

PRACE ORYGINALNE

położnictwo

Wpływ polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) śródbłonkowej syntazy tlenku azotu (eNOS) oraz konwertazy angiotensyny (ACE) na przebieg ciąży powikłanej cukrzycą typu 1

The influence of single nucleotide polymorphisms of Endothelial Nitric Oxide Synthase and Angiotensin-Converting Enzyme on the course of pregnancy complicated by type 1 diabetes

Ewa Wender-Ożegowska¹, Rafał Iciek¹, Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz², Agnieszka Zawiejska¹, Maciej Brązert³, Krzysztof Drews², Jacek Brązert¹

¹ Klinika Położnictwa i Chorób Kobiectych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Polska

² Klinika Perinatologii i Chorób Kobiectych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Polska

³ Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodu, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Polska

Streszczenie

Cel pracy: Zbadanie częstości występowania polimorfizmów genu ACE oraz eNOS u ciężarnych z cukrzycą typu 1 oraz zbadanie zależności pomiędzy występowaniem wymienionych polimorfizmów/genotypów a zaburzeniami we wzrastaniu płodu.

Materiał i metody: Do badania włączono 107 ciężarnych z cukrzycą typu 1 objętych opieką Kliniki Położnictwa i Chorób Kobiectych w latach 2008-2011. U 96 ciężarnych (90%) ciąża zakończyła się pomyślnym rozwiązaniem, czyli urodzeniem zdrowego dziecka. Ciężarne leczono za pomocą intensywnej insulinoterapii, a glikemię kontrolowano za pomocą osobistych glukometrów. Jako docelowe wartości glikemii przyjęto poziom glikemii na czczo poniżej 90 mg/dl (5,0 mmol/l), a po posiłkach poniżej 120 mg/dL (6,7 mmol/l).

DNA do badania polimorfizmów eNOS i ACE otrzymywano z leukocytów krwi. Następnie określono liczbę i odsetek poszczególnych połączonych genotypów eNOS i ACE w grupie badanej ciężarnych z cukrzycą.

Największą reprezentację stanowiły pacjentki z genotypem heterozygotycznym eNOS GT, ACE ID – 24 (22%), najmniej liczne były pacjentki z genotypami homozygotycznymi eNOS TT (ACE II, ID, DD) – łącznie 8 pacjentek, co stanowiło około 8% całej grupy badanej. W dalszych etapach pracy, połączono ciężarne w podgrupy w zależności od genotypów i przeanalizowano wyrównanie metaboliczne i wynik położniczy dla całej grupy badanej z uwzględnieniem występującego genotypu eNOS i ACE.

Adres do korespondencji:

Ewa Wender-Ożegowska
Klinika Położnictwa i Chorób Kobiectych,
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.
Polna 33, Poznań, Polska
e-mail: ewaoz@post.pl
tel.: +48 61 8419 334, fax: +48 61 84 19 399

Otrzymano: 20.08.2013
Zaakceptowano do druku: 30.10.2013

Wender-Ożegowska E, et al. Wpływ polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) oraz konwertazy angiotensyny (ACE).

Wyniki: Na podstawie przeprowadzonych powyżej analiz stwierdzono, iż pacjentki z homozygotycznym genotypem eNOS TT, mimo takiego samego, jak w innych grupach ciężarnych modelu leczenia, prezentowały najwyższą masę ciała, cechowały je zaburzenia lipidowe i nieprawidłowe wyrównanie metaboliczne, co prawdopodobnie doprowadziło w konsekwencji do nieprawidłowej (podwyższonej) masy urodzeniowej noworodków.

Wnioski: Polimorfizm genetyczny eNOS i ACE może mieć wpływ na przebieg ciąży i wynik położniczy u ciężarnych z cukrzycą typu 1.

Słowa kluczowe: **cukrzyca / ciąża / polimorfizm / homozygota / heterozygota /**

Abstract

Aim: to study the frequency of genetic variants of eNOS and ACE polymorphism and their possible influence on the course of diabetic pregnancy and perinatal outcome.

Material and methods: 107 pregnant women with type 1 diabetes, treated at the Department of Obstetrics and Women's Diseases between 2008-2011, were enrolled into the study. Ninety six (90%) of the patients delivered at term. All women were treated with intensive insulin therapy. Glucose control was performed by means of self-monitoring with glucometers. The target fasting glucose levels were below 90 mg/dl (5.0 mmol/l) and postprandial below 120 mg/dl (6.7 mmol/l). DNA for the analysis of polymorphisms was extracted from the leukocytes. Afterwards, the number of specific eNOS and ACE genotypes was calculated and the subgroups of alleles of these two genes were created.

Results: Subjects with heterozygote genotype eNOS GT and ACE ID constituted the largest group of patients (24/22%); the smallest group presented eNOS TT (ACE II, ID, DD) genotype (8/8% of the whole studied group). Next, selected genotypes were analyzed in relation to the metabolic status, duration of diabetes and perinatal outcome.

Results: Our results enabled us to conclude that, despite identical treatment of all gravidas, diabetic patients with eNOS TT polymorphism presented with the highest body weight, and the strongest lipid and glucose disturbances, what probably resulted in marosomic neonatal weight.

Conclusions: The eNOS and ACE genetic variants may affect the course of a diabetic pregnancy in terms of metabolic control and perinatal outcome.

