

**POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W SZCZECINIE**



**mgr Konrad Grzeszczak**

**Ocena stężenia wybranych pierwiastków  
i parametrów stresu oksydacyjnego  
w popłodach pochodzących z ciąży mnogich**

Determination of selected trace elements  
and oxidative stress parameters  
in afterbirths from multiple pregnancies

*Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych  
i nauk o zdrowiu*

*Dyscyplina nauki medyczne*

*Promotor: prof. dr hab. n. med. Danuta Kosik Bogacka*

*Promotor pomocniczy: dr n. med. Joanna Knul-Lebdowicz*

**Szczecin 2023 r.**

*Składam serdeczne podziękowania dla Promotora mojej pracy  
**Pani prof. dr hab. n. med. Danuty Kosik-Bogackiej,**  
za niespotykaną cierpliwość, empatię i wyrozumiałość,  
nieocenioną pomoc w osiąganiu celów,  
okazane wskazówki na każdym etapie  
powstawania niniejszej pracy i artykułów  
oraz za zaangażowanie w przekazywaniu swojej wiedzy  
i wybitnego doświadczenia*

*Serdecznie dziękuję również Promotorowi pomocniczemu  
**Pani dr n. med. Joannie Knul-Lebdowicz,**  
za wsparcie praktyczne i pomoc w skompletowaniu grupy badawczej*

***Pracownikom Katedry i Zakładowi Biologii i Parazytologii Medycznej PUM,**  
za okazaną pomoc i życzliwość.  
Szczególnie Pani mgr Joannie Kotuli  
za wsparcie emocjonalne oraz  
Pani dr hab. n. med. Natalii Łanocha-Arendarczyk  
za trafne wskazówki i wsparcie merytoryczne*

***Pracownikom Kliniki Położnictwa i Ginekologii PUM**  
za pomoc w zebraniu grupy badawczej,  
szczególnie Panu Prof. dr hab. n. med. Sebastianowi Kwiatkowskiemu*

*Pragnę podziękować również mojej **Rodzinie,**  
Za wsparcie, zrozumienie  
i motywację do osiągnięcia kolejnych sukcesów*

***Karolinie,**  
za cierpliwość, wyrozumiałość i wsparcie*

*oraz wszystkim, bez których pomocy nie udałooby się osiągnąć tego sukcesu.*

Podstawą rozprawy doktorskiej są dwie publikacje naukowe:

1. **Grzeszczak K**, Kwiatkowski S, Kosik-Bogacka D. The Role of Fe, Zn, and Cu in pregnancy. *Biomolecules*. 2020;10(8):1176.  
doi.org/10.3390/biom10081176 (IF=4.879; MEiN: 100.0)
2. **Grzeszczak K**, Kapczuk P, Kupnicka P, Cecerska-Heryć E, Kwiatkowski S, Chlubek D, Kosik-Bogacka D. Calcium, potassium, sodium, and magnesium concentrations in the placenta, umbilical cord, and fetal membrane from women with multiple pregnancies. *Life (Basel)*. 2023;13(1):153.  
doi: 10.3390/life13010153. (IF= 3.251; MEiN: 70.0)

**Sumaryczna punktacja MEiN cyklu: 170 pkt**

**Sumaryczna wartość wskaźnika Impact Factor cyklu: 8,130**

oraz opis niepublikowanych wyników badań dotyczących analizy stężenia pierwiastków śladowych (żelaza, miedzi i cynku) oraz parametrów stresu oksydacyjnego i ochrony antyoksydacyjnej w popłodach pobranych od kobiet w ciąży mnogiej.

## **Spis treści**

<b>Wykaz skrótów .....</b>	<b>5</b>
<b>Streszczenie .....</b>	<b>7</b>
<b>Summary.....</b>	<b>11</b>
<b>I. Wprowadzenie .....</b>	<b>15</b>
<b>II. Hipotezy, cele pracy i spodziewane korzyści pracy.....</b>	<b>17</b>
<b>III. Omówienie artykułu nr 1 .....</b>	<b>19</b>
<b>IV. Omówienie nieopublikowanych wyników badań.....</b>	<b>21</b>
<b>1. Wstęp.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1. Stres oksydacyjny (OS).....</b>	<b>24</b>
<b>1.2. System antyoksydacyjny .....</b>	<b>28</b>
<b>1.3. Pierwiastki śladowe, a stres oksydacyjny.....</b>	<b>30</b>
<b>1.3.1. Miedź.....</b>	<b>30</b>
<b>1.3.2. Żelazo .....</b>	<b>30</b>
<b>1.3.3. Cynk.....</b>	<b>31</b>
<b>1.4. Potencjalne biomarkery stresu oksydacyjnego.....</b>	<b>32</b>
<b>2. Cel badania .....</b>	<b>35</b>
<b>3. Materiał i metody .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Charakterystyka badanej grupy .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2. Oznaczanie stężenia pierwiastków w badanych próbkach .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.1. Przygotowanie próbek do analizy .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.2. Opis metody ICP-OES .....</b>	<b>42</b>
<b>3.2.3. Pomiar stężenia pierwiastków .....</b>	<b>43</b>
<b>3.3. Oznaczenie stresu oksydacyjnego.....</b>	<b>47</b>
<b>3.3.1. Przygotowanie próbek do badań.....</b>	<b>47</b>
<b>3.3.2. Oznaczanie zawartości białka w tkankach .....</b>	<b>48</b>
<b>3.3.3. Oznaczanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych i parametrów stresu oksydacyjnego.....</b>	<b>49</b>
<b>3.3.3.1. Oznaczenie aktywności reduktazy glutationowej .....</b>	<b>49</b>
<b>3.3.3.2. Oznaczenie aktywność peroksydazy glutationowej .....</b>	<b>50</b>
<b>3.3.3.3. Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej .....</b>	<b>51</b>
<b>3.3.3.4. Oznaczenie aktywności katalazy .....</b>	<b>52</b>

3.3.3.5. Oznaczenie ilości produktów peroksydacji lipidów .....	54
4. Opracowanie statystyczna .....	56
5. Wyniki.....	56
5.1. Stężenie pierwiastków w popłodach.....	56
5.2. Analiza parametrów stresu oksydacyjnego i aktywności enzymów antyoksydacyjnych.....	57
6. Dyskusja.....	69
6.1. Stężenia pierwiastków śladowych w popłodach .....	69
6.2. Stężenie żelaza w popłodach .....	69
6.2.1. Stężenie cynku w popłodach.....	70
6.2.2. Stężenie miedzi w popłodach.....	72
6.2.3. Interakcje między badanymi pierwiastkami .....	73
6.3. Stres oksydacyjny i stężenia Fe, Cu, Zn.....	73
7. Podsumowanie i wnioski .....	77
V. Omówienie artykułu nr 2 .....	77
VI. Podsumowanie i wnioski .....	81
VII. Ograniczenia badania.....	82
VIII. Piśmiennictwo .....	84
IX. Wykaz tabel.....	103
X. Wykaz rycin.....	104
XI. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej .....	106
Załącznik nr 1. The Role of Fe, Zn, Cu in Pregnancy .....	106
Załącznik nr 2. Calcium, Potassium, Sodium, and Magnesium Concentrations in the Placenta, Umbilical Cord, and Fetal Membrane from Women with Multiple Pregnancies .....	139
XII. Oświadczenia współautorów.....	155
XIII. Dodatkowe załączniki .....	161
<i>Załącznik 3</i> .....	161
<i>Załącznik 4</i> .....	162
<i>Załącznik 5</i> .....	164
<i>Załącznik 6</i> .....	167

## Wykaz skrótów

- 1,25-(OH)2D3** – 1,25-dihydroksycholekalcyferol (kalcytriol)
- AI** (ang. *Adequate Intake*) – odpowiedniego spożycia
- BMI** (ang. *body mass index*) wskaźnik masy ciała
- CAT** (ang. *catalase*) – katalaza
- CC** – cięcie cesarskie
- CTR1** – (ang. *copper transporter 1*) – białko wychwyty miedzi o wysokim powinowactwie 1
- Cu/Zn-SOD** (ang. *Cu/Zn superoxide dismutase*) – dysmutaza ponadtlenkowa cynkowo-miedziowa
- DMT1** (ang. *Divalent Metal Transporter 1*) – przenośnik jonów dwuwartościowych
- EFSA** (ang. *European Food Safety Authority*) – Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności
- GDM** (ang. *Gestational Diabetes Mellitus*) – cukrzyca ciążowa
- GPx** (ang. *glutathione peroxidase*) – peroksydaza glutationowa
- GR** (ang. *glutathione reductase*) – reduktaza glutationowa
- GSH** (ang. *glutathione*) – glutation
- HIF** (ang. *hypoxia inducible factor*) – czynnik indukujący hipoksję
- HO-1 i HO-2** (ang. *haem oxygenase*) – oksygenaza hemowa 1 i 2
- hs-CRP** (ang. *high sensitive CRP*) – wysoko czułe białko C-reaktywne
- ICP-OES** (ang. *Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*) – optyczna spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie
- IDA** (ang. *iron deficiency anemia*) – niedokrwistość z niedoboru żelaza
- LOD** (ang. *limit of detection*) – limit detekcji
- LPO** (ang. *lipid peroxidation*) – peroksydacja lipidów
- MT** (ang. *metallothionein*) – metalotioneina
- NADPH** (ang. *nicotinamide adenine dinucleotide*)  
dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
- PE** – promieniowanie elektromagnetyczne
- PGF** (ang. *placenta growth factor*) – czynnik wzrostu łożyska

**PTH** – hormon przytarczyc

**RFT** (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu

**RNS** (ang. *reactive nitrogen species*) – reaktywne formy azotu

**SIPS** (ang. *stress induced premature senescence*) – indukowane stresem przedwczesne starzenie

**SO** (ang. *oxidative stress*) – stres oksydacyjny

**SOD** (ang. *superoxide dismutase*) – dysmutaza ponadtlenkowa

**TfR** – (ang. *transferrin receptor*) – receptor transferyny

**TRPM6** (ang. *transient receptor potential melastatin type 6*) – przejściowy potencjał receptora melastatyny 6

**VEGF** (ang. *vascular endothelial growth factor*) – czynnik wzrostu naczyń krwionośnych

**WHO** – (ang. *World Health Organization*) – Światowa Organizacja Zdrowia

**WIC** (ang. *special supplemental food program for women, infants and children*) – Specjalny Program Żywienia Uzupełniającego dla Kobiet, Niemowląt i Dzieci

**ZIP** (ang. *Zrt-/Irt-like protein*) – rodzina transporterów cynku

**ZnTs** – rodzina transporterów cynku



## Streszczenie

W ostatnich latach wzrosła liczba ciąż mnogich. Jest to związane ze stosowaniem technik wspomaganego rozrodu, w tym indukowanej owulacji oraz zapłodnienia *in vitro*. Ciąże mnogie są zawsze ciążami podwyższonego ryzyka i częściej niż w przypadku ciąż pojedynczych występują powikłania ciążowe, wady rozwojowe płodu oraz zachorowalność i śmiertelność okołoporodowa. Ciąża mnoga może być przyczyną porodu przedwczesnego, poronienia, hipotrofii jednego lub więcej płodów, wewnątrzmacicznego obumarcia lub zespołu zanikającego płodu. Stan przedrzucawkowy (preeklampsja) występuje co najmniej dwa-trzy razy częściej i ma na ogół cięższy przebieg niż w ciążach pojedynczych. Makro- i mikroelementy są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Uczestniczą one w wielu procesach, w tym w metabolizmie komórkowym, obronie antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej, a także wpływają na aktywność enzymów, regulują ekspresję genów oraz biorą udział w syntezie białek. W okresie ciąży dieta powinna zaspokajać potrzeby dziecka, a także matki, której zdrowie jest ściśle związane z dostarczeniem odpowiedniej ilości niezbędnych pierwiastków, w tym żelaza (Fe), miedzi (Cu), cynku (Zn), wapnia (Ca), potasu (K), sodu (Na) i magnezu (Mg). Dostarczenie odpowiedniej ilości niezbędnych składników z dietą lub poprzez ich suplementację może zmniejszyć ryzyko wystąpienia wad rozwojowych płodu i porodu przedwczesnego.

W czasie ciąży w organizmie matki zachodzą liczne zmiany adaptacyjne, w tym anatomiczne, fizjologiczne i metaboliczne, które prowadzą między innymi do wzrostu produkcji reaktywnych form tlenu (RFT). Wolne rodniki są niezbędne do prawidłowego przebiegu wielu procesów życiowych, w tym regulacji ekspresji genów, procesów fosforylacji białek oraz regulacji stężenia Ca w komórkach. W warunkach fizjologicznych uwalniana jest niewielka ilość RFT, która jest bezpieczna dla komórek. Jednakże w trakcie ciąży może nastąpić osłabienie ochrony antyoksydacyjnej. Może to prowadzić do zaburzenia równowagi między produkcją RFT, a zdolnościami antyoksydacyjnymi organizmu, co określane jest mianem stresu oksydacyjnego (SO). Wyniki wielu badań dowodzą, że SO ma niekorzystny wpływ na organizm kobiety, przebieg ciąży i rozwój płodów. Prowadzi do nieprawidłowej czynności łożyska w konsekwencji powodując

zaburzenia zaopatrzenia płodu w tlen i substancje odżywcze. Może to być przyczyną między innymi poronień, wad rozwojowych płodu przedwczesnego porodu i niskiej masy urodzeniowej noworodka. Ilość RFT w organizmie jest kontrolowana przez aktywność enzymów antyoksydacyjnych, w tym dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT), peroksydazy glutationowej (GPx), reduktazy glutationowej (GR), a także stężenia glutationu (GSH) oraz witaminy C i E.

Głównym celem badań była ocena stężenia pierwiastków, w tym żelaza (Fe), cynku (Zn), miedzi (Cu), wapnia (Ca), potasu (K), sodu (Na) i magnezu (Mg) oraz analiza parametrów stresu oksydacyjnego i skuteczności ochrony antyoksydacyjnej w łożysku, pępowinie i błonach płodowych pobranych od kobiet w ciąży mnogiej. W badaniach uwzględniono wiek, wagę i BMI kobiet oraz parametry antropometryczne noworodków (szerokość ramion, wagę, długość ciała, obwód głowy i płeć), wiek ciążowy, a także przyjmowanie suplementów diety w czasie ciąży i palenia papierosów przez kobiety przed ciążą.

W badaniu określono korelacje pomiędzy stężeniami Fe, Cu i Zn w łożysku, pępowinie i błonie płodowej, a parametrami antropometrycznymi noworodków, stylem życia matki i wiekiem ciążowym. Stwierdzono silne dodatnie korelacje pomiędzy stężeniem Cu i Zn w błonie płodowej ( $\rho=0,66$ ) i stężeniem Zn i Fe w łożysku ( $\rho=0,61$ ). Dodatkowo stwierdzono korelację między stężeniem Zn w błonie płodowej, a szerokością ramion noworodka ( $\rho=-0,35$ ); między stężeniem Cu w łożysku, a (i) wagą łożyska ( $\rho=0,46$ ) i (ii) szerokością ramion noworodka ( $\rho=0,36$ ); między stężeniem Cu w pępowinie, a (i) obwodem głowy noworodka ( $\rho=0,36$ ), (ii) masą urodzeniową noworodka ( $\rho=0,35$ ) oraz między stężeniem Fe w łożysku, a wagą łożyska ( $\rho=0,33$ ). W tej samej grupie badanej określono korelacje między parametrami statusu antyoksydacyjnego (GPx, GR, CAT, SOD)/stresu oksydacyjnego (LPO), a parametrami antropometrycznymi noworodków i matki, wiekiem ciążowym, suplementacją i paleniem papierosów przed ciążą. Stwierdzono ujemne korelacje między stężeniami Fe i produktów LPO w błonie płodowej ( $\rho=-0,50$ ) i w łożysku ( $\rho=-0,58$ ). Ponadto odnotowano korelację pomiędzy stężeniem Cu i aktywnością SOD w pępowinie ( $\rho=0,55$ ). Stwierdzono także spadek aktywności GPx w pępowinie u kobiet, które nie przyjmowały suplementów w czasie ciąży w porównaniu do kobiet, które je stosowały; zwiększenie aktywności CAT w pępowinie u noworodków

z prawidłową masą urodzeniową w porównaniu z noworodkami z niską masą urodzeniową; zwiększenie aktywności SOD w łożysku u kobiet niepalących w porównaniu do kobiet palących papierosy przed ciążą; zmniejszenie aktywności GR w łożysku kobiet z BMI od >18,5 do <25 w porównaniu do kobietami z BMI <18,5 i >25.

W drugiej części badań stwierdzono silne dodatnie korelacje między stężeniem Ca i Mg zarówno w pępowinie ( $\rho=0,81$ ;  $p=0,00$ ), jak i w błonie płodowej ( $\rho=0,73$ ;  $p=0,00$ ); między stężeniem K i Mg w pępowinie ( $\rho=0,73$ ;  $p=0,00$ ); między stężeniem Ca i K w błonie płodowej ( $\rho=0,73$ ;  $p=0,00$ ), a także stwierdzono umiarkowanie dodatnie korelacje między stężeniem Ca w łożysku, a masą łożyska ( $\rho=0,42$ ;  $p=0,00$ ) oraz między stężeniem Mg w pępowinie, a długością ciąży ( $\rho=0,42$ ;  $p=0,00$ ). Stwierdzono ujemne korelacje pomiędzy stężeniem Na i Ca w błonie płodowej ( $\rho=-0,40$ ;  $p=0,00$ ) oraz stężeniem Na w błonie płodowej i Mg w łożysku ( $\rho=-0,16$ ;  $p=0,02$ ). Potwierdzono ujemne korelacje pomiędzy długością ciąży, a obwodem głowy ( $\rho=-0,42$ ;  $p=0,00$ ), wagą noworodka ( $\rho=-0,42$ ;  $p=0,00$ ), długością ciała noworodka ( $\rho=-0,49$ ;  $p=0,00$ ), szerokością barków noworodka ( $\rho=-0,49$ ;  $p=0,00$ ) oraz między masą ciała noworodka, a obwodem głowy ( $\rho=-0,62$ ;  $p=0,00$ ), masą ciała kobiet przed porodem ( $\rho=-0,36$ ;  $p=0,00$ ), długością ciała noworodka ( $\rho=-0,45$ ;  $p=0,00$ ), szerokością barków noworodka ( $\rho=-0,63$ ;  $p=0,00$ ), a przyrostem masy ciała kobiet w czasie ciąży ( $\rho=-0,31$ ;  $p=0,01$ ). Stwierdzono istotne statystycznie korelacje między paleniem papierosów przed ciążą, a masą ciała kobiet przed porodem ( $\rho=0,32$ ;  $p=0,00$ ) oraz ujemną korelację między wiekiem kobiet, a obwodem głowy noworodków ( $\rho=-0,20$ ;  $p=0,02$ ).

Wszystkie założenia i cele pracy doktorskiej zostały zrealizowane. Prezentowane badania wnoszą nowe dane dotyczące stężenia Fe, Cu, Zn, Ca, Na, K i Mg, a także stężenia produktów peroksydacji lipidów oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych (dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej) w łożysku, pępowinie i błonie płodowej kobiet w ciąży mnogiej. Ponadto wyniki własne oraz innych badaczy wskazują na istotne zależności pomiędzy Fe, Cu, i Zn oraz pomiędzy Ca, Na, K i Mg w organizmie. Wzrost lub spadek jednego pierwiastka może znacząco wpływać na działanie innych pierwiastków. Fe, Cu, Zn, Ca, Na, K i Mg mogą być obiecującymi biomarkerami, które mogą umożliwić przewidywanie

powikłań związanych z ciążą, ponieważ odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu, a wszelkie zmiany ich stężenia mogą powodować interakcje niebezpieczne dla zdrowia matki i płodu.

## Summary

The number of multiple pregnancies has increased significantly in recent years. This is related to the use of assisted reproductive techniques – induced ovulation and *in vitro* fertilization. Multiple pregnancies are always high-risk pregnancies. Pregnancy complications, fetal malformations and perinatal morbidity and mortality are more often than in the case of single pregnancies. Multiple pregnancy can be the cause of premature birth, miscarriage, hypotrophy of one or more fetuses, intrauterine death or vanishing twom syndrome. Preeclampsia occurs at least two to three times more often and is generally more severe than in single pregnancies. Macro- and microelements are necessary for the proper functioning of living organisms. Macro- and microelements participate in many processes, including cellular metabolism, antioxidant and anti-inflammatory defense, as well as affect enzyme activity, regulate gene expression and take part in protein synthesis. During pregnancy, the diet should meet the needs of the child, as well as the mother. Health of the mother and the fetus is closely related to providing the right amount of essential elements, including iron (Fe), copper (Cu), zinc (Zn), calcium (Ca), potassium (K), sodium (Na) and magnesium (Mg). Providing the right amount of essential ingredients with the diet or through their supplementation can reduce the risk of fetal malformations and premature birth.

In the mother's body during pregnancy occur numerous adaptive changes, including anatomical, physiological and metabolic changes. Metabolic changes lead to increase of the production of reactive oxygen species (ROS). Free radicals are necessary for the proper course of many life processes, including the regulation of gene expression, protein phosphorylation processes and regulation of Ca concentration in cells. Under physiological conditions is released a small amount of ROS. That amount is safe for the cells. However, during pregnancy, antioxidant protection may be weakened. This can lead to an imbalance between ROS production and the body's antioxidant capacity, which is referred to as oxidative stress (OS). The results of many studies prove that OS has an adverse effect on a woman's body, the course of pregnancy and fetal development. It leads to abnormal placenta function, consequently causing impaired supply of oxygen and nutrients to the fetus. This can be the cause,

among other things, of miscarriages, fetal malformations, premature birth and low birth weight of the newborn. The amount of ROS in the body is controlled by the activity of antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), as well as glutathione concentration (GSH) and vitamins C and E.

The main object of the study was to assess the concentration of elements, including iron (Fe), zinc (Zn), copper (Cu), calcium (Ca), potassium (K), sodium (Na) and magnesium (Mg) and analyze the parameters of oxidative stress and the effectiveness of antioxidant protection in the placenta, umbilical cord and amniotic sac taken from woman in the multiple pregnancy. The studies include the biological and anthropometric characteristics of women (age, weight, BMI) and newborns (arm width, weight, body length, head circumference and gender), gestation time, taking the dietary supplements and smoking during pregnancy.

The study identified correlations between concentrations of Fe, Cu and Zn in the placenta, umbilical cord and amniotic sac, and the morphometric characteristics of newborns, maternal characteristics and gestational age. Strong positive correlations were found between the concentration of Cu and Zn in the amniotic sac ( $\rho=0.66$ ) and the concentration of Zn and Fe in the placenta ( $\rho=0.61$ ). Additionally, there was a correlation between the concentration of Zn in the amniotic sac and the width of the newborn's arms ( $\rho=-0.35$ ); between the concentration of Cu in the placenta, and the placenta weight ( $\rho=0.46$ ) and the width of the newborn's arms ( $\rho=0.36$ ); between the Cu concentration in the umbilical cord and head circumference ( $p=0.36$ ), weight of newborn ( $p=0.35$ ) and between Fe concentration in the placenta and its weight ( $p=0.35$ ). In the same study group, correlations were determined between antioxidant status parameters (GPx, GR, CAT, SOD) / oxidative stress (LPO) and neonatal morphometric features, maternal features, gestational age, supplementation and smoking before pregnancy. Negative correlations were found between concentrations of Fe and LPO products in the amniotic sac ( $\rho=-0.50$ ) and in the placenta ( $\rho=-0.58$ ). In addition, a correlation was noted between Cu concentration and SOD activity in the umbilical cord ( $\rho=0.55$ ). There was also a decrease in umbilical cord GPx activity among women who did not take supplements compared to group of women who used them; an increase

in umbilical cord CAT activity in newborns with normal birth weight compared to infants with low birth weight; increased SOD activity in the placenta in non-smoking women compared to women smoking cigarettes before pregnancy; a decrease of GR activity in placentas from women with BMI 18,5-25 compared to this with BMI <18,5 and >25.

The second study found strong positive correlations between Ca and Mg concentrations both in the umbilical cord ( $r=0.81$ ;  $p=0.00$ ) and the amniotic sac ( $r=0.73$ ;  $p=0.00$ ); between the concentration of K and Mg in the umbilical cord ( $r=0.73$ ;  $p=0.00$ ); between the concentration of Ca and K in the amniotic sac ( $r=0.73$ ;  $p=0.00$ ), also moderately positive correlations between Ca concentration in placenta and its weight ( $p=0.42$ ;  $p=0,00$ ) and Mg concentrations in the umbilical cord and the gestation time ( $p=0,42$ ;  $p=0,00$ ). Negative correlations were found between the concentration of Na and Ca in the amniotic sac ( $r=-0.40$ ;  $p=0.00$ ) and the concentration of Na in the amniotic sac and Mg in the placenta ( $r=-0.16$ ;  $p=0.02$ ). Negative correlations were confirmed between the gestation time and the circumference of the head ( $\rho=-0.42$ ;  $p=0.00$ ), the mass of the newborn ( $\rho=-0.42$ ;  $p=0.00$ ), the length of the newborn ( $\rho=-0.49$ ;  $p=0.00$ ), the shoulder width of the newborn ( $\rho=-0.49$ ;  $p=0.00$ ) and between newborn weight and head circumference ( $\rho=-0.62$ ;  $p=0.00$ ), weight of women before labour ( $\rho=-0,36$ ;  $p=0.00$ ), length of newborn body ( $\rho=-0,45$ ;  $p=0.00$ ), width of newborn arms ( $\rho=-0,63$ ;  $p=0,00$ ) and the women weight gain during pregnancy ( $\rho=-0,31$ ;  $p=0,01$ ). There were statistically significant correlations between smoking before pregnancy and women's body weight before childbirth ( $\rho=0.32$ ;  $p=0.00$ ) and a negative correlation between women's age and neonatal head circumference ( $\rho=-0.20$ ;  $p=0.02$ ).

All the assumptions and goals of the doctoral dissertation have been achieved. The own research brings new data on the concentration of Fe, Cu, Zn, Ca, Na, K and Mg, as well as the concentration of lipid peroxidation products and the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase) in the placenta, umbilical cord and amniotic sac from multiple pregnancies. In addition, own and other researchers' results indicate significant relationships between Fe, Cu, and Zn and between Ca, Na, K and Mg in the body. The increase or decrease of one element can significantly affect the function of others. Fe, Cu, Zn, Ca, Na, K

and Mg can be promising biomarkers in predicting complications because they play a key role in the body's homeostasis, and any changes in their concentration can cause interactions dangerous to the health of the mother and the fetus.



## I. Wprowadzenie

W ostatnich latach wzrosła liczba ciąż mnogich. Jest to związane ze stosowaniem technik wspomaganego rozrodu, w tym indukowanej owulacji oraz zapłodnienia *in vitro*. Średni czas trwania ciąży pojedynczej wynosi około 39 tygodni, natomiast ciąży mnogiej dla bliźniąt, trójczeków i czworaczeków odpowiednio około 36, 32 i 30 tygodni (Dudenhausen i Maier 2010; Latar i wsp. 2014). W Europie w 2010 roku w oparciu o współczynnik porodów mnogich kraje europejskie podzielono na cztery grupy. Do pierwszej grupy zaklasyfikowano kraje, w których współczynnik porodów wynosił poniżej 15 porodów bliźniaczych na 1000 rodzących kobiet. Grupa ta obejmowała kraje Europy Środkowo-Wschodniej, w tym Rumunię, Łotwę, Litwę, Polskę i Słowację oraz niektóre kraje skandynawskie (Islandię i Szwecję). Do drugiej grupy zaliczono Estonię, Portugalię, Finlandię, Wielką Brytanię, Włochy, Norwegię i Irlandię, w których współczynnik porodów wynosił od 15,0 do 16,9 porodów bliźniaczych na 1000 rodzących kobiet. W trzeciej grupie (od 17,0 do 18,9 porodów bliźniaczych na 1000 rodzących kobiet) znalazły się Austria, Francja, Holandia, Luksemburg, Szwajcaria, Słowenia i Niemcy. Do czwartej grupy, w której współczynnik porodów wynosił 19 porodów bliźniaczych na 1000 rodzących kobiet zaliczono Belgię, Malte, Hiszpanię, Danię, Czechy i Cypr (Heino i wsp. 2016).

Ciąże mnogie są zawsze ciążami podwyższonego ryzyka. U kobiet w ciąży mnogiej częściej niż w przypadku ciąż pojedynczych występują powikłania ciążowe, wady rozwojowe płodu oraz zachorowalność i śmiertelność okołoporodowa (Dudenhausen i Maier 2010). Ciąża mnoga może być przyczyną porodu przedwczesnego, poronienia, hipotrofii jednego lub więcej płodów, wewnątrzmacicznego obumarcia lub zespołu zanikającego płodu (Siddiqui i wsp. 2007). Stan przedrzucawkowy (preeklampsja) występuje co najmniej dwa-trzy razy częściej i ma na ogół cięższy przebieg w ciążach bliźniaczych niż w ciążach pojedynczych (Chantanahom i Phupongi, 2021)

Makro- i mikroelementy są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Uczestniczą one w wielu procesach, w tym w metabolizmie komórkowym, obronie antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej, a także wpływają na aktywność enzymów, regulują ekspresję genów oraz biorą udział w syntezie

białek (WHO 1996). Niezbędne pierwiastki są dostarczane w diecie, a ich poziom w organizmie człowieka zależy od płci, wieku, miejsca zamieszkania (położenia geograficznego) i zanieczyszczenia środowiska. W okresie ciąży dieta powinna zaspokajać potrzeby dziecka, a także matki, której zdrowie jest ściśle związane z dostarczeniem odpowiedniej ilości niezbędnych pierwiastków, w tym żelaza (Fe), miedzi (Cu), cynku (Zn), wapnia (Ca), potasu (K), sodu (Na) i magnezu (Mg). Ich poziom przed ciążą również może mieć istotne znaczenie (King 2000). Badania Caan i wsp. (1987) wykazały, że Specjalny Program Żywienia Uzupełniającego dla Kobiet, Niemowląt i Dzieci (ang. *special supplemental food program for women, infants and children*, WIC) rozpoczęty pięć-siedem miesięcy przed ciążą powoduje wzrost masy urodzeniowej średnio o około 131 g, a długość noworodka o około 0,3 cm. Dostarczenie odpowiedniej ilości niezbędnych składników z dietą lub poprzez ich suplementację może zmniejszyć ryzyko wystąpienia wad rozwojowych płodu i porodu przedwczesnego (McAlpine i wsp. 2019; Szymankiewicz 2010).

W czasie ciąży w organizmie matki zachodzą liczne zmiany adaptacyjne, w tym anatomiczne, fizjologiczne i metaboliczne, które prowadzą między innymi do wzrostu produkcji reaktywnych form tlenu (RFT), szczególnie w drugiej połowie ciąży (Casanueva i Viteri 2003; Lurie i Mamet 2000). Wolne rodniki są niezbędne do prawidłowego przebiegu wielu procesów życiowych, w tym regulacji ekspresji genów, procesów fosforylacji białek oraz regulacji stężenia Ca w komórkach. W warunkach fizjologicznych uwalniana jest niewielka ilość RFT, która jest bezpieczna dla komórek (Agarwal i wsp. 2012; Karpińska i Gromadzka 2013). W trakcie ciąży może nastąpić osłabienie ochrony antyoksydacyjnej. Może to prowadzić do zaburzenia równowagi między produkcją RFT, a zdolnościami antyoksydacyjnymi organizmu, co określane jest mianem stresu oksydacyjnego (OS) (Buhimschi i wsp. 2003; Chen i Scholl 2005; Devrimi i wsp. 2006; Granot i Kohen 2004; Myatt i Cui 2004; Peuchant i wsp. 2004; Poston i Raijmakers 2004). Jednym z głównych źródeł RFT u kobiet w ciąży jest łożysko bogate w mitochondria, które w trakcie ciąży zwiększa swoją wielkość i unaczynienie (Scholl i wsp. 2005). Wytwarza ono duże ilości anionorodnika ponadtlenkowego, który łączy się z innymi cząsteczkami tworząc nadtlenek wodoru i rodniki hydroksylowe (Myatt i Cui 2004). Wzrost wytwarzania RFT

obserwowany jest zwłaszcza w przypadku ciąż mnogich (Grazul-Bilska i wsp 2006).

Wyniki wielu badań dowodzą, że stres oksydacyjny ma niekorzystny wpływ na przebieg ciąży, zdrowie kobiet i rozwój płodów. Prowadzi do niewydolności łożyska w konsekwencji powodując zaburzenia zaopatrzenia płodu w tlen i substancje odżywcze (Jauniaux i wsp 2006; Saugstad 1998). Może to być przyczyną między innymi poronień, wad rozwojowych płodu, przedwczesnego porodu i niskiej masy urodzeniowej noworodka (Ziemiański i Wartanowicz 1999; Poston i Raijmakers 2004). Ilość RFT w organizmie jest kontrolowana przez aktywność enzymów antyoksydacyjnych, w tym dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT), peroksydazy glutationowej (GPx), reduktazy glutationowej (GR), a także stężenia glutationu (GSH) oraz witaminy C i E (Agarwal i wsp 2012). Dodatkowo kluczową rolę pełnią pierwiastki śladowe, które modulują system obrony antyoksydacyjnej. Miedź, mangan i cynk są niezbędnymi mikroelementami do prawidłowego funkcjonowania dysmutazy ponadtlenkowej, podczas gdy selen wpływa na działanie antyoksydacyjne układu enzymatycznego glutationu (Basu i wsp 2015). Natomiast żelazo, które występuje w dużych ilościach w łożysku może indukować SO ze względu na wytwarzanie RFT, co może powodować uszkodzenie komórek i tkanek (Casanueva i Viteri 2003; Khayat i wsp. 2017).

## **II. Hipotezy, cele pracy i spodziewane korzyści pracy**

Przystępując do badań postawiono następujące hipotezy badawcze:

**H1.** Występują różnice w stężeniu żelaza (Fe), miedzi (Cu), cynku (Zn), wapnia (Ca), potasu (K), sodu (Na) i magnezu (Mg) w popłodach, w tym łożysku, błonie płodowej i pępowinie;

**H2.** Stężenie Fe, Cu, Zn, Ca, K, Na i Mg w popłodach wpływa na parametry antropometryczne noworodków (szerokość ramion, wagę, długość ciała, obwód głowy);

**H3.** Stężenie Fe, Cu i Zn w popłodach wpływa na stężenie antyoksydantów i prooksydantów w łożysku, pępowinie i błonie płodowej;

**H4.** Wzrost lub spadek stężenia żelaza, cynku lub miedzi wpływa na stężenie

pozostałych dwóch pierwiastków;

**H5.** Stężenie pierwiastków w popłodach pochodzących od kobiet w ciąży mnogiej jest mniejsze niż w popłodach pochodzących z ciąży pojedynczych (porównanie z danymi z piśmiennictwa naukowego).

Głównym celem badań była ocena stężenia pierwiastków, w tym żelaza (Fe), cynku (Zn), miedzi (Cu), wapnia (Ca), potasu (K), sodu (Na) i magnezu (Mg) oraz ocena parametrów stresu oksydacyjnego i skuteczności ochrony antyoksydacyjnej w popłodach (łożysku, pępowinie i błonach płodowych) pobranych od kobiet w ciąży mnogiej. W badaniach uwzględniono wiek, wagę i BMI kobiet oraz parametry antropometryczne noworodków (szerokość ramion, wagę, długość ciała, obwód głowy i płeć), wiek ciążowy, a także przyjmowanie suplementów diety w czasie ciąży i palenie papierosów przez kobiety przed ciążą.

**Cele szczegółowe:**

- określenie stężenia pierwiastków (Fe, Cu, Zn, Ca, K, Na, Mg) w łożysku, błonie płodowej i pępowinie pobranych od kobiet w ciąży mnogiej w czasie porodu;
- ocena stresu oksydacyjnego w popłodach poprzez pomiar produktów peroksydacji lipidów;
- zbadanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych (katalazy, peroksydazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej, reduktazy glutationowej) w popłodach;
- ocena wpływu stężenia poszczególnych pierwiastków na stres oksydacyjny w popłodach;
- ocena zależności pomiędzy stężeniem pierwiastków (Fe, Cu, Zn, Ca, K, Na, Mg) w popłodach, a parametrami morfometrycznymi noworodka;
- zbadanie zależności pomiędzy stężeniem pierwiastków (Fe, Cu, Zn, Ca, K, Na, Mg) w popłodach, a wiekiem, wagą i BMI kobiet;
- analiza zależności pomiędzy stężeniem pierwiastków (Fe, Cu, Zn, Ca, K, Na, Mg) w popłodach, a czasem trwania ciąży, paleniem papierosów przed ciążą oraz podstawową suplementacją w czasie ciąży;

- ocena zależności pomiędzy parametrem stresu oksydacyjnego i aktywnością enzymów antyoksydacyjnych w popłodach, a parametrami antropometrycznymi noworodka;
- analiza zależności pomiędzy parametrem stresu oksydacyjnego i aktywnością enzymów antyoksydacyjnych w popłodach, a czasem trwania ciąży, paleniem papierosów przed ciążą oraz podstawową suplementacją w czasie ciąży.

Spodziewanym wynikiem badania jest ustalenie wpływu Fe, Cu, Zn, Ca, K, Na, Mg na przebieg ciąży mnogiej, parametrów antropometrycznych noworodka oraz wybranych parametrów (cech lub nawyki) kobiet oraz zależności pomiędzy stężeniem żelaza, miedzi i cynku, a równowagą prooksydacyjno-antyoksydacyjną. Istotność tego zagadnienia wynika z corocznego wzrostu odsetka ciąż mnogich w Polsce i na świecie, małej dostępności badań dotyczących tego tematu oraz braku swoistych norm suplementacji wymienionych pierwiastków w ciąży mnogiej.

### III. Omówienie artykułu nr 1

**Grzeszczak K**, Kwiatkowski S, Kosik-Bogacka D. The Role of Fe, Zn, and Cu in pregnancy. *Biomolecules* 2020;10:1176. doi: 10.3390/biom10081176.

Celem niniejszego przeglądu było podsumowanie danych z piśmiennictwa naukowego dotyczącego wpływu Fe, Cu i Zn na przebieg ciąży pojedynczej i mnogiej, a także omówienie zależności zachodzących pomiędzy tymi pierwiastkami.

Żelazo, miedź i cynk to mikroelementy niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Pierwiastki te biorą udział w wielu procesach, w tym w metabolizmie komórkowym, obronie antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej, a także wpływają na aktywność enzymów, regulują ekspresję genów i biorą udział w syntezie białek. Mają one także istotny wpływ na organizm kobiet w ciąży i rozwój płodu. Odpowiednie stężenie Fe, Cu i Zn w organizmie

kobiety w czasie ciąży zmniejsza ryzyko wystąpienia powikłań, w tym niedokrwistości, nadciśnienia tętniczego indukowanego ciążą, stanu przedrzucawkowego, powikłań okołoporodowych oraz niskiej masy urodzeniowej noworodka.

Żelazo wchodzi w skład mioglobiny i hemoglobiny oraz wielu enzymów uczestniczących w transporcie elektronów, syntezie elementów morfotycznych krwi, neuroprzebieżników i związków wysokoenergetycznych. W czasie ciąży zaleca się uzupełnianie codziennej diety kobiet w ciąży o 27 mg Fe na dobę, a przy stwierdzeniu anemii zaleca się przyjmowanie do 60 mg Fe. Badania wykazały, że suplementacja ciężarnych tym mikroelementem powoduje wzrost masy ciała noworodków średnio o 200 g. U kobiet w wieku rozrodczym niedobory Fe spotykane są często. Deficyt Fe jest przyczyną niedokrwistości, co może w przypadku kobiet w ciąży, prowadzić do pogorszenia parametrów urodzeniowych dziecka. Ponadto przy niewystarczającej ilości tego pierwiastka u kobiet w ciąży opisywano stany przedrzucawkowe oraz przedwczesne pęknięcie błony płodowej. Z drugiej strony nadmierna suplementacja Fe może prowadzić do nadmiernego tworzenia reaktywnych form tlenu, co może powodować uszkodzenie tkanek i narządów.

Miedź odgrywa ważną rolę w reakcjach utleniania, ponieważ jest składnikiem katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej i oksydazy cytochromowej. Ponadto wchodzi w skład ceruloplazminy i odgrywa znaczącą rolę w metabolizmie Fe. W czasie ciąży zapotrzebowanie na Cu wzrasta z 900 mg/dobę do 1000 mg/dobę. Niedobór tego mikroelementu w czasie ciąży może być przyczyną SO, co może prowadzić do ograniczenia wzrostu płodu.

