszej ciąży, u których przed 34 tygodniem ciąży doszło do rozwoju ciężkiego stanu przedrzucawkowego (populacja kobiet Republiki Południowej Afryki) oraz 50 kobiet z przedwczesnym oddzieleniem łożyska. W obrębie obu badanych grup wydzielono podgrupę kobiet, u których współistniały obie patologie. Grupę kontrolną stanowi-

ło 50 zdrowych ciężarnych. Autorzy pracy nie stwierdzili związku polimorfizmu *Met235Thre* genu *AGT* z rozwojem stanu przedrzucawkowego i przedwczesnym oddzieleniem łożyska. Analizując polimorfizm *Glu298Asp* genu *NOS3* wykazano większą częstość występowania genotypów *Glu/Asp* oraz *Asp/Asp* w grupie z przedwczesnym oddzieleniem łożyska (49%) w porównaniu do grupy kontrolnej (21%) (WR=3,51, $p=0,006$). Podobnie zaobserwowano częstsze występowanie allela *298Asp* w grupie z przedwczesnym oddzieleniem łożyska (25%) w porównaniu do grupy kontrolnej (8%) (WR=2,49, $p=0,023$). Ponadto w podgrupie kobiet z preeklampsją, u których doszło do przedwczesnego oddzielenia łożyska wykazano korelację z genotypem *Glu/Asp* ($p<0,0001$). W związku z tym nosicielstwo allela *298Asp* wydaje się być ważnym czynnikiem ryzyka przedwczesnego oddzielenia łożyska w przebiegu preeklampsji (WR=5,92, $p<0,000$). Co ciekawe nie wykazano korelacji między badanym polimorfizmem a ryzykiem rozwoju samego stanu przedrzucawkowego (wyniki analizy genetycznej nie różniły się istotnie pomiędzy grupą z preeklampsją a grupą kontrolną) [13].

Odmienne wyniki prezentowane w różnych pracach dotyczących genetycznych uwarunkowań nadciśnienia w ciąży uwarunkowane są prawdopodobnie zmiennymi takimi jak rasa, wiek, status socjoekonomiczny i inne, mogącymi mieć wpływ na rozwój tej jednostki chorobowej w ciąży.

Zaprezentowane w naszej pracy wyniki dotyczące polimorfizmu *894G>T* (*Glu298Asp*) oraz *-786T>C* genu *NOS3* są nieco odmienne. W pracy zaobserwowaliśmy przede wszystkim wyższą częstość występowania genotypu zmutowanego *894TT* u zdrowych ciężarnych, co pozwala przypuszczać o jego ochronnej roli w stosunku do rozwoju stanu przedrzucawkowego. W powyższym badaniu nie wykazano również różnic statystycznie istotnych pomiędzy częstością występowania poszczególnych genotypów polimorfizmu *-786T>C* w grupie kobiet ciężarnych z nadciśnieniem w ciąży oraz grupie kontrolnej. Interesującym jest natomiast fakt korelacji wyższych wartości ciśnienia skurczowego z występowaniem genotypu homozygotycznego zmutowanego *-786CC* polimorfizmu *-786T>C*. W pracy wykonano również analizę współwystępowania genotypów oraz analizę częstości występowania haplotypów badanych polimorfizmów. Analiza ta pokazała statystycznie istotnie wyższą częstość jednoczesnego występowania genotypów homozygotycznych zmutowanych *894TT/-786CC* w całej grupie kobiet z nadciśnieniem (GH + PE). Analiza haplotypów w zakresie badanych polimorfizmów genu *NOS3* natomiast nie pokazała różnic statystycznie istotnych w częstości ich występowania. Wszystkie powyższe obserwacje wymagają z pewnością dalszych badań w zdecydowanie większej liczbie grupie kobiet ciężarnych. Jednocześnie zwraca uwagę fakt braku porównywalnych wyników dotyczących współwystępowania genotypów wśród prac innych autorów.

Wnioski

W badanej grupie ciężarnych obecność zmutowanego genotypu *894TT* polimorfizmu *894G>T* (*Glu298Asp*) *NOS3* może mieć wartość ochronną w stosunku do wystąpienia stanu przedrzucawkowego. Analiza wyników badań sugeruje, że obecność zmutowanego genotypu *-786CC* polimorfizmu *-786T>C* genu *NOS3* może korelować ze wzrostem ciśnienia skurczowego w przebiegu stanu przedrzucawkowego.

Perlik M, et al. Warianty genetyczne śródblonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) w nadciśnieniu ciążowym i stanie przedrzucawkowym.