Key words: **diabetes / pregnancy / polymorphism / homozygote / heterozygote /**

Wstęp

Mimo znacznego postępu w leczeniu cukrzycy typu 1 (T1DM), coraz bardziej precyzyjnych metod kontroli wyrównania metabolicznego oraz intensyfikacji insulinoterapii, ciężarne te stanowią nadal grupę wysokiego ryzyka wystąpienia szeregu powikłań położniczych, a szczególnie zaburzeń wzrastania płodów. Obserwujemy wielokrotnie, iż uzyskanie prawidłowych wskaźników optymalnej kontroli glikemii, mierzonej czy to odsetkiem glikowanej hemoglobiny, czy dobowych profili glikemii, nie daje gwarancji prawidłowego wzrastania płodu [1].

Polimorfizm genetyczny związków aktywnych biologicznie u ciężarnych chorujących na cukrzycę może wiązać się ze zróżnicowanym stopniem wyrównania metabolicznego, a niektóre kombinacje genotypowe mogą mieć wpływ na gorsze wyrównanie metaboliczne i co za tym idzie, gorszy wynik położniczy.

Coraz większą uwagę zwraca się obecnie na możliwość wpływu śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) oraz enzymu konwertującego angiotensynę (ACE) oraz występujących polimorfizmów ich genów w indukowaniu u cukrzycy takich powikłań, jak nadciśnienie tętnicze, stan przedrzucawkowy, progresja zmian naczyniowych, stopień wyrównania metabolicznego oraz w konsekwencji zaburzeń wzrastania płodu [2].

U ludzi polimorfizm tymidyna-cytosyna (T-786→C) w regionie promotorowym jest związany ze zredukowaną aktywnością eNOS, co wiązało się z nasileniem insulinooporności zarówno u chorych bez- oraz z cukrzycą typu 2 [8, 11]. Sugeruje się tutaj także rolę polimorfizmu funkcjonalnego powodującego zamianę aminokwasu w pozycji 298 łańcucha białkowego enzymu kwasu glutaminowego na kwas asparaginowy (Glu298Asp).

Rolę polimorfizmów funkcjonalnych w ciąży, zarówno w obrębie śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) oraz konwertazy angiotensyny (ACE), badano głównie w aspekcie powikłań, takich jak nadciśnienie tętnicze i stan przedrzucawkowy [3, 4]. W dostępnych dwóch publikacjach wykazano wpływ ww. polimorfizmów na wyrównanie metaboliczne u ciężarnych z cukrzycą ciążową [5, 6]. Wpływ polimorfizmów eNOS badano w zakresie indukowania insulinooporności u chorych z kardiomiopatią, zespołem metabolicznym, nefropatią cukrzycową [7, 8, 9, 10]. Natomiast brak jest jak dotąd prac w których badano, czy u ciężarnych z typem 1 cukrzycy, istniejący genotyp w zakresie eNOS i ACE ma jakikolwiek wpływ na wyrównanie metaboliczne i wynik położniczy.

W rozwoju powikłań cukrzycowych bierze prawdopodobnie również udział enzym konwertujący angiotensynę (ACE). Opisano szereg polimorfizmów tego enzymu. Najczęściej badanym jest polimorfizm insercyjno-delecyjny genu ACE, polegają-

Wender-Ożegowska E, et al. Wpływ polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) oraz konwertazy angiotensyny (ACE).

cy na obecności lub braku odcinka 287 par zasad w intronie 16 tego genu, co związane jest ze zmianami w aktywności enzymu. Wykazano, że polimorfizmy genu tego enzymu stanowią również czynniki ryzyka rozwoju nadciśnienia, powikłań sercowych, jak również progresji cukrzycowej nefropatii [12, 13, 14].

Wydaje się więc, że polimorfizm tych niektórych genów, szczególnie występujący w regionach promotorowych, może wpływać na różnice w ekspresji związków, których translacje kodują i w konsekwencji mogą wpływać na poziomy hormonów związanych z metabolizmem ciężarnej i w istotny sposób wpływać na przebieg ciąży i rozwój płodu.

Cel pracy

W związku z postulowanym wpływem polimorfizmów wymienionych genów na przebieg ciąży, wyrównanie metaboliczne oraz wynik położniczy, postawiono sobie za cel zbadanie częstości występowania polimorfizmów genu ACE oraz eNOS u ciężarnych z cukrzycą typu 1 oraz zbadanie zależności pomiędzy występowaniem wymienionych polimorfizmów/genotypów a zaburzeniami we wzrastaniu płodu.

Materiał i metodyka

Do badania włączono łącznie 107 ciężarnych z cukrzycą typu 1 objętych opieką Kliniki Położnictwa i Chorób Kobiety w latach 2008-2011. U 96 ciężarnych (90%) ciąża zakończyła się pomyślnym rozwiązaniem, czyli urodzeniem zdrowego dziecka. W 11 przypadkach (10%) doszło do niepomyślnego zakończenia ciąży (poronienia lub obumarcia wewnątrzmacicznego). Ciężarne objęte były opieką przynajmniej jeden raz w każdym z trymestrów ciąży, zgodnie z Rekomendacjami Sekcji Cukrzycy, Otyłości i innych zaburzeń metabolicznych w ciąży PTG [15]. Badania ultrasonograficzne przeprowadzone były zgodnie z Rekomendacjami Sekcji Ultrasonografii PTG [16].

Badania w surowicy krwi zostały wykonane w Centralnym Laboratorium Ginekologiczno-Położniczym Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, ul. Polna 33. Glikemię ciężarnych badano za pomocą osobistych glukometrów.