Cynk reguluje funkcjonowanie około 100 różnych enzymów, wpływa na wchłanianie kwasu foliowego, metabolizm węglowodanów, syntezę DNA i RNA oraz równowagę kwasowo-zasadową. Dzienna podaż Zn w czasie ciąży powinna wynosić około 12 mg. Badania wykazały, że niedobór tego mikroelementu u kobiet w ciąży jest powszechny, szczególnie w krajach rozwijających się. Uważa się, że niedobór Zn może być związany z teratogennością, prowadzić do poronień oraz śmiertelności płodów.

Interakcje pomiędzy Fe, Cu i Zn wpływają na dostępność tych pierwiastków ze względu na podobne właściwości fizykochemiczne. Najczęściej ma to miejsce podczas wchłaniania jelitowego, jony metali konkurują o miejsca wiązania

ze związkami transportowymi. Ponadto relacje między tymi jonami mają duży wpływ na przebieg reakcji w tkankach, a także na ich usuwanie z organizmu.

Z przedstawionego przeglądu danych naukowych wynika, że Fe, Cu i Zn są bardzo ważne dla prawidłowego przebiegu ciąży. Wyniki większości badań wskazują na wpływ metali na parametry antropometryczne matki i dziecka. Ponadto Fe, Cu i Zn mogą być potencjalnymi biomarkerami, które umożliwią przewidywanie ryzyka powikłań związanych z ciążą. Ponadto wyniki badań wskazują na ważne zależności między Fe, Cu i Zn w organizmie. Wzrost lub spadek jednego pierwiastka może znacząco wpłynąć na działanie pozostałych dwóch pierwiastków. Szczególnie ważne jest, że pierwiastki te nie wykazują działania antagonistycznego względem siebie, gdy mieszczą się w wartościach referencyjnych. Żelazo, miedź i cynk odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu, a wszelkie zmiany ich stężenia mogą powodować interakcje niebezpieczne dla zdrowia matki i płodu.

#### **IV. Omówienie nieopublikowanych wyników badań**

##### **1. Wstęp**

Żelazo (Fe), cynk (Zn) i miedź (Cu) wpływają na stan zdrowia kobiety w czasie ciąży, rozwój płodu, a także stan zdrowia noworodka. Rola Fe, Zn i Cu w czasie ciąży, jak również charakterystyka interakcji pomiędzy tymi pierwiastkami, zostały opisane w **artykule nr 1**.

Na przestrzeni ostatnich pięciu lat wzrosła liczba badań dotyczących roli OS w patogenezie i progresji wielu chorób (Pubmed/słowa kluczowe: *Oxidativ stress AND pathogenesis* – 2 150 publikacji). Również wiele badań z tego zakresu dotyczy wpływu RFT na przebieg ciąży oraz na organizm płodu i noworodka (Pubmed/słowa kluczowe: *Oxidativ stress AND Pregnancy* – 1 494 publikacji *AND Fetus* – 45 publikacji *AND Newborn* – 164 publikacji). Jednak mechanizmy prowadzące do powstawania zmian patofizjologicznych pod wpływem RFT nie zostały jak dotąd dokładnie scharakteryzowane.

Reaktywne formy azotu (RFA)/tlenu powstają w wielu procesach biologicznych. Uwalniane w ilościach fizjologicznych pełnią rolę mediatorów i regulatorów, zapewniając komórkom prawidłowe funkcjonowanie (Dröge 2002).

Do RFA zalicza się tlenek azotu ( $\text{NO}\cdot$ ) i nadtlenoazotyn ( $\text{ONOO}^-$ ) (Kamata i Hirata 1999), natomiast do RFT anion ponadtlenkowy ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), nadtlenek wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), rodnik hydroksylowy ( $\cdot\text{OH}$ ), rodnik nadtlenkowy ( $\text{HOO}\cdot$ ), tlen singletowy ( $(^1\text{O}_2)$ ) i rodniki peroksyłowe i alkoksyłowe ( $\text{ROO}\cdot$ ) (Callahan i wsp. 2001). Podstawowym RFT wytwarzanym w trakcie metabolizmu tlenu jest nadtlenek, który jest bardzo reaktywny i cytotoksyczny. Nadtlenek przy udziale SOD katalizuje dysproporcjonowanie anionorodnika nadtlenkowego do znacznie mniej reaktywnego produktu -  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a tym samym zabezpiecza komórki przed toksycznymi produktami oddychania tlenowego (Rahman i wsp. 2012). Redukcja jednoelektronowa  $\text{O}_2$  do  $\cdot\text{O}_2^-$  i jego dysmutacji do  $\text{H}_2\text{O}_2$  zachodzi podczas oddychania mitochondrialnego. Mitochondria są również zaangażowane w generowanie NO poprzez syntezę tlenku azotu (NOS),  $\cdot\text{O}_2^-$  i NO reagują tworząc nadtlenoazotynu ( $\text{ONOO}^-$ ), który stanowi potencjalne źródło  $\cdot\text{OH}$  (Dhawan 2014). Rodnik hydroksylowy powstaje w obecności metali, w tym Cu i Fe oraz  $\text{H}_2\text{O}_2$  (reakcja Fentona). Nieenzymatyczna reakcja Fentona to reakcja degradacji  $\text{H}_2\text{O}_2$ , która jest katalizowana przez  $\text{Fe}^{2+}$ , prowadzi do powstawania  $\cdot\text{OH}$ , a zachodzi w retikulum endoplazmatycznym (Liu i wsp. 2004). Inną reakcją pozamitochondrialną jest wybuch oddechowy komórek fagocytyujących, który stanowi źródło  $\text{O}_2\cdot$ .

W stanach zapalnych zgodnie z teorią indukowanego stresem przedwczesnego starzenia (ang. *stress induced premature senescence*, SIPS), w wyniku reakcji oksydazy zredukowanego fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) małe dawki różnych czynników stresogennych, w tym  $\text{H}_2\text{O}_2$ , powodują wyczerpanie potencjału replikacyjnego komórek proliferacyjnych i akumulację starzejących się komórek, które mogą być odpowiedzialne za tworzenie stanu mikrozapalnego i aktywację komórek fagocytyujących. Kolejnym przykładem reakcji pozamitochondrialnej jest reakcja zachodząca w peroksysomach  $\beta$ -utleniania kwasów tłuszczowych z wytwarzaniem  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Gilca i wsp. 2007).

Reaktywne formy tlenu wykazują większą reaktywność niż tlen cząsteczkowy w stanie podstawowym (trypletowym). Mogą one być generowane endogennie lub egzogennie. Do endogennych źródeł RFT należą: mitochondrialny łańcuch oddechowy, łańcuch transportu elektronów i transportu mikroelektronów, enzymy utleniające (ksantynoksydaza, cyklooksygenaza),



fagocyty oraz komórkowa autooksydacja  $Fe^{2+}$  i epinefryny (Phaniendra i wsp. 2015). Natomiast do źródeł endogennych zalicza się: alkohol, dym tytoniowy, nieprawidłową dietę, wysiłek fizyczny o intensywnym nasileniu, niską temperaturę, stres, urazy mechaniczne, metale ciężkie i przejściowe, rozpuszczalniki przemysłowe, pestycydy, benzopiren, promieniowanie, niektóre leki, w tym halotan, paracetamol, a także infekcje bakteryjne i wirusowe (Phaniendra i wsp. 2015). W warunkach fizjologicznych procesy te znajdują się pod ścisłą kontrolą poprzez działanie enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów obronnych. Wpływ RFT na komórki w dużym stopniu zależy od ich stężenia i czasu działania. Krótkotrwały wzrost wytwarzania RFT jest zazwyczaj dobrze tolerowany przez komórki i w takich sytuacjach dochodzi zwykle do zwiększonej aktywności reakcji obronnych. Jednak nasilony lub długo utrzymujący się stan stresu oksydacyjnego wywołany czynnikami chorobotwórczymi lub szkodliwymi dla zdrowia czynnikami zewnętrznymi indukuje uszkodzenia składników komórkowych (Trogakos i Gonos 2006).

Reaktywne formy tlenu uczestniczą w wielu procesach, w tym skurczu mięśni, wydzielaniu hormonów, funkcjonowaniu układu obronnego i regulacji napięcia naczyniowego. Wpływają one na wzrost i różnicowanie komórek, aktywację czynnika wzrostu, odpowiedź mitogenną, modulują wytwarzanie macierzy pozakomórkowej i apoptozę komórki. Ponadto RFT powodują inaktywację NO, stymulację genów prozapalnych i aktywację wielu kinaz (Dhawan 2014). Reaktywne formy tlenu odgrywają ważną rolę regulacyjną poprzez różne szlaki transdukcji sygnałów między innymi w rozwoju pęcherzyka żółtkowego i w rozwoju płodowo-łożyskowym (Agarwal i wsp. 2008; Menezo i wsp. 2016). Podczas ciąży RFT wytwarzane są naturalnie w trakcie procesów implantacji, proliferacji, różnicowania i wzrost trofoblastu (Ahsan i wsp. 2013). Zwiększenie produkcji RFT jest związane między innymi z funkcjonowaniem łożyska (Pereira i Martel 2014).

W pierwszym trymestrze ciąży stężenie tlenu w łożysku jest niskie, ponieważ nie jest jeszcze połączone z krążeniem matki. Prowadzi to do powstania RFT, które pobudzają proliferację komórek i angiogenezę, w tym indukują produkcję czynników indukujących hipoksję (ang. *hypoxia inducible factor*, HIF), czynnika wzrostu naczyń krwionośnych (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i czynnika wzrostu łożyska (ang. *placenta growth factor*,

PGF) (Agarwal i wsp. 2012; Al-Gubory i wsp. 2010; Pereira i Martel 2014). Tlenek azotu przyczynia się do utrzymania napięcia naczyń krwionośnych w celu zwiększenia przepływu krwi w macicy (Sladek i wsp. 1997).

### **1.1. Stres oksydacyjny (OS)**

Stres oksydacyjny jest spowodowany brakiem równowagi pomiędzy produkcją i akumulacją wolnych rodników, a zdolnością organizmu do detoksykacji tych reaktywnych produktów (Al-Gubory i wsp. 2010; Pizzino i wsp. 2017). Jest wywołany zwiększonym poziomem RFT i/lub RNS lub ochrony antyoksydacyjnej, co może prowadzić do przewlekłego stanu zapalnego (Burton i wsp. 2010; Cindrova-Davies i wsp. 2007; Ruder i wsp. 2009). Powstałe RFT, w tym  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  i  $\cdot OH$ , powodują uszkodzenia białek, DNA i peroksydację lipidów. Powoduje to między innymi zaburzenia integralności błon oraz zmiany w strukturze DNA prowadzące do mutacji lub efektów cytotoksycznych, a także wpływa na metabolizm komórkowy (Waris i Ahsan 2006). Stres oksydacyjny może być bezpośrednią lub pośrednią przyczyną niektórych chorób, w tym cukrzycy, chorób neurodegeneracyjnych (choroby Parkinsona i Alzheimerera, stwardnienia rozsianego), chorób układu krążenia (miażdżycy i nadciśnienia tętniczego), chorób układu oddechowego (astmy), prowadząc do rozwoju zaćmy, reumatoidalnego zapalenia stawów i różnych nowotworów, w tym raka jelita grubego, prostaty, piersi, płuc, pęcherza moczowego (Phaniendra i wsp. 2015; Wołonciej i wsp. 2016).

Wolne rodniki wpływają na różne procesy związane z płodnością. Gamety są wrażliwe na uszkodzenia oksydacyjne i muszą być przed nimi chronione, aby zapewnić utrzymanie gatunku. Stres oksydacyjny może wpływać na strukturę i funkcję plemników, w tym zmniejszenie żywotności i ruchliwości, liczby i potencjału zapładniającego plemników, co może prowadzić do niepłodności (Sharma i Agarwal 1996; Agarwal i wsp. 2006).

Stres oksydacyjny może prowadzić do rozwoju procesów patologicznych zaburzających procesy reprodukcyjne u kobiet (Agarwal 2006; Agarwal i Allamaneni 2004). Reaktywne formy tlenu w płynie pęcherzykowym odgrywają ważną rolę w modulacji oogenezy, folikulogenezy, steroidogenezy jajnikowej, luteolizy i owulacji (Bizerea i wsp. 2018). Niektórzy badacze zwrócili uwagę na

związek pomiędzy OS, a zmianami cyklicznymi endometrium (Bizerea i wsp. 2018). Stwierdzono, że OS może brać udział w patogenezie endometriozy, zespołu policystycznych jajników, przedwczesnej niewydolności jajników oraz niewyjaśnionej niepłodności (Agarwal i wsp. 2012; Lu i wsp. 2018). Ponadto stres oksydacyjny został powiązany z negatywnym wpływem powtarzanej stymulacji jajników na zdolności rozrodcze (Agarwal i wsp. 2005), a także z potencjałem rozwojowym oocytów w warunkach *in vitro* (Soto-Heras i Paramio 2020) lub w odpowiedzi na starzenie się (Lord i Aitken 2013; Mihalas i wsp. 2017).

Ciąża jest okresem zaburzenia stabilności w organizmie matki pod względem fizycznym i fizjologicznym w związku między innymi z adaptacją do utrzymania wzrastającego płodu, przygotowaniem do porodu i karmienia piersią (Soma-Pillay i wsp. 2016). Zmiany fizjologiczne zachodzące w organizmie kobiety w czasie ciąży powodują zwiększone podstawowe zużycie tlenu oraz zmiany w wykorzystaniu związków energetycznych przez różne narządy, w tym jednostkę płodowo-łożyskową (Casanueva i Viteri 2003).

Ciąża jest związana ze zwiększoną podatnością na OS generowany przez ogólnoustrojową odpowiedź zapalną (Ademuyiwa i wsp. 2007; Hubel 1999). Stres oksydacyjny może odgrywać znaczącą rolę w czasie ciąży, inicjacji porodu przedwczesnego i naturalnego porodu (Myatt i Cui 2004; Fainaru i wsp. 2002; Mocatta i wsp. 2004; Wall i wsp. 2002; Pressman i wsp. 2003). Ogólnoustrojowa reakcja zapalna w czasie ciąży powoduje aktywację granulocytów, monocytów i limfocytów szczególnie w trzecim trymestrze ciąży, które produkują duże ilości RFT (Burton i Jauniaux 2011; Redman i Sargent 2011).

Powszechnymi zaburzeniami w czasie ciąży jest peroksydacja lipidów i dysfunkcja komórek śródbłonna. Prawdopodobnie są wywołane przez RFT, które działają na fosfolipidy błon komórkowych i reagują z wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi, tworząc nadtlenki lipidów, powodując uszkodzenie komórek (Hung i wsp. 2002).

Głównym źródłem RFT podczas ciąży jest łożysko (Burton i Jauniaux 2011). Początkowo łożysko jest niedotlenione (Toescu i wsp. 2004). Aktywność łożyska bogatego w mitochondria i wysoki metabolizm matki powoduje wytwarzanie dużej ilości RFT, głównie  $O_2^{\cdot-}$  i NO, które wpływają na przepływ krwi przez łożysko, a tym samym na odżywianie płodu (Ademuyiwa i wsp. 2007; Myatt 2010). Pod koniec I trymestru ciąży łożysko jest w pełni wykształcone, następuje

trzykrotny wzrost stężenia tlenu, co prowadzi do zwiększenia poziomu RFT, głównie w syncytiotrofoblastie. Proces ten jest w pełni regulowany przez wytwarzanie czynnika indukowanego hipoksją 1 $\alpha$  (ang. *hypoxia induced factor 1 alpha*, HIF-1 $\alpha$ ) oraz ekspresję genów kodujących enzymy przeciwutleniające, w tym oksygenazę hemową 1 i 2 (ang. *haem oxygenase*, HO-1 i HO-2), cynkowo-miedziową dysmutazę ponadtlenkową (ang. *Cu/Zn superoxide dismutase*, Cu/Zn-SOD), katalazę i peroksydazę glutationową (Agarwal i wsp. 2012; Al-Gubory i wsp. 2010; Pereira i Martel 2014). W warunkach fizjologicznych procesy te są kontrolowane przez działanie enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów obronnych (Rani i wsp. 2010). Jeżeli produkcja RFT przewyższa możliwości ich neutralizacji przez system antyoksydacyjny łożyska może to prowadzić do rozwoju wielu powikłań i nieprawidłowości w czasie ciąży (Agarwal i wsp. 2012; Al-Gubory i wsp. 2010; Pereira i Martel 2014). Nagromadzenie RFT powoduje zaburzenia rozwojowe łożyska prowadzące do niedostatecznego zaopatrzenia płodu w tlen i składniki odżywcze (Jauniaux i wsp. 2006; Saugstad 1998). Może to przyczynić się do adhezji leukocytów i płytek krwi do śródbłonka naczyń, a także uwalnianie cytokin i czynników antyangiogennych. Rozwijające się zapalenie powoduje zwężenie naczyń krwionośnych i zwiększony opór w krążeniu łożyskowym (Harrington i wsp. 1997).

Stres oksydacyjny prowadzi do zaburzenia funkcjonowania łożyska i może wpłynąć na rozwój płodu poprzez między innymi modulację kluczowych transporterów składników odżywczych, w tym Slc2a1 lub Slc38a1 oraz śmierć komórek (Bartho i wsp. 2019; Umekawa i wsp. 2008). Może powodować powikłania w czasie ciąży, w tym resorpcję krwi, nawracającą utratę ciąży, wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrostu i śmierć płodu (Gupta i wsp. 2007; Webster i wsp. 2008). Stres oksydacyjny i odpowiedź zapalna są bardziej nasilone w stanie przedrzucawkowym (Redman i Sargent 2011). Może to prowadzić do niskiej masy urodzeniowej i wad rozwojowych płodu (Poston i Raijmakers 2004).

Stwierdzono, że poziom OS u kobiet i noworodków po porodzie naturalnym był większy niż u kobiet, które przeszły poród przez cesarskie cięcie (Hracsko i wsp. 2007). W czasie przebiegu ciąży OS ściśle wiąże się z nudnościami i wymiotami ciążowymi, a pośrednio poprzez zmiany

w metabolizmie lipidów wpływa na rozwój cukrzycy ciążowej i makrosomię płodu. Nasila się również uszkodzenie tkanek związane z cukrzycą (Peuchant i wsp. 2004; Toescu i wsp. 2004). Stres oksydacyjny może być odpowiedzialny za zwiększone ryzyko stanu przedrzucawkowego i wad rozwojowych płodu (Leguizamón i wsp. 2006; Damasceno i wsp. 2002). A także nadciśnienie ciążowe, które zwiększa ryzyko przedwczesnego porodu oraz śmiertelność matek (Arribas i wsp. 2016). W przebiegu stanu przedrzucawkowego może dojść do uszkodzenia DNA łożyska, co prawdopodobnie wiąże się z zaburzeniem jego funkcji i zahamowaniem wzrostu płodu. W okresie okołoporodowym bardzo ważne jest zachowanie równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej. Wartości parametrów OS zaraz po porodzie zarówno u matki, jak i dziecka są podwyższone, a w ciągu kilku następujących dni u noworodka dalej rosną. Wykazano, że mleko matki zawiera proporcjonalną do niedoboru u dziecka ilość antyoksydantów, co może świadczyć o jego ochronnej roli w zmniejszeniu stresu oksydacyjnego (Aycicek i wsp. 2006).

Palenie papierosów lub narażenie na dym tytoniowy powoduje wzrost procesów wolnorodnikowych (Zhou i wsp. 2000). Stwierdzono, że dym tytoniowy zawiera ponad 1000 wolnych rodników oraz wzmaga zarówno podstawową, jak i indukowaną peroksydację lipidów (Isik i wsp. 2007; Ramesh i wsp. 2014; Kamceva i wsp. 2016). Dotyczy to również e-papierosów, które niekorzystnie wpływają na układ sercowo-naczyniowy i adhezję komórek odpornościowych (Chatterjee i wsp. 2019).

Stwierdzono, że działanie stresu oksydacyjnego w okresie prenatalnym może prowadzić do wystąpienia niskiej masy urodzeniowej u noworodka (Luo i wsp. 2006). W organizmie noworodków zachodzi wiele zmian fizjologicznych, które istotnie zwiększają zarówno produkcję RFT, jak i możliwość wystąpienia OS (Akçay i wsp. 2013; Friel i wsp. 2004). Zdrowe niemowlęta są w stanie przystosować się do tych zmian, jednak wcześniaki i chore noworodki są bardziej narażone na negatywny wpływ OS ze względu na niedojrzałą endogenną i niewystarczającą egzogenną ochronę antyoksydacyjną (Abdelghany i wsp. 2016; Gitto i wsp. 2012). Wzrost parametrów OS obserwowano u wcześniaków jeżeli u matek występowały stany nagłe w okresie okołoporodowym, w tym stan przedrzucawkowy, niedotlenienie i niewydolność

oddechowa lub zastosowano leczenie (np. tlenoterapia), które zmniejszały ich zdolność antyoksydacyjną oraz zwiększały produkcję RFT (Gitto i wsp. 2009; Negi i wsp. 2015). Zauważono, że RFT odgrywają rolę w patogenezie wielu chorób noworodków, w tym retinopatii wcześniaków, niedotlenienia i niedokrwienia mózgu, krwawienia dokomorowego i przewlekłej choroby płuc (Gitto i wsp. 2009; Saugstad 2005).

## 1.2. System antyoksydacyjny

Wolne rodniki są neutralizowane przez system obrony antyoksydacyjnej. Obecne są w organizmie w małych stężeniach i zapobiegają utlenianiu substratów (Rahman i wsp. 2012; Belviranli i Gökbel 2006). Antyoksydanty podzielono na enzymatyczne i nieenzymatyczne na podstawie ich działania w przedziałach wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych.

Do enzymatycznych antyoksydantów zaliczono dysmutazę ponadtlenkową (ang. *superoxide* dismutase, SOD), peroksydazę glutationową (ang. *glutathione* peroxidase, GPX), katalazę (ang. *catalase*, CAT), reduktazę glutationową (ang. *glutathione reductase*, GSR) i transferazę glutationową (ang. *glutathione S-transferases*, GSTs), które mogą powodować redukcję  $H_2O_2$  do wody i alkoholu (Ademuyiwa i wsp. 2007). Dysmutaza ponadtlenkowa katalizuje dysmutację anionorodnika nadtlenkowego do tlenu oraz nadtlenu wodoru. U ssaków występują trzy jej izoformy: (1) cytoplazmatyczna Cu/Zn SOD (SOD1), (2) mitochondrialna Mn SOD (SOD2) i (3) pozakomórkowa Cu/ZnSOD (SOD3) (Faraci i Didion 2004). Peroksydazę glutationową redukuje  $H_2O_2$  oraz nadtlenuki lipidów do wody i alkoholu, a następnie GPx utlenia glutation (ang. *glutathione*, GSH) do dwusiarczku glutationu (ang. *glutathione disulfide*, GSSG). Katalaza katalizuje konwersję  $H_2O_2$  do wody i tlenu cząsteczkowego, dzięki czemu chroni komórki przed szkodliwym działaniem  $H_2O_2$  wytwarzanego w komórce. Uważany jest za enzym wykazujący największą skuteczność podczas zwiększonego OS, kiedy poziom GSH lub GPx są obniżone. Antyoksydacyjne działanie glutationu związane jest z detoksykacją  $H_2O_2$ , nadtlenuków organicznych i innych reaktywnych form tlenu. Reduktaza tioredoksyny jest odpowiedzialna za procesy redukcyjne zależne od tiolu

w komórce. S-transferaza glutationowa i  $\text{H}_2\text{O}_2$  mogą tworzyć się spontanicznie lub mogą powstawać przez dysmutację  $\text{O}_2^{\bullet-}$  katalizowaną przez SOD:  $2\text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ . Związki siarki są cząsteczkami sygnałowymi w szlakach sygnałowych redoks, które kontrolują i integrują szlaki metaboliczne. Za regulację tych nośników odpowiedzialne są tioredoksyna, GSH/GSSG i para redoks cysteina/cystyna (ang. *cysteine/cystin*, Cys/Cyss) (Trachootham i Ogasawara 2008).

Nieenzymatyczne przeciwutleniacze, w tym witamina C i E, glutation, ubichinon, flawonoidy oraz kofaktory enzymów antyoksydacyjnych, w tym selen, cynk i miedź są zdolne do wychwytywania, usuwania oraz hamowania powstawania RFT (Belviranli i Gökbel 2006). Substancje te powodują przekształcenie wolnych rodników w nieaktywne pochodne. Nieenzymatyczna linia obrony antyoksydacyjnej obejmuje cząsteczki o niskiej masie cząsteczkowej, w tym glutation, kwas moczowy, witaminę A (retinoidy) i karotenoidy. Beta-karoten wykazuje silną aktywność przeciwutleniającą, ponieważ neutralizuje szkodliwe działanie wolnych rodników. Ponadto  $\alpha$ -tokoferol (witamina E), rozpuszczalny w tłuszczach wolnorodnikowy antyoksydant przerywa łańcuchowe reakcje wolnorodnikowe, a ze względu na obecność grupy hydroksylowej (-OH) jest skutecznym donorem wodoru. Kwas askorbinowy (witamina C) jest donorem wodoru lub elektronów. Może działać zarówno jako przeciwutleniacz, jak i jako prooksydant (Chakraborty i wsp. 2014). Owoce i warzywa w diecie są głównym źródłem witaminy C i innych nieenzymatycznych przeciwutleniaczy, w tym flawonoidów i polifenoli. Stężenie tych przeciwutleniaczy jest małe. Bilirubina, kwas liponowy, albumina, ferrytyna, ceruloplazmina i transferyna również wykazują właściwości przeciwutleniające i mogą pośrednio zmniejszać lub hamować tworzenie reaktywnych form tlenu (Dhawan 2014).

W przebiegu ciąży zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej i niedobór przeciwutleniaczy mogą wpływać na rozwój płodu. Dieta kobiet w ciąży zawierająca antyoksydanty wpływa na rozwój płodu (Ahn i wsp. 2007). U pacjentek z samoistnymi poronieniami stwierdzono, że system obrony antyoksydacyjnej jest na niższym poziomie w porównaniu do kobiet, u których nie stwierdzono poronień (Burton i Jauniaux 2011; Burton i Jauniaux 2004; Patil i wsp. 2006). Otyłość matki może indukować stres oksydacyjny i wpływa na

metabolizm w czasie ciąży zaburzać rozwój łożyska i płodu, ponadto może aktywować system immunologiczny (Hernandez-Trejo i wsp. 2017).

### **1.3. Pierwiastki śladowe, a stres oksydacyjny**

Pierwiastki śladowe tworzą linię obrony nieenzymatycznej przed OS. Ponadto wchodzi w skład enzymów antyoksydacyjnych i biorą udział w enzymatycznych mechanizmach antyoksydacyjnych (Wołonciej i wsp. 2016). Ich niedobór powoduje wzrost poziomu markerów stresu oksydacyjnego.

#### **1.3.1. Miedź**

Miedź jest pierwiastkiem kluczowym dla zdrowia i chroni komórki rozrodcze przed działaniem wolnych rodników (Spencer i wsp. 2015). Jest kofaktorem wielu enzymów niezbędnych do wielu procesów metabolicznych, angiogenezy i transportu tlenu. Pierwiastek ten wpływa na prawidłowe funkcjonowanie metylotioneiny i glutationu, a także aktywność niektórych enzymów, w tym Cu/ZnSOD, ceruloplazminy oraz enzymów, które są niezależne od Cu, w tym katalazy i peroksydazy. Małe stężenie Cu w organizmie obniża aktywność tych enzymów. Miedź jest metalem przejściowym, a duże jego stężenie wiąże się z powstawaniem OS (Gaetke i wsp. 2014). Najnowsze badania wykazały, że powikłania w pierwszym trymestrze ciąży częściej występuje u kobiet z większym stężeniem Cu w osoczu niż z niskim. Wykazano, że niedobór Cu w ciąży powoduje upośledzenie mechanizmów antyoksydacyjnych, podczas gdy jego nadmierne stężenie promuje produkcję RFT/RFN (Uriu-Adams i wsp. 2010). Jednak zależności pomiędzy Cu, a poziomem OS nie są jeszcze w pełni poznane.

#### **1.3.2. Żelazo**

Żelazo jest niezbędnym pierwiastkiem, który występuje w dużych ilościach w łożysku. Może to sprzyjać OS ze względu na wytwarzanie RFT, co może prowadzić do uszkodzenia komórek i tkanek (Casanueva i Viteri 2003;



Khayat i wsp. 2017). Żelazo może katalizować tworzenie się RFT w reakcji Fentona lub reakcjach podobnych do tej reakcji, wejść w reakcję z  $H_2O_2$  i wygenerować jedną z reaktywnych form tlenu lub rodnik hydroksylowy ( $\bullet OH$ ) (Bresgen i Eckl 2015; Emerit i wsp. 2001). Może to powodować różnego rodzaju uszkodzenia oksydacyjne DNA, białek i komórek. Żelazo, podobnie jak miedź jest ważnym kofaktorem uczestniczący w utlenianiu, procesach redukcyjnych i metabolizmie antyoksydantów (Venkataramani 2021).

Zarówno niedobór, jak i nadmiar Fe w ciąży jest niekorzystny dla rozwoju płodu (Brannon i Taylor 2017). Wykazano, że nadmiar Fe w okresie prenatalnym może zwiększać ryzyko poronienia, wcześniactwa, niskiej masy urodzeniowej i małego wzrostu w stosunku do wieku ciążowego (ang. *small for gestational age*, SGA). Jednym z prawdopodobnych mechanizmów odpowiedzialnym za te nieprawidłowości jest stres oksydacyjny. U kobiet w ciąży, u których nie wystąpiła niedokrwistość z niedoboru Fe (ang. *iron deficiency anemia*, IDA) profilaktyczna suplementacja Fe wyraźnie indukowała OS i ograniczała zdolność antyoksydacyjną organizmu (Lachili i wsp. 2007; Rak i wsp. 2021).

### 1.3.3. Cynk

Cynk jest niezbędnym pierwiastkiem śladowym pełniącym ważną rolę podczas ciąży. Bierze udział w procesie embriogenezy oraz wzroście i rozwoju płodu (Prasad 2013). Niedobór Zn jest związany z niższym wskaźnikiem implantacji, nieprawidłowym rozwojem jajników, nieprawidłowym wzrostem pęcherzyków jajnikowych i dojrzewaniem oocytów oraz wzrostem liczby spontanicznych poronień (Tian i wsp. 2014).

Niedobór Zn u kobiet w ciąży wiąże się z ryzykiem niskiej masy urodzeniowej noworodków (Wang i wsp. 2015), ponadto może być czynnikiem ryzyka rozwoju stanu przedrzucawkowego (Jin i wsp. 2022). Cynk jest bardzo dobrym antyoksydantem i ma działanie przeciwzapalne. Jony cynku tworzą chelaty z grupami sulfhydrylowymi białek chroniąc je przed procesami prooksydacyjnymi. Cynk chroni błony komórkowe przed peroksydacją przez usuwanie jonów Cu i Fe z miejsc ich wiązania na błonach komórkowych (Wołoncziej i wsp. 2016). Pierwiastek ten uczestniczy w syntezie antyoksydantów oraz jest składnikiem wielu enzymów uczestniczących w metabolizmie lipidów,

węglowodanów i białek. Cynk wraz z miedzią jest kofaktorem Cu/Zn-SOD, a aktywność tego enzymu jest zahamowana w warunkach ich niedoboru Zn (Li i wsp. 2010). Wykazano również, że Zn może wpływać na aktywność innych enzymów antyoksydacyjnych. Cynk jest związany z katalityczną aktywnością fosfatazy zasadowej oraz karboksypeptydazy, a w związku z właściwościami przeciwutleniającymi zapobiega powstawaniu rodników hydroksylowych oraz anionorodników tlenkowych. Pierwiastek ten bierze udział w syntezie, magazynowaniu i uwalnianiu insuliny, co sugeruje kluczową rolę tego mikroelementu w rozwoju cukrzycy typu 2, miażdżycy i zespołu metabolicznego (Ahn i wsp. 2014; Motamed i wsp. 2013; Otto i wsp. 2011).

Jony cynku są transportowane w organizmie przez krew związane z albuminą (60%) i transferyną (10%), pozostała część występuje w postaci wolnej. Jony cynku są niezbędne do prawidłowego przebiegu procesów reprodukcyjnych, a obniżone jego stężenie może prowadzić między innymi do zaburzenia wzrostu i deformacji płodu, stanu przedrzucawkowego, przedwczesnego porodu i krwawienia poporodowego (Jain i wsp. 2010). Niedobór  $Zn^{2+}$  powoduje stres oksydacyjny poprzez zwiększenie peroksydacji lipidów z powodu zmniejszenia aktywności obrony antyoksydacyjnej i niewydolności zależnych od Zn enzymów antyoksydacyjnych, w tym Cu-Zn SOD (Acikgoz i wsp. 2006; Gul i wsp. 2022). Podwyższony stosunek Cu/Zn powoduje dezaktywację enzymów antyoksydacyjnych, w tym Cu/Zn SOD, a wynikający z tego wzrost peroksydacji lipidów i upośledzenie antyoksydacyjnego systemu obronnego są związane z patogenezą stanu przedrzucawkowego. W związku z tym stosunek Cu/Zn może być czynnikiem prognostycznym powikłań sercowo-naczyniowych w stanach przedrzucawkowych (Bakacak i wsp. 2015).

#### **1.4. Potencjalne biomarkery stresu oksydacyjnego**

W związku z tym, że bezpośrednio określenie stężenia RFT z uwagi na ich krótką trwałość jest trudne, dlatego w celu analizy natężenia stresu oksydacyjnego wykorzystywane są białka pełniące rolę markerów. Markerami stresu oksydacyjnego mogą być zarówno cząsteczki podlegające modyfikacji w wyniku oddziaływania z RFT oraz cząsteczki systemu obrony

antyoksydacyjnej, które podlegają zmianom i modyfikacjom w wyniku stresu oksydacyjnego (Katerji i wsp. 2019). Czynnikiem warunkującym użyteczność substancji jako markerów OS jest specyficzność i wrażliwość na zwiększone stężenie RFT, stabilność w czasie umożliwiającą pobranie próbki i wykonanie pomiaru oraz powtarzalność wyników (Ho i wsp. 2013).

DNA, lipidy (w tym fosfolipidy), białka i węglowodany mogą być modyfikowane przez nadmierną ilość RFT *in vivo* (Ho i wsp. 2013). Dlatego pośredni pomiar RFT poprzez badanie uszkodzeń oksydacyjnych, jakie te rodniki powodują w lipidach, białkach i kwasach nukleinowych, jest obiecującym alternatywnym podejściem do oceny stresu oksydacyjnego w próbkach klinicznych.

Obecnie w badaniach naukowych wykorzystywane są różnorodne markery, w tym między innymi dialdehyd malonowy (ang. *malondialdehyde*, MDA), podtlenek azotu (ang. *nitrous oxide*, NO), całkowita zdolność antyoksydacyjna (ang. *total antioxidant capacity*, TAC), całkowita aktywność antyoksydacyjna (ang. *total antioxidant activity*, TAA), dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx), reduktaza glutationowa (GR), produktów peroksydacji lipidów (LPO), 8-okso-2'-deoksyguanozyna (ang. *8-Oxo-2'-deoxyguanosine*, 8-OHdG), dwusiarczek glutationu (GSSG), katalaza (CAT), ponadtlenek ( $O^{2-}$ ), paraoksynaza 1 (ang. *paraoxonase*, PON-1), index stresu oksydacyjnego (ang. *oxidative stress index*, OSI), hs-CRP (ang. *high sensitive CRP*; wysoko czułe białko C-reaktywne), 8-iso-prostaglandyna F<sub>2α</sub> (8-iso-PGF<sub>2α</sub>), prostaglandyna F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), glutation (GSH), i S-transferaza glutationowa (GST). Do tych badań wykorzystuje się różne materiały głównie krew (surowica lub osocze), łożysko, moczu, komórki sznura pępowinowego (komórki z galarety Whartona) i ślinę (Drejz i wsp. 2022; Squillacioti i wsp. 2021).

Biomarkery stresu oksydacyjnego mogą być wykorzystywane w badaniach monitoringowych do pośredniej oceny powikłań ciąży (Schoots i wsp. 2018). Wskaźnikiem nasilenia OS w komórkach i tkankach może być peroksydacja lipidów. Przyczyn zwiększonej intensywności LPO jest wiele, w tym podwyższony poziom krążących lipoprotein, zwiększona aktywność prooksydacyjna łożyska oraz zmiany metaboliczne w czasie ciąży (Jakovljević i wsp. 2012). Najbardziej znanym markerem peroksydacji lipidów jest

dialdehyd malonowy (MDA) powstający w wyniku rozkładu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (Esterbauer i wsp. 1991). Jest on wykładnikiem laboratoryjnym stresu oksydacyjnego w reakcji z kwasem tiobarbiturowym. Ten drugorzędowy produkt peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych jest toksyczny dla komórki. Dialdehyd malonowy może oddziaływać z DNA i białkami, co często prowadzi do mutagenyzy. Ma on także potencjalnie miazdżycogenne i genotoksyczne działanie. Stężenie MDA w surowicy krwi osób zdrowych powinno utrzymywać się na poziomie 0,32-53,8 nmol/ml, a jego stężenie może się istotnie zmieniać w zależności od diety i aktywności fizycznej pacjenta (Khoubnasabjafari i wsp. 2016). Spośród wszystkich utlenionych kwasów tłuszczowych najlepszymi wskaźnikami stresu oksydacyjnego *in vivo* i *in vitro* są obecnie izoprostany o strukturze podobnej do prostaglandyn F<sub>2</sub>, głównie 15-F<sub>2</sub>t-IsoP (inaczej: 8-iso-PGF<sub>2</sub>α, 8-epi-PGF<sub>2</sub>α). Potencjalną wartość prognostyczną 15-F<sub>2</sub>t-IsoP w odniesieniu do chorób o etiologii powiązanej ze stresem oksydacyjnym potwierdzono w wielu badaniach (van 't Erve i wsp. 2015). Przykładem enzymu antyoksydacyjnego, który podlega zmianom i modyfikacjom w wyniku stresu oksydacyjnego jest SOD. Stężenie dysmutazy ponadtlenkowej w surowicy krwi zdrowych osób wynosi 4,315 U/mg. W warunkach stresu oksydacyjnego synteza SOD gwałtownie wzrasta. Natomiast spadek aktywności tego enzymu wiązany jest ze zwiększonym ryzykiem OS (Younus 2018). Stwierdzono, że wskaźnikiem niedotlenienia biorącym udział w komórkowej odpowiedzi na stres oksydacyjny jest czynnik indukowany przez hipoksję 1A (ang. *hypoxia-inducible factor 1*, HIF-1A). Białko to inicjuje początkową odpowiedź na niedotlenienie.

Postuluje się, żeby w położnictwie i ginekologii wprowadzić podstawowy zestaw badań do oceny stresu oksydacyjnego. Powinien on zawierać pomiar stężenia: (1) reaktywnych formy tlenu jako bezpośredniego markera stresu oksydacyjnego, (2) 8-hydroksydeoksyguanozyny jako markera uszkodzenia DNA/RNA, (3) dialdehydu malonowego markera peroksydacji lipidów, a ponadto (4) całkowitą zdolność antyoksydacyjną i (5) stężenie glutationu (Drejza i wsp. 2022).

## **2. Cel badania**

Dostępne są ograniczone dane dotyczące parametrów stresu oksydacyjnego i obrony antyoksydacyjnej w okresie okołoporodowym w przypadku ciąży mnogich. Cięża mnogie są często związane z nieprawidłowościami w łożysku, co może prowadzić do wewnątrzmacicznego zahamowania wzrostu płodu. Dlatego celem tego badania była ocena parametrów stresu oksydacyjnego poprzez określenie stężenia produktów peroksydacji lipidów w błonach płodowych, pępowinie i łożysku pobranych od kobiet w ciąży mnogiej. Dodatkowo oceniono skuteczność ochrony przed stresem oksydacyjnym poprzez pomiar aktywności enzymów antyoksydacyjnych, w tym SOD, CAT, GPX i GR. Ze względu na rolę Fe, Cu i Zn jako kofaktorów enzymów antyoksydacyjnych w prezentowanych badaniach analizowano także stężenia tych pierwiastków w badanych popłodach. W badaniach uwzględniono wiek, wagę i BMI kobiet oraz parametry antropometryczne noworodków (szerokość ramion, wagę, długość ciała, obwód głowy i płeć), wiek ciążowy, a także przyjmowanie suplementów diety w czasie ciąży i palenia papierosów przez kobiety przed ciążą.