KOMUNIKAT

Piśmiennictwo

1. Florijn K, Derkx F, Visser W, [et al.]. Elevated plasma levels of endothelin in pre-eclampsia. *J Hypertens*. 1991, 9, 166-167.
2. Ariza A, Bobadilla N, Halhali A. Endothelin 1 and angiotensin II in preeclampsia. *Rev Invest Clin*. 2007, 59, 48-56.
3. Baksu B, Davas I, Baksu A, [et al.]. Plasma nitric oxide, endothelin-1 and urinary nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate levels in hypertensive pregnant women. *Int J Gynaecol Obstet*. 2005, 90, 112-117.
4. Derentowicz P, Markiewicz K, Wawrzyniak M, [i wsp.]. Nitric oxide (NO) - Nobel prize in medicine and physiology for 1998. *Med Wieku Rozwoj*. 2000, 4, 209-217.
5. Irmanski R, Serwa-Stepień E, Barylski M, [i wsp.]. Zaburzenia równowagi śródblonkowej w nadciśnieniu tętniczym. Rola peptydów natriuretycznych i endoteliny. *Kardiol Pol*. 2005, 63, 457-461.
6. Leszczyńska-Gorzela B, Kamiński K, Szymula D, [i wsp.]. Participation of nitric oxide in maintenance of vascular tension in human placenta. Third World Congress of Perinatal Medicine, San Francisco. *Abstract book*. 1996, 69.
7. Ihara Y, Sagawa N, Hasegawa M, [et al.]. Concentrations of endothelin-1 in maternal and umbilical cord blood at various stages of pregnancy. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1991, 17, 443-445.
8. Buhimschi I, Saade G, Chwalisz K, Gerfield R. The nitric oxide pathway in pre-eclampsia: pathophysiological implications. *Hum Reprod Update*. 1998, 4, 25-42.
9. Myatt L, Webster R. Vascular biology of preeclampsia. *J Thromb Haemost*. 2009, 7, 375-384.
10. Slowinski T, Neumayer H, Stolze T, [et al.]. Endothelin system in normal and hypertensive pregnancy. *Clin Sci (Lond)*. 2002, 103, 446-449.
11. Häkli T, Romppanen E, Hiltunen M, [et al.]. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism in preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig*. 2003, 10, 154-157.
12. Hoher B, Chen Y, Hügler S, [et al.]. Impact of maternal endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on blood pressure, protein excretion and fetal outcome in pregnancy. *J Hum Hypertens*. 2008, 22, 641-647.
13. Hillerman R, Carelse K, Gebhardt G. The Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an increased risk for abruptio placentae in pre-eclampsia. *J Hum Genet*. 2005, 50, 415-419.
14. Hyndman M, Parsons H, Verma S, [et al.]. The T-786->C mutation in endothelial nitric oxide synthase is associated with hypertension. *Hypertension*. 2002, 39, 919-922.
15. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, [et al.]. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension*. 1998, 32, 3-8.
16. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, [et al.]. T-786->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*. 1999, 99, 2864-2870.
17. Nejatizadeh A, Stobdan T, Malhotra N, Pasha M. The genetic aspects of pre-eclampsia: achievements and limitations. *Biochem Genet*. 2008, 46, 451-479.
18. Teplakov A, Shilov S, Berezikova E, [et al.]. Polymorphism of eNOS and iNOS Genes and Chronic Heart Failure in Patients With Ischemic Heart Disease. *Kardiologia*. 2010, 50, 23-30.
19. Serrano N, Casas J, Diaz L. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case-control study. *Hypertension*. 2004, 44, 702-707.
20. Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, [et al.]. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with severe preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig*. 2000, 7, 238-241.
21. Yoshimura T, Chowdhury F, Yoshimura M, Okamura H. Genetic and environmental contributions to severe preeclampsia: lack of association with the endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp variant in a developing country. *Gynecol Obstet Invest*. 2003, 56, 10-13.

Instytut
Matki i DzieckaDlaczego kobiety i dzieci
umierają w czasie ciąży i porodu?

Warszawa, 23-24 listopada 2012 roku

www.konferencja.ginekologia.pl

Szanowni Państwo,

w imieniu Komitetu Organizacyjnego pragnę zaprosić Państwa do udziału w II Konferencji Naukowo-Szkoleniowej „Dlaczego kobiety i dzieci umierają w czasie ciąży i porodu?”

Pierwszy dzień będzie składał się z trzech części:

w godz. 11.00 – 14.00 – odbędzie się prezentacja Roczno-Raportu nt. „Umieralności Okoloporodowej w 2011 r. oraz Zgonów Matek”.

w godz. 15.00 – 19.00 – zostaną przedstawione zagadnienia, których wstępowanie przyczynia się do wcześniejszego i zgonów matek – takie jak np. zakażenia (m.in. wirusem HIV oraz AIDS), nadciśnienie tętnicze, wrodzone wady płodu, uzależnienia matek (narkotyki, alkohol, tytoń).

w godz. 15.00 – 19.00 – równolegle będzie prowadzona sesja dla położnych o ich roli w opiece nad matką i dzieckiem zgodnie z obowiązującym od 23.09.2010 r. rozporządzeniem Ministra Zdrowia.

Drugi dzień:

To warsztaty, podczas których zostaną przedstawione wzorcowe posiedzenia urazowe dotyczące umieralności okołoporodowej i analizy zgonu kobiety w związku z ciążą, porodem i położeniem.

Zapraszając Państwa do Warszawy,
pozostajemy z szacunkiem,

Prof. dr hab. n. med. Jerzy Leśchang
Przewodniczący
Komitetu Naukowego Konferencji

Dr n. med. Tomasz Maciejewski
Przewodniczący
Komitetu Organizacyjnego Konferencji

Miejsce obrad: Hotel Hilton,
ul. Grzybowska 63, 00-844 Warszawa

Adres do korespondencji:

Medical Communications Sp. z o.o.

ul. Powsińska 34, 02-903 Warszawa, faks: 22 842 53 63

e-mail: konferencjaMiD@medical.pl

z dopiskiem: „Konferencja Dlaczego kobiety ...”