Jako docelowe wartości glikemii przyjęto poziom glikemii na czczo poniżej 90 mg/dl, a po posiłkach poniżej 120 mg/dl. Oznaczenie odsetka HbA_{1c} wykonano w hemolizacie krwi pełnej za pomocą turbidymetrycznej metody immunoinhibicyjnej (norma 3,8 – 6,3%). Materiałem do badań stężenia frakcji lipidowych była surowica krwi obwodowej, pobierana na czczo. Badanie stężenia cholesterolu całkowitego w surowicy krwi wykonano za pomocą ilościowego enzymatycznego testu kolorymetrycznego z wykorzystaniem esterazy cholesterolowej i oksydazy cholesterolowej [Boehringer Mannheim]. W metodzie tej natężenie barwy produktu końcowego jest proporcjonalne do stężenia substratu początkowego (cholesterolu) dla reakcji utleniania tego związku pod wpływem peroksydazy (normy 1,3 – 6,2mmol/l). Stężenie frakcji HDL cholesterolu oznaczane było w ilościowym enzymatycznym teście kolorymetrycznym z zastosowaniem modyfikowanej glikolem polietylenowym esterazy cholesterolowej i oksydazy cholesterolowej oraz siarczanu dekstranu. Natężenie barwy produktu końcowego jest proporcjonalne do stężenia substratu początkowego, czyli HDL, analogicznie jak w metodzie oznaczania cholesterolu całkowitego (norma 1,2 – 1,7mmol/l) [Boehringer Mannheim]. Badanie stężenia cholesterolu zawartego w lipoproteinach o niskiej gęstości zostało obliczone ze wzoru:

LDL = Cholesterol całkowity [mmol/l] – Cholesterol HDL [mmol/l] – Triglicerydy/5 [mmol/l] (norma 0,9 – 4,0mmol/l), natomiast badanie stężenia triglicerydów zostało wykonane w ilościowym enzymatycznym teście kolorymetrycznym wg Wahlefelda (norma 0,6 – 2,3mmol/l) – spektrofotometr Hitachi 912.

DNA do badania polimorfizmów eNOS i ACE otrzymywano z leukocytów krwi za pomocą zestawu do izolacji QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN Inc., Niemcy). Polimorfizm 894 G>T (Glu298Asp) genu eNOS badano metodą PCR/RFLP. Do reakcji PCR używano startery o sekwencji (F5' - AAg gCA ggA gAC AgT ggA Tgg A -3' i R5' - CCC AgT CAA TCC CTT Tgg TgC TCA -3') [Yoshimura i wsp. 1998]. Uzyskany produkt wielkości 248 par zasad hydrolizowano enzymem restrykcyjnym MboI (Fermentas, Litwa) w cieplarni (Memmert, Niemcy) przez całą noc w temperaturze 37°C. Po inaktywacji enzymu w 65°C przez 20 minut dodawano bufor obciążający i nanoszono próbki na 2% żel agarozowy (TiBMolBiol Universal Agarose, Polska). Po wybarwieniu żelu w bromku etydyny odczytywano genotypy: GG 248 pz, GT 248, 158, 90 pz oraz TT 158, 90 pz. Polimorfizm ACE badano za pomocą reakcji PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Do reakcji użyto starterów o następujących sekwencjach: F5' - CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT - 3', R5' - GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T - 3' [Rigat i wsp. 1992] oraz dodatkowy starter specyficzny dla insercji [Ueda i wsp., 1996] 5' - Tgg gAT TAC Agg CgT gAT ACA g-3'. W przypadku obecności delekcji otrzymywano fragment o długości 190 par zasad (pz), przy obecności insercji 480 i 160 pz. Uzyskane produkty reakcji PCR rozdzielano elektroforetycznie na 2% żelu agarozowym (TiBMolBiol Universal Agarose, Polska).

Po zastosowaniu metody polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) wytypowano genotypy w zakresie polimorfizmu eNOS oraz ACE-I. Wyznaczono 9 możliwych grup ciężarnych, ze względu na występujący genotyp eNOS i ACE oraz na podstawie tego podziału przeanalizowano przebieg ciąży i wynik położniczy.

Do analizy danych zastosowano testy odpowiednie dla rozkładu badanych zmiennych. Badanie normalności rozkładu badano testem Kołmogorowa-Smirnowa. W przypadku analizy danych, których rozkład był zgodny z rozkładem normalnym stosowano testy parametryczne: analiza ANOVA oraz test *post-hoc* LSD dla więcej niż dwóch prób. Współczynnik istotności statystycznej ustalono na poziomie $p < 0,05$. Do obliczeń statystycznych używano programów Statistica 8.0, MS Excel 2003.

Do wykonania ww. badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu.

Wyniki

W tabeli I przedstawiono ogólną charakterystykę grupy badanej.

W tabeli II przedstawiono rozkład genotypów i alleli polimorfizmów Glu298Asp (894G>T) eNOS oraz ACE I/D w grupie badanej pacjentek z cukrzycą. Zbadano zgodność rozkładu z prawem Hardy-Weinberga poprzez ocenę różnicy pomiędzy wartościami obserwowanymi a oczekiwanymi.

W kolejnym etapie pracy określono liczbę i odsetek poszczególnych połączonych genotypów eNOS i ACE w grupie badanej ciężarnych z cukrzycą. Wyniki przedstawia tabela III.

Wender-Ożegowska E, et al. Wpływ polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) śródplonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) oraz konwertazy angiotensyny (ACE).

Największą reprezentację stanowiły pacjentki z genotypem heterozygotycznym eNOS GT, ACE ID – 24 (22%), najmniej liczne były pacjentki z genotypami homozygotycznymi eNOS TT (ACE II, ID, DD) – łącznie 8 pacjentek, co stanowiło około 8% całej grupy badanej. W dalszych etapach pracy, połączono ciężarne w podgrupy w zależności od genotypów i przeanalizowano wyrównanie metaboliczne i wynik położniczy dla całej grupy badanej z uwzględnieniem występującego genotypu eNOS i ACE. Wyniki dla istotnych statystycznie parametrów opisujących wyrównanie metaboliczne pomiędzy poszczególnymi genotypami, przedstawiono w tabelach IV-X (test ANOVA i post-hoc LSD).