## **3. Materiał i metody**

Badanie przeprowadzono w latach 2015-2021. Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (KB-0012/76/14 z 13.10.2014) (Załącznik 4). Pacjentki wyraziły pisemną świadomą zgodę na udział w badaniu (Załącznik 1) i zostały poinformowane o możliwości wycofania tej zgody na dowolnym etapie badania (Załącznik 1). Badania przeprowadzono zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej.

### **3.1. Charakterystyka badanej grupy**

Do badania włączono kobiety w ciąży mnogiej (n=22) i noworodki (n=45). Byli to pacjenci Kliniki Położnictwa i Ginekologii Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego nr 2 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (SPSK 2 PUM). Grupa badana obejmowała 21 ciąż bliźniaczych, w tym dwuowodniowe dwukosmówkowe (n=14), dwuowodniowe jednokosmówkowe

(n=5), jednoowodniowe jednokosmówkowe (n=2) i jedną potrójną ciążę (trojaczki trójowodniowe dwukosmówkowe). Wszystkie ciążę zostały zakończone cięciem cesarskim. Kryteriami włączenia do badania były ciążę mnogie i noworodki zdrowe, bez chorób okołoporodowych, z losowym doбором grupy. Wykluczono niemowlęta z niedokrwistością, nieprawidłowościami chromosomalnymi oraz wadami wrodzonymi. W tabelach 1 i 2 przedstawiono charakterystykę badanych kobiet w ciąży i noworodków.

**Tabela 1.** Charakterystyka badanych kobiet i parametry antropometryczne noworodków (AM, średnia; SD, odchylenie standardowe; Med, mediana; Zakres, min-max)

Parametry	AM±SD	Med.	Zakres
charakterystyka kobiet w ciąży			
wiek (w latach)	31,0±4,8	32,0	21,0-41,0
waga przed ciążą (w kg)	64,2±9,2	63,0	53,0-90,0
BMI przed ciążą	23,7±3,9	24,0	18,3-31,1
waga przed porodem (w kg)	84,0±17,5	81,0	81,5-63,0
przyrost wagi w czasie ciąży (w kg)	17,6±7,7	15,0	8,0-37,0
czas trwania ciąży (w tygodniach)	34,6±2,5	35,0	26,0-38,0
waga łożyska (w g)	550±230	500	510-1300
charakterystyka noworodków			
waga urodzenia (w g)	2247±496	2330	690-3350
długość ciała (w cm)	48,4±4,0	49,0	38,0-55,0
obwód głowy (w cm)	32,3±2,1	32,0	28,0-37,0
szerokość ramion (w cm)	29,5±2,8	30,0	23,0-36,0

**Tabela 2.** Karta Fentona (ang. *Fenton Growth Chart*) dla centyli długości i wagi noworodków płci męskiej (n=54) i żeńskiej (n=65)

centyle długości (cm)	płeć noworodków			centyle wagi (kg)	płeć noworodków		
	męskiej	żeńskej	razem		męskiej	żeńskej	razem
>3 lub <97	19	15	34	<3 lub <97	21	21	42
<3 lub >97	3	8	11	<3 lub >97	1	2	3

Po urodzeniu zastosowano standardowe procedury antropometryczne do pomiaru wagi urodzeniowej, długości ciała, szerokości ramion i obwodu głowy. Wiek ciążowy został określony na podstawie długości ciemieniowo-siedzeniowej płodu (parametr CRL) zmierzonej w pierwszym trymestrze podczas badania ultrasonograficznego lub obliczony na podstawie pierwszego dnia ostatniej miesiączki z wykorzystaniem reguły Naegelego. Wiek, waga i wzrost kobiet, wiek ciążowy, a także parametry antropometryczne noworodków (szerokość ramion, waga, długość ciała, obwód głowy) oraz ich płeć uzyskano z dokumentacji medycznej wraz z danymi dotyczącymi masy łożyska i długości pępowiny.

Dane dotyczące historii palenia tytoniu przed ciążą uzyskano za pomocą kwestionariusza ogólnego. Podczas okresowych wywiadów lekarskich większość kobiet (n=19) zgłosiła przyjmowanie Prenatal DUO<sup>®</sup>, codziennego suplementu fumaranu żelaza (II) w dawce 30 mg.

Wskaźnik masy ciała (BMI) obliczano na podstawie masy ciała kobiety (kg) podzielonej przez wzrost (m<sup>2</sup>). Jedynie 18 kobiet zmieściło się w rekomendowanym przedziale 18,5-24,9 (CDC). Niestety, informacje na temat diety kobiet w czasie ciąży były niedostępne, chociaż wśród uczestniczek badania nie było oznak zaburzeń odżywiania lub niedożywienia.

Każda ciąża zakończyła się cięciem cesarskim (CC) przeprowadzonym przez lekarzy specjalistów z Kliniki Położnictwa i Ginekologii SPSK2 PUM. Ciecie cesarskie polega na chirurgicznym otwarciu jamy brzusznej po nacięciu skóry brzucha nad spojeniem łonowym lub podłużnie między spojeniem łonowym a pępkiem, z następowym nacięciem mięśnia macicy i wydobywaniem płodu oraz popłodów (łożyska, pępowiny i błon płodowych). W dalszym etapie operacji następuje zeszywanie mięśnia macicy oraz powłok brzucha. Celem operacji jest

urodzenie płodów z pominięciem czynników związanych z porodem drogami natury. Łożysko, pępowina i błony płodowe oznaczono numerem kodowym, który był tajny i ściśle chroniony przed osobami trzecimi. Reprezentatywna próbka łożyska o długości 10-15 cm była wycinana ze środka promienia (odległość między wprowadzeniem pępowiny a obwodem) bez części płodowych i macznych. Pępowina i błona płodowa były wykorzystywane do badań w całości.

Łożyska (n=38), pępowiny (n=45) i błony płodowe (n=42) zostały pobrane natychmiast po porodzie, a następnie zważone, zmierzone i przechowywane w temperaturze -27 °C do czasu dalszych analiz. Przed zamrożeniem popłodów pobrano dodatkowo ze środkowych części po 1-2 cm skrawki reprezentatywne do badania parametrów stresu oksydacyjnego. Każda próbka do badania parametrów stresu oksydacyjnego została od razu zamrożona z wykorzystaniem ciekłego azotu, a następnie przełożona do zamrażarki i przechowywana w temperaturze -80 ° C.

### **3.2. Oznaczanie stężenia pierwiastków w badanych próbkach**

Mineralizacja to proces, którego zadaniem jest całkowite usunięcie składników organicznych w celu oznaczenia składników nieorganicznych. Następuje rozkład (utlenianie) węgla w substancjach organicznych do dwutlenku węgla, wodoru do wody, a azot staje się niezwiązanym pierwiastkiem. Natomiast ilościowa mineralizacja to całkowite utlenienie organicznych składników badanej próbki, w związku z tym część nieorganiczna pozostaje niezmienną. Metoda mineralizacji z wykorzystaniem energii mikrofalowej na aparacie MARS 5 (CEM, Matthews, USA) (Ryc. 1) miała za zadanie przygotowanie próbki do analizy z wykorzystaniem aparatu ICP-OES. Aparat MARS z wykorzystaniem energii mikrofalowej podgrzewa próbki. Woda i inne polarne roztwory szybko absorbują energię mikrofalową. Wykorzystuje się specjalne naczynia teflonowe z roztworem jonowym ( $\text{HNO}_3$ ), który poddaje się szybkiemu ogrzaniu i podwyższonemu ciśnieniu, co powoduje szybkie rozpuszczenie badanej próbki.





**Ryc. 1.** Mineralizator mikrofalowy CEM MARS 5 Digestion Oven

### 3.2.1. Przygotowanie próbek do analizy

Przed analizą badany materiał ogrzewano do temperatury pokojowej i suszono przez trzy tygodnie w temperaturze 55°C, a następnie w temperaturze 105°C przez siedem dni do uzyskania stałej masy. Takie postępowanie pozwoliło oznaczyć w badanych próbkach zawartość wody (metodą wagową). Przygotowany materiał rozdrabniano na proszek w moździerzu porcelanowym (Ryc. 2).



**Ryc. 2.** Przygotowanie materiału biologicznego do mineralizacji, rozdrabnianie próbek biologicznych w moździerzu porcelanowym

Do czystych próbek polipropylenowych dodawano 0,2 g 5 ml 65% roztworu HNO<sub>3</sub> Suprapur (Merck, Kenilworth, NJ, USA) i 1 ml niestabilizowanego 30% roztworu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Suprapur (Merck, Kenilworth, NJ, USA). Każdej próbce zapewniono 30-minutowy czas wstępnej reakcji. Po inkubacji przelewano próbki do teflonowych naczyń i poddawano mineralizacji. Proces był podzielony na trzy etapy:

1. stopniowe ogrzewanie próbki do temperatury 180°C przez 15 minut,
2. inkubacja 20 minut w temperaturze 180°C,
3. chłodzenie teflonowych naczyń w mineralizatorze przez 5 minut.

Po wykonaniu wszystkich czynności próbki przelano do czystych próbek polipropylenowych. Przed pomiarem każda próbka została rozcieńczona (Tabela 3), a próba ślepa została przygotowana zgodnie z danymi zawartymi w tabeli 4.

**Tabela 3.** Sposób przygotowania próbek biologicznych do wykonania oznaczeń zawartości badanych pierwiastków

	próbka
Roztwór Itru 5 mg/L (Y)	0,7 ml
Triton x-100 1% roztwór	0,7 ml
Badana próbka	1,4 ml
Kwas HNO <sub>3</sub> 0,075%	4,2 ml
Suma	7,0 ml

**Tabela 4.** Przygotowanie próby ślepej oraz wzorca rozcieńczeń do badań

		na 30 ml									
		IV				XVI			P		
Zerowa	Próba	0,01 mg	0,1 IV	1 mg IV	10 mg IV	0,01 mg XVI	0.1 mg XVI	1mg XVI	P 0,1 mg	P 1 mg	P 5 mg
Wzorzec	0	0,03	0,30	0,03	0,30	0,003	0,03	0,30	0,30	3,0	15
Roztwór											
Itru 5 mg/L (Y)	5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Triton x-100 1% roztwór	5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Kwas 65%	2,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Kwas HNO <sub>3</sub> 0,075%	37,5	22,5	22,2	22,5	22,2	22,5	22,5	22,2	22,2	19,5	7,5
Suma	50 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml

### 3.2.2. Opis metody ICP-OES

Optyczna spektrometria emisyjna ze wzbudzeniem w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-OES) to jedna z metod spektrometrycznych, której podstawowym zadaniem jest pomiar natężenia promieniowania elektromagnetycznego (PE). PE pochodzi ze wzbudzonych termicznie atomów pierwiastków. Wyjątkowość tej techniki polega na połączeniu dwóch elementów:

- spektrografii – rejestr i analiza wzbudzonych pierwiastków,
- fotometrii płomieniowej – wyłapywanie sygnału w formie natężenia emitowanego promieniowania przez badany analit w ciekłej postaci.

Badany materiał zostaje wprowadzony do palnika plazmowego i ulega zmianom chemicznym oraz fizycznym. Rozpuszczalnik i stałe cząstki analitu zostają odparowane tworząc aerozol (proces nebulizacji). Następnie wytworzony aerozol zostaje przeniesiony do kanału plazmy (temperatura około 10000 K), a w wyniku odparowania, rozpylania, wzbudzania i/lub jonizowania powstają atomy i jony. Powstały w ten sposób nietrwały stan wzbudzony powraca w spontaniczny sposób do swojego stanu podstawowego emitując przy tym charakterystyczne dla siebie kwanty promieniowania elektromagnetycznego. Wyemitowana długość fali fotonów jest mierzona i wykorzystana do identyfikacji pierwiastków. Natomiast całkowita ilość fotonów jest wprost proporcjonalna do stężenia pierwiastka w próbce.

Część fotonów emitowanych przez ICP jest gromadzona za pomocą soczewki lub wklęsłego lustro tworząc obraz, który na otworze wejściowym urządzenia służy do wyboru długości fali (monochromator). Charakterystyczna długość fali światła wychodzącego z monochromatora jest przekształcana na sygnał elektryczny przez fotodetektor (PMT). Sygnał jest wzmacniany i przetwarzany przez detektor i prezentowany na ekranie komputera. Sposób uzyskiwania danych jakościowych, czyli występujących pierwiastków w próbce, polega na zidentyfikowaniu obecności emisji przy charakterystycznej fali dla danego pierwiastka. Odczyt trzech linii widmowych umożliwia rzeczywiste sklasyfikowanie pierwiastka i zmniejsza możliwość wystąpienia błędnego odczytu. Interferencje występują bardzo rzadko. Jednak duża liczba linii emisji dostępnych dla pierwiastków i trzykrotny odczyt widma emisji umożliwia

znielowanie takich zakłóceń do minimum. Natomiast dane ilościowe dotyczące stężenia danego pierwiastka w analizie uzyskiwane są za pomocą intensywności emisji widocznych na ekranie komputera w postaci krzywej kalibracji. Przy pomocy wystandaryzowanych roztworów ze znanymi pierwiastkami mierzona jest intensywność emisji. Intensywność można następnie wykreślić na podstawie stężeń wzorców i krzywych kalibracyjnych dla danego pierwiastka. Przy badaniu próbek, w celu ustalenia stężenia pierwiastków, intensywności emisji jest porównywalna do krzywej wzorcowej.

### 3.2.3. Pomiar stężenia pierwiastków

Oznaczenie stężenia pierwiastków (Fe, Cu i Zn) dokonano z wykorzystaniem metody atomowej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w indukcji sprzężonej plazmie (ICP-OES, iCAP 7400 Duo, Thermo Scientific). Aparat wyposażony jest w koncentryczny nebulizator i cyklonową komorę mgłową (Ryc. 3).



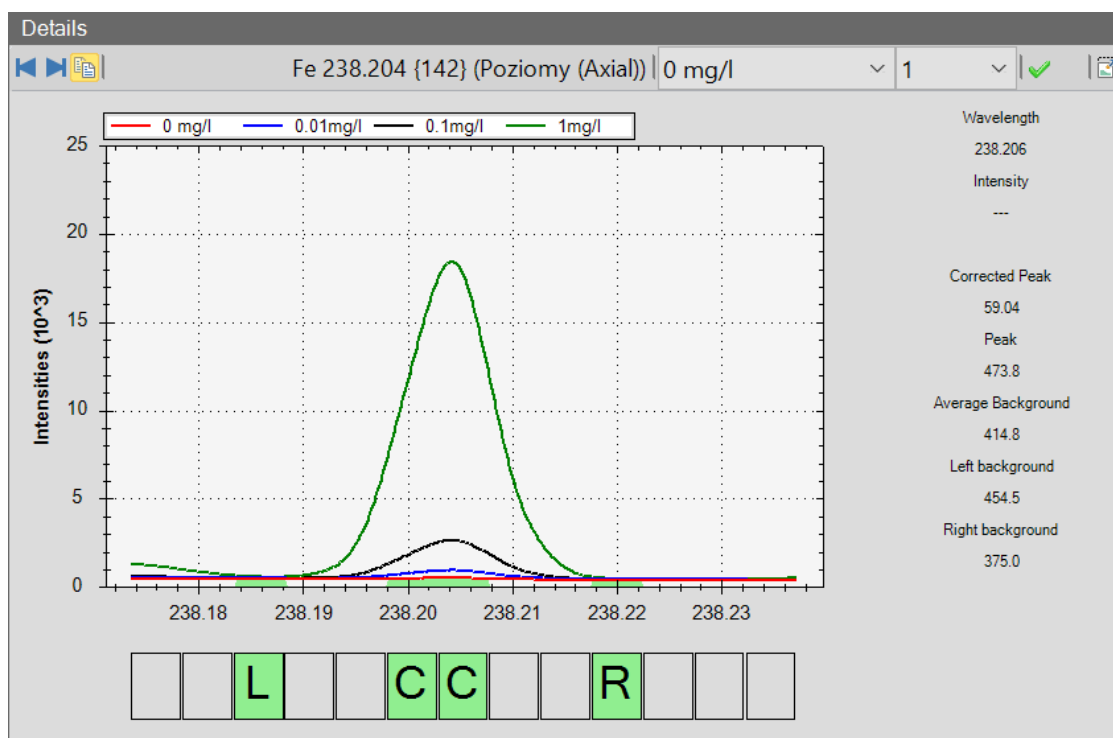
**Ryc. 3.** Aparatu iCAP 7000 (fotografia oryginalna)

Do wykonania krzywej kalibracyjnej został użyty wielopierwiastkowy roztwór wzorcowy (ICP Multi-element standard solution IV, Merck). Roztwory

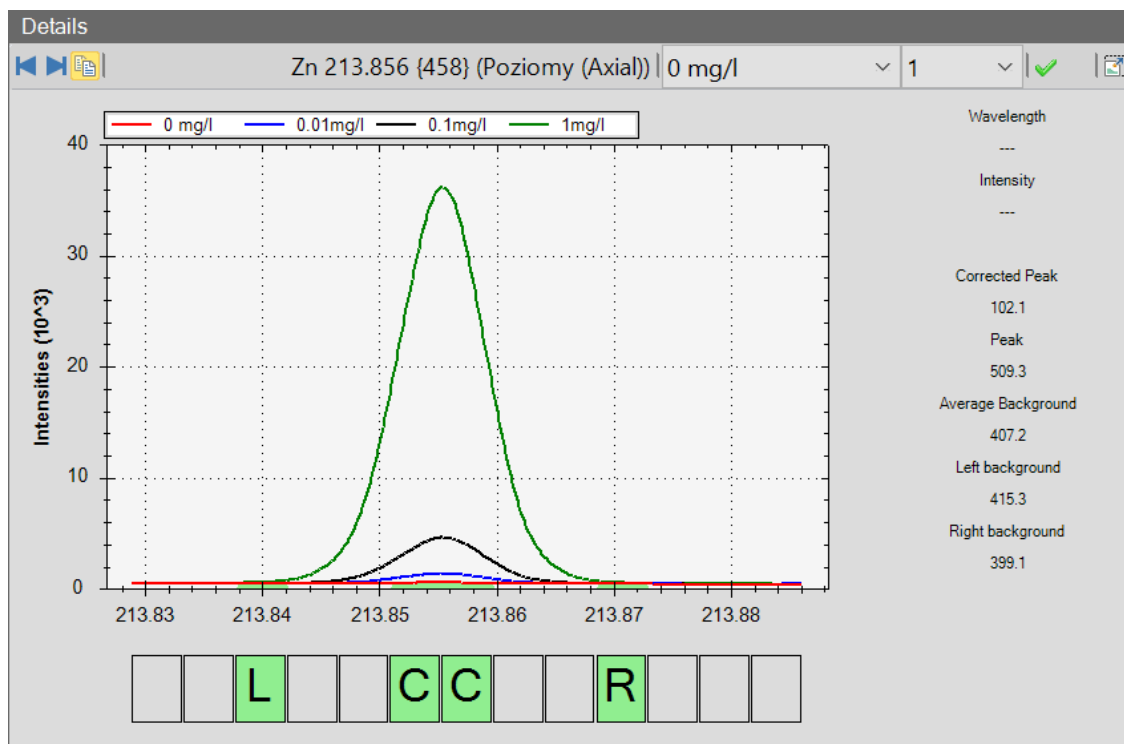
wykonane były przy użyciu wody dejonizowanej (Direct Q UV, Milipore, około 18.0 MΩ). Wzorzec został rozcieńczony według następującego szeregu:

1. 1:1000000, stężenie 0,001 mg/l,
2. 1:100000, stężenie 0,01 mg/l,
3. 1:10000, stężenie 0,1 mg/l,
4. 1:1000, stężenie 1 mg/l.

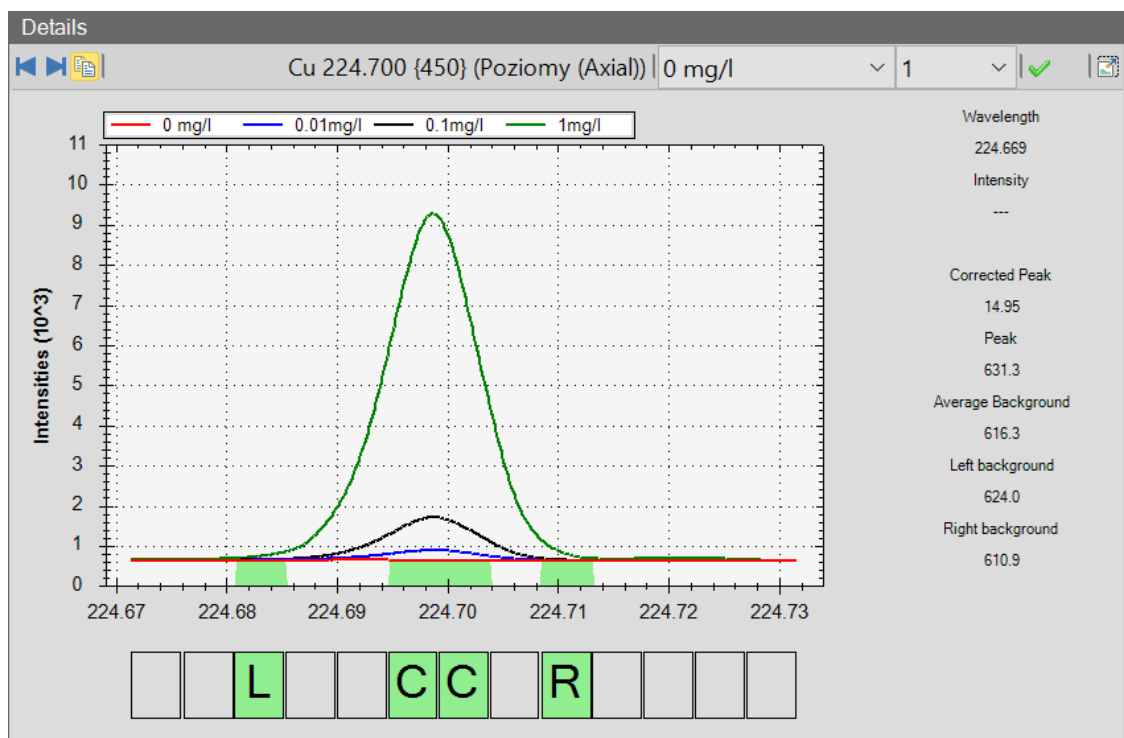
Długość fali (nm) wynosiła Fe=238,204; Zn=213,856; i Cu=224,700. Stężenia Fe, Zn i Cu w łożysku, pępowinie i błonie płodowej przedstawiono w mg/kg<sup>-1</sup> suchej masy (s.m.). Na rycinie 5, 6, 7 przedstawiono wykres widma emisyjnego odpowiednio Fe 238,204 nm; Zn=213,856 nm; i Cu=224,700 nm dla prób badanych i prób kontrolnych.



**Ryc. 4.** Wykres widma emisyjnego żelaza (Fe) 238,204 nm roztworu żelaza w stężeniu 0,01 mg/l, 0,1 mg/l, 1 mg/l oraz próby zerowej (kontroli)



**Ryc. 5.** Wykres widma emisyjnego cynku (Zn) 213,856 nm roztworu cynku w stężeniu 0,01 mg/l, 1,1 mg/l, 1 mg/l oraz próby zerowej (kontroli)



**Ryc. 6.** Wykres widma emisyjnego cynku (Cu) 224,700 nm roztworu miedzi w stężeniu 0,01 mg/l, 1,1 mg/l, 1 mg/l oraz próby zerowej (kontroli)

Limit detekcji (ang. *limit of detection*, LOD) wyraża najniższą wartość, która jest możliwa do uzyskania sygnału analitycznego i może zostać oddzielona od tła (Tabela 5).

**Tabela 5.** Granica wykrywalności i oznaczalności żelaza (Fe), cynku (Zn) i miedzi (Cu)

	Limit detekcji (LOD)
Fe	0,0009 mg/l
Zn	0,0009 mg/l
Cu	0,0016 mg/l

Poprawność toku postępowania analitycznego kontrolowano poprzez oznaczenie badanych pierwiastków w materiale referencyjnym o znanym stężeniu Bovine Muscle Powder NIST 8414 (National Institute of Standards and Technology). Wartości stężenia pierwiastków w materiale referencyjnym podana przez producenta oraz własnych oznaczeń przedstawiono w tabeli 6.

**Tabela 6.** Wartości stężeń badanych pierwiastków w materiale certyfikowanym (w mg/kg suchej masy)

Pierwiastek	Wartość referencyjna (mg/L)	Średni odzysk analizowanych pierwiastków (%)
Fe	71,2±9,2	75,8
Zn	142,0±14,0	148,0
Cu	2,84±0,45	3,12

W celu ograniczenia dryfu podczas analizy została użyta korekcja o wynik itru (Y). Itr (Y) o stężeniu 5 mg/L użyto jako wzorzec wewnętrzny. W celu wyliczenia w aparacie czynnika posłużyły zmiany intensywności widma standardu wewnętrznego. Procent odzysku wzorca wewnętrznego Y wynosił 89-105%.



### 3.3. Oznaczenie stresu oksydacyjnego

#### 3.3.1. Przygotowanie próbek do badań

Próbki biologiczne poddano homogenizacji nożycowej przeznaczonej do rozpraszania i emulgowania materiałów organicznych i nieorganicznych w stanie ciekłym i stałym. Podczas pracy materiał był wciągany na dno końcówki uszczelnionej ETFE przez wirnik i wypychany na boki przez szczeliny. Końcówka działała jako idealne miejsce przepływu materiału, zapobiega dużym rotacjom i umożliwia wprowadzenie dużej energii mechanicznej na bardzo małej przestrzeni. Homogenizacja trwała kilka minut i uzyskano optymalną redukcję wielkości.

Zebrany materiał wielkości kilkunastu milimetrów został zamrożony w  $-80^{\circ}\text{C}$ , a następnie poddany homogenizacji nożowej (Ryc. 7) z wykorzystaniem następujących buforów:

- **Bufor I:** 50 mM Tris-HCL, pH 7,5, 5 mM EDTA, 1mM DTT  
Do oznaczenia: **GPx, SOD**
- **Bufor II:** 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,5, 1 mM EDTA  
Do oznaczenia: **GR, CAT**
- **Bufor III:** 20 mM Tris-HCL, pH 7,  
Do oznaczenia: **LPO**



Ryc. 7 Homogenizator nożowy

### 3.3.2. Oznaczanie zawartości białka w tkankach

Oznaczenie stężenia białka w próbce badanej było niezbędne do oszacowania ostatecznej wartości aktywności enzymatycznej markerów stresu oksydacyjnego. Do oznaczania stężenia białka wykorzystano metodę Bradforda (1976).

Stężenia białka w próbkach mierzono za pomocą zestawu MicroBCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Peirce Biotechnology, Stany Zjednoczone) i czytnika płytek (BiochromASYS UVM340). W pierwszym etapie badań wykonano serię rozcieńczeń celem uzyskania krzywej standardowej według tabeli 7. Następnie pobierano po 23  $\mu$ l homogenatu z badanych próbek po homogenizacji nożowej i dodawano do probówek z 2  $\mu$ l 50% roztworu NaOH. Inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 60°C w bloku grzewczym, a następnie wirowano (10 min/3000 rpm) uzyskując supernatant. W celu oznaczenia białka wykonano kolejne rozcieńczenie z 10  $\mu$ l supernatantu oraz 90  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Do oceny próbek badanych wykorzystano rozcieńczenie 20  $\mu$ l supernatantu oraz 130  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i 150  $\mu$ l odczynnika WB (ang. *Working Buffer*). Następnie inkubowano w cieplarni przez 2 godziny w temperaturze 37°C i wykonano odczyt absorbancji przy długości fali 562 nm.

**Tabela 7.** Seria rozcieńczeń w celu uzyskania krzywej standardowej (wzorzec)

Oznaczenie	Ilość standardu	
	H <sub>2</sub> O (ml)	wzorzec
A	4,5	0,5 ml standard
B	8,0	2,0 ml A
C	4,0	4,0 ml B
D	4,0	4,0 ml C
E	4,0	4,0 ml D
F	4,0	4,0 ml E
G	4,8	3,2 ml F
H	4,0	4,0 ml G
J (ślepa próba)	8	-

### **3.3.3. Oznaczanie aktywności enzymów antyoksydacyjnych i parametrów stresu oksydacyjnego**

#### **3.3.3.1. Oznaczenie aktywności reduktazy glutationowej**

Aktywność reduktazy glutationowej określono za pomocą zestawu Glutathione Reductase Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, Stany Zjednoczone) i postępowano zgodnie z instrukcją producenta. W pierwszym etapie do studzienek stanowiących tło (studzienki nieenzymatyczne, ang. *Background wells*, BW) dodano 120  $\mu$ l buforu do oznaczania (ang. *Assay Buffer*, AB) oraz 20  $\mu$ l utlenionego glutationu (GSSG) (Tabela 8). Następnie do studzienek stanowiących kontrolę pozytywną (PC) dodano 100  $\mu$ l buforu do oznaczania, 20  $\mu$ l GSSG oraz 20  $\mu$ l rozcieńczonego roztworu reduktazy glutationowej pochodzącej z drożdży piekarskich (kontrola) (Tabela 8). W kolejnym etapie do studzienek z próbkami badanymi (każda po trzy powtórzenia) dodano 100  $\mu$ l buforu do oznaczania (AB), 20  $\mu$ l GSSG i 20  $\mu$ l próbki badanej. Następnie do wszystkich studzienek dodano 50  $\mu$ l NADPH celem zainicjowania reakcji. Ostrożnie przemieszano 96-dołkową przez kilka sekund. Odczyt absorbancji wykonywano raz na minutę przy długości fali 340 nm za pomocą spektrofotometru Alpha 40 (PerkinElmer). Aktywność GR określano jako ilość próbki wymaganej do utlenienia 1  $\mu$ M NADPH na minutę w oparciu o absorbancję cząsteczkową  $6,22 \times 10^6$  dla NADPH i wyrażono jako  $U/mg^{-1}$  białka.

**Tabela 8.** Płytką 96-dołkowej dla oznaczenia aktywności GR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BW	BW	BW	7	7	7	15	15	15	23	23	23
B	PC	PC	PC	8	8	8	16	16	16	24	24	24
C	1	1	1	9	9	9	17	17	17	25	25	25
D	2	2	2	10	10	10	18	18	18	26	26	26
E	3	3	3	11	11	11	19	19	19	27	27	27
F	4	4	4	12	12	12	20	20	20	28	28	28
G	5	5	5	13	13	13	21	21	21	29	29	29
H	6	6	6	14	14	14	22	22	22	30	30	30

### 3.3.3.2. Oznaczenie aktywność peroksydazy glutationowej

Aktywność komórkowej peroksydazy glutationowej mierzono przy użyciu komercyjnego zestawu Glutathione Peroxidase Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, Stany Zjednoczone) i postępowano zgodnie z instrukcją producenta. Do pierwszych trzech studzienek stanowiących tło (BW) dodawano 70 µl buforu do oznaczania (AB), 50 µl mieszaniny współsubstratów (glutationu i reduktazy glutationowej) i 50 µl NADPH. Do kontrolnych studzienek z kontrolą pozytywną (PC) dodawano 50 µl buforu do oznaczania (AB), 50 µl mieszaniny współsubstratów, 50 µl NADPH i 20 µl rozcieńczonej peroksydazy glutationowej (kontrola) pochodzącej z erytrocytów bydlęcych (Tabela 9). Do studzienek badanych (każda po trzy powtórzenia) dodawano 50 µl buforu do oznaczania, 50 µl mieszaniny współsubstratów, 50 µl NADPH i 20 µl próbki badanej. Następnie dodawano do wszystkich studzienek 20 µl wodoronadtlenku tert-butylu (ang. *Cumen Hydroperoxide*) celem zainicjowania reakcji. Ostrożnie mieszano przez kilka sekund. Odczyt absorbancji wykonywano raz na minutę przy długości fali 340 nm za pomocą spektrofotometru Alpha 40 (PerkinElmer). Aktywność GPx wyrażono jako U/mg białka<sup>-1</sup>.

**Tabela 9.** Płytką 96-dołkowej dla oznaczenia aktywności GPx

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BW	BW	BW	7	7	7	15	15	15	23	23	23
B	PC	PC	PC	8	8	8	16	16	16	24	24	24
C	1	1	1	9	9	9	17	17	17	25	25	25
D	2	2	2	10	10	10	18	18	18	26	26	26
E	3	3	3	11	11	11	19	19	19	27	27	27
F	4	4	4	12	12	12	20	20	20	28	28	28
G	5	5	5	13	13	13	21	21	21	29	29	29
H	6	6	6	14	14	14	22	22	22	30	30	30

### 3.3.3.3. Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej

Do oznaczania aktywności całkowitej (Cu-Zn i Mn) dysmutazy ponadtlenkowej wykorzystano zestaw Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, Stany Zjednoczone) i wykonano go zgodnie z procedurą producenta. Test ten wykorzystuje sól tetrazolową do wykrywania rodników ponadtlenkowych generowanych przez oksydazę ksantynową. Przed rozpoczęciem procedury przygotowano rozcieńczenie standardu SOD za pomocą rozcieńczonego buforu do próbek w celu uzyskania roztworu podstawowego SOD. Następnie wykonano serię rozcieńczeń z odczynnikiem Sample Buffer (rozcieńczony) celem uzyskania krzywej standardowej według tabeli 11. Następnie na płytkę 96-dołkową nakładano 200 µl roztworu soli tetrazolowej (Radical Detector) rozcieńczonej 50 mM buforem Tris-HCl o pH 8.0 zawierającym 0,1 mM kwas dietylenotriaminopentaoctowy y i 0,1 mM hipoksantynę (AB) oraz 10 µl próby badanej lub wzorca (Tabela 10). W kolejnym etapie dodawano 20 µl rozcieńczonej oksydazy ksantynowej, delikatnie mieszano przez kilka sekund i poddawano inkubacji na wytrząsarce przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Aktywność SOD określano przez pomiar absorbancji przy długości fali 450 nm za pomocą spektrofotometru Alpha

40 (PerkinElmer). Aktywność enzymatycznej dysmutazy ponadtlenkowej została wyrażona w U/mg białka<sup>-1</sup> w danej próbce.

**Tabela 10.** Płytką 96-dołkowej dla oznaczenia aktywności SOD

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	A	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34
B	B	B	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
C	C	C	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
D	D	D	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
E	E	E	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
F	F	F	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
G	G	G	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40
H	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33	41	41

**Tabela 11.** Seria rozcieńczeń w celu uzyskania krzywej standardowej (wzorzec)

Oznaczenie	Ilość standardu SOD ( $\mu$ l)	Ilość buforu do rozcieńczania próbek ( $\mu$ l)
A	0	1,000
B	20	980
C	40	960
D	80	920
E	120	880
F	160	840
G	200	800

#### 3.3.3.4. Oznaczenie aktywności katalazy

Oznaczenie aktywność katalazy przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu Catalase Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, Stany Zjednoczone) i wykonywano go zgodnie z procedurą producenta. Test ten

wykorzystuje peroksydazową funkcję katalazy do oznaczania jej aktywności enzymatycznej.

W pierwszym etapie rozcieńczono 20  $\mu$ l standardu zawierającego formaldehyd za pomocą 9,99 ml rozcieńczonego buforu do próbek, aby otrzymać roztwór podstawowy 4,25 mM formaldehydu. Następnie wykonano serię rozcieńczeń z roztworem podstawowym 4,25 mM formaldehydu do rozcieńczania próbek celem uzyskania krzywej standardowej (Tabela 13). Na płytkę 96-dołkową nakładano 100  $\mu$ l 10 mM roztwór fosforanu potasu o pH 7.0 (AB), 30  $\mu$ l metanolu oraz 20  $\mu$ l próby badanej, wzorca lub kontroli pozytywnej (katalaza z wątroby bydłowej) (Tabela 12). Następnie dodawano 20  $\mu$ l 8,82 M roztworu nadtlenku wodoru. Delikatnie mieszano próbki i zaklejoną folią płytkę inkubowano na wytrząsarce przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie w celu zatrzymania reakcji dodawano 30  $\mu$ l 10 M wodorotlenku potasu oraz 30  $\mu$ l purpaldu, ponownie zaklejało płytkę folią i inkubowano na wytrząsarce przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Po dodaniu 10  $\mu$ l roztworu nadjodanu potasu w 0,5 M wodorotlenku potasu próby ponownie wytrząsano pod przykryciem w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Aktywność CAT określano poprzez pomiar absorpcji przy długości fali 540 nm za pomocą spektrofotometru Alpha 40 (PerkinElmer). Aktywność katalazy wyrażono jako U/mg białka<sup>-1</sup>.

**Tabela 12.** Płytkę 96-dołkowej dla oznaczenia aktywności CAT

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	A	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33
B	B	B	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34
C	C	C	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
D	D	D	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
E	E	E	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
F	F	F	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
G	G	G	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
H	PC	PC	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40

**Tabela 13.** Seria rozcieńczeń w celu uzyskania krzywej standardowej (wzorzec).

Oznaczenie	Ilość standardu formaldehydu ( $\mu\text{l}$ )	Ilość buforu do rozcieńczania próbek ( $\mu\text{l}$ )
A	0	1,000
B	10	990
C	30	970
D	60	940
E	90	910
F	120	880
G	150	850

### 3.3.3.5. Oznaczenie ilości produktów peroksydacji lipidów

Oznaczenie ilości produktów peroksydacji lipidów mierzono przy użyciu zestawu Lipid Peroxidation (LPO) Assay (G-Biosciences, Stany Zjednoczone) zgodnie z procedurą producenta. Wykonano serię rozcieńczeń z rozcieńczonym buforem (standard LPO, ang. *LPO Reagent A Solution*) do rozcieńczania próbek celem uzyskania krzywej standardowej (Tabela 15). Następnie w osobnych probówkach zmieszano po 100  $\mu\text{l}$  wzorca (Tabela 14) i 325  $\mu\text{l}$  uprzednio przygotowanego roztworu LPO roztworu odczynnika A (ang. *Reagent A solution*). Dokładnie taką samą procedurę zastosowano dla próbek badanych. Do powstałych mieszanin (wzorca i próbek badanych) dodawano 75  $\mu\text{l}$  LPO odczynnik B (ang. *LPO Reagent B*), dokładnie mieszano i inkubowano przez 40 minut w temperaturze 40°C. Następnie przeniesiono 200  $\mu\text{l}$  supernatantu z każdej probówki na płytkę 96-dołkową (Tabela 14). Zmierzono absorbancję przy 586 nm za pomocą spektrofotometru Alpha 40 (PerkinElmer). Stężenie produktów LPO wyrażono jako U/mg białka<sup>-1</sup>.



**Tabela 14.** Płytką 96-dołkowej dla oznaczenia aktywności LPO

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	S1	S1	1	1	9	9	17	17	25	25	33	33
<b>B</b>	S2	S2	2	2	10	10	18	18	26	26	34	34
<b>C</b>	S3	S3	3	3	11	11	19	19	27	27	35	35
<b>D</b>	S4	S4	4	4	12	12	20	20	28	28	36	36
<b>E</b>	S5	S5	5	5	13	13	21	21	29	29	37	37
<b>F</b>	S6	S6	6	6	14	14	22	22	30	30	38	38
<b>G</b>	S7	S7	7	7	15	15	23	23	31	31	39	39
<b>H</b>	S8	S8	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40

**Tabela 15.** Seria rozcieńczeń uzyskania krzywej standardowej (wzorzec).

<b>Nr standard</b>	<b>Standard LPO [<math>\mu</math>L]</b>	<b>H<sub>2</sub>O [<math>\mu</math>L]</b>
S1 (Blank)	0	1000
S2	5	995
S3	10	990
S4	20	980
S5	30	970
S6	40	960
S7	50	950
S8	60	940

#### 4. Opracowanie statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu programu Statistica v13.0 (Stat Soft). W celu zbadania normalności rozkładu danych przeprowadzono analizę Shapiro-Wilka. Ze względu na nienormalny rozkład danych do analizy zależności między zmiennymi wykorzystano korelację rang Spearmana, określając wartość współczynnika i poziom istotności statystycznej ( $\rho$ ,  $p$ ). W celu oceny różnic między badanymi parametrami zastosowano test Kruskala-Wallis ANOVA lub test U Manna-Witneya. Poziom istotności przeprowadzonych analiz przyjęto dla wartości  $p < 0,05$ .