Ciężarne z genotypem eNOS TT i ACE II najpóźniej zachorowały na cukrzycę (20,5 lat), ale różnica ta w stosunku do ciężarnych z pozostałymi genotypami nie osiągnęła istotności statystycznej, wobec czego odstąpiono od prezentacji tabelarycznej.

Jak wynika z powyższych analiz, ciężarne u których stwierdzono występowanie homozygotycznego genotypu eNOS TT, charakteryzowały się otyłością w I trymestrze ciąży (najwyższa masa ciała i współczynnik BMI), nieprawidłowym profilem lipidowym (najwyższe stężenie triglicerydów i najniższe cholesterolu HDL), ponadto ich wyrównanie metaboliczne w III trymestrze ciąży i okołoporodowo było także nieprawidłowe (najwyższa średnia glikemia i odsetek HbA_{1c}). Konsekwencją powyższych nieprawidłowości była prawdopodobnie najwyższa masa urodzeniowa noworodka w tych podgrupach. Ciężarne te także najkrócej chorowały na cukrzycę. W kolejnych etapach pracy, połączono te podgrupy ciężarnych i przeanalizowano łącznie.

Następnie zbadano, czy ww. parametry metaboliczne w opisywanej podgrupie ciężarnych z homozygotycznym genotypem eNOS TT mają wpływ na masę urodzeniową noworodka. Zbudowano model regresji wielorakiej, w którym zmienną objaśnianą była masa urodzeniowa noworodka, a zmiennymi objaśniającymi korygowalne zmienne metaboliczne, w zakresie których wykazano istotne statystycznie różnice. W tabeli XI przedstawiono wyniki ww. modelu regresji.

Jak wynika z tabeli XII, w badanej grupie ciężarnych z genotypem eNOS TT, wykazano dodatnią korelację wszystkich badanych parametrów (dodatnia wartość B) z masą urodzeniową noworodka, z czego najsłabszy wpływ wykazywało stężenie cholesterolu w I trymestrze ciąży. Istotność statystyczną wykazano dla BMI w I trymestrze ciąży oraz średniej glikemii i HbA_{1c} w III trymestrze ciąży.

Dyskusja

Jednym z istotnych celów opieki położniczej nad kobietą ciężarną jest monitorowanie wzrastania płodu. Powszechnie znanym jest fakt niezwykle istotnego prawidłowego wyrównania metabolicznego w ciąży powikłanej cukrzycą w zapobieganiu nadmiernemu wzrastaniu płodu [15].

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny, czy fakt występowania któregośkolwiek z genotypów w zakresie polimorfizmów eNOS i ACE wiąże się z wyrównaniem metabolicznym w trakcie całej ciąży oraz z wynikiem położniczym. Polimorfizm genetyczny związków aktywnych biologicznie jest powszechnym zjawiskiem występującym w przyrodzie. Z definicji polimorfizmem nazywa się stosunkowo często występujące zmiany, których częstość określa się na min. 1%. W przeciwnym razie, gdy częstość ta jest mniejsza, zmiana taka nazywana jest mutacją [16].

Tabela I. Charakterystyka grupy badanej.

Badany parametr	Średnia	Odchylenie standardowe
Wiek (lata)	28,2	5,3
Masa ciała ciężarnej – I trymestr (kg)	66,8	13,2
BMI I trymestr (kg/m ²)	24,6	4,8
Średnia glikemia I trymestr (mmol/l)	6,0	1,6
Odsetek HbA _{1c} I trymestr (%)	7,8	1,9
Cholesterol LDL I trymestr (mmol/l)	2,2	0,7
Cholesterol HDL I trymestr (mmol/l)	0,8	0,2
Triglicerydy I trymestr (mmol/l)	1,0	0,7
Cholesterol całkowity I trymestr (mmol/l)	4,4	1,0
Czas trwania cukrzycy (lata)	12,8	7,0
Wiek wystąpienia cukrzycy (lata)	15,6	8,5
Masa ciała okołoporodowo (kg)	78,7	14,0
BMI okołoporodowo (kg/m ²)	29,3	8,8
Średnia glikemia okołoporodowo (mmol/l)	5,3	1,2
Odsetek HbA _{1c} okołoporodowo (%)	7,3	1,9
Cholesterol LDL okołoporodowo (mmol/l)	3,5	1,3
Cholesterol HDL okołoporodowo (mmol/l)	1,1	0,3
Triglicerydy okołoporodowo (mmol/l)	3,0	1,4
Cholesterol całkowity okołoporodowo (mmol/l)	6,8	1,7
Poród (tydzień ciąży)	35,1	7,4
Masa noworodka (g)	3334,0	91,6

Oceną przydatności wymienionych parametrów przeprowadzono trójetapowo. W etapie pierwszym wyselekcjonowano ciężarne, które donosiły ciążę do porodu, natomiast ciężarne u których doszło do przedwczesnego zakończenia ciąży (poronienie lub obumarcie wewnątrzmaciczne), zdyskwalifikowano z dalszych analiz. W drugim etapie wyznaczono podgrupy ciężarnych z możliwymi kombinacjami genotypów eNOS i ACE i sprawdzono, czy różnią się one między sobą wyrównaniem metabolicznym i wynikiem położniczym.

Wender-Ożegowska E, et al. Wpływ polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) śródblankowej syntazy tlenu azotu (eNOS) oraz konwertazy angiotensyny (ACE).

Tabela II. Analiza rozkładu genotypów Glu298Asp (894G>T) eNOS oraz ACE I/D w grupie pacjentek z cukrzycą typu 1. /N=107/

Polimorfizm	Genotyp	Wartość obserwowana N(%)		Wartość oczekiwana N(%)		Istotność*
eNOS 894 G>T	GG	48	44,86	50	47,18	$\chi^2=1,25$
	GT	51	47,66	46	43,01	
	TT	8	7,48	10	9,8	
Suma		107	100	-	-	
Allel G		147	69	-	-	
Allel T		67	31	-	-	
Suma		214	100	-	-	
ACE I/D	II	35	32,71	28	25,94	$\chi^2=7,85$
	ID	39	36,45	53	49,97	
	DD	33	30,84	25	24,07	
Suma		107	100	-	-	
Allel I		109	51	-	-	
Allel D		105	49	-	-	
Suma		214	100	-	-	

Tabela III. Rozkład genotypów eNOS i ACE w badanej grupie ciężarnych z cukrzycą.

Genotyp eNOS i ACE	N	%
eNOS GG i ACE II - {1}	20	18,7
eNOS GG i ACE ID - {2}	15	14,0
eNOS GG i ACE DD - {3}	12	11,2
eNOS GT i ACE II - {4}	17	15,9
eNOS GT i ACE ID - {5}	24	22,4
eNOS GT i ACE DD - {6}	16	14,9
eNOS TT i ACE II - {7}	4	4
eNOS TT i ACE ID - {8}	2	2
eNOS TT i ACE DD - {9}	2	2
Razem	107	100

Zidentyfikowano ciężarne z genotypem o nieprawidłowym wyrównaniu, które urodziły dzieci z makrosomią oraz wskazano parametry, w zakresie których występuje pomiędzy nimi różnica istotna statystycznie. W trzecim etapie zbadano wpływ tych parametrów na nieprawidłową masę ciała noworodka, konstruując model regresji z tymi parametrami jako zmiennymi objaśniającymi. Warto podkreślić ograniczoną wartość modelu regresji w grupach o niewielkiej liczebności, co wiąże się z koniecznością jej zwiększania, celem potwierdzenia otrzymanych w niniejszej pracy, wyników.

W niniejszej pracy wykazano, iż otyłe ciężarne, u których występuje homozygotyczny genotyp eNOS TT były gorzej wyrównane pod względem glikemii i urodziły noworodki z nadmierną masą ciała. Pacjentki z genotypem eNOS TT cechował najwyższy wskaźnik masy ciała oraz również największe zaburzenia

metaboliczne, czyli najwyższe stężenie triglicerydów, a najniższe stężenie frakcji HDL cholesterolu. Co ciekawe, ciężarne te chorowały najkrócej na cukrzycę, co wiązało się prawdopodobnie mimo złego wyrównania metabolicznego z brakiem występowania u nich powikłań naczyniowych typowych dla cukrzycy. Jak obecnie wiadomo, obecność tych powikłań w zaawansowanej, wieloletniej cukrzycy, może wiązać się niższą masą urodzeniową noworodków [17].

W dostępnym piśmiennictwie jest jedna praca podejmująca próbę oceny wpływu SNP ACE I/D na kontrolę glikemii u ciężarnych bez współistniejącej cukrzycy. W pracy tej Hoher i wsp. wykazali, że na gorsze wyrównanie metaboliczne miały wpływ homozygotyczne genotypy ACE DD oraz II a wpływ ten może być modulowany przez płęć płodu [6]. Natomiast w pracy Dostalovej i wsp. określono odsetek występowania genotypów

Wender-Ożegowska E, et al. Wpływ polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) oraz konwertazy angiotensyny (ACE).

Tabela IV. Masa ciężarnej w I trymestrze ciąży w zależności od genotypu eNOS i ACE.

eNOS i ACE/ Masa ciała (kg)	{1} - 66,96	{2} - 67,92	{3} - 60,82	{4} - 67,10	{5} - 65,84	{6} - 70,27	{7} - 85,66	{8} - 56,250	{9} - 68,00
eNOS GG i ACE II-{1}		0,852	0,218	0,976	0,790	0,484	0,022	0,269	0,914
eNOS GG i ACE ID-{2}	0,852		0,213	0,877	0,680	0,666	0,045	0,241	0,993
eNOS GG i ACE DD-{3}	0,218	0,213		0,225	0,304	0,078	0,004	0,646	0,473
eNOS GT i ACE II-{4}	0,976	0,877	0,225		0,777	0,519	0,025	0,268	0,926
eNOS GT i ACE ID-{5}	0,790	0,680	0,304	0,777		0,339	0,015	0,320	0,822
eNOS GT i ACE DD-{6}	0,484	0,666	0,078	0,519	0,339		0,066	0,157	0,817
eNOS TT i ACE II-{7}	0,028	0,040	0,004	0,025	0,015	0,066		0,014	0,138
eNOS TT i ACE ID-{8}	0,269	0,241	0,646	0,268	0,320	0,157	0,014		0,366
eNOS TT i ACE DD-{9}	0,919	0,993	0,473	0,926	0,822	0,817	0,138	0,366	

Tabela V. BMI ciężarnej w I trymestrze ciąży w zależności od genotypu eNOS i ACE.