#### 5. Wyniki

##### 5.1. Stężenie pierwiastków w popłodach

Średnie stężenie wody w łożysku, błonie płodowej i pępowinie wynosiło odpowiednio około 83%, 85% i 88%. Stężenia Fe, Zn i Cu w łożysku, pępowinie i błonie płodu przedstawiono w Tabeli 16. Największe stężenie Fe ( $417,5 \text{ mg/kg}^{-1}$  s.m.) stwierdzono w łożysku, a najmniejsze w pępowinie ( $200,2 \text{ mg/kg}^{-1}$  s.m.). Stężenie Zn było największe w łożysku ( $50,21 \text{ mg/kg}^{-1}$  s.m.), a najmniejsze w błonie płodowej ( $36,91 \text{ mg/kg}^{-1}$  s.m.). Natomiast największe stężenie Cu stwierdzono w błonie płodowej ( $7,26 \text{ mg/kg}^{-1}$  s.m.), podczas gdy najmniejsze stężenie Cu stwierdzono w łożysku ( $4,47 \text{ mg/kg}^{-1}$  s.m.). Odpowiednio stężenia Fe, Cu i Zn różnią się istotnie między pępowiną, łożyskiem i błoną płodową (Ryc. 8-10).

W badaniu określono korelacje pomiędzy stężeniami Fe, Cu i Zn w łożysku, pępowinie i błonie płodowej, a parametrami antropometrycznymi noworodków, wiekiem, wagą i BMI kobiet, wiekiem ciążowym oraz paleniem papierosów w czasie ciąży i przyjmowaniem suplementów diety w czasie ciąży. Stwierdzono silne dodatnie korelacje pomiędzy stężeniami Cu i Zn w błonie płodowej ( $\rho=0,66$ ); stężenia Zn i Fe w łożysku ( $\rho=0,61$ ). Dodatkowo stwierdzono korelację między stężeniem Zn w błonie płodowej, a szerokością ramion noworodka ( $\rho=-0,35$ ); między stężeniem Cu w łożysku, a (i) wagą łożyska ( $\rho=0,46$ ) i (ii) szerokością ramion noworodka ( $\rho=0,36$ ); między stężeniem Cu w pępowinie, a (i) obwodem głowy noworodka ( $\rho=0,36$ ), (ii) wagą

urodzeniową noworodka ( $p=0,35$ ) oraz między stężeniem Fe w łożysku, a wagą łożyska ( $p=0,33$ ).

Ponadto porównano stężenia Fe, Cu i Zn w łożysku, pępowinie i błonie płodu oraz parametry matki i noworodków, wiek ciążowy, suplementację i palenie papierosów. Test U Manna-Whitneya wykazał:

- większe stężenie Zn w łożysku u kobiet niepalących w porównaniu z kobietami palącymi przed ciążą ( $p=0,01$ ) (Ryc. 11);
- większe stężenie Fe u noworodków o długości  $>3$  lub  $< 97$  centyli w porównaniu do noworodków o długości  $<3$  lub  $> 97$  ( $p=0,02$ ) (Ryc. 12);
- większe stężenie Cu w łożysku kobiet w wieku ciążowym  $\geq 37$  tygodnia w porównaniu do kobiet w wieku ciążowym  $<37$  tygodnia (Ryc. 13).

## **5.2. Analiza parametrów stresu oksydacyjnego i aktywności enzymów antyoksydacyjnych**

W tabeli 17 przedstawiono dane dotyczące stężenia produktów peroksydacji lipidów oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych (SOD, CAT, GPx, GR) w błonach płodowych, pępowinach i łożyskach pobranych od kobiet w ciąży mnogiej. Najwyższe stężenie produktów peroksydacji lipidów stwierdzono w łożysku, natomiast niższe stężenia zaobserwowano w pępowinie i błonie płodowej. W badanych próbkach zaobserwowano, że aktywność enzymów antyoksydacyjnych układała się w następujący szereg:

- dla CAT i SOD: pępowina  $>$  błona płodowa  $>$  łożysko;
- dla GPx: błona płodowa  $>$  łożysko  $>$  pępowina;
- dla GR: łożysko  $>$  pępowina  $>$  błona płodowa.

Aby ocenić, czy mechanizm obrony antyoksydacyjnej jest wystarczający w okresie okołoporodowym, zbadano stosunek SOD/GPx i SOD/CAT (Tabela 17). Najwyższy wskaźnik stosunku SOD/GPx zaobserwowano w pępowinie, natomiast wartość stosunku SOD/CAT był podobny we wszystkich badanych tkankach. Zaobserwowano istotne różnice w stosunku SOD/GPx i SOD/CAT pomiędzy niektórymi analizowanymi parametrami: SOD/GPx i GPx w błonie płodowej ( $p=-0,67$ ); SOD/GPx i SOD w błonie płodowej ( $p=0,64$ ); SOD/GPx i GPx w łożysku ( $p=-0,85$ ); SOD/GPx i SOD w łożysku ( $p=0,39$ ); SOD/GPx w łożysku i Cu w pępowinie ( $p=0,35$ ); SOD/GPx i GPx w pępowinie

( $\rho=-0,55$ ); SOD/GPx i SOD w pępowinie ( $\rho=0,60$ ); SOD/CAT w błonie płodowej i GPx w pępowinie ( $\rho=0,32$ ); SOD/ CAT i CAT w błonie płodowej ( $\rho=-0,45$ ); SOD/ CAT i SOD w błonie płodowej ( $\rho=0,70$ ); SOD/ CAT i GR w łożysku ( $\rho=-0,37$ ); SOD/ CAT i CAT w łożysku ( $\rho=-0,70$ ); SOD/ CAT i SOD w łożysku ( $\rho=0,41$ ); SOD/CAT w łożysku i SOD w pępowinie ( $\rho=-0,55$ ); SOD/CAT w pępowinie i GPx w łożysku ( $\rho=-0,36$ ); SOD/CAT w pępowinie i CAT w łożysku ( $\rho=0,47$ ); SOD/CAT i SOD w pępowinie ( $\rho=0,82$ ); SOD/CAT i Zn w pępowinie ( $\rho=0,36$ ) oraz SOD/CAT i Cu w pępowinie ( $\rho=0,52$ ).

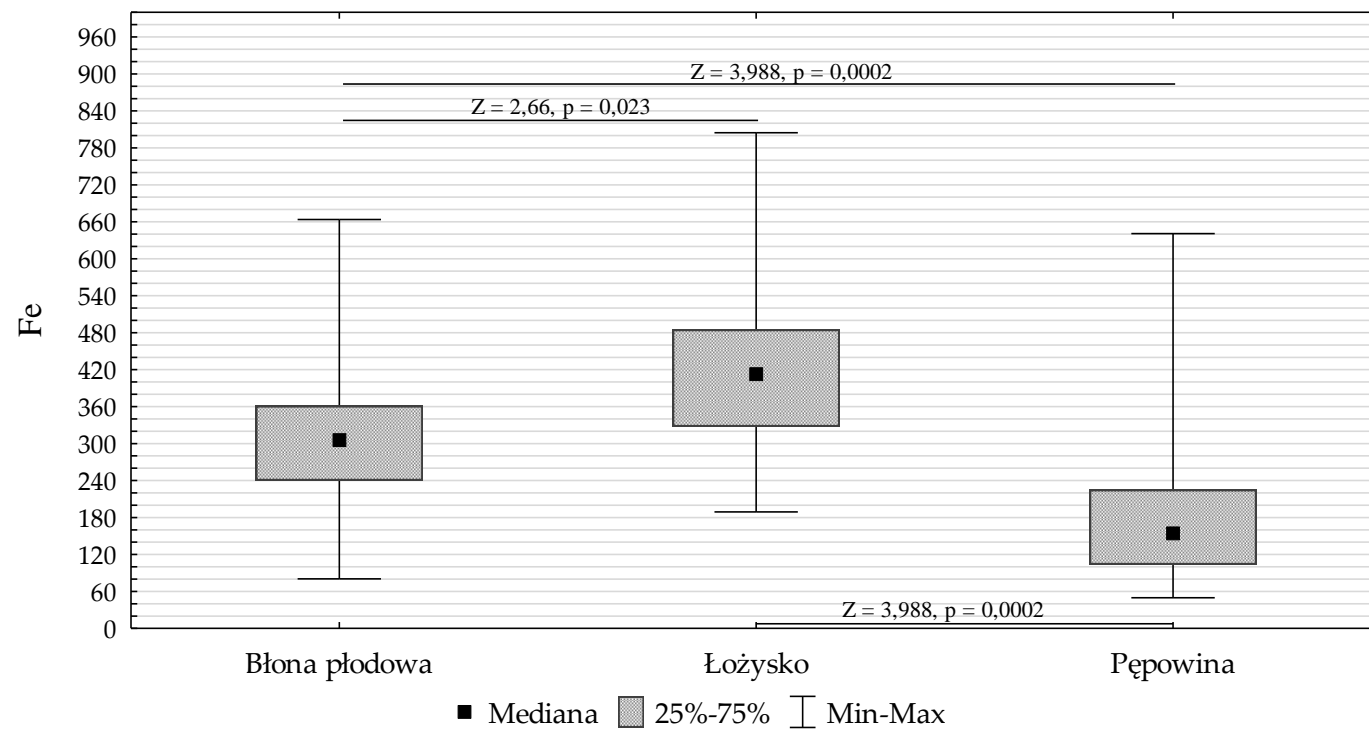
Ponadto określono korelacje między aktywnością enzymów antyoksydacyjnych (GPx, GR, CAT, SOD)/stresem oksydacyjnym (produkty LPO), a parametrami antropometrycznymi noworodków, wiekiem, wagą i BMI matek, wiekiem ciążowym, stosowaniem suplementacji w czasie ciąży i paleniem papierosów przed ciążą (Tabela 16). Stwierdzono ujemne korelacje między stężeniem Fe i produktów LPO w błonie płodowej ( $\rho=-0,50$ ) i w łożysku ( $\rho=-0,58$ ). Ponadto odnotowano korelację pomiędzy stężeniem Cu i aktywnością SOD w pępowinie ( $\rho=0,55$ ).

Określono także zależności pomiędzy obroną antyoksydacyjną (SOD, CAT, GPx, GR) a stresem oksydacyjnym (produktami LPO) w łożysku, pępowinie i błonie płodu oraz badanymi parametrami kobiet w ciąży i noworodków (Tabela 16). A także porównano aktywność SOD, CAT, GPx, GR i LPO w łożysku, pępowinie i błonie płodowej z wiekiem, wagą i BMI matki, parametrami antropometrycznym noworodków, wiekiem ciążowym, suplementacją i paleniem papierosów przez kobiety w ciąży. Test U Manna-Whitneya wykazał:

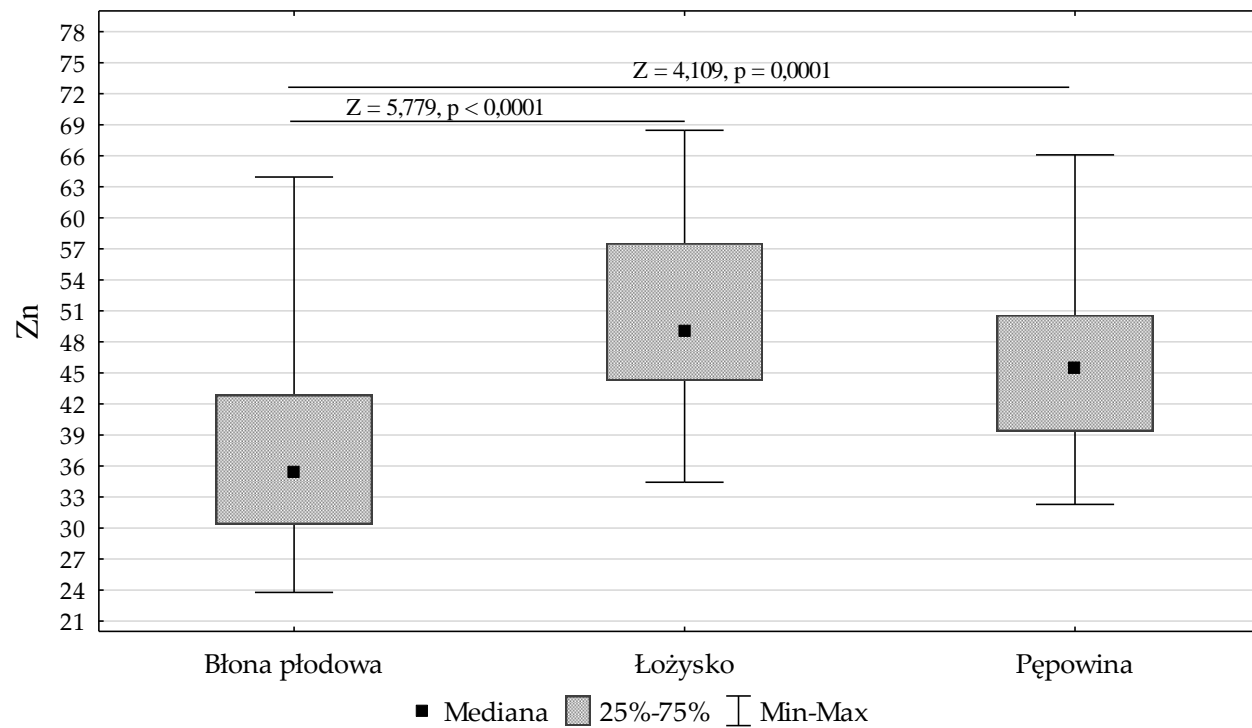
- spadek aktywności GPx w pępowinie kobiet, które nie przyjmowały suplementów w porównaniu do kobiet, które je stosowały (Ryc. 14);
- zwiększenie aktywności CAT w pępowinie u noworodków z prawidłową masą urodzeniową w porównaniu z niemowlętami z niską masą urodzeniową (Ryc. 15);
- zwiększenie aktywności SOD w łożysku kobiet niepalących w porównaniu do kobiet palących papierosy przed ciążą (Ryc. 16);
- zmniejszenie aktywność GR w łożyska kobiet z BMI od  $>18,5$  do  $<25$  w porównaniu do kobietami z BMI  $<18,5$  i  $>25$  (Ryc. 17).

**Tabela 16.** Stężenie żelaza (Fe), cynku (Zn) i miedzi (Cu) w łożysku, pępowinie i błonie płodowej kobiet w ciąży mnogiej (mg/kg<sup>-1</sup>; sucha masa, s.m.) (AM, średnia arytmetyczna; Med, mediana; Zakres, Min-Max; SD, odchylenie standardowe)

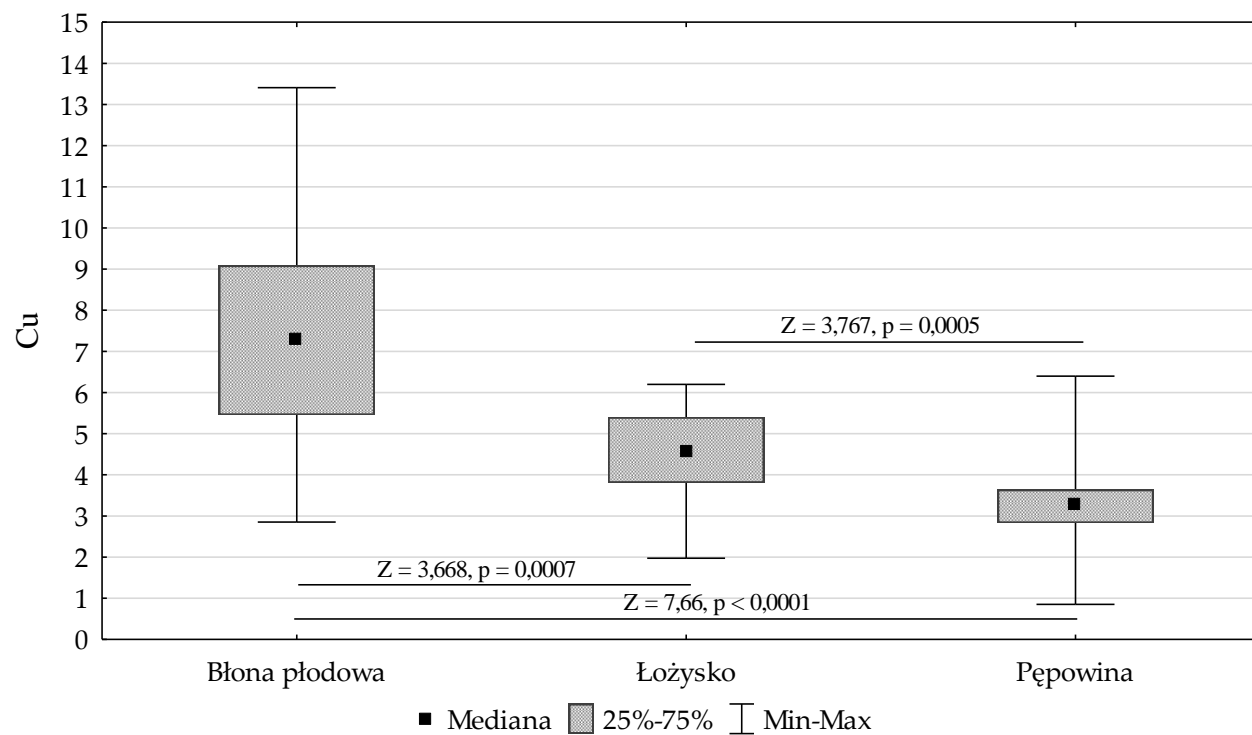
Pierwiastek	łożysko			pępowina			błona płodowa		
	AM±SD	Med	Zakres	AM±SD	Med	Zakres	AM±SD	Med	Zakres
Noworodki razem (n=22) = bliźnięta (n=21) + trojaczki (n=1)									
Fe	417,5±133,3	412,9	189,2- 804,6	200,2±138,6	154,3	49,77- 640,8	317,1±117,1	306,5	80,53- 663,8
Zn	50,21±8,41	48,98	34,42- 68,47	45,88±7,80	45,44	32,28- 66,08	36,91±9,14	35,42	23,78- 63,95
Cu	4,47±1,09	4,58	1,97-6,2	3,21±0,98	3,28	0,85-6,40	7,26±2,54	7,31	2,85- 13,41



**Ryc. 8.** Zastosowanie testu Kruskala-Wallisa do porównania stężenia żelaza (Fe) w łożysku, błonie płodowej i pępowinie

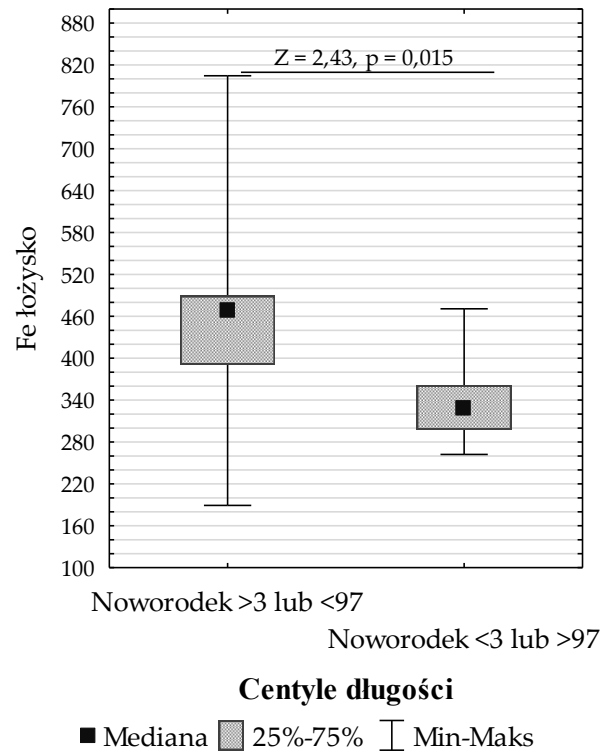


**Ryc. 9.** Zastosowanie testu Kruskala-Wallisa do porównania stężenia cynku (Zn) w łożysku, błonie płodowej i pępowinie

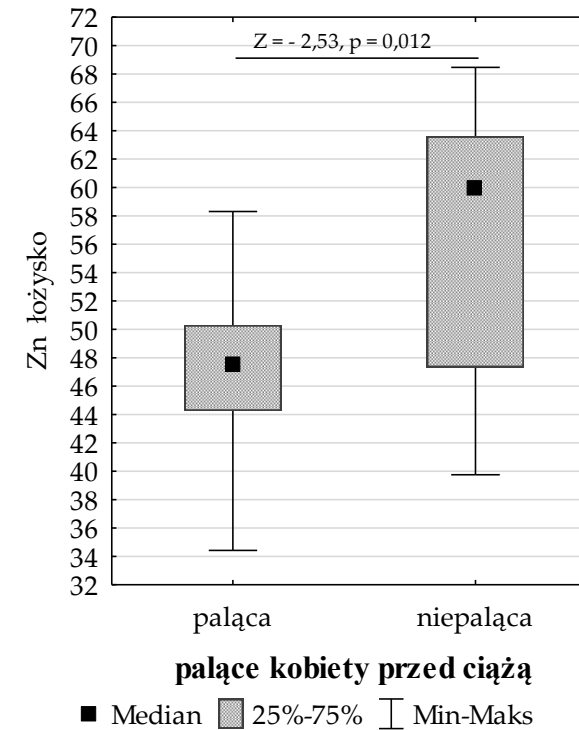


**Ryc. 10.** Zastosowanie testu Kruskala-Wallis do porównania stężenia cynku (Cu) w łożysku, błonie płodowej i pępowinie

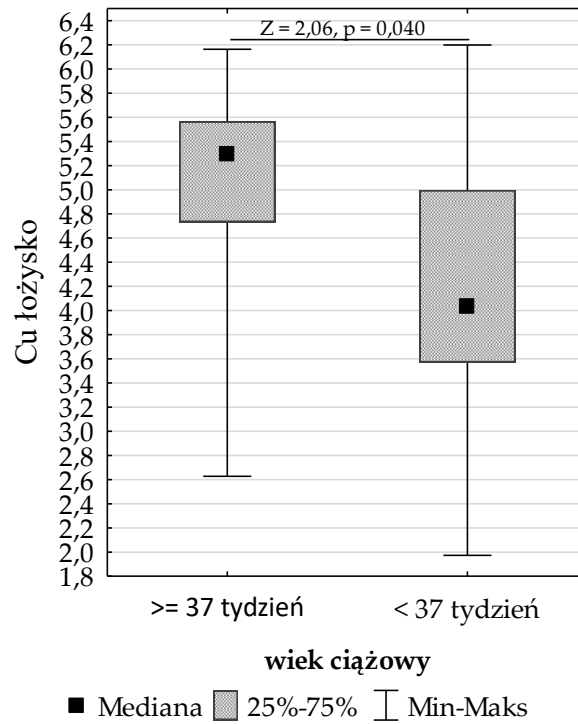




**Ryc. 11.** Zastosowanie testu Manna-Whitneya do porównania centyli długości noworodka, a stężenie żelaza (Fe) w łożysku



**Ryc. 12.** Zastosowanie testu Manna-Whitneya do porównania wpływu palenia papierosów przez kobiety przed ciążą, a stężenie cynku (Zn) w łożysku



**Ryc. 13.** Zastosowanie testu Manna-Whitneya do porównania wpływu wieku ciążowego, a stężenie cynku (Cu) w łożysku

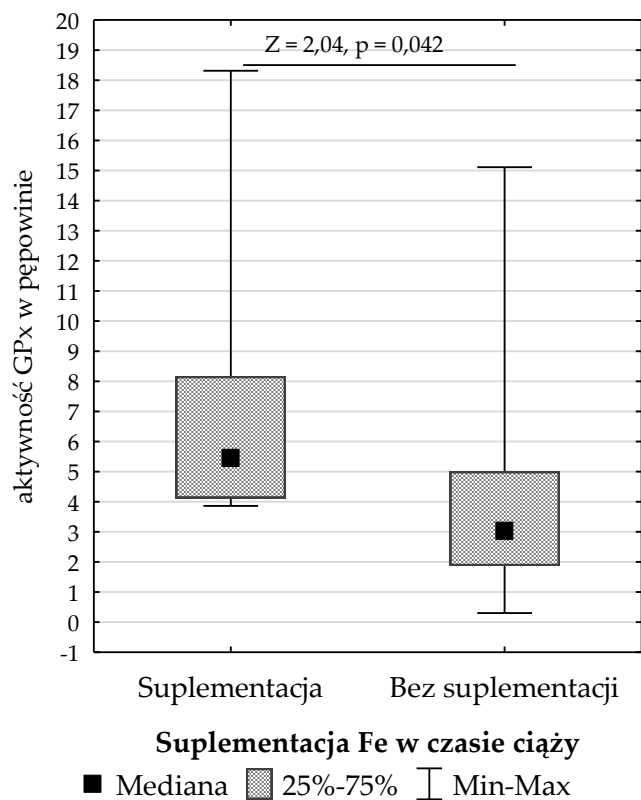
**Tabela 17.** Stężenie antyoksydantów i prooksydantów w łożysku, pępowinie i błonie płodowej (U/mg białka<sup>-1</sup>) (AM, średnia arytmetyczna; Med, mediana; Zakres: Max-Min; SD, odchylenie standardowe; GPx, peroksydaza glutationowa; GR, reduktaza glutationowa; CAT, katalaza; SOD, dysmutaza ponadtlenkowa; LPO, peroksydacja lipidów)

	Łożysko			Pępowina			Błona płodowa		
	AM±SD	Med.	Zakres	AM±SD	Med.	Zakres	AM±SD	Med	Zakres
Noworodki razem (n=22) = bliźnięta (n=21) + trojaczki (n=1)									
Parametry określające status antyoksydacyjny									
SOD	0,04±0,03	0,04	0,01-0,14	0,09±0,07	0,07	0,01-0,29	0,06±0,07	0,04	0,01-0,30
CAT	1,17±1,41	0,69	0,17-8,26	3,21±1,70	2,90	0,76-8,34	2,28±2,12	1,46	0,27-8,83
GPx	5,19±6,57	3,14	0,10-36,07	4,45±3,73	3,82	0,30-18,31	6,37±5,68	4,49	0,33-25,64
GR	5,55±3,27	5,24	0,56-14,26	4,05±3,08	3,52	0,14-13,24	3,85±3,45	3,40	0,18-16,98
stosunek SOD/GPx	0,03±0,07	0,01	0,01-0,39	0,04±0,05	0,02	0,01-0,26	0,02±0,02	0,01	0,01-0,11
stosunek SOD/CAT	0,07±0,08	0,04	0,01-0,31	0,06±0,17	0,03	0,01-1,10	0,03±0,02	0,03	0,01-0,11
Parametry określające status oksydacyjny									
LPO	2,16±1,17	2,26	0,04-4,19	1,66±1,35	1,41	0,04-6,09	1,65±1,26	1,42	0,11-4,67

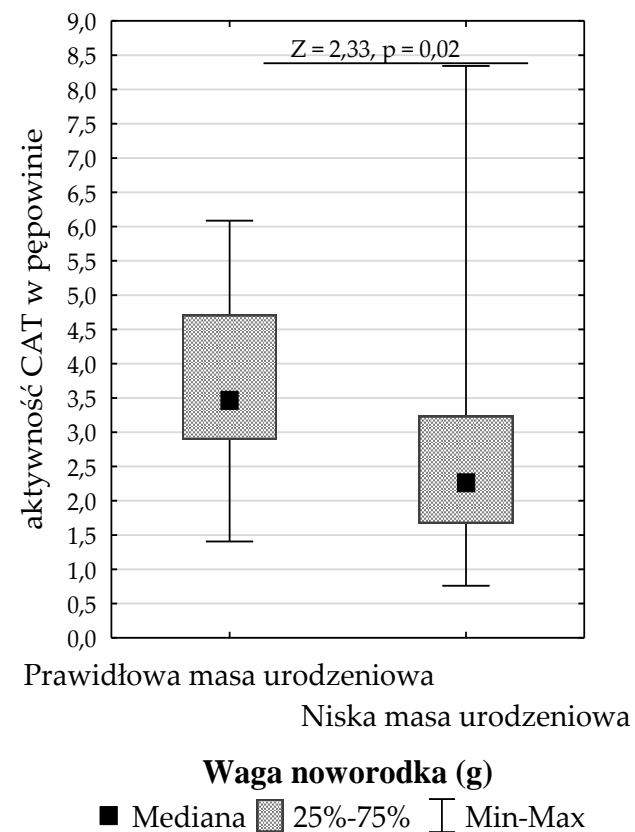
**Tabela 18.** Zastosowanie korelacji Spearmana do analizy zależności pomiędzy stężeniami żelaza (Fe), cynku (Zn) i miedzi (Cu) w łożysku, pępowinie i błonie płodowej, a bilansem prooksydacyjno-antyoksydacyjnym i parametrami antropometrycznymi noworodków

		Aktywność GPx	Aktywność GR	Aktywność CAT		Produkty LPO			Aktywność SOD	
		łożysko	łożysko	błona płodowa	łożysko	błona płodowa	łożysko	pępowina	łożysko	pępowina
Stężenie Zn	łożysko						0,43**		0,48***	
	pępowina								0,48***	
Stężenie Cu	błona płodowa			0,39*						
	łożysko								0,42**	
	pępowina			0,45***	0,44*				0,59***	0,50***
Stężenie Fe	błona płodowa					-0,50***				
	łożysko	0,36*	0,33*				0,58***			
Parametry noworodka	długość ciała							0,39*		0,41**
	obwód głowy			0,37*					0,33*	
	waga urodzenia			0,37*					0,33*	0,45***
	szerokość ramion									0,35*
BMI przed ciążą			0,40*							

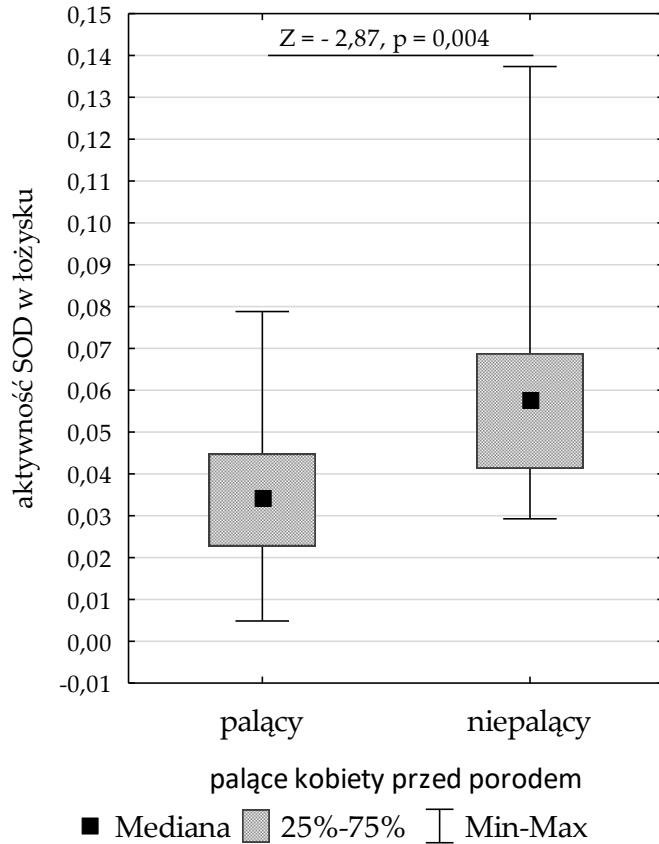
\*\*\*p<0,001; \*\* p<0,01, \*p <0,05



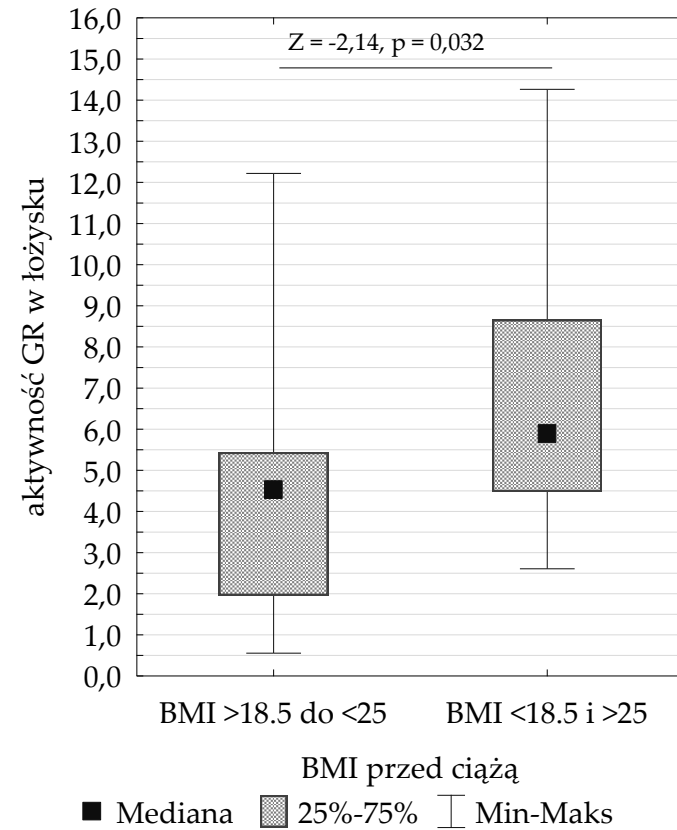
**Ryc. 14.** Zastosowanie testu Manna-Whitneya dla porównania wpływu przyjmowania suplementów żelaza przez kobiety w ciąży, a aktywność peroksydazy glutationowej (GPx)



**Ryc. 15.** Zastosowanie testu Manna-Whitneya dla porównania aktywności wpływu wagi ciała noworodków, a aktywność katalazy (CAT)



**Ryc. 16.** Zastosowanie testu Manna-Whitneya dla porównania aktywności wpływu palenia papierosów przez kobiety przed ciążą, a aktywność dysmutazy nadadtlenkowej (SOD)



**Ryc. 17.** Zastosowanie testu U Manna-Whitneya dla porównania aktywności GR łóżyska między grupami >18,5 do <25 BMI oraz <18,5 i >25 BMI

## 6. Dyskusja

### 6.1. Stężenia pierwiastków śladowych w popłodach

Niezbędne pierwiastki śladowe, w tym żelazo, miedź i cynk odgrywają kluczową rolę w przebiegu ciąży i działają jako kofaktory enzymów antyoksydacyjnych zaangażowanych w enzymatyczne mechanizmy obronne przed stresem oksydacyjnym. Jednak w dostępnym piśmiennictwie naukowym brakuje badań dotyczących stężenia tych pierwiastków w łożysku, pępowinie i błonie płodowej kobiet w ciąży mnogiej.

W literaturze naukowej stężenia metali podaje się w przeliczeniu na suchą (mg kg<sup>-1</sup> s.m.) lub moką masę (mg kg<sup>-1</sup> m.m.) tkanek i narządów. Aby umożliwić porównanie własnych wyników z danymi literaturowymi wyrażonymi w mg kg<sup>-1</sup> m.m., w badaniu zastosowano następujący współczynnik konwersji: 1,5, ponieważ popłody zawierają co najmniej 85% wody.

### 6.2. Stężenie żelaza w popłodach

W prezentowanych badaniach stwierdzono, że średnie stężenie Fe wyniosło 417,5 mg/kg<sup>-1</sup> s.m. w łożysku, 200,2 mg/kg<sup>-1</sup> s.m. w pępowinie i 317,1 mg/kg<sup>-1</sup> s.m. w błonie płodowej pobranych od kobiet w ciąży mnogiej. Porównując wyniki własne z wynikami badań dotyczących stężenia Fe w popłodach pobranych od kobiet w ciąży pojedynczej z tego samego obszaru badań stwierdzono większe stężenie Fe w łożysku (640,73 mg/kg<sup>-1</sup> s.m.), błonie płodowej (640,73 mg/kg<sup>-1</sup> s.m.) i pępowinie (567,29 mg/kg<sup>-1</sup> s.m.) pobranych od kobiet w ciąży pojedynczej (Kot i wsp. 2019) niż u kobiet w ciąży mnogiej. Barad i wsp. (2022) odnotowali mniejsze stężenie Fe w łożysku pobranym od nastolatek w ciąży pojedynczej (71,1 mg/kg<sup>-1</sup> m.m.; po przeliczeniu 106,7 mg/kg<sup>-1</sup> s.m.) niż u kobiet w ciąży mnogiej w wieku 20-46 lat (84,6 i 78,6 mg/kg<sup>-1</sup> m.m.; po przeliczeniu 126,9 i 117,9 mg/kg<sup>-1</sup> s.m., odpowiednio dla łożysk pobranych z ciąż bliźniaczych i trojaczych). De Angelis i wsp. (2017) stwierdzili, że stężenie Fe w łożysku było większe u kobiet w ciążach mnogich (26,05 µg/g<sup>-1</sup> s.m.) niż u kobiet w ciążach pojedynczych (17,99 µg/g<sup>-1</sup> s.m.), jednak różnica ta nie była istotna statystycznie. Rozbieżności w stężeniu Fe w popłodach mogły wynikać z różnic między badanymi grupami. Na przykład

Mbofung i wsp. (1990) wykazali większe stężenie Fe w łożysku noworodków płci żeńskiej niż u noworodków płci męskiej. A Reddy i wsp. (2014) stwierdzili, że stężenie Fe w łożysku kobiet z obszarów miejskich było wyższe niż u kobiet z obszarów wiejskich. Ponadto Irwinda i wsp. (2019) zauważyli, że stężenie Fe w łożysku wcześniaków było mniejsze niż u noworodków urodzonych w okresie od 38 do 42 tygodnia ciąży.

W prezentowanych badaniach stwierdzono, że stężenie Fe w łożysku wpływało na wagę noworodków, co potwierdzają analizy Hindmarsha i wsp. (2000) u kobiet w ciążach pojedynczych. Godfrey i wsp. (1991) wykazali, że niedobór Fe wiąże się z większą masą łożyska, co może mieć znaczący wpływ na płód. Levario-Carrillo i wsp. (2003) zauważyli tendencję do zwiększania masy łożyska u kobiet z niedokrwistością z niedoboru żelaza (IDA), nie wpłynęło to jednak na wagę i wzrost noworodka. Z drugiej strony, inne badania wykazały, że IDA w czasie ciąży może prowadzić do niskiej masy urodzeniowej (Figueiredo i wsp. 2018; Col Magdendag i wsp. 2019; Rahmati i wsp. 2017).

W prezentowanych badaniach nie stwierdzono związku między suplementacją Fe a parametrami antropometrycznymi noworodków. Jednak Shi i wsp. (2021) w badaniach kobiet i noworodków z ciąż pojedynczych stwierdzili, że suplementacja Fe w czasie ciąży miała wpływ na zwiększenie masy urodzeniowej noworodków, szczególnie u kobiet z niedokrwistością. Ważne jest jednak, aby suplementacja była indywidualnie dopasowana, gdyż nadmierne spożycie Fe może mieć negatywny wpływ na rozwój płodu. Hwang i wsp. (2013) wykazali, że zwiększone spożycie Fe u matki może prowadzić do ograniczenia wzrostu płodu. Z drugiej strony, Preziosi i wsp. (1997) zauważyli, że średnia długość ciała noworodka i wynik skali Apgar były wyższe w grupie kobiet w ciąży otrzymujących suplementy zawierające Fe niż w grupie otrzymującej placebo. Potwierdzono związek między suplementacją Fe a większą masą urodzeniową, co wskazuje, że suplementacja Fe może mieć wpływ na parametry antropometryczne noworodków (Cogswell i wsp. 2003; Alwan i wsp. 2011).

### **6.2.1. Stężenie cynku w popłodach**

W prezentowanych badaniach średnie stężenie Zn w łożysku, pępowinie i błonie płodowej pobranych od kobiet w ciążach mnogich z północno-zachodniej



Polski wynosiło odpowiednio 50,21, 45,55 i 36,91 mg/kg<sup>-1</sup> s.m. Znacznie większe stężenie Zn w łożysku (66,90 mg/kg<sup>-1</sup> s.m.), pępowinie (54,65 mg/kg<sup>-1</sup> s.m.) i błonie płodowej (62,79 mg/kg<sup>-1</sup> s.m.) stwierdzono u kobiet w ciążach pojedynczych pochodzących z tego samego obszaru badania (Kot i wsp. 2019). De Angelis i wsp. (2017) stwierdzili, że stężenie Zn w łożysku było większe u kobiet w ciążach mnogich (5,9 µg/g<sup>-1</sup> s.m.) niż u kobiet w ciążach pojedynczych (2,6 µg/g<sup>-1</sup> s.m.), ale różnica nie była statystycznie istotna. Mazurek i wsp. (2020) odnotowali znacznie mniejsze stężenia Zn w łożyskach (od 3,3 do 11,5 mg/kg<sup>-1</sup> m.m; po przeliczeniu od 5,0 do 17,3 mg/kg<sup>-1</sup> s.m.) pobranych od kobiet w ciąży pojedynczej pochodzących z okolic Wrocławia. Kantola i wsp. (2000) stwierdzili większe stężenia Zn w łożysku pobranym od niepalących kobiet w ciąży pojedynczej pochodzących z Finlandii, Estonii i Petersburga (77,14 mg/kg<sup>-1</sup> s.m.) niż w prezentowanym badaniu.