eNOS i ACE/ BMI (kg/m ²)	{1} - 24,34	{2} - 24,91	{3} - 23,30	{4} - 24,58	{5} - 24,26	{6} - 25,16	{7} - 33,53	{8} - 19,93	{9} - 26,07
eNOS GG i ACE II-{1}		0,756	0,555	0,881	0,956	0,627	0,002	0,203	0,617
eNOS GG i ACE ID-{2}	0,756		0,426	0,863	0,717	0,897	0,005	0,167	0,746
eNOS GG i ACE DD-{3}	0,555	0,426		0,484	0,580	0,327	0,001	0,345	0,437
eNOS GT i ACE II-{4}	0,881	0,863	0,484		0,837	0,743	0,002	0,184	0,670
eNOS GT i ACE ID-{5}	0,956	0,717	0,580	0,837		0,585	0,001	0,209	0,59
eNOS GT i ACE DD-{6}	0,627	0,897	0,327	0,743	0,585		0,005	0,139	0,795
eNOS TT i ACE II-{7}	0,002	0,005	0,001	0,002	0,001	0,005		0,001	0,080
eNOS TT i ACE ID-{8}	0,203	0,167	0,345	0,184	0,257	0,139	0,001		0,187
eNOS TT i ACE DD-{9}	0,617	0,746	0,437	0,670	0,598	0,796	0,080	0,187	

Tabela VI. Stężenie cholesterolu HDL u ciężarnej w I trymestrze ciąży w zależności od genotypu eNOS i ACE.

eNOS i ACE/ HDL (mmol/l)	{1} - 1,95	{2} - 1,61	{3} - 1,82	{4} - 1,83	{5} - 1,82	{6} - 2,00	{7} - 1,14	{8} - 2,23	{9} - 1,74
eNOS GG i ACE II-{1}		0,075	0,474	0,443	0,395	0,870	0,011	0,421	0,568
eNOS GG i ACE ID-{2}	0,075		0,322	0,282	0,266	0,070	0,171	0,152	0,715
eNOS GG i ACE DD-{3}	0,474	0,322		0,987	0,995	0,416	0,048	0,296	0,845
eNOS GT i ACE II-{4}	0,44	0,282	0,987		0,980	0,388	0,035	0,238	0,834
eNOS GT i ACE ID-{5}	0,395	0,266	0,995	0,980		0,347	0,033	0,915	0,840
eNOS GT i ACE DD-{6}	0,870	0,070	0,416	0,388	0,347		0,010	0,523	0,523
eNOS TT i ACE II-{7}	0,011	0,171	0,042	0,035	0,033	0,010		0,020	0,195
eNOS TT i ACE ID-{8}	0,468	0,109	0,290	0,283	0,271	0,526	0,020		0,313
eNOS TT i ACE DD-{9}	0,568	0,71	0,844	0,834	0,840	0,523	0,195	0,333	

Tabela VII. Stężenie triglicerydów u ciężarnych w I trymestrze ciąży w zależności od genotypu eNOS i ACE.

eNOS i ACE/ TG (mmol/l)	{1} - 0,84	{2} - 0,77	{3} - 1,08	{4} - 0,97	{5} - 0,95	{6} - 0,99	{7} - 2,49	{8} - 0,96	{9} - 0,79
eNOS GG i ACE II-{1}		0,794	0,309	0,544	0,613	0,501	0,001	0,780	0,928
eNOS GG i ACE ID-{2}	0,794		0,260	0,441	0,491	0,409	0,001	0,688	0,962
eNOS GG i ACE DD-{3}	0,309	0,260		0,652	0,546	0,722	0,001	0,812	0,552
eNOS GT i ACE II-{4}	0,544	0,441	0,652		0,888	0,930	0,001	0,995	0,711
eNOS GT i ACE ID-{5}	0,613	0,491	0,546	0,888		0,820	0,001	0,953	0,755
eNOS GT i ACE DD-{6}	0,501	0,409	0,722	0,930	0,820		0,001	0,960	0,681
eNOS TT i ACE II-{7}	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001		0,009	0,004
eNOS TT i ACE ID-{8}	0,780	0,688	0,812	0,995	0,953	0,960	0,001		0,783
eNOS TT i ACE DD-{9}	0,928	0,962	0,552	0,711	0,755	0,681	0,001	0,783	

Wender-Ożegowska E, et al. Wpływ polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) śródblonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) oraz konwertazy angiotensyny (ACE).

Tabela VIII. Czas trwania cukrzycy u ciężarnej w zależności od genotypu eNOS i ACE.

eNOS i ACE/ Czas trwania DM (lata)	{1} - 13,70	{2} - 11,50	{3} - 11,72	{4} - 16,38	{5} - 12,50	{6} - 13,73	{7} - 6,25	{8} - 7,50	{9} - 8,50
eNOS GG i ACE II-{1}		0,41	0,454	0,284	0,610	0,985	0,055	0,235	0,319
eNOS GG i ACE ID-{2}	0,419		0,940	0,100	0,723	0,436	0,208	0,462	0,581
eNOS GG i ACE DD-{3}	0,454	0,940		0,107	0,778	0,472	0,180	0,434	0,550
eNOS GT i ACE II-{4}	0,284	0,100	0,107		0,140	0,320	0,013	0,098	0,141
eNOS GT i ACE ID-{5}	0,610	0,723	0,778	0,140		0,625	0,113	0,343	0,448
eNOS GT i ACE DD-{6}	0,988	0,436	0,472	0,320	0,625		0,060	0,239	0,323
eNOS TT i ACE II-{7}	0,055	0,208	0,183	0,013	0,113	0,065		0,837	0,711
eNOS TT i ACE ID-{8}	0,235	0,462	0,434	0,098	0,343	0,239	0,837		0,886
eNOS TT i ACE DD-{9}	0,319	0,581	0,550	0,141	0,448	0,323	0,711	0,886	

Tabela IX. Średnia glikemia u ciężarnych w III trymestrze ciąży w zależności od genotypu eNOS i ACE.

eNOS i ACE/ Średnia glikemia (mmol/l)	{1} - 5,27	{2} - 4,49	{3} - 5,28	{4} - 5,31	{5} - 5,49	{6} - 5,38	{7} - 4,27	{8} - 9,76	{9} - 5,77
eNOS GG i ACE II-{1}		0,111	0,982	0,616	0,653	0,827	0,390	0,005	0,714
eNOS GG i ACE ID-{2}	0,116		0,146	0,289	0,049	0,090	0,852	0,001	0,31
eNOS GG i ACE DD-{3}	0,985	0,146		0,664	0,675	0,828	0,402	0,005	0,712
eNOS GT i ACE II-{4}	0,616	0,289	0,664		0,365	0,504	0,508	0,003	0,585
eNOS GT i ACE ID-{5}	0,657	0,049	0,675	0,365		0,846	0,314	0,005	0,824
eNOS GT i ACE DD-{6}	0,828	0,090	0,823	0,504	0,846		0,353	0,000	0,774
eNOS TT i ACE II-{7}	0,397	0,852	0,402	0,508	0,314	0,353		0,001	0,373
eNOS TT i ACE ID-{8}	0,002	0,003	0,005	0,003	0,005	0,005	0,001		0,019
eNOS TT i ACE DD-{9}	0,716	0,317	0,712	0,585	0,824	0,774	0,373	0,019	

Tabela X. Średni odsetek HbA_{1c} u ciężarnych w III trymestrze ciąży w zależności od genotypu eNOS i ACE.

eNOS i ACE/ HbA _{1c} (%)	{1} - 6,48	{2} - 6,88	{3} - 6,46	{4} - 6,75	{5} - 6,64	{6} - 6,96	{7} - 9,40	{8} - 8,50	{9} - 8,40
eNOS GG i ACE II-{1}		0,053	0,997	0,967	0,977	0,182	0,008	0,001	0,047
eNOS GG i ACE ID-{2}	0,053		0,073	0,079	0,051	0,443	0,005	0,043	0,048
eNOS GG i ACE DD-{3}	0,997	0,073		0,968	0,978	0,228	0,009	0,009	0,004
eNOS GT i ACE II-{4}	0,967	0,079	0,968		0,986	0,244	0,008	0,009	0,057
eNOS GT i ACE ID-{5}	0,977	0,051	0,978	0,986		0,180	0,007	0,009	0,008
eNOS GT i ACE DD-{6}	0,182	0,444	0,228	0,244	0,180		0,754	0,634	0,096
eNOS TT i ACE II-{7}	0,868	0,528	0,869	0,882	0,875	0,754		0,904	0,901
eNOS TT i ACE ID-{8}	0,999	0,430	0,998	0,988	0,993	0,634	0,904		0,996
eNOS TT i ACE DD-{9}	0,996	0,426	0,997	0,984	0,989	0,630	0,901	0,996	

Tabela XI. Średnia masa noworodka w zależności od genotypu eNOS i ACE.

eNOS i ACE/ Masa noworodka (g)	{1} - 3144,7	{2} - 3552,7	{3} - 3184,2	{4} - 3349,3	{5} - 3363,5	{6} - 3368,0	{7} - 4616,7	{8} - 3625,0	{9} - 3765,0
eNOS GG i ACE II-{1}		0,227	0,904	0,507	0,432	0,469	0,008	0,460	0,341
eNOS GG i ACE ID-{2}	0,226		0,311	0,556	0,553	0,592	0,062	0,913	0,750
eNOS GG i ACE DD-{3}	0,904	0,311		0,624	0,563	0,585	0,012	0,507	0,383
eNOS GT i ACE II-{4}	0,501	0,556	0,624		0,960	0,953	0,023	0,673	0,526
eNOS GT i ACE ID-{5}	0,432	0,553	0,563	0,960		0,987	0,020	0,683	0,531
eNOS GT i ACE DD-{6}	0,469	0,592	0,585	0,953	0,987		0,025	0,694	0,544
eNOS TT i ACE II-{7}	0,001	0,062	0,012	0,023	0,020	0,025		0,213	0,285
eNOS TT i ACE ID-{8}	0,460	0,913	0,507	0,673	0,683	0,694	0,213		0,872
eNOS TT i ACE DD-{9}	0,341	0,750	0,383	0,526	0,531	0,544	0,285	0,872	

Wender-Ożegowska E, et al. Wpływ polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) śródłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) oraz konwertazy angiotensyny (ACE).

Tabela XII. Wpływ czynników metabolicznych na masę noworodka w grupie z genotypem eNOS TT.

Zmienna/ Parametr	B	Skorygowany R	istotność
Masa ciała ciężarnej I trymestr	90,02	R – 0,8976352821	0,622
BMI ciężarnej I trymestr	123,03		0,0402
Cholesterol HDL I trymestr	23,36		0,541
Triglicerydy I trymestr	920,32		0,577
Średnia glikemia III trymestr	37,62		0,007
HbA _{1c} III trymestr	12,44		0,009