W przedstawionych badaniach wykazano różnice w stężeniu Zn w łożysku pomiędzy kobietami palącymi i niepalącymi przed ciążą. Kantola i wsp. (2000) zauważyli, że stężenie Zn w łożysku kobiet w ciąży pojedynczej pochodzących z różnych regionów Europy, które paliły w czasie ciąży było o 20% większe niż u kobiet niepalących w badaniu z udziałem kobiet. Natomiast Kutlu i wsp. (2006) stwierdzili, że stężenie Zn w łożysku kobiet palących w czasie ciąży było mniejsze niż u kobiet niepalących. Wyniki te sugerują, że zmiany stężenia Zn spowodowane przez nikotynę mogą być wywołane zwężeniem naczyń krwionośnych macicy i łożyska, co może zakłócać transport składników odżywczych, w tym makro- i mikroelementów. Ponadto nikotyna może przyczyniać się do niszczenia komórek nabłonkowych łożyska odpowiedzialnych za transport tych pierwiastków (Wickstrom 2007).

Zaobserwowano, że pierwotny niedobór Zn może prowadzić do opóźnienia wzrostu płodu, co potwierdza ważną rolę Zn w prawidłowym rozwoju prenatalnym (Prasad 2013). Bermúdez i wsp. (2015) nie stwierdzili związku między parametrami antropometrycznymi noworodka, a stężeniem Zn we krwi pępowinowej i matczynej. Natomiast Kot i wsp. (2021) odnotowali ujemną korelację między stężeniem Zn we krwi matki, a obwodem klatki piersiowej noworodka, a także między stężeniem Zn we krwi pępowinowej, a obwodem głowy noworodka. W prezentowanych badaniach stwierdzono zależność między stężeniem Zn w błonie płodowej, a szerokością ramion

noworodka. Badanie kohortowe wykazało, że niedobór Zn u kobiet w ciąży zwiększa ryzyko niskiej masy urodzeniowej (LBW) noworodków (Wang i wsp. 2015). Simmer i Thompson (1985) odnotowali związek między małym stężeniem Zn w osoczu matki, a zbyt małą masą noworodków w odniesieniu do wieku ciążowego (ang. *small-for-gestational age*, SGA). Natomiast Lira i wsp. (1998) wykazali, że suplementacja Zn nieznacznie wpływa na zwiększenie wagi urodzeniową. A Zahiri Sorouri i wsp. (2016) w randomizowanym kontrolowanym badaniu nie stwierdzili istotnego wpływu na wagę noworodka codziennej suplementacji siarczanem cynku (15 mg) od 16 tygodnia ciąży do porodu.

### 6.2.2. Stężenie miedzi w popłodach

W prezentowanych badaniach średnie stężenie Cu w łożysku, pępowinie i błonie płodowej pobranych od kobiet w ciąży mnogiej pochodzących z terenu północno-zachodniej Polski wynosiło odpowiednio 4,47, 3,21 i 7,26 mg/kg<sup>-1</sup> s.m. Znacznie większe stężenie Cu w łożysku (6,01 mg/kg<sup>-1</sup> s.m.), pępowinie (4,32 mg/kg<sup>-1</sup> s.m.) i błonie płodowej (8,91 mg/kg<sup>-1</sup> s.m.) stwierdzono u kobiet w ciąży pojedynczej z tego samego obszaru badania (Kot i wsp. 2019). Znacznie mniejsze stężenie Cu w łożysku (od 0,05 do 3,91 µg/g<sup>-1</sup> m.m.; po przeliczeniu od 0,08 do 5,9 µg/g<sup>-1</sup> s.m.) odnotowali Mazurek i wsp. (2020). Większe stężenia Cu w łożysku stwierdzili Reddy i wsp. (2014) u kobiet w ciąży pochodzących z obszarów wiejskich (78,4 µg/g<sup>-1</sup> s.m.) i miejskich (61,4 µg/g<sup>-1</sup> s.m.).

Ponadto w prezentowanych badaniach stwierdzono, że stężenie Cu w łożysku istotnie koreluje z masą łożyska i szerokością ramion noworodków, a stężenie Cu w pępowinie z obwodem głowy noworodków. Kot i wsp. (2019) wykazali ujemną korelację między stężeniem Cu w błonach płodowych pobranych od kobiet w ciąży pojedynczej, a masą urodzeniową noworodków. Ponadto Kot i wsp. (2021) odnotowali ujemną korelację między stężeniem Cu we krwi pępowinowej pobranej od kobiet w ciąży pojedynczej, a parametrami noworodków (obwód głowy, obwód klatki piersiowej i wynik Apgar w pierwszej minucie). Mbofung i Subbarau (1990) wykazali pozytywną korelację między stężeniem Cu w łożysku pobranym od kobiet w ciąży pojedynczej, a masą urodzeniową noworodków. Kantola i wsp. (2000) stwierdzili ujemną korelację

między stężeniem Cu w łożysku, a masą urodzeniową noworodka, która była silniejsza w grupie kobiet palących papierosy niż niepalących.

### **6.2.3. Interakcje między badanymi pierwiastkami**

Metabolizm Fe i Cu jest ze sobą powiązany, a podczas ciąży zarówno niedobór Cu, jak i nadmiar Fe mogą wpływać na siebie (Gambling i McArdle 2004). Stwierdzono, że Fe i Cu mogą konkurować ze sobą na etapie wchłaniania jelitowego, a suplementacja Fe może obniżać poziom Cu w organizmie (Suliburska i wsp. 2021). Zaobserwowano, że niedobór Fe w łożysku powoduje wzrost stężenia Cu do stężenia większego niż w innych tkankach (Gambling i wsp. 2003).

W prezentowanych badaniach odnotowano korelację między stężeniem Fe w łożysku, a stężeniem Zn i Cu w łożysku oraz między stężeniem Fe i Zn w błonie płodowej. Ponadto stwierdzono dodatnią korelację między stężeniem Zn i Fe w łożysku oraz między stężeniem Zn w łożysku i Cu w łożysku oraz pępowinie, a także między stężeniem Zn w błonie płodu i pępowinie, a stężeniem Cu w tych strukturach. Kinnamon (1963) zauważył, że występowanie Cu i Zn w diecie indukuje mechanizm konkurencyjny w organizmie płodu i w łożysku. Kantola i wsp. (2000) stwierdzili ujemną korelację między stężeniem Cu w łożysku, a masą urodzeniową noworodka.

Niedobory zarówno Zn, jak i Cu są dobrze opisane u wcześniaków i kobiet w ciąży (Griffin i wsp. 2013), ale nie w przypadku struktur takich jak łożysko, błona płodowa lub pępowina pochodzących od kobiet w ciąży mnogiej. Można wywnioskować, że antagonistyczne działanie Zn i Cu, Zn i Fe oraz Cu i Fe może również wystąpić na poziomie interakcji matka-płód i płód-łożysko, błona płodowa i pępowina.

### **6.3. Stres oksydacyjny i stężenia Fe, Cu, Zn**

Organizm ludzki naturalnie wytwarza wolne rodniki (Dröge 2002), ale ich niekontrolowana produkcja może powodować peroksydację lipidów i uszkodzenie błon komórkowych (Ayala i wsp. 2014). W czasie ciąży wzrost peroksydacji lipidów i stresu oksydacyjnego może stanowić potencjalne

zagrożenie dla rozwijającego się płodu. Do przeciwdziałania niekorzystnym skutkom OS organizm wykorzystuje enzymatyczne i nieenzymatyczne antyoksydanty (Irato i Santovito 2021). Jednakże ten mechanizm adaptacyjny nie zawsze zapewnia odpowiednią ochronę przed OS (Gitto i wsp. 2002). W przypadku ciąż mnogich ryzyko stresu oksydacyjnego jest większe, ponadto zmniejszona jest zdolność antyoksydacyjna, co potencjalnie łączy stres oksydacyjny z powikłaniami ciąży (Jantsch i wsp. 2020). Na przykład Minghetti i wsp. (2011) stwierdzili korelację między poziomem stresu oksydacyjnego, a niższą masą urodzeniową noworodków.

W prezentowanych badaniach średnie stężenie GPx w łożysku, pępowinie i błonie płodu wynosiło odpowiednio 5,19, 4,45 i 6,37 U/mg białka<sup>-1</sup>. Mistry i wsp. (2010) stwierdzili, że aktywność GPx była niższa w tkankach łożyska kobiet ze stanem przedrzucawkowym niż u kobiet z normalnym ciśnieniem. Podobnie Biri i wsp. (2017) zaobserwowali, że aktywność GPx była niższa u kobiet w ciąży ze stanem przedrzucawkowym niż u zdrowych kobiet.

U kobiet w ciąży mnogiej z terenu północno-zachodniej Polski średnie stężenie GR w łożysku, pępowinie i błonie płodu wynosiło odpowiednio 5,55, 4,05 i 3,85 U/mg białka<sup>-1</sup>. Das i wsp. (2012) nie stwierdzili istotnych różnic między aktywnością GR w łożysku kobiet ze stanem przedrzucawkowym, a zdrowymi kobietami w ciąży.

W prezentowanych badaniach stwierdzono, że średnie stężenie CAT w łożysku, pępowinie i błonie płodu wynosiło odpowiednio 1,17, 3,21 i 2,28 U/mg białka<sup>-1</sup>. Ferreira i wsp. (2020) zauważyli, że aktywność CAT była niższa u kobiet ze stanem przedrzucawkowym niż u zdrowych kobiet w ciąży.

U kobiet w ciąży mnogiej aktywność SOD w łożysku, pępowinie i błonie płodu wynosiła odpowiednio 0,04, 0,09 i 0,06 U/mg białka<sup>-1</sup>. Biri i wsp. (2007) stwierdzili, że aktywność SOD u kobiet w ciąży ze stanem przedrzucawkowym była podobna do aktywności tego enzymu u zdrowych kobiet w ciąży. Ferreira i wsp. (2020) odnotowali, że aktywność SOD była wyższa u kobiet ze stanem przedrzucawkowym niż u zdrowych kobiet w ciąży.

W prezentowanych badaniach zauważono, że stężenie produktów peroksydacji lipidów było największe w łożysku (2,26 U/mg białka<sup>-1</sup>), a następnie w pępowinie (1,66 U/mg białka<sup>-1</sup>) i błonie płodowej (1,65 U/mg białka<sup>-1</sup>). Podobnie Ohel i wsp. (1985) stwierdzili, że LPO było znacznie wyższe w błonach

plodowych w porównaniu z łożyskiem. Ponadto badanie wykazało, że stężenie Fe w łożysku i błonie płodowej wpływa na poziom stresu oksydacyjnego poprzez modulowanie parametrów antyoksydacyjnych w łożysku (GPx, GR) i pępowinie (GPx).

Kilku badaczy potwierdziło pozytywny wpływ Fe na parametry obrony antyoksydacyjnej (Lee i wsp. 1981; Toblli i wsp. 2012; Nuhu i wsp. 2019). Bozkaya i wsp. (2021) wykazali, że wartość enzymatycznych markerów antyoksydacyjnych była zmniejszona u kobiet z niedokrwistością z niedoboru żelaza. Niedobór Fe u kobiet z IDA może nasilać stres oksydacyjny, powodując zmiany w funkcjonowaniu serca. Isler i wsp. (2002) stwierdzili, że Fe wpływa na aktywność SOD i GPx. Badacze zauważyli, że aktywność SOD była niższa u pacjentów z IDA, a suplementacja Fe pacjentów z IDA przywracała optymalną aktywność antyoksydacyjną. Stwierdzono, że nadmiar Fe predysponuje do zwiększonej aktywności LPO (Myatt i Cui 2004; Lymperaki i wsp. 2015). Lachili i wsp. (2001) wykazali, że farmakologiczne dawki Fe podawane kobietom w ciąży bez niedokrwistości powodują niekontrolowaną peroksydację lipidów. Podobnie Rajendran i wsp. (2020) stwierdzili, że suplementacja Fe u kobiet w ciąży bez anemii spowodowała zwiększony stres oksydacyjny i stan zapalny. Wyniki prezentowanych badań potwierdziły związek między stężeniem Fe w łożysku pobranych od kobiet w ciąży mnogiej, a aktywnością LPO.

Metaloproteiny (CAT i SOD) działają jako przeciwutleniacze poprzez enzymatyczną detoksykację reaktywne formy tlenu, w tym  $O_2$ ,  $H_2O_2$  i  $-OOH$ . W prezentowanych badaniach stwierdzono, że aktywność Cu/Zn dysmutazy ponadtlenkowej, szczególnie wymagającej ze względu na prawidłowe funkcjonowanie i zależna od kofaktorów (Cu/Zn), jest skorelowana ze stężeniami Cu i Zn w łożysku oraz w pępowinie. Ponadto zaobserwowano korelację między stężeniem Cu w błonie płodowej, a stężeniem Cu w pępowinie i aktywnością CAT w błonie płodowej oraz stężeniem Cu w pępowinie z aktywnością CAT w łożysku.

Według badaczy na utrzymanie ciąży istotny wpływ ma odpowiednia aktywność Cu/Zn SOD (Ghneim i wsp. 2016; Sugino i wsp. 2000; Noda i wsp. 2012). Stwierdzono, że aktywność tej dysmutazy zmniejsza się w łożysku kobiet z cukrzycą ciążową (White i wsp. 2010) i stanem przedrzucawkowym (Bakacak i wsp. 2015), co wskazuje na możliwy związek

między aktywnością Cu/Zn SOD, a powikłaniami ciąży. Jednak Araújo Brito i wsp. (2013) sugerują, że SOD może nie być użytecznym markerem stanu przedrzucawkowego. Badacze stwierdzili, że aktywność tego enzymu wzrasta zarówno u kobiet ze stanem przedrzucawkowym, jak i bez objawów stanu przedrzucawkowego.

Stres oksydacyjny może wpływać na parametry antropometryczne płodu, szczególnie na masę urodzeniową (Ashina i wsp. 2021; Ochoa i wsp. 2007). W prezentowanych badaniach stwierdzono, że aktywność SOD w łożysku koreluje z masą urodzeniową i obwodem głowy noworodka. Ponadto aktywność SOD w pępowinie korelowała z masą urodzeniową, długością ciała i szerokością ramion noworodka. Saker i wsp. (2008) wykazali zwiększoną aktywność SOD w przypadkach wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu (ang. *intrauterine growth restriction*, IUGR). Podobnie Biri i wsp. (2007) stwierdzili zwiększoną aktywność SOD u noworodków z IUGR i zasugerowali, że podawanie antyoksydantów może być przydatne w zapobieganiu lub leczeniu IUGR.

Zauważono, że aktywność CAT wpływa na parametry antropometryczne noworodka (Guo i wsp. 2022). W prezentowanych badaniach stwierdzono wyższą aktywność CAT w grupie noworodków o prawidłowej masie ciała w porównaniu z grupą o niskiej masie ciała. Dodatkowo aktywność CAT w błonie płodowej korelowała z obwodem głowy i masą urodzeniową noworodków. Ordóñez-Díaz i wsp. (2021) powiązali spowolnienie wzrostu macicy z upośledzeniem statusu obrony antyoksydacyjnej. Karowicz-Bilinska i wsp. (2007) oraz Luo i wsp. (2018) wykazali, że IUGR wiąże się z większym ROS łożyska i uszkodzeniem oksydacyjnym. Ashin i wsp. (2021) zauważyli, że IUGR silnie koreluje z markerami stresu oksydacyjnego. U kobiet w ciąży mnogiej z terenu północno-zachodniej Polski stwierdzono również korelację między ilością produktów LPO w pępowinie, a długością ciała noworodka.

W prezentowanych badaniach odnotowano, że aktywność SOD w łożysku była wyższa u kobiet w ciąży mnogiej, które paliły papierosy przed ciążą. Podobnie Pizent i wsp. (2020) stwierdzili wyższą aktywność SOD w łożysku palących kobiet w porównaniu z osobami niepalącymi, podczas gdy aktywność GPx była podobna w obu grupach. Ermis i wsp. (2004) odnotowali wzrost aktywności GPx w surowicy palących kobiet i ich niemowląt. Napierała i wsp.

(2019) wykazali, że aktywność GPx, CAT i SOD w surowicy i mleku palących kobiet była wyższa niż u osób niepalących i biernie narażonych na dym tytoniowy.

## 7. Podsumowanie i wnioski

Ciąże mnogie wiążą się z licznymi powikłaniami, w tym przedwczesnym porodem, nadciśnieniem i cukrzycą ciążową oraz nieprawidłowościami w łożysku i pępowinie. Dlatego badania w tej dziedzinie są niezbędne do zapobiegania powikłaniom ciążowym. Prezentowane badania dostarczają nowych informacji dotyczących stężenia żelaza, cynku i miedzi, a także parametrami stresu oksydacyjnego i aktywnością antyoksydacyjną w łożysku, pępowinie i błonie płodowej kobiet w ciąży mnogiej. Dane te mogą być wykorzystane jako dane porównawcze w przyszłych badaniach, chociaż nasze wyniki powinny być interpretowane ostrożnie, pomimo osiągnięcia istotności statystycznej.

## V. Omówienie artykułu nr 2

**Grzeszczak K**, Kapczuk P, Kupnicka P, Cecerska-Heryć E, Kwiatkowski S, Chlubek D, Kosik-Bogacka D. Calcium, potassium, sodium, and magnesium concentrations in the placenta, umbilical cord, and fetal membrane from women with multiple pregnancies. *Life* (Basel). 2023;13(1):153.

Wapń (Ca), potas (K), sód (Na) i magnez (Mg) to pierwiastki odpowiedzialne za podstawowe procesy metaboliczne i biochemiczne zachodzące w organizmie. Zapotrzebowanie na te pierwiastki znacznie wzrasta w czasie ciąży, a odpowiednia dieta chroni kobiety w ciąży rozwojem nadciśnienia tętniczego występującego w stanie przedzucawkowym i porodem przedwczesnym.

Wapń uznany został za niezbędny pierwiastek odpowiedzialny za prawidłowy rozwój układu kostnego. W czasie ciąży metabolizm mineralny matki dostosowuje się do zwiększonego zapotrzebowania na Ca. Szczególnie znaczenie ma podczas wzrostu i rozwoju płodu. Zgodnie z aktualnymi zaleceniami średnie zapotrzebowanie (ang. *Average Requirement*, AR)

na Ca dla kobiet w ciąży między 18. a 24. rokiem życia (r.ż.) oraz powyżej 25. r. ż. wynosi odpowiednio 860 i 750 mg/dobę, a referencyjne wartości spożycia dla populacji (ang. *Population Reference Intakes*, PRI) to odpowiednio 1000 i 950 mg Ca/dobę. Dla kobiet w ciąży i karmiących piersią górny tolerowany poziom spożycia (ang. *Tolerable Upper Intake Level*, UL) powinien wynosić 2500 mg Ca dostarczany zarówno z diety, jak i pochodzić z suplementacji. W czasie ciąży dochodzi do znacznego wzrostu jelitowego wchłaniania  $Ca^{2+}$ , w czym pośredniczą aktywny metabolit witaminy D3 1,25-dihydroksycholekalcyferol (1,25-(OH) $_2$ D $_3$ , kalcytriol), hormon przytarczyc (PTH) oraz kalcytonina. Najwięcej wapnia jest wchłaniane w trzecim trymestrze ciąży (do około 70%), jest to związane z intensywnym wzrostem kości płodu. W czasie ciąży notuje się wykładniczy wzrost stężenia Ca u płodu. Wapń do płodu jest transportowany trzema drogami: (1) do syncytiotrofoblastu z krwi matki za pośrednictwem kanałów wapniowych, (2) do błony podstawnej płodu poprzez białka wiążące Ca, w tym kalbindynę-D $_9$ K oraz (3) poprzez ATPazę wapniową błony komórkowej, która transportuje Ca przez błonę podstawną płodu. Jankowska i wsp. (2021) wykazali, że większość kobiet w Polsce nie zaspokaja zapotrzebowania na najbardziej niezbędne składniki diety, w tym Ca. Nieodpowiedni poziom Ca w diecie w czasie ciąży może powodować zmniejszenie gęstości kości zarówno u matki, jak i dziecka, a także prowadzić do nadciśnienia indukowanego ciążą, porodu przedwczesnego, niskiej masy urodzeniowej oraz zgonów prenatalnych i matczynych.

Potas (K) jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego przebiegu ciąży, a norma odpowiedniego spożycia (ang. *Adequate Intake*, AI) dla kobiet ciężarnych powyżej 18. roku życia wynosi 3500 mg/dzień. Potas jest wchłaniany głównie w jelicie cienkim i dystalnej części jelita grubego z udziałem ATPazy. Nie udowodniono wpływu matczynej hipokaliemii na parametry płodu u ludzi ze względu na skuteczne wyrównywanie niedoboru K przez łożysko. Jednak w badaniach na modelach zwierzęcych wykazano, że niedobór K upośledza rozwój płodu. Z kolei hiperkaliemia może być przyczyną rozwoju cukrzycy ciążowej (ang. *Gestational Diabetes Mellitus*, GDM) i stanu przedrzucawkowego.

Sód jest najważniejszym elektrolitem w płynach pozakomórkowych. Spożycie 2 g Na/dobę jest uważane za bezpieczny i odpowiedni poziom, zgodny z wartością referencyjną ustaloną dla dorosłych. Sód jest wchłaniany z jelit wraz



z glukozą i aminokwasami na drodze wymiany  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , a następnie transportowany jest do enterocytów. Do płodu Na przenoszony jest przez syncytiotrofoblast przez  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPazę łożyskową. Stwierdzono, że matczyne hiponatremia wpływa na wystąpienie niskiej masy urodzeniowej, poronienia samoistnego lub upośledzonego wzrostu płodu.

Magnez to pierwiastek pełniący istotną rolę w organizmach żywych ze względu na możliwości aktywacji enzymów metabolicznych. Pierwiastek ten jest antagonistą Ca i drugim po K najważniejszym kationem wewnątrzkomórkowym. Zalecane spożycie Mg dla kobiet w ciąży powyżej 18. roku życia wynosi 300 mg/dobę, natomiast maksymalny UL nie powinien przekraczać 250 mg/dobę. Magnez wchłania się w jelicie czczym i krętym poprzez transport bierny związany z gradientem elektrochemicznym oraz dyfuzję przez kanał jonowy TRPM6 (ang. *transient receptor potential melastatin type 6*). Duże stężenie Mg w łożysku może zmniejszać transport Ca do płodu. Magnez wpływa na kanały potasowe i może regulować ich transport łożyskowy. Pomimo stosowania suplementacji u wielu kobiet występuje niedobór Mg, który może powodować nadciśnienie tętnicze, stan przedrzucawkowy, bolesne skurcze mięśni i migreny. Ponadto niedobór Mg zwiększa ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego, cukrzycy ciąży oraz zaburzeń wzrostu płodu. Natomiast zwiększone spożycie Mg w czasie ciąży wiąże się ze zwiększeniem masy urodzeniowej noworodka. Suplementacja Mg wpływa na mniejszą częstość występowania zarówno porodów przedwczesnych, jak i niskiej masy urodzeniowej. Hipermagnezemia ma jednak toksyczny wpływ na ciążę, prowadząc do zmniejszenia odruchów ścięgnistych (głębokich), bezdechu i dysocjacji elektromechanicznej.

Niedobory mikroelementów mogą prowadzić do poważnych, długoterminowych konsekwencji zdrowotnych zarówno dla matki, jak i dziecka, dlatego bardzo ważne jest jak najwcześniejsze uświadomienie zagrożenia kobietom w ciąży. Niewiele jest dostępnych danych dotyczących stężenia Ca, Mg, Na i K u kobiet w ciąży mnogiej. Dlatego celem pracy była ocena związku pomiędzy zawartością makroelementów (Ca, Mg, Na i K) w łożysku, błonie płodowej i pępowinie pobranych od kobiet w ciąży mnogiej, a parametrami antropometrycznymi noworodków.

Badaniami objęto 57 ciężarnych kobiet ze zdrowymi, niepowikłanymi ciążami bliźniaczymi (n=52) i potrójnymi (n=5); 40 par bliźniąt dwuowodniowych dwukosmówkowych, 11 par bliźniąt jednoowodniowych dwukosmówkowych, jedna para bliźniąt jednokosmówkowych i jednoowodniowych, trzy pary trójowodniowe trójkosmówkowe i dwie pary dwuowodniowe i trójkosmówkowe.

Łożyska (n=107), pępowiny (n=114) i błony płodowe (n=112) były pobierane bezpośrednio po porodzie, a następnie ważone i mierzone. Poziomy Ca, K, Na i Mg oznaczono za pomocą atomowej spektroskopii emisyjnej w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-OES) w aparacie Thermo Scientific ICAP 7400 Duo (Waltham, MA, USA).

Średnie stężenia Ca, K, Na i Mg wynosiło odpowiednio: 2466, 8873, 9323 i 436 mg/kg<sup>-1</sup> s.m. w łożysku; 957, 6173, 26,757 i 326 mg/kg<sup>-1</sup> s.m. w pępowinie oraz 1252, 7460, 13,562 i 370 mg/kg<sup>-1</sup> s.m. w błonie płodowej. U kobiet w ciąży mnogiej pochodzących z północno-zachodniej Polski stwierdzono silne dodatnie korelacje pomiędzy stężeniami Ca i Mg zarówno w pępowinie (r =0,81; p=0,00), jak i w błonie płodowej (r=0,73; p=0,00); pomiędzy stężeniami K i Mg w pępowinie (r=0,73; p=0,00); między stężeniem Ca i K w błonie płodowej (r=0,73; p=0,00). Ponadto odnotowano dodatnie korelacje między łożyskowym stężeniem Ca, a masą łożyska (ρ=0,42; p=0,00) oraz między stężeniem Mg w pępowinie, a długością ciąży (ρ=0,42; p=0,00). Stwierdzono ujemne korelacje pomiędzy stężeniami Na i Ca w błonie płodowej (r= -0,40; p=0,00) oraz stężeniem Na w błonie płodowej i Mg w łożysku (r= -0,16; p=0,02). Potwierdzono ujemne korelacje pomiędzy długością ciąży, a obwodem głowy noworodka (ρ=-0,42; p=0,00), masą ciała noworodka (ρ=-0,42; p=0,00), długością niemowlęcia (ρ=-0,49; p=0,00), szerokością barków noworodka (ρ=-0,49; p=0,00) oraz między masą ciała noworodka, a jego obwodem głowy (ρ=-0,62; p=0,00), masą ciała przed porodem matki (ρ =-0,36; p=0,00), długością ciała noworodka (ρ=-0,45; p=0,00), szerokością barków (ρ=-0,63; p=0,00), a przyrostem masy ciała w czasie ciąży matki (ρ=-0,31; p=0,01). Stwierdzono istotne statystycznie korelacje między paleniem papierosów przed ciążą, a masą ciała kobiet przed porodem (ρ=0,32; p=0,00) oraz ujemną korelację między wiekiem kobiet, a obwodem głowy noworodka (ρ=-0,20; p=0,02).

Wyniki prezentowanych badań mogą wskazać drogę do dalszych badań, ale należy wziąć pod uwagę, że wszystkie wymienione pierwiastki są pod

kontrolą homeostatyczną w płynach ustrojowych oraz wpływ ma patofizjologia organizmu, jak również osobiste nawyki żywieniowe i styl życia. Jednakże jest to prawdopodobnie pierwsze badanie oceniające stężenia Ca, Na, K i Mg w popłodach kobiet w ciąży mnogiej. Uzyskane wyniki uzupełniają wiedzę na temat stężeń pierwiastków w ciążach mnogich i ich ewentualnego wpływu na parametry antropometryczne płodu.

## **VI. Podsumowanie i wnioski**

Wszystkie założenia i cele pracy doktorskiej zostały zrealizowane. Badania własne oraz przeprowadzony systematyczny przegląd literatury umożliwiły sformułowanie końcowych sformułowań i wniosków:

- ✓ uzyskane wyniki wyraźnie potwierdzają różnice między stężeniami żelaza, cynku, miedzi, wapnia, potasu, sodu i magnezu w popłodach;
- ✓ Fe, Cu, Zn, Ca, Na, K i Mg mogą wpływać na parametry matki i płodu oraz przebieg ciąży;
- ✓ badanie stężenia Fe, Cu, Zn, Ca, Na, K i Mg w popłodach może być wykorzystywane do oceny ryzyka powikłań ciążowych, jednak wymaga to dalszych badań;
- ✓ wzrost lub spadek stężenia żelaza, cynku lub miedzi może znacząco wpłynąć na działanie pozostałych dwóch pierwiastków;
- ✓ wzrost lub spadek stężenia wapnia, potasu, sodu lub magnezu może znacząco wpłynąć na działanie pozostałych pierwiastków;
- ✓ Fe, Cu i Zn nie wykazują działania antagonistycznego względem siebie, gdy mieszczą się w dziennych wartościach referencyjnych;
- ✓ aktywności enzymów antyoksydacyjnych (katalazy, peroksydazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej, reduktazy glutationowej) związana była ze stężeniem Fe, Cu i Zn w popłodach;
- ✓ aktywności badanych enzymów antyoksydacyjnych ma istotny wpływ na parametry antropometryczne noworodka;
- ✓ oznaczenie parametrów prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w popłodach może być wykorzystywane w monitorowaniu przebiegu ciąży mnogiej i szacowaniu ryzyka wystąpienia powikłań ciążowych;

- ✓ Fe, Cu, Zn, Ca, Na, K i Mg odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu, a wszelkie zmiany ich stężenia mogą powodować interakcje niebezpieczne dla zdrowia matki i płodu;
- ✓ Wyniki przedstawionych badań dostarcza nowych informacji dotyczących stężenia Fe, Cu, Zn, Ca, Na, K i Mg, a także aktywności parametrów stresu oksydacyjnego w łożysku, pępowinie i błonie płodowej kobiet w ciąży mnogich.

## VII. Ograniczenia badania

W trakcie prowadzenia badań zauważono następujące ograniczenia:

- liczba uczestników badania stanowiła jedynie niewielki odsetek kobiet ciężarnych z terenu w północno-zachodniej Polsce;
- nie wykonano pomiarów białek transportujących żelazo, w tym ferroportyny (ang. *Ferroportin*, FPN) i nie badano poziomu receptora transferyny (ang. *transferrin receptor*, TfR)
- nie oznaczono hepcydyny, hormonu odpowiedzialnego za transport żelaza do łożyska;
- nie oznaczono dwóch transbłonowych białek uczestniczących w transporcie miedzi: błonowego transportera jonów *miedzi 1* (ang. *copper transporter 1*, CTR1) i przenośnika jonów dwuwartościowych (ang. *Divalent Metal Transporter 1*, DMT1);
- nie oznaczono transporterów cynku: białka Zip (ang. *Zrt- and Irt-like protein*, ZIP) i ZnTs;
- nie analizowano poziomu albuminy i alfa-2-makroglobuliny, które powszechnie tworzą kompleksy z cynkiem;
- nie oznaczono metaloproteiny (ang. *metallothionein*, MT), które odgrywają istotną rolę w komórkowym transporcie cynku;
- w badaniach nie uwzględniono czynników zewnętrznych, w tym diety, zanieczyszczenia środowiska i jakości życia kobiet, które mogłyby wpłynąć na wyniki badań;
- w badaniach nie uwzględniono masy, położenia, perfuzji i funkcji łożyska (określanej za pomocą badania dopplerowskiego i testów

biochemicznych, takich jak PLGF), które mogą mieć istotny wpływ na rozwój płodu;

- nie oznaczono parametrów układu renina-angiotensyna-aldosteron (ang. *renin-angiotensin-aldosterone* system, RAAS) odpowiedzialnych za kontrolę równowagi potasowo-sodowej;
- nie analizowano parametrów odpowiedzialnych za wchłanianie Ca, w tym witaminy D3 1,25- dihydroksycholekalcyferol (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, kalcytriol), hormonu przytarczyc (PTH) i kalcytoniny;
- dane dotyczące suplementów diety i palenia tytoniu zostały zebrane za pomocą dobrowolnego kwestionariusza.

## VIII. Piśmiennictwo

1. Abdel Ghany E.A, Alsharany W., Ali A.A, Youness E.R, Hussein J.S. Antioxidant profiles and markers of oxidative stress in preterm neonates. *Paediatr Int Child Health*. **2016**;36(2):134-40.
2. Ademuyiwa O, Odusoga O. L., Adebawo O. O., Ugbaja R. N. Endogenous Antioxidant Defences in Plasma and Erythrocytes of Pregnant Women during Different Trimesters of Pregnancy. *Acta Obstet. Gynecol. Scand*. **2007**;8(10):1175–1180.
3. Agarwal A., Allamaneni S. S. R. Role of Free Radicals in Female Reproductive Diseases and Assisted Reproduction. *Reprod. Biomed. Online* **2004**;9(3):338–347.
4. Agarwal A., Sharma R. K., Nallella K. P., Thomas A. J., Alvarez J. G., Sikka S. C. Reactive Oxygen Species as an Independent Marker of Male Factor Infertility. *Fertil. Steril*. **2006**;86(4):878–885.
5. Agarwal A., Aponte-Mellado A., J Premkumar B., Shaman A., Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*. **2012**;10:49.
6. Agarwal A., Gupta S., Sekhon L., Shah R. Redox Considerations in Female Reproductive Function and Assisted Reproduction: From Molecular Mechanisms to Health Implications. *Antioxid. Redox Signal*. **2008**;10(8):1375–1403.
7. Ahn B. I., Kim M. J., Koo H. S., Seo N., Joo N. S., Kim Y. S. Serum Zinc Concentration Is Inversely Associated with Insulin Resistance but Not Related with Metabolic Syndrome in Nondiabetic Korean Adults. *Biol. Trace Elem. Res*. **2014**;160(2):169–175.
8. Ahn Y. M., Kim Y. J., Park H., Park B., Lee H. Prenatal Vitamin C Status Is Associated with Placental Apoptosis in Normal-Term Human Pregnancies. *Placenta* **2007**;28(1):31–38.
9. Ahsan T., Banu S., Nahar Q., Ahsan M., Khan M.N.I., Islam S.N. Serum Trace Elements Levels in Preeclampsia and Eclampsia: Correlation with the Pregnancy Disorder. *Biol. Trace Elem. Res*. **2013**;152(3):327–332.
10. Akçay A., Tatar Aksoy H., Uras N., Dilmen U. Reference values of oxidative stress biomarkers in healthy newborns. *Pediatr Int*. **2013**;55(5):604-607.

11. Al-Gubory K.H., Fowler P.A., Garrel C. The Roles of Cellular Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress and Antioxidants in Pregnancy Outcomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**;42(10):1634–1650.
12. Alwan N. A., Greenwood D. C., Simpson N. A. B., McArdle H. J., Godfrey K. M., Cade J. E. Dietary Iron Intake during Early Pregnancy and Birth Outcomes in a Cohort of British Women. *Hum. Reprod.* **2011**;26(4):911.
13. Araújo Brito J., do Nascimento Marreiro D., Moita Neto J. M., Silva D. M. C., de Sousa Almondes K. G., de Deus Valadares Neto J, do Nascimento Nogueira N. Enzyme Activity of Superoxide Dismutase and Zincemia in Women with Preeclampsia. *Nutr. Hosp.* **2013**;28(2):486–490.
14. Arribas L., Almansa I., Miranda M., Muriach M., Romero F. J., Villar V. M. Serum Malondialdehyde Concentration and Glutathione Peroxidase Activity in a Longitudinal Study of Gestational Diabetes. *PLoS One.* **2016**;11(5): e0155353.
15. Ashina M., Kido T., Kyono Y., Yoshida A., Suga S., Nakasone R., Abe S., Tanimura K., Nozu K., Fujioka K. Correlation between Severity of Fetal Growth Restriction and Oxidative Stress in Severe Small-for-Gestational-Age Infants. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **2021**;18(20):10726.
16. Ayala A., Muñoz M. F, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production Metabolism and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**;2014.
17. Aycicek A., Erel O., Kocyigit A., Selek S., Demirkol M. R. Breast Milk Provides Better Antioxidant Power than Does Formula. *Nutrition.* **2006**;22(6):616–619.
18. Bakacak M., Kılınç M., Serin S., Ercan Ö., Köstü B., Avcı F., Kıran H., Kıran G. Changes in Copper Zinc and Malondialdehyde Levels and Superoxide Dismutase Activities in Pre-Eclamptic Pregnancies. *Med. Sci. Monit.* **2015**;21:2414.
19. Bartho L. A., Holland O. J., Moritz K. M., Perkins A. V., Cuffe J. S. M. Maternal Corticosterone in the Mouse Alters Oxidative Stress Markers Antioxidant Function and Mitochondrial Content in Placentas of Female Fetuses. *J. Physiol.* **2019**;597(12):3053–3067.

20. Bartho L. A., Holland O. J., Moritz K. M., Perkins A. V., Cuffe J. S. M. Maternal Corticosterone in the Mouse Alters Oxidative Stress Markers Antioxidant Function and Mitochondrial Content in Placentas of Female Fetuses. *J. Physiol.* **2019**;597(12):3053–3067.
21. Basu A., Yu J.Y., Jenkins A.J., Nankervis A.J., Hanssen K.F., Henriksen T., Lorentzen B., Garg S.K., Menard M.K., Hammad S.M., Scardo J.A., Aston C.E., Lyons T.J.. Trace elements as predictors of preeclampsia in type 1 diabetic pregnancy. *Nutr Res.* **2015**;35:421–430.
22. Belviranlı M., Gökbel H. Acute Exercise Induced Oxidative Stress and Antioxidant Changes. *European Journal of General Medicine. Eur J Gen Med.* **2006**;3(3):126-131.
23. Bermúdez L., García-Vicent C., López J., Torró M. I., Lurbe E. Assessment of Ten Trace Elements in Umbilical Cord Blood and Maternal Blood: Association with Birth Weight. *J. Transl. Med.* **2015**;13(1):291.
24. Biri A., Bozkurt N., Gunaydin G., Korucuoglu U., Durak I., Kavutcu M. Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in Preeclampsia. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **2007**;96(3):196–197.
25. Bizerea T. O., Dezsi Ștefana G., Marginean O., Stroescu R., Rogobete A., Bizerea-Spiridon O., Ilie C. The Link Between Selenium Oxidative Stress and Pregnancy Induced Hypertensive Disorders. *Clin. Lab.* **2018**;64(10):1593–1610.
26. Bozkaya V. Ö., Oskovi-Kaplan Z. A., Erel O., Keskin L. H. Anemia in Pregnancy: It's Effect on Oxidative Stress and Cardiac Parameters. *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.* **2021**;34(1):105–111.
27. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **1976**;72:248-54.
28. Brannon P. M., Taylor C. L. Iron Supplementation during Pregnancy and Infancy: Uncertainties and Implications for Research and Policy. *Nutrients.* **2017**;9(12):1327.
29. Bresgen N., Eckl P. M. Oxidative Stress and the Homeodynamics of Iron Metabolism. *Biomol.* **2015**;5(2):808–847.