i alleli ACE I/D u ciężarnych z cukrzycą ciążową i nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy genotypami [7]. Ciekawą obserwacją, dotyczącą wpływu polimorfizmów eNOS3 i ACE I/D na podatność śródbłonna na hiperglikemię badali Joshi i wsp. [13]. Wykazano, iż komórki śródbłonna z homozygotycznym genotypem eNOS są mniej podatne na toksyczne działanie hiperglikemii niż komórki z genotypem heterozygotycznym – destrukcja komórek śródbłonna była mniejsza u tych pacjentek. Ww. efektów nie zaobserwowano w przypadku genotypów ACE [13]. Przekładając to na wyniki niniejszej pracy, można spekulować o ochronnym działaniu homozygotycznych genotypów eNOS na niszczenie śródbłonna w ciąży, co może być związane z upośledzonym przepływem maciczo-łożyskowym i ew. mniejszą masą noworodka w przypadku genotypów heterozygotycznych. W naszej pracy ciężarne z homozygotycznym genotypem TT eNOS mimo, że najkrócej chorowały na cukrzycę, były najgorzej wyrównane metabolicznie, nie miały powikłań naczyniowych i urodziły największe dzieci. Z powodu niewielkiej liczebności tej podgrupy, nasze wyniki wymagają potwierdzenia na większej grupie ciężarnych.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych powyżej analiz stwierdzono, iż pacjentki z homozygotycznym genotypem eNOS TT, mimo takiego samego, jak w innych grupach ciężarnych modelu leczenia, cechowało nieprawidłowe wyrównanie metaboliczne a w konsekwencji prawdopodobnie nieprawidłowa (podwyższona) masa urodzeniowa noworodków.

Pracę sfinansowano z grantu nr N N407 2783 33 – kierownik grantu prof. Ewa Wender-Ożegowska.

Oświadczenie autorów

1. Ewa Wender-Ożegowska – autor koncepcji i założeń pracy, zebranie materiału, przygotowanie manuskryptu – autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Rafał Iciek – zebranie materiału, analiza statystyczna wyników, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa.
3. Agnieszka Seremak-Mrozikiewicz – opracowanie metody badań genetycznych, interpretacja wyników.
4. Agnieszka Zawiejska – analiza i interpretacja wyników, korekta ostatecznego kształtu manuskryptu.
5. Krzysztof Drews – weryfikacja i wyników, akceptacja manuskryptu.
6. Jacek Brząrt – weryfikacja projektu, manuskryptu i akceptacja pracy.

Źródło finansowania:

Część projektu finansowanego z grantu KBN nr N N407 187936.

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Stenninger E, Schollin J, Aman J, [et al.]. Early postnatal hypoglycaemia in newborn infants of diabetic mothers. *Acta Paediatr.* 1997, 86, 1374-1376.
2. Muniz L, Luizon MR, Palei AC, [et al.]. eNOS tag SNP haplotypes in hypertensive disorders of pregnancy. *DNA Cell Biol.* 2012, 31, 1665-1670.
3. Perlik M, Seremak-Mrozikiewicz A, Barlik M, [et al.]. Genetic variants of endothelial nitric synthase in gestational hypertension and preeclampsia. *Ginekol Pol.* 2012, 83, 652-659.
4. Shaik AP, Sultana A, Bammidi VK, [et al.]. A meta-analysis of eNOS and ACE gene polymorphisms and risk of pre-eclampsia in women. *Obstet Gynaecol.* 2011, 31, 603-607.
5. Dostálová Z, Bienertová-Vaskú AJ, Vaskú A, [et al.]. Insertion-deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme (I/D ACE) in pregnant women with gestational diabetes. *Ceska Gynkol.* 2006, 71, 369-373.
6. Hoche B, Schlemm L, Haumann H, [et al.]. Offspring sex determines the impact of the maternal ACE I/D polymorphism on maternal glycaemic control during the last weeks of pregnancy. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2011, 12, 254-261.
7. Vecoli C, Andreassi MG, Liga R, [et al.]. T(-786)→C polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with insulin resistance in patients with ischemic or non ischemic cardiomyopathy. *BMC Med Genet.* 2012, 13, 2, 92-99.
8. Ohtoshi K, Yamasaki Y, Gorogawa S, [et al.]. Association of (-)786T-C mutation of endothelial nitric oxide synthase gene with insulin resistance. *Diabetologia.* 2002, 45, 1594-1601.
9. Alkharfy KM, Al-Daghri NM, Al-Attas OS, [et al.]. Variants of endothelial nitric oxide synthase gene are associated with components of metabolic syndrome in an Arab population. *Endocr J.* 2012, 59, 253-263.
10. Li C, Dong Y, Lü W. The association between polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene and diabetic nephropathy. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2001, 40, 729-732.
11. Monti LD, Barlassina C, Citterio L, [et al.]. Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes.* 2003, 52, 1270-1275.
12. Faerch LH, Sejlberg AS, Lajer M, [et al.]. ACE genotype, phenotype and all-cause mortality in different cohorts of patients with type 1 diabetes. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2013, Jul 5. [Epub ahead of print].
13. Joshi MS, Wattanapitayakul S, Scharnacher BL, Bauec JA. Effects of human endothelial gene polymorphisms on cellular responses to hyperglycaemia: role of NOS3 (Glu298Asp) and ACE (I/D) polymorphisms. *Diab Vasc Dis Res.* 2011, 8, 276-283.
14. Chawla T, Sharma D, Singh A. Role of the renin angiotensin system in diabetic nephropathy. *World J Diabetes.* 2010, 15, 141-145.
15. Hillemaas V, Suhonen L, Teramo K. Glycaemic control is associated with pre-eclampsia but not with pregnancy-induced hypertension in women with type I diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2000, 43, 1534-1539.
16. Iciek R, Wender-Ożegowska E, Seremak-Mrozikiewicz A, [et al.]. Wpływ czynników metabolicznych na wzrastanie płodu u ciężarnych z cukrzycą typu 1 oraz wariantem homozygotycznym polimorfizmu -2548 G/A genu leptyny i 668 A/G receptora leptyny. *Ginekol Pol.* 2010, 81, 571-577.
17. Negrato CA, Mattar R, Gomes MB. Adverse pregnancy outcomes in women with diabetes. *Diabetol Metab Syndr.* 2012, 11, 41-45.