30. Buhimschi J. A., Buhimschi C. S., Pupkin M., Weiner C. P. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. *Am J Obstet Gynecol* **2003**;189:181-188.
31. Burton G. J., Jauniaux E. Oxidative Stress. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2011**;25(3):287–299.
32. Burton G. J., Jauniaux E. Placental Oxidative Stress: From Miscarriage to Preeclampsia. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **2004**;11(6):342–352.
33. Burton G. J., Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* **2011**;25(3):287–99.
34. Caan B., Horgen D.M., Margen S., King J. C., Jewell N.P. Benefits associated with WIC supplemental feeding during the interpregnancy interval. *Am. J. Clin. Nutr.* **1987**;45:29–41.
35. Callahan L. A., She Z. W., Nosek T. M. Superoxide, hydroxyl radical, and hydrogen peroxide effects on single-diaphragm fiber contractile apparatus. *J Appl Physiol (1985).* **2001**;90(1):45-54.
36. Casanueva E, Viteri F. E. Iron and Oxidative Stress in Pregnancy. *J. Nutr.* **2003**;133(5 Suppl 2):1700S-1708S.
37. Chakraborty A., Ramani P., Sherlin H. J., Premkumar P., Natesan A. Antioxidant and pro-oxidant activity of Vitamin C in oral environment. *Indian J Dent Res.* **2014**;25(4):499-504.
38. Chantanahom N., Phupongi V. Clinical Risk Factors for Preeclampsia in Twin Pregnancies. *PLoS ONE.* **2021**;16:e0249555.
39. Chatterjee S, Tao J. Q., Johncola A., Guo W., Caporale A., Langham M. C., Wehrli F. W. Acute exposure to e-cigarettes causes inflammation and pulmonary endothelial oxidative stress in nonsmoking, healthy young subjects. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2019**;317(2):L155-L166.
40. Chen X., Scholl T. O. Oxidative stress: changes in pregnancy and with gestational diabetes melitus. *CurrDiab Rep.* **2005**;5:282-288.
41. Cindrova-Davies T., Yung H. W., Johns J., Spasic-Boskovic O., Korolchuk S., Jauniaux E., Burton G. J., Charnock-Jones D. S. Oxidative Stress, Gene Expression, and Protein Changes Induced in the Human Placenta during Labor. *Am. J. Pathol.* **2007**;171(4):1168–1179.

42. Cogswell M. E, Parvanta I, Ickes L, Yip R, Brittenham G. M. Iron Supplementation during Pregnancy Anemia and Birth Weight: A Randomized Controlled Trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**;78(4):773–781.
43. Col Madendag I., Eraslan Sahin M., Madendag Y., Sahin E., Demir M. B., Acmaz B., Acmaz G., Muderris I. I. The Effect of Iron Deficiency Anemia Early in the Third Trimester on Small for Gestational Age and Birth Weight: A Retrospective Cohort Study on Iron Deficiency Anemia and Fetal Weight. *Biomed Res. Int.* **2019**;2019.
44. Damasceno D. C., Volpato G. T., Paranhos Calderon I. de M., Cunha Rudge M. V. Oxidative Stress and Diabetes in Pregnant Rats. *Anim. Reprod. Sci.* **2002**;72(3–4):235–244.
45. Das B., Saha-Roy S., Das Gupta A., Lahiri T. K., Das H. N. Assessment of Placental Oxidative Stress in Pre-Eclampsia. *J. Obstet. Gynecol. India* **2012**;62(1):39–42.
46. de Angelis P., Miller R. K., Darrah T. H., Katzman P. J., Pressman E. K., Kent T. R., O'Brien K. O. Elemental Content of the Placenta: A Comparison between Two High-Risk Obstetrical Populations Adult Women Carrying Multiples and Adolescents Carrying Singletons. *Environ. Res.* **2017**;158:553-565.
47. Devrim E., Tarhan J., Erguder J.B., Durak J. Oxidant/antioxidant status of placenta, blood and cord blood samples from pregnant women supplemented with iron. *J Soc Gynecol Investig.* **2006**;13:502-505.
48. Dhawan V. Reactive Oxygen and Nitrogen Species: General Considerations. W: Ganguly, N., Jindal, S., Biswal, S., Barnes, P., Pawankar, R.: Studies on Respiratory Disorders. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. Humana Press, 2014, New York, NY.
49. Drejza M. A., Rylewicz K., Majcherek E., Gross-Tyrkin K., Mizgier M., Plagens-Rotman K., Wójcik M., Panecka-Mysza K., Pisarska-Krawczyk M., Kędzia W., Jarzabek-Bielecka G. Markers of Oxidative Stress in Obstetrics and Gynaecology—A Systematic Literature Review. *Antioxidants* **2022**;11(8):1477.

50. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological* **2002**;82:47–95.
51. Dudenhausen J. W., Maier R. F. Perinatal Problems in Multiple Births. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2010**;107:663.
52. Emerit J., Beaumont C., Trivin F. Iron Metabolism Free Radicals and Oxidative Injury. *Biomed. Pharmacother.* **2001**;55(6):333–339.
53. Ermis B., Ors R., Yildirim A., Tastekin A., Kardas F., Akcay F. Influence of Smoking on Maternal and Neonatal Serum Malondialdehyde Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Levels. *Ann Clin Lab Sci.* **2004**;34(4):405–409.
54. Esterbauer H., Schaur R. J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* **1991**;11(1):81-128.
55. Fainaru O., Almog B., Pinchuk I., Kupfermanc M. J., Lichtenberg D., Many A. Active Labour Is Associated with Increased Oxidisibility of Serum Lipids Ex Vivo. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **2002**;109(8):938–941.
56. Faraci F. M., Didion S. P. Vascular Protection: Superoxide Dismutase Isoforms in the Vessel Wall. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology.* **2004**;24(8):1367-1373.
57. Ferreira R. C., Fragoso M. B. T., Tenório M. C. dos S., Martins A. S. da P., Borbely A. U., Moura F. A., Goulart M. O. F., Oliveira A. C. M. de. Biomarkers of Placental Redox Imbalance in Pregnancies with Preeclampsia and Consequent Perinatal Outcomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2020**:691;108464.
58. Figueiredo A. C. M. G., Gomes-Filho I. S., Silva R. B., Pereira P. P. S., Da Mata F. A. F., Lyrio A. O., Souza E. S., Cruz S. S., Pereira M. G. Maternal Anemia and Low Birth Weight: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutr.* **2018**;10(5):601.
59. Friel J. K, Friesen R. W, Harding S. V, Roberts L. J. Evidence of Oxidative Stress in Full-Term Healthy Infants. *Pediatr. Res.* 2004 566 **2004** 56 (6) 878–882.
60. Gaetke L. M., Chow-Johnson H. S., Chow C. K. Copper: Toxicological Relevance and Mechanisms. *Arch. Toxicol.* **2014**;88(11):1929–1938.

61. Gambling L., Danzeisen R., Fosset C., Andersen H. S., Dunford S., Srai S. K. S., McArdle H. J. Iron and Copper Interactions in Development and the Effect on Pregnancy Outcome. *J. Nutr.* **2003**;133(5):1554S-1556S.
62. Gambling L., McArdle H. J. Iron Copper and Fetal Development. *Proc. Nutr. Soc.* **2004**;63(4):553–562.
63. Ghneim H. K., Al-Sheikh Y. A., Alshebly M. M., Aboul-Soud M. A. M. Superoxide Dismutase Activity and Gene Expression Levels in Saudi Women with Recurrent Miscarriage. *Mol. Med. Rep.* **2016**;13(3):2606.
64. Ghosh S., Laxmi Prasanna V., Sowjanya B., Srivani P., Alagaraja M., Banji d. Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectroscopy: A Review. *Asian J. Pharm. Ana.* **2013**;3(1):24-33.
65. Gilca M., Stoian I., Atanasiu V., Virgolici B. The oxidative hypothesis of senescence. *Journal of Postgraduate Medicine.* **2007**;53:207–213.
66. Gitto E., D'Angelo G., Cusumano E., Reiter R. J., Gitto E., D'Angelo G., Cusumano E., Reiter R. J. Oxidative Stress of Newborn. *Complementary Pediatrics.* **2012**:73–88.
67. Gitto E., Pellegrino S., Gitto P., Barberi I., Reiter R. J. Oxidative Stress of the Newborn in the Pre- and Postnatal Period and the Clinical Utility of Melatonin. *J. Pineal Res.* **2009**;46(2)128–139.
68. Gitto E., Reiter R. J., Karbownik M., Tan D. X., Gitto P., Barberi S., Barberi I. Causes of Oxidative Stress in the Pre- and Perinatal Period. *Biol. Neonate.* **2002**;81(3):146–157.
69. Godfrey K. M, Redman C. W. G, Barker D. J. P, Osmond C. The Effect of Maternal Anaemia and Iron Deficiency on the Ratio of Fetal Weight to Placental Weight. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **1991**;98(9):886–891.
70. Granot E., Kohen R. Oxidative stress in childhood — in healthy and disease states. *Clin Nutr.* **2004**;23:3-11.
71. Grazul-Bilska A.T., Pant D., Luther J.S., Borowicz P.P., Navanukraw C., Caton J.S., Ward M.A., Redmer D.A., Reynolds L.P. Pregnancy rates and gravid uterine parameters in single, twin and triplet pregnancies in naturally bred ewes and ewes after transfer of in vitro produced embryos. *Animal Rep Sci.* **2006**;92:268-283.

72. Griffin I. J., Domellöf M., Bhatia J., Anderson D. M., Kler N. Zinc and Copper Requirements in Preterm Infants: An Examination of the Current Literature. *Early Hum. Dev.* **2013**;89(SUPPL2):S29–S34.
73. Guo G., Zhou T., Ren F., Sun J., Deng D., Huang X., Wassie T., Qazi I. H., Wu X. Effect of Maternal Catalase Supplementation on Reproductive Performance Antioxidant Activity and Mineral Transport in Sows and Piglets. *Animals (Basel)*. **2022**;12(7):828.
74. Harrington K., Goldfrad C., Carpenter R. G., Campbell S. Transvaginal Uterine and Umbilical Artery Doppler Examination of 12-16 Weeks and the Subsequent Development of Pre-Eclampsia and Intrauterine Growth Retardation. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **1997**;9(2):94–100.
75. Heino A., Gissler M., Hindori-Mohangoo A.D., Blondel B., Klungsøyr K., Verdenik I., Mierzejewska E., Velebil P., Ólafsdóttir H.S., Macfarlane A., et al. Variations in Multiple Birth Rates and Impact on Perinatal Outcomes in Europe. *PLoS ONE*. **2016**;11:149252.
76. Hernández-Trejo M., Montoya-Estrada A., Torres-Ramos Y., Espejel-Núñez A., Guzmán-Grenfell A., Morales-Hernández R., Tolentino-Dolores M., Laresgoiti-Servitje E. Oxidative stress biomarkers and their relationship with cytokine concentrations in overweight/obese pregnant women and their neonates. *BMC Immunol.* **2017**;18(1):3.
77. Hindmarsh P. C., Geary M. P. P., Rodeck C. H., Jackson M. R., Kingdom J. C. P. Effect of Early Maternal Iron Stores Placental Weight and Structure. *Lancet*. **2000**;356(9231):719–723.
78. Ho E., Karimi Galougahi K., Liu C. C., Bhindi R., Figtree G. A. Biological Markers of Oxidative Stress: Applications to Cardiovascular Research and Practice. *Redox Biol.* **2013**;1(1):483–491.
79. Hracsko Z., Safar Z., Orvosb H., Novak Z., Pal A., Varga I. S. Evaluation of Oxidative Stress Markers after Vaginal Delivery or Caesarean Section - PubMed. *In Vivo (Brooklyn)*. **2007**;21(4):703–706.
80. Hung T. H, Skepper J. N, Charnock-Jones D. S, Burton G. J. Hypoxia-Reoxygenation: A Potent Inducer of Apoptotic Changes in the Human Placenta and Possible Etiological Factor in Preeclampsia. *Circ. Res.* **2002**;90(12):1274–1281.

81. Hwang J. Y., Lee J. Y., Kim K. N., Kim H., Ha E. H., Park H., Ha M., Kim Y., Hong Y. C., Chang N. Maternal Iron Intake at Mid-Pregnancy Is Associated with Reduced Fetal Growth: Results from Mothers and Children's Environmental Health (MOCEH) Study. *Nutr. J.* **2013**;12(1):1–7.
82. Irato P., Santovito G. Enzymatic and Non-Enzymatic Molecules with Antioxidant Function. *Antioxidants (Basel Switzerland)* **2021**;10(4):579.
83. Irwinda R, Wibowo N, Putri A. S. The Concentration of Micronutrients and Heavy Metals in Maternal Serum Placenta and Cord Blood: A Cross-Sectional Study in Preterm Birth. *J. Pregnancy.* **2019**;2019:5062365.
84. Isik B., Ceylan A., Isik R. Oxidative Stress in Smokers and Non-Smokers. *Inhal. Toxicol.* **2007**;19(9):767–769.
85. Isler M., Delibas N., Guclu M., Gultekin F., Sutcu R., Bahceci M., Kosar A. Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase in Erythrocytes of Patients with Iron Deficiency Anemia: Effects of Different Treatment Modalities - PubMed. *Croat Med J.* **2002**;43(1):16–19.
86. Jankowska A., Grzesiak M., Krekora M., Dominowska J., Jerzyńska J., Kałużny P., Wesołowska E., Szadkowska-Stańczyk I., Trafalska E., Kaleta D., et al. Determinants of the Essential Elements and Vitamins Intake and Status during Pregnancy: A Descriptive Study in Polish Mother and Child Cohort. *Nutrients.* **2021**;13:949.
87. Jantsch L. B., de Lucca L., Dorneles B. N., Konopka C. K., Gonçalves T. de L. Evaluation of Oxidative Stress and  $\delta$ -Aminolevulinate Dehydratase Activity in Twin Pregnancies. *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.* **2020**;33(18):3071–3076.
88. Jauniaux E., Poston L., Burton G. J. Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update.* **2006**;12:747-755.
89. Kamata H., Hirata H. Redox regulation of cellular signalling. *Cell. Signal.* **1999**;11:1–14.

90. Kamceva G., Arsova-Saradinovska Z., Ruskovska T., Zdravkovska M., Kamceva-Panova L., Stikova E. Cigarette Smoking and Oxidative Stress in Patients with Coronary Artery Disease. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* **2016**;4(4):636.
91. Kantola M., Purkunen R., Kröger P., Tooming A., Juravskaja J., Pasanen M., Saarikoski S., Vartiainen T. Accumulation of Cadmium Zinc and Copper in Maternal Blood and Developmental Placental Tissue: Differences between Finland Estonia and St. Petersburg. *Environ. Res.* **2000**;83(1):54–66.
92. Karowicz-Bilinska A., Kędziora-Kornatowska K., Bartosz G. Indices of Oxidative Stress in Pregnancy with Fetal Growth Restriction. *Free Radic. Res.* **2007**;41(8):870–873.
93. Karpińska A., Gromadzka G. Stres oksydacyjny i naturalne mechanizmy antyoksydacyjne – znaczenie w procesie neurodegeneracji. Od mechanizmów molekularnych do strategii terapeutycznych. *Post Hig.* **2013**;67:43-53.
94. Katerji M., Filippova M., Duerksen-Hughes P. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**;2019:1279250.
95. Khayat S., Fanaei H., Ghanbarzahi A. Minerals in Pregnancy and Lactation: A Review Article. *J ClinDiagn Res.* **2017**;11:QE01–QE05.
96. Khoubnasabjafari M., Ansarin K., Jouyban A. Reliability of Malondialdehyde Measurements as a Marker of Oxidative Stress in Pediatrics. *Pediatr Neonatol.* **2016**;57(5):450.
97. King J. C. Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**;71:1218–1225.
98. Kinnamon K. E. Some Independent and Combined Effects of Copper Molybdenum and Zinc on the Placental Transfer of Zinc-65 in the Rat. *J. Nutr.* **1963**;81(4):312–320.
99. Kot K., Kosik-Bogacka D., Łanocha-Arendarczyk N., Malinowski W., Szymański S., Mularczyk M., Tomska N., Rotter I. Interactions between 14 Elements in the Human Placenta Fetal Membrane and Umbilical Cord. *Int. J. Environ. Res. Public Heal.* **2019**;16(9):1615.

100. Kot K., Łanocha-Arendarczyk N., Kupnicka P., Szymański S., Malinowski W., Kalisińska E., Chlubek D., Kosik-Bogacka D. Selected Metal Concentration in Maternal and Cord Blood. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**;18(23):12407.
101. Kutlu T., Karagozler A. A., Gozukara E. M. Relationship Among Placental Cadmium Lead Zinc and Copper Levels in Smoking Pregnant Women. *Biol. Trace Elem. Res.* **2006**;114(1–3):7–18.
102. Lachili B., Hininger I., Faure H., Arnaud J., Richard M. J., Favier A., Roussel A. M. Increased lipid peroxidation in pregnant women after iron and vitamin C supplementation. *Biol Trace Elem Res.* **2001**;83(2):103-110.
103. Latar I. L. M., Razali N. The Desire for Multiple Pregnancy among Patients with Infertility and Their Partners. *Int. J. Reprod. Med.* **2014**;2014:301452.
104. Lee Y. H, Layman D. K, Bell R. R. Glutathione Peroxidase Activity in Iron-Deficient Rats. *J. Nutr.* **1981**;111(1):194–200.
105. Leguizamón G. F, Zeff N. P, Fernández A. Hypertension and the Pregnancy Complicated by Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **2006**;6(4):297–304.
106. Levario-Carrillo M., Hernandez M., Vasquez M., Chavez D., Sanchez C., Corral M. Effects of Iron-Deficiency Anemia on Placenta and Birth Weight. *Ginecol Obs. Mex.* **2003**;71:75–81.
107. Li H. T., Jiao M., Chen J., Liang Y. Roles of Zinc and Copper in Modulating the Oxidative Refolding of Bovine Copper Zinc Superoxide Dismutase. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* **2010**;42(3):183–194.
108. Lira P. I. C., Ashworth A., Morris S. S. Effect of Zinc Supplementation on the Morbidity Immune Function and Growth of Low-Birth-Weight Full-Term Infants in Northeast Brazil. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**;68(2):418S-424S.
109. Liu Q., Berchner-Pfannschmidt U., Möller U., Brecht M., Wotzlaw C., Acker H., Jungermann K., Kietzmann T. A Fenton Reaction at the Endoplasmic Reticulum Is Involved in the Redox Control of Hypoxia-Inducible Gene Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**;101(12):4302.
110. Lord T., Aitken R. J. Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction.* **2013**;146(6):R217-27.
111. Lu J., Wang Z., Cao J., Chen Y., Dong Y. A Novel and Compact Review on the Role of Oxidative Stress in Female Reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2018**;16(1):80.



112. Luo Z., Luo W., Li S., Zhao S., Sho T., Xu X., Zhang J., Xu W., Xu J. Reactive Oxygen Species Mediated Placental Oxidative Stress Mitochondrial Content and Cell Cycle Progression through Mitogen-Activated Protein Kinases in Intrauterine Growth Restricted Pigs. *Reprod. Biol.* **2018**;18(4):422–431.
113. Luo Z. C, Fraser W. D, Julien P, Deal C. L, Audibert F, Smith G. N, Xiong X, Walker M. Tracing the Origins of “Fetal Origins” of Adult Diseases: Programming by Oxidative Stress? *Med. Hypotheses.* **2006**;66(1):38–44.
114. Lurie S., Mamet Y. Red blood cell survival and kinetics during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* **2000**;93:185-192.
115. Lymperaki E., Tsikopoulos A., Makedou K., Paliogianni E., Kiriazi L., Charisi C., Vagdatli E. Impact of Iron and Folic Acid Supplementation on Oxidative Stress during Pregnancy. *J Obstet Gyneacol.* **2015**;35(8):803–806.
116. Mazurek D., Łożna K., Bronkowska M. The Concentration of Selected Elements in the Placenta According to Selected Sociodemographic Factors and Their Effect on Birth Mass and Birth Length of Newborns. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2020**;58:126425.
117. Mbofung C. M. F, Subbarau V. V. Trace Element (Zinc Copper Iron and Magnesium) Concentrations in Human Placenta and Their Relationship to Birth Weight of Babies. *Nutr. Res.* **1990**;10(4):359–366.
118. McAlpine J. M., McKeating D. R., Vincze L., Vanderlelie J. J., Perkins A. V. essential mineral intake during pregnancy and its association with maternal health and birth outcomes in South East Queensland, Australia. *Nutr. Metab. Insights.* **2019**;12:1–12.
119. Menezo Y. J. R., Silvestris E., Dale B., Elder K. Oxidative Stress and Alterations in DNA Methylation: Two Sides of the Same Coin in Reproduction. *Reprod. Biomed. Online.* **2016**;33(6):668–683.
120. Mihalas B. P., Bromfield E. G., Sutherland J. M. De., Iuliis G. N., McLaughlin E.A., Aitken R.J., Nixon B. Oxidative damage in naturally aged mouse oocytes is exacerbated by dysregulation of proteasomal activity. *J Biol Chem.* **2018**;293(49):18944-18964.
121. Minghetti L., Suppiej A., Greco A., Franzoi M., Pascoli I., Zanardo V. Oxidative Stress in Twin Neonates Is Influenced by Birth Weight and Weight Discordance. *Clin. Biochem.* **2011**;44(8–9):654–658.

122. Mistry H. D., Kurlak L. O., Williams P. J., Ramsay M. M., Symonds M. E., Broughton Pipkin F. Differential Expression and Distribution of Placental Glutathione Peroxidases 1, 3 and 4 in Normal and Preeclamptic Pregnancy. *Placenta*. **2010**;31(5):401–408.
123. Mocatta T. J., Winterbourn C. C., Inder T. E., Darlow B. A. The Effect of Gestational Age and Labour on Markers of Lipid and Protein Oxidation in Cord Plasma. *Free Radic. Res*. **2004**;38(2):185–191.
124. Motamed S., Ebrahimi M., Safarian M., Ghayour-Mobarhan M., Mouhebat M., Azarpazhouh M., Esmailie H., Norouzi A., Ferns G. A. A. Micronutrient Intake and the Presence of the Metabolic Syndrome. *N. Am. J. Med. Sci*. **2013**;5(6):377.
125. Myatt L. Reactive Oxygen and Nitrogen Species and Functional Adaptation of the Placenta. *Placenta*. **2010**;31:S66.
126. Myatt L., Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*. **2004**;122:369-382.
127. Napierala M., Merritt T. A., Miechowicz I., Mielnik K., Mazela J., Florek E. The Effect of Maternal Tobacco Smoking and Second-Hand Tobacco Smoke Exposure on Human Milk Oxidant-Antioxidant Status. *Environ. Res*. **2019**;170:110–121.
128. Negi R., Pande D., Karki K., Kumar A., Khanna R. S., Khanna H. D. A Novel Approach to Study Oxidative Stress in Neonatal Respiratory Distress Syndrome. *BBA Clin*. **2014**;3:65–69.
129. Noda Y., Ota K., Shirasawa T., Shimizu T. Copper/Zinc Superoxide Dismutase Insufficiency Impairs Progesterone Secretion and Fertility in Female Mice. *Biol. Reprod*. **2012**;86(1):16–17.
130. Nuhu F., Seymour A. M., Bhandari S. Impact of Intravenous Iron on Oxidative Stress and Mitochondrial Function in Experimental Chronic Kidney Disease. *Antioxidants*. **2019**;8(10):498.
131. Ochoa J. J., Contreras-Chova F., Muñoz S., Araujo-Nepomuceno E., Bonillo A., Molina-Carballo A., Muñoz-Hoyos A. Fluidity and Oxidative Stress in Erythrocytes from Very Low Birth Weight Infants during Their First 7 Days of Life. *Free Radic. Res*. **2007**;41(9):1035–1040.

132. Ohel G., Kisselevitz R., Margalioth E. J., Schenker J. G. Ascorbate-Dependent Lipid Peroxidation in the Human Placenta and Fetal Membranes. *Gynecol. Obstet. Invest.* **1985**;19(2):73–77.
133. Ordóñez-Díaz M. D., Gil-Campos M., Flores-Rojas K., Muñoz-Villanueva M. C., Mesa M. D., de la Torre-Aguilar M. J., Gil Á., Pérez-Navero J. L. Impaired Antioxidant Defence Status Is Associated With Metabolic-Inflammatory Risk Factors in Preterm Children With Extrauterine Growth Restriction: The BIORICA Cohort Study. *Front. Nutr.* **2021**;8:1140.
134. Patil S, Kodliwadmth M, Kodliwadmth S. Lipid Peroxidation and Nonenzymatic Antioxidants in Normal Pregnancy. *J Obs. Gynecol India.* **2006**;56:399–401.
135. Pereira A.C., Martel F. Oxidative Stress in Pregnancy and Fertility Pathologies. *Cell Biol. Toxicol.* **2014**;30(5):301–312.
136. Peuchant E., Brun J.L., Rigalleau V., Dubourg L., Thomas M. J., Daniel Y. L., Leng J. J., Gin H. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clin Biochem.* **2004**;37:293-298.
137. Phaniendra A., Jestadi D.B., Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* **2015**;30(1):11–26.
138. Pizent A., Lazarus M., Kovačić J., Lovaković B. T., Karačonji I. B., Semren T. Ž., Sekovanić A., Orct T., Branović-čakanić K., Brajenović N., Jurič A., Miškulin I., Škratić L., Stasenko S., Mioč T., Jurasović J., Piasek M. Cigarette Smoking during Pregnancy: Effects on Antioxidant Enzymes Metallothionein and Trace Elements in Mother-Newborn Pairs. *Biomolecules.* **2020**;10(6):1–19.
139. Pizzino G., Irrera N., Cucinotta M., Pallio G., Mannino F., Arcoraci V., Squadrito F., Altavilla D., Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* **2017**;2017:8416763.
140. Poston L., Raijmakers M. T. Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome — a review. *Placenta Suppl.* **2004**;18:72-78.
141. Prasad A. S. Discovery of Human Zinc Deficiency: Its Impact on Human Health and Disease. *Adv. Nutr.* **2013**;4(2):176–190.

142. Pressman E. K, Cavanaugh J. L, Mingione M, Norkus E. P, Woods J. R. Effects of Maternal Antioxidant Supplementation on Maternal and Fetal Antioxidant Levels: A Randomized Double-Blind Study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2003**;189(6):1720–1725.
143. Preziosi P., Prual A., Galan P., Daouda H., Boureima H., Hercberg S. Effect of Iron Supplementation on the Iron Status of Pregnant Women: Consequences for Newborns. *Am. J. Clin. Nutr.* **1997**;66(5):1178–1182.
144. Rahman T., Hosen I., Islam M. M. T., Shekhar H. U. Oxidative stress and human health. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **2012**;03:997–1019.
145. Rahmati S., Delpishe A., Azami M., Ahmadi M. R. H., Sayehmiri K. Maternal Anemia during Pregnancy and Infant Low Birth Weight: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Reprod. Biomed.* **2017**;15(3):125.
146. Rajendran S., Bobby Z., Habeebullah S., Elizabeth Jacob S. Differences in the Response to Iron Supplementation on Oxidative Stress Inflammation and Hematological Parameters in Nonanemic and Anemic Pregnant Women. *J Matern Fetal Neonatal Med.* **2020**;35(3):465–471.
147. Rak K., Łożna K., Styczyńska M., Bobak Ł., Bronkowska M. Oxidative Stress at Birth Is Associated with the Concentration of Iron and Copper in Maternal Serum. *Nutrients.* **2021**;13(5):1491.
148. Ramesh T., Sureka C., Bhuvana S., Begum V. H. Oxidative Stress in the Brain of Cigarette Smoke-Induced Noxiousness: Neuroprotective Role of *Sesbania Grandiflora*. *Metab. Brain Dis.* **2015**;30(2):573–582.
149. Reddy Y. S, Aparna Y, Ramalaksmi B. A, Dinesh Kumar B. Lead and Trace Element Levels in Placenta Maternal and Cord Blood: A Cross-Sectional Pilot Study. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **2014**;40(12):2184–2190.
150. Redman C. W. G, Sargent I. L. Pre-Eclampsia the Placenta and the Maternal Systemic Inflammatory Response--a Review. *Placenta* **2003**;24Suppl A:S21-27.
151. Ruder E. H., Hartman T. J., Goldman M. B. Impact of Oxidative Stress on Female Fertility. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **2009**;21(3):219.
152. Saker M., Soulimane Mokhtari N., Merzouk S. A., Merzouk H., Belarbi B., Narce M. Oxidant and Antioxidant Status in Mothers and Their Newborns According to Birthweight. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2008**;141(2):95–99.

153. Saugstad O. D. Oxidative stress in the newborn--a 30-year perspective. *Biol Neonate*. **2005**;88(3):228-36.
154. Saugstad O. D. Oxygen radical disease in neonatology. *Semin Neonatal*. **1998**;3:229-238.
155. Scholl T. O., Leskiw M., Chen X., Sims M., Stein P.T. Oxidative stress, diet and the etiology of preeclampsia. *Am J Clin Nutr*. **2005**;81:1390-1396.
156. Schoots M. H., Gordijn S. J., Scherjon S. A., van Goor H., Hillebrands J. L. Oxidative Stress in Placental Pathology. *Placenta* **2018** 69 153–161.
157. Sharma R. K., Agarwal A. Role of Reactive Oxygen Species in Male Infertility. *Urology* **1996**;48(6):835–850.
158. Shi G., Zhang Z., Ma L., Zhang B., Dang S., Yan H. Association between Maternal Iron Supplementation and Newborn Birth Weight: A Quantile Regression Analysis. *Ital. J. Pediatr*. **2021**;47(1):1–9.
159. Siddiqui F., McEwan A. Twins. *Obstet. Gynaecol. Reprod. Med*. **2007**;17:289–295.
160. Simmer K., Thompson R. P. H. Maternal Zinc and Intrauterine Growth Retardation. *Clin. Sci. (Lond)*. **1985**;68(4):395–399.
161. Sladek S.M., Kanbour-Shakir A., Watkins S., Berghorn K.A., Hoffman G.E., Roberts J.M. Granulated metrial gland cells contain nitric oxide synthases during pregnancy in the rat. *Placenta*. **1998**;19(1):55-65.
162. Soma-Pillay P., Nelson-Piercy C., Tolppanen H., Mebazaa A. Physiological Changes in Pregnancy. *Cardiovasc. J. Afr*. **2016**;27(2):89–94.
163. Soto-Heras S., Paramio M. T. Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs. *Res Vet Sci*. **2020**;132:342-350.
164. Spencer B. H, Vanderlelie J. J.,; Perkins A. V. Essentiality of Trace Element Micronutrition in Human Pregnancy: A Systematic Review. *J. Pregnancy Child Heal*. **2015**;2(3):1–7.
165. Squillacioti G., Guglieri F., Colombi N., Ghelli F., Berchiolla P., Gardois P., Bono R. Non-Invasive Measurement of Exercise-Induced Oxidative Stress in Response to Physical Activity. A Systematic Review and Meta-Analysis. *Antioxidants (Basel Switzerland)*. **2021**;10(12):2008.

166. Sugino N., Takiguchi S., Kashida S., Karube A., Nakamura Y., Kato H. Superoxide Dismutase Expression in the Human Corpus Luteum during the Menstrual Cycle and in Early Pregnancy. *Mol. Hum. Reprod.* **2000**;6(1):19–25.
167. Suliburska J., Skrypnik K., Chmurzyńska A. Iron and Folic Acid Supplementation Affects Mineral Status in Female Rats with a Deficiency of These Micronutrients. *Biol. Trace Elem. Res.* **2021**;199(9):3393.
168. Szymankiewicz M. Incidence and mortality of newborns from multiple pregnancies. *Perinatol. Neonatol. i Ginekol.* **2010**;3:245–248.
169. Tian X., Anthony K., Neuberger T., Diaz F. J. Preconception Zinc Deficiency Disrupts Postimplantation Fetal and Placental Development in Mice. *Biol. Reprod.* **2014**;90(4):83.
170. Toblli J. E., Cao G., Oliveri L., Angerosa M. Effects of Iron Deficiency Anemia and Its Treatment with Iron Polymaltose Complex in Pregnant Rats Their Fetuses and Placentas: Oxidative Stress Markers and Pregnancy Outcome. *Placenta.* **2012**;33(2):81–87.
171. Toescu V., Nuttall S. L., Martin U., Nightingale P., Kendall M. J., Brydon P., Dunne F. Changes in Plasma Lipids and Markers of Oxidative Stress in Normal Pregnancy and Pregnancies Complicated by Diabetes. *Clin. Sci. (Lond).* **2004**;106(1):93–98.
172. Trachootham D., Lu W., Ogasawara M. A., Valle N. R., Del Huang P. Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxidants and Redox Signaling.* **2008**;10(8):1343–1374.
173. Trougakos I. P., Gonos E. S. Regulation of Clusterin/Apolipoprotein J, a Functional Homologue to the Small Heat Shock Proteins, by Oxidative Stress in Ageing and Age-Related Diseases. *Free Radic. Res.* **2006**;40(12):1324–1334.
174. Umekawa T., Sugiyama T., Kihira T., Murabayashi N., Zhang L., Nagao K., Kamimoto Y., Ma N., Yodoi J., Sagawa N. Overexpression of Thioredoxin-1 Reduces Oxidative Stress in the Placenta of Transgenic Mice and Promotes Fetal Growth via Glucose Metabolism. *Endocrinology* **2008**;149(8):3980.
175. Uriu-Adams J. Y, Keen C. L. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med.* **2005**;26(4-5):268-298.

176. van't Erve T. J, Lih F. B., Kadiiska M. B., Deterding L. J., Eling T. E., Mason R. P. Reinterpreting the best biomarker of oxidative stress: The 8-iso-PGF(2 $\alpha$ )/PGF(2 $\alpha$ ) ratio distinguishes chemical from enzymatic lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* **2015**;83:245-51.
177. Venkataramani V. Iron Homeostasis and Metabolism: Two Sides of a Coin. *Adv Exp Med Biol.* **2021**;1301:25-40.
178. Wall P. D, Pressman E. K, Woods J. R. Preterm Premature Rupture of the Membranes and Antioxidants: The Free Radical Connection. *J. Perinat. Med.* **2002**;30(6):447–457.
179. Wang H., Hu Y.-F., Hao J.-H., Chen Y.-H., Su P.-Y., Wang Y., Yu Z., Fu L, Xu Y.-Y., Zhang C., Tao F.-B., Xu D.-X. Maternal Zinc Deficiency during Pregnancy Elevates the Risks of Fetal Growth Restriction: A Population-Based Birth Cohort Study. *Sci. Rep.* **2015**;5:11262.
180. Wang H., Hu Y. F., Hao J. H., Chen Y. H., Su P. Y., Wang Y., Yu Z., Fu L., Xu Y. Y., Zhang C., Tao F. B., Xu D. X. Maternal zinc deficiency during pregnancy elevates the risks of fetal growth restriction: a population-based birth cohort study. *Sci Rep.* **2015**;5:11262.
181. Waris G., Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog.* **2006**;11;5:14.
182. White V., Capobianco E., Higa R., Martínez N., Sosa M., Pustovrh M. C., Jawerbaum A. Increased Nitration and Diminished Activity of Copper/Zinc Superoxide Dismutase in Placentas from Diabetic Rats. *Free Radic. Res.* **2010**;44(12):1407–1415.
183. Wickstrom R. Effects of Nicotine During Pregnancy: Human and Experimental Evidence. *Curr. Neuropharmacol.* **2007**;5(3):213.
184. Wołonciej M., Milewska E., Roszkowska-Jakimiec W. Trace Elements as an Activator of Antioxidant Enzymes. *Postep. Hig Med Dosw.* **2016**;70:1483–1498.
185. World Health Organization. International Atomic Energy Agency & Food and Agriculture Organization of the United Nations Trace Elements in Human Nutrition and Health; World Health Organization. **1996**. [accessed on 14 April 2023]. Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37931>
186. Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim).* **2018**;12(3):88-93

187. Zahiri sorouri Z., Sadeghi H., Pourmarzi D. The Effect of Zinc Supplementation on Pregnancy Outcome: A Randomized Controlled Trial. *J. Matern. Neonatal Med.* **2016**;29(13):2194–2198.
188. Zhou J. F. Effects of Cigarette Smoking and Smoking Cessation on Plasma Constituents and Enzyme Activities Related to Oxidative Stress. *Biomed Env. Sci.* **2000**;13(1):44–55.



## IX. Wykaz tabel

**Tabela 1.** Charakterystyka badanych kobiet i parametry antropometryczne noworodków (AM, średnia; SD, odchylenie standardowe, Med, mediana)

**Tabela 2.** Karta Fentona (ang. *Fenton Growth Chart*) dla centyli długości i wagi noworodków płci męskiej (n=54) i żeńskiej (n=65)

**Tabela 3.** Sposób przygotowania próbek biologicznych do wykonania oznaczeń zawartości badanych pierwiastków

**Tabela 4.** Przygotowanie próby ślepej oraz wzorca rozcieńczeń do badań

**Tabela 5.** Granica wykrywalności i oznaczalności żelaza (Fe), cynku (Zn) i miedzi (Cu)

**Tabela 6.** Wartości stężeń badanych pierwiastków w materiale certyfikowanym (w mg/kg suchej masy)

**Tabela 7.** Seria rozcieńczeń uzyskania krzywej standardowej (wzorzec)

**Tabela 8.** Płytką 96-dołkowej dla oznaczenia aktywności GR

**Tabela 9.** Płytką 96-dołkowej dla oznaczenia aktywności GPx

**Tabela 10.** Płytką 96-dołkowej dla oznaczenia aktywności SOD

**Tabela 11.** Seria rozcieńczeń uzyskania krzywej standardowej (wzorzec).

**Tabela 12.** Płytką 96-dołkowej dla oznaczenia aktywności CAT

**Tabela 13.** Seria rozcieńczeń uzyskania krzywej standardowej (wzorzec).

**Tabela 14.** Płytką 96-dołkowej dla oznaczenia aktywności LPO

**Tabela 15.** Seria rozcieńczeń uzyskania krzywej standardowej (wzorzec).

**Tabela 16.** Stężenie żelaza (Fe), cynku (Zn) i miedzi (Cu) w łożysku, pępowinie i błonie płodowej kobiet w ciąży mnogiej

**Tabela 17.** Stężenie antyoksydantów i prooksydantów w łożysku, pępowinie i błonie płodowej

**Tabela 18.** Zastosowanie korelacji Spearmana do analizy zależności pomiędzy stężeniami żelaza (Fe), cynku (Zn) i miedzi (Cu) w łożysku, pępowinie i błonie płodowej, a bilansem prooksydacyjno-antyoksydacyjnym i parametrami antropometrycznymi noworodków

## X. Wykaz rycin

**Ryc. 1.** Mineralizator mikrofalowy CEM MARS 5 Digestion Oven

**Ryc. 2.** Przygotowanie materiału biologicznego do mineralizacji, rozdrabnianie próbek biologicznych w moździerzu

**Ryc. 3.** Aparatu iCAP 7000 (fotografia oryginalna)

**Ryc. 4.** Wykres widma emisyjnego Fe 238,204 nm roztworu żelaza w stężeniu 0,01mg/l, 1,1mg/l, 1mg/l oraz próby zerowej (kontroli).

**Ryc. 5.** Wykres widma emisyjnego Zn 213,856 nm roztworu cynku w stężeniu 0,01mg/l, 1,1mg/l, 1mg/l oraz próby zerowej (kontroli).

**Ryc. 6.** Wykres widma emisyjnego Cu 224,700 nm roztworu miedzi w stężeniu 0,01mg/l, 1,1mg/l, 1mg/l oraz próby zerowej (kontroli).

**Ryc. 7.** Homogenizator nożowy.

**Ryc. 8.** Zastosowanie testu Kruskala-Wallisa do porównania stężenia żelaza (Fe) w łożysku, błonie płodowej i pępowinie

**Ryc. 9.** Zastosowanie testu Kruskala-Wallisa do porównania stężenia cynku (Zn) w łożysku, błonie płodowej i pępowinie

**Ryc. 10.** Zastosowanie testu Kruskala-Wallisa do porównania stężenia cynku (Cu) w łożysku, błonie płodowej i pępowinie

**Ryc. 11.** Zastosowanie testu Manna-Whitneya do porównania centyli długości noworodka na stężenie żelaza (Fe) w łożysku

**Ryc. 12.** Zastosowanie testu Manna-Whitneya do porównania wpływu palenia papierosów przez kobiety przed ciążą, a stężeniem cynku (Zn) w łożysku

**Ryc. 13.** Zastosowanie testu Manna-Whitneya do porównania wpływu wieku ciążowego na stężenie cynku (Cu) w łożysku

**Ryc. 14.** Zastosowanie testu Manna-Whitneya dla porównania wpływu przyjmowania suplementów żelaza przez kobiety w ciąży na aktywność peroksydazy glutationowej (GPx)

**Ryc. 15.** Zastosowanie testu Manna-Whitneya dla porównania aktywności wpływu wagi ciała noworodków na aktywność katalazy (CAT)

**Ryc. 16.** Zastosowanie testu Manna-Whitneya dla porównania aktywności wpływu palenia papierosów przez kobiety przez ciążą na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

**Ryc. 17** Zastosowanie testu U Manna-Whitneya dla porównania aktywności GR  
łożyska między grupami  $>18,5$  do  $<25$  BMI oraz  $<18,5$  i  $>25$  BMI

## XI. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

### Załącznik nr 1. The Role of Fe, Zn, Cu in Pregnancy



Review

## The Role of Fe, Zn, and Cu in Pregnancy

Konrad Grzeszczak <sup>1</sup>, Sebastian Kwiatkowski <sup>2</sup> and Danuta Kosik-Bogacka <sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology and Medical Parasitology, Pomeranian Medical University in Szczecin, Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin, Poland; konrad.grzeszczak@pum.edu.pl

<sup>2</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Pomeranian Medical University in Szczecin, Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin, Poland; kwiatkowskiseba@gmail.com

<sup>3</sup> Independent Laboratory of Pharmaceutical Botany, Pomeranian Medical University in Szczecin, Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin, Poland

\* Correspondence: kodan@pum.edu.pl; Tel.: +48-605103907

Received: 12 June 2020; Accepted: 5 August 2020; Published: 12 August 2020



**Abstract:** Iron (Fe), copper (Cu), and zinc (Zn) are microelements essential for the proper functioning of living organisms. These elements participate in many processes, including cellular metabolism and antioxidant and anti-inflammatory defenses, and also influence enzyme activity, regulate gene expression, and take part in protein synthesis. Fe, Cu, and Zn have a significant impact on the health of pregnant women and in the development of the fetus, as well as on the health of the newborn. A proper concentration of these elements in the body of women during pregnancy reduces the risk of complications such as anemia, induced hypertension, low birth weight, preeclampsia, and postnatal complications. The interactions between Fe, Cu, and Zn influence their availability due to their similar physicochemical properties. This most often occurs during intestinal absorption, where metal ions compete for binding sites with transport compounds. Additionally, the relationships between these ions have a great influence on the course of reactions in the tissues, as well as on their excretion, which can be stimulated or delayed. This review aims to summarize reports on the influence of Fe, Cu, and Zn on the course of single and multiple pregnancies, and to discuss the interdependencies and mechanisms occurring between Fe, Cu, and Zn.

**Keywords:** microelements; iron; copper; zinc; pregnancy

### 1. Introduction

Macroelements and microelements are essential for the proper functioning of living organisms (Figure 1). They participate in many processes, including cellular metabolism and antioxidant and anti-inflammatory defenses, and also influence enzyme activity, regulate gene expression, and take part in protein synthesis [1]. Provided in the diet, their levels in the human body depend on the geographical location, environmental pollution, gender, and age. A considerable body of research has been devoted to the concentrations of iron (Fe), copper (Cu), and zinc (Zn) in biological materials from women during childbirth, including fetal membrane (FM) and serum (FS), cord blood (CB), serum (CS) and plasma (CP), and maternal blood (MB), serum (MS) and plasma (MP), and placenta (P) (Table 1).

**Table 1.** The concentrations of iron (Fe), copper (Cu), and zinc (Zn) in different biological materials collected from women during childbirth (*n*, number of women; FM, fetal membrane; FS, fetal serum; C, cord; CB, cord blood; CS, cord serum; CP, cord plasma MB, maternal blood; MS, maternal serum; MP, maternal plasma; P, placenta; dw, dry weight; ww, wet weight).

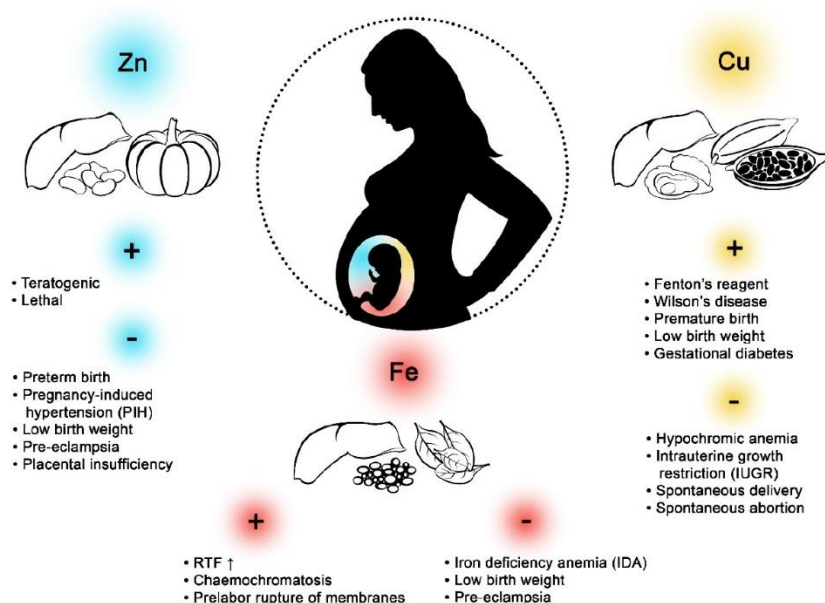
Research Area	n	Mean Age (Years)	Concentration of			References
			Fe	Cu	Zn	
Europe						
Szczecin, Poland	170	29	P: 640.726 mg/kg dw FM: 640.726 mg/kg dw C: 567.285 mg/kg dw	P: 6.013 mg/kg dw FM: 8.908 mg/kg dw C: 4.320 mg/kg dw	P: 66.904 g/kg dw FM: 62.789 g/kg dw C: 54.653 g/kg dw	[2]
Poznan, Poland	64	28.1	MS: 1.08 µg/mL CS (vein): 1.96 µg/mL CS (artery): 1.63 µg/mL	MS: 0.63 µg/mL CS (vein): 0.65 µg/mL CS (artery): 0.65 µg/mL	MS: 1.91 µg/mL CS (vein): 0.36 µg/mL CS (artery): 0.36 µg/mL	[3]
Oleśnica, Poland	64	27	-	MP: 1.93 mg/L CP: 0.49 mg/L	MP: 0.58 mg/L CP: 0.82 mg/L	[4]
Sverdlovsk region (non-industrial areas) and Yekaterinburg (industrial city), Russian	Pregnant women from non-industrial areas (29)	Age range: 17-42	-	MS: 5.44 mk/mg/L P: 6.1 mk/mg/L	-	[5]
	Pregnant women from industrial city (127)		-	MS: 4.73 mk/mg/L P: 13.34 mk/mg/L	-	
Moscow, Russian	(150) control	33.1	MS: 1.34 µg/L	MS: 1.15 µg/L	-	[6]
	Pregnancy (169)	33.4	MS: 1.27 µg/L	MS: 1.60 µg/L	-	
	Miscarriage (75)	34.8	MS: 1.43 µg/L	MS: 1.12 µg/L	-	
	Infertility (91)	35.5	MS: 1.29 µg/L	MS: 1.04 µg/L	-	
Barcelona, Spain	Appropriate for gestational age (96)	32	-	-	MS: 1181 µg/dL ww FS: 1518 µg/dL ww P: 8.4 µg/dL ww	[7]
	Intrauterine growth restriction (49)	32	-	-	MS: 935 µg/dL ww FS: 935 µg/dL ww P: 8.5 µg/dL ww	
	Small for gestational age (33)	30	-	-	MS: 984 µg/dL ww FS: 1134 µg/dL ww P: 8.9 µg/dL ww	

**Table 1. Cont.**

Africa						
Mid-Western Region, Nigeria	22	-	P: 84.3 µg/gm dw	P: 6.3 µg/µm dw	P: 66.6 µg/µm dw	[8]
North America						
New Hampshire, USA	1159	31.2	-	-	P: 10.26 µg/g ww	[9]
Las Vegas, Nevada, USA	28	29.9	P: 1185.18 µg/L dw	P: 7.81 µg/L dw	P: 63.59 µg/L dw	[10]
New York, USA	Women carrying multiples (101)	30	P: 26.63 µg/g dw	-	P: 5.9 µg/g dw	[11]
	Women carrying singletons (132)	17.4	P: 17.99 µg/g dw	-	P: 2.6 µg/g dw	
Chattanooga, USA	374	-	P: 503,200 µg/kg dw	P: 3889 µg/kg dw	P: 55,120 µg/kg dw	[12]
Pune, India	Normal pregnancies (47)	Age range: 19-35	MB: 120.4 µg/dL CB: 153.4 µg/dL	MB: 1.44 µg/dL CB: 0.26 µg/dL	MB: 57.5 µg/dL CB: 90.8 µg/dL	[13]
	Preclampsic pregnancies (14)		MB: 96.3 µg/dL CB: 118.6 µg/dL	MB: 1.58 µg/dL CB: 0.81 µg/dL	MB: 49.2 µg/dL CB: 79.9 µg/dL	
Delhi, India	Females delivered full term babies (gestational age >37 weeks) (50)	25.54	P: 58.94 µg/dL dw	P: 0.255 µg/dL dw	P: 18.28 µg/dL dw	[14]
	Females delivered pre-term babies (gestational age <37 weeks) (30)	24.63	P: 50.60 µg/dL dw	P: 0.220 µg/dL dw	P: 17.26 µg/dL dw	
Jaipur, India	Pregnant women (80)	29.8	P: 72.7 µg/dL	P: 187.3 µg/dL	P: 70.5 µg/dL	[15]
	Non-pregnant women (20)	20	P: 106.9 µg/dL	P: 127.7 µg/dL	P: 100.9 µg/dL	
Ahmedabad, India	Women with spontaneous abortion (159)	24.85	-	MS: 1.59 mg/L	MS: 1.43 mg/L	[16]
	Woman without spontaneous abortion (118)	23.65	-	MS: 1.81 mg/L	MS: 1.46 mg/L	

Table 1. Cont.

Hyderabad, India	Pregnant women from rural area (30)	21.1	MS: 201.6 µg/dL CS: 279.8 µg/dL P: 1159.5 µg/g	MS: 166.6 µg/dL CS: 92.03 µg/dL P: 78.4 µg/g	MS: 205.1 µg/dL CS: 128.2 µg/dL P: 49.6 µg/g	[17]
	Pregnant women from urban area (30)	22.2	MS: 128.6 µg/dL CS: 203.5 µg/dL P: 1458.2 µg/g	MS: 150.7 µg/dL CS: 83.5 µg/dL P: 61.4 µg/g	MS: 245.6 µg/dL CS: 122.1 µg/dL P: 51.5 µg/g	
Jakarta, Indonesia	Pregnant women ≥37 weeks of gestational age for the term group (25)	27.68	P: 252.16 µg/g dw CB: 212.00 µg/dL dw MS: 77 µg/dL dw	P: 2.96 µg/g dw CB: 32.20 µg/dL dw MS: 222.65 µg/dL dw	P: 58.34 µg/g dw CB: 293.80 µg/dL dw MS: 45.16 µg/dL dw	[18]
	Pregnant women preterm birth in 26–36 weeks of gestational age (26)	24.0	P: 78.45 µg/g dw CB: 236.50 µg/dL dw MS: 71.50 µg/dL dw	P: 1.62 µg/g dw CB: 20.60 µg/dL dw MS: 215.35 µg/dL dw	P: 28.41 µg/g dw CB: 321.43 µg/dL dw MS: 40.26 µg/dL dw	
Fukuoka, Japan	48	29.3	-	P: 3910 ng/g dw C: 2960 ng/g dw	P: 48,100 ng/g dw C: 35,700 ng/g dw	[19]
Shanghai, China	1568	26.4	MS: 8.1 mmol/l.	MS: 23.43 µmol/l.	MS: 87.32 µmol/l.	[20]
Amman, Jordan	92	27	CB: 116 µg/dL.	CB: 49 µg/dL.	CB: 114 µg/dL.	[21]



**Figure 1.** Effects of zinc (Zn), copper (Cu), and iron (Fe) on pregnant women. Excess Zn in the body during pregnancy can have teratogenic or lethal effects. A deficiency of this element may cause preterm birth, pregnancy-induced hypertension (PIH), low birth weight, preeclampsia, and placental insufficiency. High concentrations of Fe in pregnant women may increase the amount of reactive oxygen species (ROS,) lead to hemochromatosis and prelabor rupture of membranes. Fe deficiency, in turn, may lead to iron deficiency anaemia (IDA), low birth weight, and preeclampsia. Hypercupremia may lead to Wilson's disease and Fenton's reagent, and may contribute to premature birth, low birth weight, and gestational diabetes. Hypocupremia may lead to hypochromic anemia, intrauterine growth restriction (IUGR), spontaneous delivery, and spontaneous abortion. Large amounts of inorganic Fe can be found in lentils and spinach, while organic Fe is abundant in pork liver. Oysters, beef liver, and cocoa are rich sources of Cu, while calf liver, pumpkin, pork liver, and white beans have high concentrations of Zn.

During pregnancy, the diet should meet the needs of the baby, as well as that of the mother, whose health is closely related to the provision of adequate amounts of essential elements including Fe, Cu, and Zn. Their levels before pregnancy can also be of significance [22]. The study by Caan et al. [23] showed that the Special Supplemental Nutrition Program for Women, Infants, and Children (WIC) initiated 5–7 months before pregnancy resulted in an increase in birth weight by 131 g and length by 0.3 cm. Providing the right amount of essential elements with a diet or by supplementation can reduce the risk of fetal malformation and preterm birth [24], including multiple pregnancies—associated with a higher risk of perinatal complications [25]. These complications are likely to cause premature birth, miscarriage, hypotrophy of one or both fetuses, preeclampsia, fetal death, or fetal atrophy syndrome [26].

## 2. Iron (Fe)

Iron (Fe) is a microelement necessary for the proper functioning of living organisms. An adult female body contains about 2 g of Fe (42 mg Fe/kg body weight, b.w.), mainly in the

hemoglobin (Hgb; ~60%), in ferritin and hemosiderin in the liver, spleen, and bone marrow, and myoglobin and some enzymes, including catalase, peroxidases, and cytochromes [27].

Fe is involved in many metabolic processes, including oxygen respiration, detoxification of reactive oxygen species (ROS), drugs and xenobiotics, and the synthesis and metabolism of various compounds, such as hormones, myelin, neurotransmitters, nucleic acids, and heme. Fe participates in the transport of molecular oxygen from the lungs to all body tissues and cells [28]. This element takes part in erythropoiesis and immune reactions affecting the humoral and cellular immunity of the body [29–32]. The iron is essential trace element for collagen synthesis and the conversion of 25-hydroxyvitamin D into an active form [33]. Fe plays an important role in electron transport [34] and takes part in the regulation of the cell cycle by influencing the expression of certain genes, such as protein kinase C, nitric oxide synthase, and cyclin dependent kinase inhibitor 1A (p21) [32,35,36].

Iron is supplied to the human body with the food. A balanced diet for men should contain about 1–2 mg Fe per day [37], while women, due to blood loss during menstruation, should intake 4–5 mg per day [38]. During pregnancy, this level should increase from 4 mg in the 1st trimester to 8 mg in the 2nd trimester, and 15 mg per day in the 3rd trimester [39], due to the increased demand associated with fetal growth, placenta, Hgb formation, and the increase in maternal muscle mass, especially in the 2nd and 3rd trimester of pregnancy [40]. During pregnancy, plasma volume increases by 40–60% and red cell mass by 18–25% [41–43]. Hemoglobin concentration decreases to 10.5–11 g/dL and the hematocrit value to 30–32% [42,44]. This process, known as hemodilution, usually intensifies between the 17th and 36th weeks of pregnancy [43]. Additionally, it may result in a slightly decreased vitamin B<sub>12</sub> concentration (in about 10–28% of women) [45] and a slight decrease in platelet count [46]. It is also worth noting in that during this time (i.e., 17–36 weeks) the number of white blood cells increases by about 20% due to increased hormonal activity (e.g., glucocorticosteroids) and cytokine synthesis (an increase in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) [47]. The World Health Organization (WHO) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) define anemia in the 1st and 3rd trimesters as Hgb concentrations below 11.0 g/dL and hematocrit below 33%. In the 2nd trimester the values are lower, 10.5 g/dL and 32%, respectively [48,49]. Large amounts of inorganic Fe (non-heme Fe–Fe<sup>3+</sup>) can be found in lentils (8.6 mg/100 g), spinach (3.1 mg/100 g), and broccoli (1.1 mg/100 g) [50]. In contrast, organic Fe (heme Fe–Fe<sup>2+</sup>) is mainly found in meat, such as pork liver (19 mg/100 g) and beef (3.1 mg/100 g) [50]. The assimilability of Fe<sup>3+</sup> is about 10% and Fe<sup>2+</sup> up to 50% [51].

Human food most often contains Fe<sup>3+</sup>, reduced by ferrireductase to Fe<sup>2+</sup> in the intestinal lumen [52]. Fe<sup>2+</sup> absorption is based on the principle of active transport with a divalent metal transporter (DMT-1) in the apical membrane of the duodenum and the upper part of the small intestine [53,54]. The divalent metal transporter 1 (DMT1) is a non-selective transporter of bivalent metal ions, including iron, zinc, copper, manganese, cobalt, and cadmium, whose transport through the membrane occurs via proton-coupled divalent metal ion transporters [55,56]. Fe levels may also be influenced by the expression of intestinal copper transporting P-type ATPases copper-transporting ATPase  $\alpha$  (ATP7A), which indirectly impairs Fe absorption by affecting the expression of Fe transporters [57]. Some researchers suggest a separate mechanism for the absorption of heme Fe which involves heme carrier protein (HCP1), where Fe<sup>2+</sup> is transported through the apical membrane of the small intestine to enter the enterocytes, and then binds to apoferritin to form ferritin, a compound used to store Fe<sup>2+</sup> [58,59]. However, not all researchers agree that HCP1 plays this role [60]. For example, a study by Qiu et al. [61] confirms the thesis that patients with a mutation in the gene encoding HCP1/PCFT have a folate deficiency, with Fe metabolism intact. This shows that mechanism of heme absorption via the intestines is still undefined [60]. The surplus Fe<sup>2+</sup> in the enterocytes is transported to the bloodstream by ferroportin (IREG1) and reoxidized to Fe<sup>3+</sup> by hephaestin and ceruloplasmin, then immediately bound to the major iron-binding plasma protein apotransferrin to form transferrin [62,63]. In a study on zebrafish (*Danio rerio*), Donovan [64] demonstrated that IREG-1 on the surface of placental syncytiotrophoblasts is involved in the transport of Fe from the mother to the fetus. The main protein transporting Fe<sup>3+</sup> to cells is transferrin [65]. Equally important



in Fe turnover is lactoferrin found in breast milk—a source of Fe<sup>3+</sup> for newborns and infants [66]. The assimilability of Fe from lactoferrin is about 50%, while the assimilability of Fe from cow's milk is only about 5% [29]. Another important source of Fe in the body are macrophages, which recover Fe<sup>2+</sup> from erythrocytes [67]. Macrophages degrade Hgb, resulting in the release of Fe<sup>2+</sup>, which is then transported by the transmembrane ferroportin transporter (FPN1) and oxidized by ceruloplasmin to Fe<sup>3+</sup>, to finally bind to transferrin [68]. The whole process is controlled by hepcidin, a peptide synthesized in hepatocytes, which regulates both the amount of Fe absorbed by enterocytes and Fe<sup>2+</sup> released by macrophages [69,70].

The bioavailability of Fe in the bloodstream affects the absorption of Fe in the placenta and increases with gestational age [71]. It is likely that the Fe balance between the woman and the fetus is controlled by hepcidin [72]. Thanks to transferrin receptor 1 (TFR 1), Fe combined with transferrin can be transferred to placental syncytiotrophoblasts from the bloodstream [73–75]. Bastin et al. [76] showed the expression of TFR 1 on the apical maternal-facing membrane and, additionally, the expression of ferroportin (FPN) which was localized on the basal fetal-facing membrane. This is the direction that suggests the transport of Fe from mother to fetus. Moreover, the authors noted that ferritin was strongly expressed in the stroma fetal tissue, which suggests iron storage. In the next stage, Fe<sup>3+</sup> is reduced to Fe<sup>2+</sup> by ferrireductases STEAP 3 and STEAP 4 [77]. Subsequently, the transport of Fe from the endosome, through the basale membrane to the fetus, takes place via DMT-1 [78] and/or ZIP 8 and ZIP 14 [79]. However, Gunshin et al. [80] challenged the theory of DMT-1 involvement in the transport of Fe in the placenta. In their study, the mouse gene DMT-1 was inactivated, but this did not prevent the birth of live offspring and confirmed the effective transfer of Fe through the placenta. Therefore, ZIP 8 and 14 are more important than DMT-1, but current reports are not conclusive for humans in this case [79,81]. The second interesting source of Fe supply to the fetus may be ferritin, heme, and non-transferrin-bound iron (NTBI), but unfortunately at this point it has not been confirmed by research. The entire mechanism described in this paragraph is not fully understood and we need considerably more research on how exactly the placenta delivers Fe to the fetus [82,83].

Small amounts of Fe are excreted from the body with urine, saliva, sweat, and also as a result of physiological blood loss in the digestive tract [84–86]. In women, epithelial exfoliation and blood loss during menstruation cause a loss of about 1 mg of Fe [38]. To compensate for this loss, a similar amount of Fe is absorbed from the gastrointestinal tract [87]. During pregnancy, intestinal absorption of Fe in the 2nd and 3rd trimester increases by about 3 mg compared to the physiological state [88]. The high loss of Fe from the body is compensated by reserves stored in hepatocytes or macrophages [89]. The correct Fe concentration in blood should be 80–130 µg/L and remains in dynamic equilibrium with the concentration of this element in erythrocytes, bone marrow, and in its free form [27].

Fe deficiency may occur as a result of a low Fe supply [90], increased blood loss [91], intravascular hemolysis with hemoglobinuria occurring in malaria [92], *Ancylostoma duodenale* [93], Fe absorption disorders from the gastrointestinal tract in the course of e.g., *Helicobacter pylori* infections, inflammatory bowel diseases, coeliac disease [94], congenital or acquired transferrin deficiency [95], cancer [96], and increased demand for Fe, e.g., during pregnancy [97]. The risk of Fe deficiency is high among women during pregnancy and lactation, children and adolescents during intensive growth, vegetarians, and in the elderly [98]. In addition, poisoning or oversupply of certain heavy metals, including lead, manganese or cobalt may also cause Fe deficiency [99]. Fe homeostasis is particularly vulnerable to Pb due to its ability to bind to DMT1, which results in the secondary inhibition of Fe absorption [100].

In a study on laboratory animals (C57BL/6 mice), Hubbard et al. [101] found that removal of Fe from the diet reduced the birth weight of the offspring and increased the risk of stillbirth. Woodman et al. [102], in a study on Sprague-Dawley rats, evaluated mitochondrial function and ROS generation in animals totally or partially deprived of Fe in their diet. The authors showed an increase in the number of mitochondria in male kidneys. Additionally, they found an increase in cytosolic superoxide in male kidneys and liver and in female kidneys. The results suggested that male fetuses were more susceptible to mitochondrial disorders and oxidative stress than female fetuses.

At the beginning of pregnancy, a woman's body uses tissue reserves of Fe (e.g., from hepatocytes) [103]. In laboratory tests, the only indicator is a decrease in serum ferritin concentration at normal serum Fe levels [104]. Then, as a result of increased hematopoiesis and the development of the fetus and placenta, the Fe reserves in the mother's body are exhausted [105]. This results in hypochromic microcytic anemia, especially in the 2nd and 3rd trimester, which may give adverse symptoms of organ and tissue dysfunction [106]. Premature birth or a low weight birth may occur [107], as well as myocardial hypoxia (e.g., tachycardia) [108], cerebral hypoxia (e.g., weakness, drowsiness, headaches, and dizziness) [109–111], immunosuppression [111], and appetite disorders (e.g., eating chalk) [112]. The prevalence of anemia in pregnant women ranges from 17% to 31% in Europe and North America, 53–61% in Africa, and 44–53% in Southeast Asia [113]. Milman et al. [114] found that the prevalence of iron deficiency (ID) and iron deficiency anemia (IDA) in pregnant women from Europe is 10–32% and 2–5%, respectively, and the lack of Fe supplementation during pregnancy increased the prevalence. Only 20–35% of women of childbearing age did not require additional Fe supplementation.

Insufficient supply of Fe can cause disorders in oxygen transport and consequently lead to anemia [100]. It is particularly dangerous for women of reproductive age due to blood loss during menstruation and also during pregnancy [115]. Fe deficiency may cause preeclampsia and premature fetal membrane rupture in pregnant women [116], and also lead to a decrease in the child's vital signs [117,118]. The meta-analysis of Figueiredo et al. [119] proved that maternal anaemia was associated with a higher risk of low birth weight. Pregnant women, especially those with multiple pregnancies, should monitor Fe levels from the beginning of the pregnancy. Low Fe concentration at the beginning of pregnancy significantly correlates with the occurrence of anemia in the last trimester of pregnancy [120]. Therefore, it is recommended to supplement pregnant women's daily diet with 27 mg of Fe per day, and with as much as 60 mg if they are diagnosed with anemia [121,122].

Fe-containing preparations have been found to have a positive effect on the course of pregnancy and in the perinatal period. The supplementation of pregnant women with this micronutrient may increase the bodyweight of newborns by 200 g on average [123]. On the other hand, excessive Fe supplementation may lead to an increase in ROS formation, which in turn leads to tissue and organ damage [124]. Peña-Rosas et al. [125] evaluated the effect of Fe supplementation in pregnant and perinatal women and noted that daily Fe supplementation had a beneficial effect on the course of pregnancy, reducing the risk of low birth weight of the newborn, and preventing the occurrence of anemia in women. Abioye et al. [126] studied the effect of taking Fe supplementation in a group of pregnant women with a deficiency of this element, assessing the value of hematological parameters in patients before and after birth. The authors demonstrated a significant increase in the levels of ferritin, hepcidin, and Hgb, and a decreased level of soluble transferrin receptor (sTfR). The increase in Hgb concentration in the mothers also resulted in a reduced risk of newborn death. Similar results concerning an increase in Hgb concentration and a decrease of anemia in women were described by Zhao et al. [127]. Peña-Rosas et al. [128] found that pregnant women taking daily preparations containing Fe were less at risk of adverse events and anemia during pregnancy than women who supplemented this element irregularly. In contrast to other researchers, Ziaei et al. [129] showed that there was no significant relationship between the dosage of Fe-containing supplements and ferritin concentration in pregnant women. Ali et al. [130] also studied the effects of different levels of Fe supplementation in women pregnant with twins from 12 to 36 weeks of pregnancy. One group of women received 27 mg of Fe daily and the other group 54 mg. In both groups, Hgb and hematocrit (Hct) levels were normal throughout the study period, and in only one group was the mean ferritin level higher. The authors concluded that a daily intake of 27 mg Fe is as effective as a higher dose of Fe. The higher level of Fe supply did not affect Hgb and Hct levels, but it did increase the incidence of side effects (nausea or vomiting). In the study by Shinar et al. [131] on 172 women pregnant with twins with IDA, divided into two groups receiving 34 and 68 mg of Fe sulfate, showed that higher doses of Fe caused higher Hgb values in the examined women.

Acute poisoning was observed as a result of an overdose of Fe from a pharmaceutical preparation [132]. If the transferrin potential is exhausted or exceeds 85% in the blood, non-transferrin-related Fe (NTBI) may occur, increasing the risk of intraocular and cardiac Fe accumulation [133]. NTBI initially appears in the bloodstream and then is transported to the interstitial cells via a transferrin-independent mechanism [134]. It was initially assumed that DMT1 transporter is responsible for the transfer of NTBI to the liver and then its removal, but a study on DMT1-negative mice showed they were not protected against the accumulation of Fe in the liver. Therefore, another mechanism was proposed, consisting in the ability of Zip14 to uptake NTBI [135]. Two types of hemochromatosis have been identified: primary (hereditary) and secondary (acquired, due to excessive accumulation of Fe in the body) [136]. As a result of excessive Fe accumulation in organs, such as the heart, liver, and endocrine glands, their function is impaired, producing cardiomyopathy, cirrhosis, or insulin-dependent diabetes [136,137]. In case of pregnancy, the liver metabolism error described above had a negative effect on the fetus's Fe balance, which was emphasized in the study by Silver et al. [138]. The placenta acquired excessive amounts of Fe and passed them to the fetus, although the authors could not identify any underlying mechanism of this effect, indicating the necessity for further research on the metabolism and kinetics of Fe transport to the fetus.

A high accumulation of Fe results in the reduced absorption of other essential elements including zinc, copper, molybdenum, chromium, manganese, and magnesium, and the production of ROS [139]. Oxidative stress is particularly dangerous for pregnant women, who may suffer damage to the placental tissue and consequently a premature birth [124]. Oxidative stress leads to faster aging of the cells, which gives a signal to the uterus to contract, resulting in premature birth. This process can also lead to the rupture of the fetal membrane [140].

### 3. Copper (Cu)

Copper is an essential micronutrient. It has been estimated that the amount of this element in an adult human body ranges from 50 to 120 mg [141]. The highest concentrations of Cu were found in the brain and the liver [142]. Cu is involved in the formation and metabolism of bone tissue and participation in oxidation–reduction reactions as a coenzyme, a regulator of Fe metabolism and transport, as well as collagen metabolism [122,143]. Cu participates in the metabolism of fatty acids, in RNA synthesis, supports the absorption of Fe in the gastrointestinal tract, and participates in the synthesis of myelin [144,145]. Cu also participates in the synthesis of melanin and—as a component of tyrosinase—is involved in the conversion of tyrosine to melanin [27].

The copper is delivered with the food. The greatest source of this element is oysters (44,996 µg/100 g), beef liver (6434 µg/100 g), cocoa (5000 µg/100 g), sunflower seeds (1770 µg/100 g) [146]. The daily supply of Cu should be 0.9–1.3 mg per day, although it is mostly consumed in larger amounts—about 2 mg per day [147]. During pregnancy, the demand for Cu increases to 1 mg/day [122]. Cu homeostasis is determined by the balance between intestinal absorption and biliary secretion [148]. About 50–70% of Cu from food is absorbed in the duodenum and upper sections of the small intestine, and small amounts in the stomach [143,149]. In the stomach,  $\text{Cu}^{2+}$  is reduced to  $\text{Cu}^{1+}$  and then absorbed into the intestinal endothelium [150]. Uptake, intracellular transport, and removal of excess Cu is strictly regulated and involves specific proteins. Copper is transported to cells via two transmembrane proteins: high affinity copper uptake protein 1 (CTR1) and DMT1 [151–153]. CTR1 is responsible for the transport of 80% of Cu and other metals to cells [154,155]. It is believed that the *Ctr1* mutation may lead to the abnormal functioning of intracellular signaling pathways during embryonic development. Kuo et al. [156] found early embryonic lethality associated with a *Ctr1* null mutation in mice. In cytoplasm, Cu is complexed mainly with metallothionein (MT). Copper ions serve as cofactors of certain enzymes to which they bind via cytoplasmic copper chaperones. Copper chaperone for superoxide dismutase 1 (CSS) and cyclooxygenase (COX) and synthesis of cytochrome c oxidase (SCO) proteins are responsible for the transport of Cu to superoxide dismutase type 1 (SOD1) and cytochrome c oxidase (CCO), respectively. Antioxidant protein 1 (ATOX1) transports Cu ions to copper transporting P-type ATPases ATP7A

and copper-transporting ATPase  $\beta$  (ATP7B), which regulate the concentration of Cu ions in the cell and mediate the incorporation of cations of this element into enzymatic proteins [157]. The lack of ATOX1 results in the accumulation of Cu and inhibition of its secretion. The role of six-transmembrane epithelial antigen of the prostate (STEAP) and duodenal cytochrome b (Dcytb) in Cu metabolism is poorly understood [153]. In the blood, Cu occurs in complexes with histidine, threonine, and glutamic acids transported to the liver, kidney, intestines, and other tissues [143,158]. The main organ responsible for Cu metabolism is the liver, which accumulates this element in the prenatal and postnatal period, as well as synthesizing ceruloplasmin and producing bile, which has a high Cu concentration [122,143–145,148–150,158–162].

Cu is excreted from the body with urine and feces. Only 2% of  $\text{Cu}^{1+}$  is excreted through the kidneys because in proximal tubules Cu is mostly reabsorbed by ATP7A proteins and then returned to the bloodstream [163]. In the liver, the excess Cu is transported via ATP7B and bound with substances contained in the bile and passed to the digestive tract where it is removed with the feces [164,165]. In this way, more than 90% of the excess Cu is excreted, and its incorporation into ceruloplasmin prevents reabsorption from the intestines.

The process of transporting Cu to the placenta from the maternal circulation is probably caused by the copper transport protein 1 (CTR1), as shown by Lee et al. [166], who deprived the mouse of CTR1 and observed teratogenicity or fetal mortality in the uterus. When Cu is delivered to the placenta, the element is attached to the copper-transporting P-type ATPases (ATP7A or ATP7B) [167]. The ATPases are coordinated with each other as ATP7A is located on the basolateral membrane and is responsible for the excretion of Cu into the fetal circulation. In contrast, ATP7B is in a perinuclear compartment or the microvillar membrane, releasing excess Cu into maternal circulation [168]. In contrast, McArdle et al. [169] do not agree with this model of transporting Cu in the placenta and believe that this mechanism should be further investigated.

Cu deficiency is rare due to the high availability of this element in food [170]. Cu deficiency may lead to pancytopenia and the occurrence of hypodermic anemia which does not respond to the administration of Fe [171,172], loss of appetite [173], damage to internal organs [174,175], bone deformities [176], reduced reproductive capacity [177], myocardial fibrosis [178,179], and chronic debilitating diarrhea [180]. It may lead to neurological disorders, and hair depigmentation [181,182]. A deficiency of this micronutrient during pregnancy may lead to oxidative stress, which often results in reduced fetal growth [122]. Cu has an important role in the production of collagen and elastin, and an insufficient amount of this element can lead to a reduction in the tensile strength of the fetal membrane, resulting in its interruption and premature birth [183]. On the other hand, excessive administration of Cu causes vomiting, diarrhea, as well as liver necrosis, acute kidney damage, and—ultimately—death [184,185].

Several diseases related to abnormal Cu metabolism have been described, especially those caused by Cu deficiency. An example is Menkes disease which is caused by the absence of or defect in two Cu-transporting ATPases encoded by the *ATP7A* gene, which affects the absorption of Cu ions in the gastrointestinal tract [186]. This condition, found in one per 300,000 live births in the European population [186], is due to the mutation of the *ATP7A* gene on the chromosome 3 that causes X-linked recessive disorders [187]. It affects almost exclusively men, with women considered to be only carriers of the mutation, except a few isolated female cases reported in literature [188]. Menkes disease is characterized by significant physical and mental impairment of patients and death in early childhood [187]. In rare cases, the activity of ATP7A protein is partially preserved and the symptoms milder (occipital Horn syndrome), with patients living as long as 50 [171]. The mutation in the *ATP7A* gene does not necessarily lead to Menkes disease; it has also been described in patients suffering from hereditary motor neuropathy which results in the weakness of the upper limbs that progresses with age [189]. Another disease leading to the disorder of Cu metabolism is Huppke-Brendel syndrome, resulting from the mutation of the *SLC33A1* gene encoding the AT-1 protein, first described in 2012 [190]. People with this syndrome have very low levels of Cu and ceruloplasmin, and often do not reach the age

of 6. The symptoms of this disease include psychomotor disability, hypoplasia, and hypomyelination, probably due to the lack of ATP7A protein acetylation. Another disease affecting Cu homeostasis is MEDNIK syndrome (mental retardation, enteropathy, deafness, ichthyosis, keratoderma), caused by the mutation of the *AP1S1* gene located on the long arm of chromosome 7 at position q22 [191]. The patients suffer from mental and motor impairment and deafness; other characteristic symptoms include dermatological changes including excessive keratosis and exfoliation of the epidermis with features of fish scale (lat. ichthyosis) and erythroderma.

Kashaninet al. [192] studied the effects of Cu on pregnancy. They showed that women who had been supplemented with 1000 mg of Cu daily from the 17th week of pregnancy experienced reduced depression symptoms in the 2nd and 3rd trimesters of pregnancy compared to the control group. Jankowski et al. [193] demonstrated in an in vitro study on rat embryos that Cu is essential for early embryonic development. The fetus is sensitive to a lack of Cu, which may lead to irreversible changes in the nervous system [194,195]. Meta-analysis by Lewandowska et al. [196] showed that reduced serum Cu levels at the beginning of pregnancy were associated with a higher risk of pregnancy-induced hypertension. Prohaska and Brokate [197] showed that a correct amount of Cu in the body has a protective effect during pregnancy. Vukelići et al. [198] found that in women with normal fetal development, Cu levels were significantly higher than in women with fetal developmental disorders. Another study also showed that Cu protects against spontaneous miscarriages [16]. However, elevated Cu levels in the first trimester of pregnancy may lead to later pregnancy complications, including spontaneous miscarriages [199]. Li et al. [200] concluded that too much Cu can increase the incidence of gestational diabetes, which—if untreated—can lead to macrosomia, intrauterine hypotrophy, birth defects, and miscarriages.

An excess of Cu is harmful but rare [201]. It results in the formation of free radicals that damage cell membranes and proteins in the body (the so-called Fenton Reaction) [202]. Excess Cu has been observed in the course of Wilson's disease (WD) as a result of abnormal cellular transport [203]. In pregnant women with WD, it is important to take early treatment to prevent spontaneous miscarriages [204,205]. In pregnant women, Cu levels may be elevated due to increased levels of Cu-bearing proteins [206] and may cause premature births and low birth weight compared to pregnancies with normal Cu levels [122].

#### 4. Zinc (Zn)

As an essential trace element (micronutrient), Zn has several important roles in human bodies, and after Fe, it is the second most abundant trace element [207]. The total Zn content in the human body is 2–4 g, with a plasma concentration of 12–16  $\mu\text{M/L}$  [208–210]. In cells, Zn is present as a divalent ion ( $\text{Zn}^{2+}$ ) [211]. The highest Zn concentrations have been found in skeletal muscle (60%), bones (30%), liver (5%), and skin (5%) [212].

Zn is a co-factor of more than 300 enzymes that regulate a variety of cellular processes and cellular signaling [213]. It is responsible for the DNA-binding ability of many transcription factors through the unique ability to form molecules known as Zn finger (Znf) proteins [214]. Zn is essential for cell division, differentiation, and the development of organs, such as the kidneys and heart [215]. It is required for normal testicular development [216]. Zn regulates reproduction, fetal development, membrane stability, digestion, wound healing, and homeostasis of the central nervous system [217–219]. As a cofactor for the enzymes, Zn participates in bone mineralization and collagen structure development of the bone [220]. Zn influences the function of many hormones, including growth hormone, insulin, testosterone, and gonadotropins [221]. It plays a role in the synthesis, storage, and secretion of insulin. This element is also a component of thymulin, a thymus hormone, essential for maturation and differentiation of T cells [222,223]. Zn participates in the elimination of free peroxide radicals, as part of peroxide dismutase (Zn-SOD) [224]. It inhibits the oxidation of unsaturated fatty acids [225], regulates the concentration of vitamin A in plasma [226], and acts as an antagonist of cadmium and lead [227].

Recommended daily intake of Zn depends on several factors such as age, sex, weight, and phytate content of the diet [228]. Food products containing the most Zn (per 100 g) are calf liver (8.4 mg),

pumpkin (7.5 mg), pork liver (4.5 mg), and white beans (3.8 mg) [159]. Zn is best assimilated from meat products (red meat, fish) than from plant products [229]. The degree of bioavailability of Zn from food depends on the concentration of Zn in the body, stress [230,231], functional state of the kidneys [232] and/or liver [233], pH of the nutrient content [234]. The presence of citric acid [235], a high intake of animal proteins [236], the presence of highly processed products and lactose [237] have a positive influence on the bioavailability of Zn. Negative effects on Zn absorption are by heavy metals (cadmium and mercury), calcium, Fe, Cu, oxalates, phosphates, alcohol, folates, and phytates, alkaline drugs, contraceptives, and diuretics [238–241].

Daily Zn supply according to WHO should be 6.5 mg/day for women and 9.4 mg/day for men (both over 19 years of age) [242]. Due to hemodilution and decreased albumin levels, Zn serum concentration declines during pregnancy [243]. Since intestinal absorption is not increased during pregnancy, an additional Zn requirement for fetal and placental tissues must be covered by increased intake and from maternal tissues. Therefore, daily requirements for Zn during pregnancy range from 7.3 to 13.3 mg [244]. Zn enters the human body through the digestive and respiratory systems, and skin. Zn is absorbed by passive diffusion in the intestine by specific zinc transporting proteins [245]. The most important Zn transporters include Zrt-/Irt-like protein (ZIP) zinc transporters and ZnTs (zinc transporters) [246]. The zinc transporter protein-1 (ZnT1)–ZnT10 which decrease cytoplasmic zinc level by zinc export, and Zip (Zip 1–14) which increase cytoplasmic zinc level by zinc import [246]. The ZIP4 transporter can be found in the entire digestive tract and is responsible for Zn transport from the apical membrane into enterocytes [247]. Additionally, similar to Cu, DMT1 transporter may help in the absorption of Zn, by transporting Zn from the intestinal lumen into the enterocytes [248].

The average absorption of Zn from food is 33% [249].  $Zn^{2+}$  ions in the plasma are transported to the cells mainly as complexes with albumin (84%), alpha-2-macroglobulin (15%), and amino acids (1%) [250,251]. They also form complexes with cysteine and histidine [252,253]. Metallothioneins (MT) play an important role in cellular transport [254]. These low-molecular proteins, rich in cysteine residues, are located in the extra- and intracellular environment [255]. Their intracellular pool acts as a reservoir of important heavy metals, including Zn, and participates in the detoxification of ROS, nitrogen, excess heavy metals, and organic compounds [256–259]. Their extracellular pool is responsible for the transport of  $Zn^{2+}$  (and other heavy metals) and organic compounds, and is also a free radical scavenger [256]. One MT molecule is capable of binding seven  $Zn^{2+}$  ions and up to 12 monovalent Cu ions [260,261]. The intra- and extracellular Zn concentration is controlled by two families of transporters: ZnT (SLC30-Soluble Carrier 30) and ZIP (SLC39A1–A14) [262,263]. ZIP proteins are responsible for the transport of  $Zn^{2+}$  to the cell cytoplasm [264]. ZnT proteins originate from a large family of Cation Diffusion Facilitator (CDF) proteins and are responsible for transporting Zn ions from the cytoplasm of the cell to cell organelles or outside the cell [265]. The main organ responsible for the metabolism and systemic Zn homeostasis is the liver [266]. Zn is excreted mainly in feces (90%) and the rest of Zn is excreted in the urine, sweat, and saliva, and incorporated into hair [267].

The transport of Zn to the fetus is fully dependent on its concentration in the mother's blood [268]. Its low intake will reduce the expression of ZnT, resulting in less Zn being transported in the placenta, protecting the mother against Zn homeostasis disorder. Zinc released from enterocytes into the mother's blood through ZnT1 reaches placental syncytiotrophoblasts using ZIP proteins [269]. In the next step Zn can be intercepted by transporters including ZIP 14 and ZIP 8, ZnT2 and DMT-1 or bind to MT and in this form delivered to the fetus [81,270,271]. This mechanism requires further investigation.

A Zn deficiency caused by inadequate dietary intake is a common phenomenon and affects up to two billion people in the world, mainly in developing countries [272,273]. Marginal Zn deficiency is estimated to affect 82% of pregnant women worldwide [274]. Zn deficiency can be classified as primary or secondary. Primary Zn deficiency may lead to growth retardation, puberty delay, immune deficiency, and the impairment of cognitive function, taste, and smell [275]. Major manifestations of Zn deficiency include growth retardation, testicular and ovarian dysfunction, immune dysfunctions, and cognitive impairment [276]. Maternal Zn deficiency during pregnancy is linked with adverse pregnancy

outcomes including abortion, preterm delivery, stillbirth, and fetal neural tube defects [277–279]. Secondary Zn deficiency is caused by gastrointestinal diseases, including malabsorption syndrome and Crohn's disease [280]. It may also be caused by heavy hemorrhage, cirrhosis, kidney disease, and alcoholism [281–283].

Zn takes part in the embryogenesis and formation of the fetus, and so its low level may result in impaired development and affect the final phenotype of the newborn's organs [284,285]. Additionally, during pregnancy, a deficiency may contribute to preterm delivery, pregnancy-induced hypertension, low birth weight, and preeclampsia [286]. Zn deficiency may lead to faulty estrogen function, resulting in uterine spasms, cervical dilation, and amniotic fluid integrity [287]. Zn deficiency is also involved in the synthesis of prostaglandins, as well as collagen synthesis and degradation, and so its absence may result in premature fetal membrane rupture [280]. In laboratory animal studies, Zn deficiency during the early stages of pregnancy is associated with reduced fertility [288] and the increased incidence of nervous system congenital malformations [289]. Zn deficiency in later stages of a pregnancy negatively affects neuronal growth and brain function and synaptogenesis and may be associated postnatally with impaired brain function and behavioral abnormalities [290].

Scientific literature data on the influence of Zn supplementation on the course of pregnancy and fetal development are divergent. Nossier et al. [291] concluded that Zn intake minimizes the risk of premature birth in women and infections in newborns. A double-blind and randomized controlled study shows that Zn supplementation during pregnancy improves birth length after adjusting for maternal height and pre-pregnancy weight [292]. Wang et al. [293] in a cohort study on 3187 pregnant women from China, concluded that Zn deficiency in the diet of pregnant women increases the risks of low birth weight and small gestational size. Merialdi et al. [294] noted that prenatal supplementation of Zn-deficient mothers may be beneficial to fetal neurobehavioral development. In an earlier study, Merialdi et al. [295] concluded that the fetuses of mothers who received Zn supplementation showed fewer episodes of minimal fetal heart rate variability, increased fetal heart rate range, an increased number of accelerations, an increased number of movement bouts, an increased amount of time spent moving, and an increased number of large movements. Further, Merialdi et al. [296], studying the effect of Zn supplementation of pregnant women on fetal bone growth found that supplementing Zn-deficient mothers with 25 mg Zn/day caused a higher fetal femur diaphysis length. This was caused by this microelement stimulating osteoblast production and inhibiting osteoclast activity.

In a study in laboratory animals (C57B1-6J mice) Wilson et al. [297] proved that the lack of Zn in the diet negatively affected the growth and development of the offspring in the uterus mainly due to impaired placenta development. Additionally, they noted that a lack of Zn affected the capacity of the heart and organ perfusion. Correct blood pressure in the pregnant woman is essential to properly maintain the growth of the fetus and provide appropriate nutrients [298]. Many studies have shown a slight effect of Zn supplementation or lack of it on maternal and fetal bodies [299–301]. Meta-analysis by Chaffee and King [302] concluded that the additional supply of Zn does not affect fetal morphometric results. Discrepancies in study results may have been caused by a different study area. In developing countries, shortages of Zn occur quite frequently, compared to developed countries, where such a phenomenon is probably related to low social status, as confirmed by Mori et al. [303]. Finally, King [304] concluded that Zn supplementation is essential to counteract the effects of smoking, alcohol abuse, infections, injuries, and impaired gastrointestinal function.

There are not many reports on Zn supplementation in women with multiple pregnancies. Goodnight et al. (2009) concluded that in this group additional supplementation could bring positive benefits [305]. Mahomed et al. [306] noted that 15–44 mg of Zn supplementation per day was associated with a 14% reduction in preterm birth. Campbell et al. [307] noted the Zn concentration in plasma in twin pregnancies was similar to that in single pregnancies. It may suggest that the body regulates Zn deficiency in case of multiple pregnancies without additional supplementation.

High doses (100–300 mg/d) of Zn disturb many biochemical processes [308]. Excess Zn can manifest itself through nausea, vomiting, abdominal cramps, and diarrhea [309]. According to WHO [310], excess Zn during embryogenesis can be teratogenic or ultimately fatal.

### 5. Fe vs. Cu

Dietary Fe and Cu are absorbed in the proximal small intestine [311]. These elements must be reduced before uptake into enterocytes, then both metals are oxidized after export into the interstitial fluids [312]. Chen et al. [313] showed that Cu-deficient C57BL/6 mice had significantly lower hephaestin and ceruloplasmin (Cp) ferroxidase activity. Cu facilitates the absorption and utilization of Fe [314], which takes part in red cell regeneration [315] and bone formation [316].

Ha et al. [312] proved that with a high supply of Fe, there is a lower Cu concentration in diseased tissue, and serum Cu activity decreases. Ha et al. [317] also analyzed the mechanism responsible for the impairment of Cu absorption by feeding mice with a feed containing an appropriate amount of Fe and low/suitable/high Cu levels. The mice showed no disruption in Cu absorption and utilization in rodents. However, an increased supply of Fe did impair the utilization of Cu in the body, although the absorption of Cu was normal. The authors investigated the locations of absorbed Cu with a radioactive marker, but could not identify most of the absorbed Cu in any of the tested tissues. They concluded that additional experiments should be performed to investigate the mechanism of distribution, storage, and bioavailability of Cu under elevated condition of Fe. The Cu activity affects the transport of Fe mainly during blood loss. Hephaestin (protein homolog of ceruloplasmin) is not able to make up for this deficiency on its own and the body replaces it with Cp [318]. Additionally, the reduced Cp activity prevents the release of stored Fe from the spleen and liver macrophages [319]. This is probably caused by the reduction or inhibition of Fe oxidation via Cp [320].

Harris [321] confirmed the role of Cp in the metabolism and release of tissue Fe. This study was conducted on a ceruloplasmin genetic defect in protein synthesis in patients who were diagnosed with excessive accumulation of Fe in the brain and pancreas. This resulted in retinal degeneration and diabetes. The patients were given Cu intravenously which resulted in increased serum Fe concentration. These results confirm a significant influence of Cu on the release of tissue Fe. Ha et al. [322] showed that Cu metabolism is impaired when dietary Fe intake is >10 times higher than the normal Fe supply established by WHO. Significantly elevated levels of Fe may result in anemia, likely due to a lack of Cu in the diet [323]. This is because Cu is a component of cytochrome oxidase, necessary for oxidative phosphorylation, which allows the incorporation of Fe into heme. Additionally, the lack of Cu may shorten the erythrocyte life span [324]. This may be due to the inhibition of superoxide dismutase, which contains Cu, leading to cell membrane damage by ROS. In addition, there is a decrease in Cu activity, which inhibits peroxide formation [325]. Hepatic Fe overload also causes liver damage, causing hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia [326] and elevated Fe levels may lead to fibrosis or cirrhosis of the liver, via a decrease in superoxide dismutase activity [327]. On the other hand, when the supply of Cu is increased, the absorption of Fe may be impaired due to the affinity of Cu to transferrin [328]. However, Cu overload is very rare because there is a difference between Fe and Cu in the final metabolism of both elements. Cu is removed from the body with bile, and there is no mechanism of removing excess Fe.

Sebio et al. [329] concluded that elevated concentrations of Fe or Cu in the body cause brain damage due to oxidative stress. Lan et al. [330] found that the accumulation of Fe, Cu, and cobalt in the brain causes a decrease in glutathione, which is responsible for oxidative protection of neurons. In rats, Fe supplementation lowers the level and absorption of Cu. In patients who received 3 mg of Cu from 100 or 400 mg of Fe in the form of Fe gluconate, no effect of Fe on Cu absorption has been demonstrated [331].

The study by Christian et al. [332] on 235 pregnant women showed no negative effect between Zn and Fe when these elements were administered at a 2:1 ratio. The additional effect of supplementation with these elements was shown by Saak [333] carried out in Ghana on 354 pregnant women given



a dose of 40 mg of Fe and Zn—an increase in HgB and ferritin values was reported. Although the results of that study suggest a beneficial effect of such a supplementation model, it was effective only for women with Fe deficiency. This was also confirmed in the subsequent study by Saaka et al. [334]. Harvey et al. [335] estimated that even taking 100 mg of Fe with a meal does not affect Zn metabolism. The authors suggest that Zn status is maintained after the effective absorption of Zn from food meals. In the opposite situation, when Zn was supplemented in a diet, it also did not affect the balance of Fe [336]. However, in the study by O'Brien et al. [337] daily Fe supplementation (60 mg) significantly reduced the absorption of Zn and only the inclusion of 15 mg Zn supplementation in the diet of these women reduced this adverse effect of Fe. The authors also noted the need for additional studies in this direction and the establishment of the mechanism that causes such interaction.

## 6. Fe vs. Zn

Zn and Fe interact competitively during intestinal absorption [338]. In a study on animals, Bodiga and Krishnapillai [339] found that the interactions between Fe and Zn during absorption in Fe- and Zn-deficient rats are mutually antagonistic. The competition of Fe and Zn for metal transporter 1 (DMT-1) at the site of absorption results in reduced uptake of these elements during concurrent administration [340]. This was confirmed in a study by Espinoza et al. [56] in which DMT-1 was involved in the active transport of Fe, Cu, and Zn, although Zn showed a different relative capacity. Kordas and Stoltzfus [341] showed that although Fe does seem to reduce the absorption of Zn, DMT-1 is an unlikely site for this absorptive antagonism because Zn is not transported by DMT-1. Zrt- and Irt-like protein-14 (Zip14) is a transmembrane metal iron transporter that is abundantly expressed in the liver, heart, and pancreas [342].

It was found that a 1:1 mass ratio of Fe/Zn in the diet causes a slight inhibition of Zn absorption, whereas when the Fe/Zn ratio is higher, 2:1 or 3:1, the absorption of Zn is limited. It has been noted that the intake of heme Fe together with inorganic Zn in the appropriate ratio does not impair the absorption of Zn. Organic Zn does not affect the absorption of Fe [343,344].

Pregnant women have an increased demand for Zn and Fe [345]. The administration of Fe at more than 100 mg/day to pregnant women resulted in a reduction in serum Zn compared to the women who were given less than 100 mg of Fe [346]. Women in the first trimester of pregnancy who additionally received multivitamin preparations containing 60–65 mg of Fe showed a reduction in Zn absorption compared to women receiving less than 30 mg Fe/day [347]. Ziaei et al. [348] estimated that HgB greater than 13.2 g/dL in pregnant women reduces serum Zn levels. Andersen et al. [349] suggested that Cu deficiency has not only a direct effect on the concentration of Fe, but also an indirect effect through regulation of Fe transporters, which, *inter alia*, affects the delivery of Fe to the fetus. On the other hand, Gambling et al. [350] suggests that there is no connection between Fe and Cu in their research. Additionally, Shidfar et al. [351] reports that Fe supplementation does not have a significant effect on Cu levels in the body.

Donangelo et al. [352] examined adult women ( $n = 23$ ; aged 20–28 years), non-anemic but with low Fe stores. The authors investigated the effect of Fe supplementation (100 mg Fe/day) or Zn supplementation (22 mg Zn/day) for 6 weeks. They found that these Fe supplements in those women improved Fe indices with no effect on Zn status. However, modest Zn supplementation improved Zn indices, appeared to induce a cellular Fe deficiency and, possibly, further reduced Fe status. In the study by De Brito et al. [353], healthy children of both sexes, aged 8–9 years ( $n = 15$ ), were given a placebo (control group) or 10 mg Zn/day (experimental group) for 3 months. The researchers showed that the decrease in serum Fe was likely due to the effects of chronic Zn administration. The supplementation did not influence levels of HgB, mean corpuscular volume, ferritin, transferrin, transferrin saturation, ceruloplasmin, or total protein. Similarly, in a study by Antunes et al. [354] on the acute and chronic effects of Zn on the serum Fe profile of children aged 6–9 years, there was a decrease in Fe levels due to Zn supplementation, but no negative effect of Zn on hematocrit and

Hgb levels. Wieringa et al. [355] confirmed the positive effect of Fe and Zn supplementation in the prevention of anemia and Zn deficiency.

Holmes et al. [356] studied the effects of multiple micronutrient (MMN) supplementation (15 mg Zn, 65 mg Se, 2 mg Cu) with or without Fe on serum Zn, Se, and Cu concentrations in women from Cambodia. Predominantly anemic nonpregnant women (aged 18–45) received daily 60 mg of Fe (I group); MMN, but no Fe (II group); 60 mg Fe plus MMN (III group); or a placebo (IV group). It was found that 60 mg Fe and the daily MMN formulation may be interfering with the absorption and/or metabolism of supplemental Zn. However, patients took the supplement together with food which was not controlled, and so it is possible that Zn competed for metabolic transporters not only with Fe and minerals contained in the MMN complex but also with elements from the diet. Troost et al. [331] noted that oral Fe therapy may impair Zn absorption. A significant decrease in Zn absorption was observed with 100 and 400 mg of Fe administered in aqueous solution. Unfortunately, that study was limited to a very small group of patients ( $n = 11$ ).

Nguyen et al. [357] conducted a randomized control study on women ( $n = 459$ ) from Guatemala where they received for 12 weeks: (i) weekly 120 mg Fe with 30 mg Zn, (ii) weekly 120 mg Fe, (iii) daily 60 mg Fe with 15 mg Zn, and (iv) daily 60 mg Fe. The combined Fe-Zn supplementation was as effective as Fe alone in improving Fe status, but not effective in Zn status. This may be because Zn and Fe compete with each other only when given in aqueous solution, and if supplementation takes place in the form of a solid meal, such an effect is not recorded, although studies are inconclusive in this case [241,358].

## 7. Cu vs. Zn

The high concentration of Zn in the body caused by the supplementation of this element leads to an increase in the production of metallothionein in the intestinal cells [257]. Cu accumulates in enterocytes due to its high affinity for metallothionein, displacing Zn [359]. As a result of exfoliation of enterocytes in the gastrointestinal tract, Cu concentration is reduced, which may lead to Cu deficiency [360]. A study by Sutton et al. [361] showed that cytopenia in patients can be caused by a high Zn concentration in the body combined with Cu deficiency, and Cu supplementation leads to a reversal of hematologic levels. According to Prasad et al. [362], increased Zn concentration may be caused by improperly fitting dentures, resulting in increased use of dental adhesive, which contains high levels of Zn. Excess Cu can lead to both anemia and neutropenia as a result of the mechanisms in which Cu participates.

Deur et al. [363] concluded that in the case of anemia, Cu deficiency may affect Fe metabolism, including inhibition of Fe absorption from the gastrointestinal tract and shortening of red blood cell life. In the case of neutropenia, on the other hand, an abnormal synthesis of progenitor cells and abnormal maturation and release of neutrophils into the bloodstream occur. Moreover, the removal of granulocytes containing a low Cu concentration is increased [364]. Zn concentration in the body influences SOD activity and Cu level [365]. Extracellular superoxide dismutase and Cu/Zn superoxide dismutase react differently to Zn levels in the body. The extracellular SOD activity increases in response to an increase in Zn levels, as opposed to SOD Cu/Zn whose activity decreases [366].

Zn is used to treat Wilson's disease, a condition that leads to an excessive accumulation of Cu in the liver [367,368], as Zn supplementation may reduce Cu concentration in the body [344]. Although Zn therapy is often insufficient, it plays an important role as a second-line treatment, supplementing the use of trientine or penicillamine [369]. Sometimes, Zn monotherapy is effective and has therapeutic effects, especially in the neurological Wilson's disease [370]. Malik et al. [371] reported positive effects of Zn supplementation during pregnancy in WD patients. Optimized doses of Zn have helped to carry out the pregnancy. However, the authors emphasize that pregnancy in these patients has a high risk of preeclampsia. In the case of acrodermatitis enteropathica (AE) patients in Sandström et al. [241] the status of Zn and Cu was measured in response to 1000 and 525  $\mu\text{M/d}$  supplementation. High doses of Zn supplementation were found to decrease Cu absorption and during the dose correction the concentration of Cu was normalised. The authors argue that the primary lesion in AE is a cellular

defect in Zn metabolism and not a Zn absorption disorder. Moreover, they point out that in AE it is important to control Zn and Cu concentration due to teratogenic effects of Cu deficiency or excess.

The antagonistic action of Zn and Cu has been the subject of many studies. Wu et al. [372] investigated the effects of dietary Cu and Zn on apparent mineral retention and serum biochemical indicators in young male mink on a corn-fishmeal based diet. It was observed that moderately high Cu in the diet increased Cu retention, but did not reduce Zn absorption, while moderately high Zn in the diet reduced plasma Cu levels.

Eckert et al. [373] showed that the concentration of Zn in the liver does not change after the administration of Cu in the diet, which suggests no interaction between these elements. However, Du et al. [374] observed that the relationship between Zn and Cu depends on the form of Cu administration. Complexes of Cu with protein or lysine caused an increase in the liver concentration of Zn compared to the administration of Cu in the form of inorganic salts, which did not induce any changes in Zn levels.

Zetzsche et al. [375] determine the effect of high dietary Zn oxide on trace element accumulation in various organs in pigs. They found that dietary Zn supplementation led to Cu co-accumulation in the kidney of the pigs.

A study by Baecker et al. [376] in an animal model investigated the effect of high Cu concentration and Zn deficiency on the formation of autism spectrum disorder (ASD). Cu supplementation of pregnant female rats caused a significant decrease in Zn in the brain, above all in the hippocampus. Additionally, the antagonistic action of Cu against Zn caused abnormalities in nerve synapses. Those results suggest that Cu and Zn homeostasis disturbances in pregnant females may contribute to brain underdevelopment and nerve impulse transmission disorders, which may lead to ASD development. Similar conclusions were reached by Reinstein et al. [377] showing an increased risk of fetal malformations with insufficient supply of Zn in the diet and with an increase in Cu. Moreover, Kinnamon [378] reported that Cu and Zn are competing with each other in the fetus and placenta. The result of this competition is a greater absorption of Cu, which is pushing out Zn. Although, Garg et al. [379] in a study on pregnant women who were supplemented with Zn did not report hypocupremia. However, the ratio of both elements should be optimized in pregnancy, to improve reproduction results and reduce the chance of spontaneous abortion [16].

## 8. Conclusions

The presented literature review suggests that Fe, Cu, and Zn are crucial for the proper course of pregnancy. The results should be approached with caution, but most studies indicate the influence of metals on the parameters of mother and child. Moreover, Fe, Cu, and Zn may be promising biomarkers in predicting complications in pregnancy.

Additionally, the results of the researchers show important relationships between Fe, Cu, and Zn in the body. An increase or decrease of one element may significantly affect the action of the other two. It is particularly significant to note that the elements do not exhibit antagonistic actions against each other when they are within daily reference values.

Fe, Cu, and Zn play a key role in the homeostasis of the body, and any changes in their concentrations can cause interactions that are dangerous to the health of the mother and fetus.

**Author Contributions:** K.G.: literature search and review, manuscript draft preparation, writing manuscript, and preparation of manuscript revision. S.K.: participation in writing the manuscript. D.K.-B.: writing the manuscript, preparation of manuscript revision, and final acceptance of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** This study was supported by the statutory budget of the Department of Biology and Medical Parasitology, Pomeranian Medical University.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interests.

## References

- Choi, R.; Sun, J.; Yoo, H.; Kim, S.; Cho, Y.Y.; Kim, H.J.; Kim, W.K.; Chung, J.H.; Oh, S.; Lee, S.-Y. A Prospective study of serum trace elements in healthy Korean pregnant women. *Nutrients* **2016**, *8*, 749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kot, K.; Kosik-Bogacka, D.; Łanocha-Arendarczyk, N.; Malinowski, W.; Szymański, S.; Mularczyk, M.; Tomska, N.; Rotter, I. Interactions between 14 Elements in the Human Placenta, Fetal Membrane and Umbilical Cord. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 1615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kocylowski, R.; Lewicka, I.; Grzesiak, M.; Gaj, Z.; Oszukowski, P.; von Kaisenberg, C.; Suliburska, J. Evaluation of Mineral Concentrations in Maternal Serum Before and After Birth and in Newborn Cord Blood Postpartum—Preliminary Study. *Biol. Trace Elem. Res.* **2018**, *182*, 217–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wasowicz, W.; Wolkanin, P.; Bednarski, M.; Gromadzinska, J.; Skłodowska, M.; Grzybowska, K. Plasma trace element (Se, Zn, Cu) concentrations in maternal and umbilical cord blood in Poland. *Biol. Trace Elem. Res.* **1993**, *38*, 205–215. [[CrossRef](#)]
- Kovalchuk, L.; Tarkhanova, A.; Tarkhanov, A. The essential and toxic effects of trace elements in the biological tissues of pregnant women and newborn babies (an ecologically unfavourable region). *Int. J. Saf. Secur. Eng.* **2013**, *3*, 265–277. [[CrossRef](#)]
- Skalnaya, M.G.; Tinkov, A.A.; Lobanova, Y.N.; Chang, J.S.; Skalny, A.V. Serum levels of copper, iron, and manganese in women with pregnancy, miscarriage, and primary infertility. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2019**, *56*, 124–130. [[CrossRef](#)]
- Sabra, S.; Malmqvist, E.; Saborit, A.; Gratacós, E.; Gomez Roig, M.D. Heavy metals exposure levels and their correlation with different clinical forms of fetal growth restriction. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0185645. [[CrossRef](#)]
- Mbofung, C.M.F.; Subbarau, V.V. Trace element (Zinc, copper, iron and magnesium) concentrations in human placenta and their relationship to birth weight of babies. *Nutr. Res.* **1990**, *10*, 359–366. [[CrossRef](#)]
- Punshon, T.; Li, Z.; Jackson, B.P.; Parks, W.T.; Romano, M.; Conway, D.; Baker, E.R.; Karagas, M.R. Placental metal concentrations in relation to placental growth, efficiency and birth weight. *Environ. Int.* **2019**, *126*, 533–542. [[CrossRef](#)]
- Young, S.M.; Gryder, L.K.; David, W.B.; Teng, Y.; Gerstenberger, S.; Benyshek, D.C. Human placenta processed for encapsulation contains modest concentrations of 14 trace minerals and elements. *Nutr. Res.* **2016**, *36*, 872–878. [[CrossRef](#)]
- de Angelis, P.; Miller, R.K.; Darrah, T.H.; Katzman, P.J.; Pressman, E.K.; Kent, T.R.; O'Brien, K.O. Elemental content of the placenta: A comparison between two high-risk obstetrical populations, adult women carrying multiples and adolescents carrying singletons. *Environ. Res.* **2017**, *158*, 553–565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mikelson, C.K.; Troisi, J.; LaLonde, A.; Symes, S.J.K.; Thurston, S.W.; DiRe, L.M.; Adair, C.D.; Miller, R.K.; Richards, S.M. Placental concentrations of essential, toxic, and understudied metals and relationships with birth outcomes in Chattanooga, T.N. *Environ. Res.* **2019**, *168*, 118–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rathore, S.; Gupta, A.; Batra, H.S.; Rathore, R. Comparative study of trace elements and serum ceruloplasmin level in normal and pre-eclamptic pregnancies with their cord blood. *Biomed. Res.* **2010**, *22*, 209–212.
- Singh, L.; Agarwal, P.; Anand, M.; Taneja, A. Toxic and essential metals in placenta and its relation with lipid peroxides/glutathione status in pre-term and full-term deliveries. *Asian J. Med. Sci.* **2015**, *7*, 34–39. [[CrossRef](#)]
- Upadhyaya, C.; Mishra, S.; Ajmera, P.; Sharma, P. Serum iron, copper and zinc status in maternal and cord blood. *Indian J. Clin Biochem.* **2004**, *19*, 48–52. [[CrossRef](#)]
- Thaker, R.; Oza, H.; Shaikh, I.; Kumar, S. Correlation of Copper and Zinc in Spontaneous Abortion. *Int. J. Fertil. Steril.* **2019**, *13*, 97–101. [[CrossRef](#)]
- Reddy, Y.S.; Aparna, Y.; Ramalaksmi, B.A.; Kumar, B.D. Lead and trace element levels in placenta, maternal and cord blood: A cross-sectional pilot study. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **2014**, *40*, 2184–2190. [[CrossRef](#)]
- Irwindi, R.; Wibowo, N.; Putri, A.S. The Concentration of Micronutrients and Heavy Metals in Maternal Serum, Placenta, and Cord Blood: A Cross-Sectional Study in Preterm Birth. *J. Pregnancy* **2019**, *2019*, 5062365. [[CrossRef](#)]
- Sakamoto, M.; Yasutake, A.; Domingo, J.L.; Chan, H.M.; Kubota, M.; Murata, K. Relationships between trace element concentrations in chorionic tissue of placenta and umbilical cord tissue: Potential use as indicators for prenatal exposure. *Environ. Int.* **2013**, *60*, 106–111. [[CrossRef](#)]

20. Shen, P.J.; Gong, B.; Xu, F.Y.; Luo, Y. Four trace elements in pregnant women and their relationships with adverse pregnancy outcomes. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2015**, *19*, 4690–4697.
21. Awadallah, S.M.; Abu-Elteen, K.H.; Elkarmi, A.Z.; Qaraein, S.H.; Salem, N.M.; Mubarak, M.S. Maternal and cord blood serum levels of zinc, copper, and iron in healthy pregnant Jordanian women. *J. Trace Elem. Exp. Med.* **2004**, *17*, 1–8. [[CrossRef](#)]
22. King, J.C. Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 1218–1225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Caan, B.; Horgen, D.M.; Margen, S.; King, J.C.; Jewell, N.P. Benefits associated with WIC supplemental feeding during the interpregnancy interval. *Am. J. Clin. Nutr.* **1987**, *45*, 29–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. McAlpine, J.M.; McKeating, D.R.; Vincze, L.; Vanderlelie, J.J.; Perkins, A.V. essential mineral intake during pregnancy and its association with maternal health and birth outcomes in South East Queensland, Australia. *Nutr. Metab. Insights* **2019**, *12*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Szymankiewicz, M. Incidence and mortality of newborns from multiple pregnancies. *Perinatol. Neonatol. i Ginekol.* **2010**, *3*, 245–248.
26. Filipecka-Tyczka, D. Medical care for a pregnant woman with a multiple pregnancy. *Postępy Nauk Med.* **2016**, *7*, 475–482.
27. Gertig, H.; Przysławski, J. *BBromatology: An Outline of Food and Nutrition Science*; Wydawnictwo Lekarskie PZWL: Warsaw, Poland, 2007.
28. Camaschella, C. Iron-deficiency anemia. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 1832–1843. [[CrossRef](#)]
29. Artym, J.; Zimecki, M. The role of lactoferrin in the proper development of newborns. *Postępy Hig. Med. Dosw.* **2005**, *59*, 421–432.
30. Terada, N.; Or, R.; Szepesi, A.; Lucas, J.J.; Gelfand, E.W. Definition of the roles for iron and essential fatty acids in cell cycle progression of normal human T lymphocytes. *Exp. Cell Res.* **1993**, *204*, 260–267. [[CrossRef](#)]
31. Zhang, C. Essential functions of iron-requiring proteins in DNA replication, repair and cell cycle control. *Protein Cell.* **2014**, *5*, 750–760. [[CrossRef](#)]
32. Beard, J.L. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 568S–580S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Dejkhamron, P.; Wejaphikul, K.; Mahatumarat, T.; Silvilairat, S.; Charoenkwan, P.; Saekho, S.; Unachak, K. Vitamin D deficiency and its relationship with cardiac iron and function in patients with transfusion-dependent thalassemia at Chiang Mai University Hospital. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **2018**, *35*, 52–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Tavsan, Z.; Ayar Kayali, H. The Effect of Iron and Copper as an Essential Nutrient on Mitochondrial Electron Transport System and Lipid Peroxidation in *Trichoderma harzianum*. *Appl Biochem. Biotechnol.* **2013**, *170*, 1665–1675. [[CrossRef](#)]
35. Aisen, P.; Enns, C.; Wessling-Resnick, M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2001**, *33*, 940–959. [[CrossRef](#)]
36. Lieu, P.T.; Heiskala, M.; Peterson, P.A.; Yang, Y. The roles of iron in health and disease. *Mol. Asp. Med.* **2001**, *22*, 1–87. [[CrossRef](#)]
37. Abbaspour, N.; Hurrell, R.; Kelishadi, R. Review on iron and its importance for human health. *J. Res. Med. Sci.* **2014**, *19*, 164–174.
38. Bothwell, T.H.; Charlton, R.W. A general approach to the problems of iron deficiency and iron overload in the population at large. *Semin Hematol.* **1982**, *19*, 54–67.
39. DeMaeyer, E.; Dallman, P.; Gurney, J.; Hallberg, L.; Sood, S.K.; Srikantia, S.G. *Preventing and Controlling Iron Deficiency Anaemia through Primary Health Care: A Guide for Health Administrators and Programme Managers*; World Health Organization, Ed.; WHO: Geneva, Switzerland, 1989; 58p.
40. Scholl, T.O.; Reilly, T. Anemia, iron and pregnancy outcome. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 443–447. [[CrossRef](#)]
41. Hytten, F. Blood volume changes in normal pregnancy. *Clin. Haematol.* **1985**, *14*, 601–612. [[CrossRef](#)]
42. Khoigani, M.G.; Goli, S.; Hasanzadeh, A. The relationship of hemoglobin and hematocrit in the first and second half of pregnancy with pregnancy outcome. *Iran. J. Nurs Midwifery Res.* **2012**, *17* (Suppl. 1), S165–S170.
43. Soma-Pillay, P.; Nelson-Piercy, C.; Tolppanen, H.; Mebazaa, A.; Tolppanen, H.; Mebazaa, A. Physiological changes in pregnancy. *Cardiovasc J. Afr.* **2016**, *27*, 89–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Laflamme, E.M. Maternal hemoglobin concentration and pregnancy outcome: A study of the effects of elevation in el alto, bolivia. *McGill J. Med.* **2011**, *13*, 47. [[PubMed](#)]

45. Rogne, T.; Tielemans, M.J.; Chong, M.F.-F.; Yajnik, C.S.; Krishnaveni, G.V.; Poston, L.; Jaddoe, V.W.V.; Steegers, E.A.P.; Joshi, S.; Chong, Y.-S.; et al. Associations of maternal vitamin B12 concentration in pregnancy with the risks of preterm birth and low birth weight: A systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Am. J. Epidemiol.* **2017**, *185*, 212–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ciobanu, A.M.; Colibaba, S.; Cimpoca, B.; Peltecu, G.; Panaitescu, A.M. Thrombocytopenia in pregnancy. *Maedica* **2016**, *11*, 55–60.
47. Kopeć, I. Hematologic complications during pregnancy. *Hematologia* **2016**, *7*, 295–302. [[CrossRef](#)]
48. WHO/UNICEF/UNO IDA. *Prevention, Assessment and Control. Report of a WHO/UNICEF/UNO Consultation*; WHO: Geneva, Switzerland, 1998.
49. Centers for Disease Control (CDC). CDC criteria for anemia in children and childbearing-aged women. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **1989**, *38*, 400–404.
50. Paweł, L.; Rafał, R.; Starzyński, A.S.; Robert Staroń, A.G. Dietary iron deficiency anemia. *Kosmos* **2014**, *63*, 373–379.
51. Anderson, G.J.; Frazer, D.M.; McKie, A.T.; Vulpe, C.D.; Smith, A. Mechanisms of haem and non-haem iron absorption: Lessons from inherited disorders of iron metabolism. *BioMetals* **2005**, *18*, 339–348. [[CrossRef](#)]
52. McKie, A.T.; Barrow, D.; Latunde-Dada, G.O.; Rolfs, A.; Sager, G.; Mudaly, E.; Richardson, C.; Barlow, D.; Bomford, A.; Peters, T.J.; et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* **2001**, *291*, 1755–1759. [[CrossRef](#)]
53. Donovan, A.; Brownlie, A.; Dorschner, M.O.; Zhou, Y.; Pratt, S.J.; Paw, B.H.; Phillips, R.B.; Thisse, C.; Thisse, B.; Zon, L.I. The zebrafish mutant gene chardonnay (cdy) encodes divalent metal transporter 1 (DMT-1). *Blood* **2002**, *100*, 4655–4659. [[CrossRef](#)]
54. Lipiński, P.; Starzyński, R.R.; Gajowiak, A.; Staroń, R. Iron Metabolism- state of the art. *Kosm Ser A* **2014**, *63*, 299–308.
55. Wang, X.; Flores, S.R.; Ha, J.-H.; Doguer, C.; Woloshun, R.R.; Xiang, P.; Grosche, A.; Vidyasagar, S.; Collins, J.F. Intestinal DMT1 Is Essential for Optimal Assimilation of Dietary Copper in Male and Female Mice with Iron-Deficiency Anemia. *J. Nutr.* **2018**, *148*, 1244–1252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Espinoza, A.; Le Blanc, S.; Olivares, M.; Pizarro, F.; Ruz, M.; Arredondo, M. Iron, copper, and zinc transport: Inhibition of divalent metal transporter 1 (DMT 1) and human copper transporter 1 (hCTR1) by shRNA. *Biol. Trace Elem. Res.* **2012**, *146*, 281–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Ha, J.-H.; Doguer, C.; Collins, J.F. Knockdown of copper-transporting ATPase 1 (Atp7a) impairs iron flux in fully-differentiated rat (IEC-6) and human (Caco-2) intestinal epithelial cells. *Metallomics* **2016**, *8*, 963–972. [[CrossRef](#)]
58. Latunde-Dada, G.O.; Takeuchi, K.; Simpson, R.J.; McKie, A.T. Haem carrier protein 1 (HCP1): Expression and functional studies in cultured cells. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 6865–6870. [[CrossRef](#)]
59. Macara, I.G.; Hoy, T.G.; Harrison, P.M. The formation of ferritin from apoferritin. Catalytic action of apoferritin. *Biochem. J.* **1973**, *135*, 343. [[CrossRef](#)]
60. Doguer, C.; Ha, J.-H.; Collins, J.F. Intersection of iron and copper metabolism in the mammalian intestine and liver. *Compr. Physiol.* **2018**, *8*, 1433. [[CrossRef](#)]
61. Qiu, A.; Jansen, M.; Sakaris, A.; Min, S.H.; Chattopadhyay, S.; Tsai, E.; Sandoval, C.; Zhao, R.; Akabas, M.; Goldman, I.D. Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption. *Cell* **2006**, *127*, 917–928. [[CrossRef](#)]
62. Le, N.T.; Richardson, D.R. Ferroportin1, a new iron export molecule? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2002**, *34*, 103–108. [[CrossRef](#)]
63. Vulpe, C.D.; Kuo, Y.-M.; Murphy, T.L.; Cowley, L.; Askwith, C.; Libina, N.; Gitschier, J.; Anderson, G.J. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat. Genet.* **1999**, *21*, 195–199. [[CrossRef](#)]
64. Donovan, A.; Brownlie, A.; Zhou, Y.; Shepard, J.; Pratt, S.J.; Moynihan, J.; Paw, B.H.; Drejer, A.; Barut, B.; Zapata, A.; et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* **2000**, *403*, 776–781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Daher, R.; Karim, Z. Iron metabolism: State of the art. *Transfus Clin. Biol.* **2017**, *24*, 115–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Giansanti, F.; Panella, G.; Leboffe, L.; Antonini, G. Lactoferrin from Milk: Nutr.aceutical and Pharmacological Properties. *Pharmaceuticals* **2016**, *9*, 61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

67. Nairz, M.; Theurl, I.; Swirski, F.K.; Weiss, G. "Pumping iron"—How macrophages handle iron at the systemic, microenvironmental, and cellular levels. *Pflugers Arch.* **2017**, *469*, 397–418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Sukhbaatar, N.; Weichhart, T. Iron Regulation: Macrophages in Control. *Pharmaceuticals* **2018**, *11*, 137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Nicolas, G.; Bennoun, M.; Devaux, I.; Beaumont, C.; Grandchamp, B.; Kahn, A.; Vaulont, S. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 8780–8785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Pigeon, C.; Ilyin, G.; Courselaud, B.; Leroyer, P.; Turlin, B.; Brissot, P.; Lortal, O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 7811–7819. [[CrossRef](#)]
71. Barrett, J.F.; Whittaker, P.G.; Williams, J.G.; Lind, T. Absorption of non-haem iron from food during normal pregnancy. *BMJ* **1994**, *309*, 79–82. [[CrossRef](#)]
72. Nemeth, E.; Tuttle, M.S.; Powelson, J.; Vaughn, M.B.; Donovan, A.; Ward, D.M.; Ganz, T.; Kaplan, J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* **2004**, *306*, 2090–2093. [[CrossRef](#)]
73. Wada, H.G.; Hass, P.E.; Sussman, H.H. Transferrin receptor in human placental brush border membranes. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 12629–12635.
74. Müller, R.; Verma, I.M.; Adamson, E.D. Expression of *c-onc* genes: *C-fos* transcripts accumulate to high levels during development of mouse placenta, yolk sac and amnion. *EMBO J.* **1983**, *2*, 679–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Gambling, L.; Danzeisen, R.; Gair, S.; Lea, R.G.; Charania, Z.; Solanky, N.; Joory, K.D.; Srai, S.K.; McArdle, H.J. Effect of iron deficiency on placental transfer of iron and expression of iron transport proteins in vivo and in vitro. *Biochem. J.* **2001**, *356* (Pt 3), 883–889. [[CrossRef](#)]
76. Bastin, J.; Drakesmith, H.; Rees, M.; Sargent, I.; Townsend, A. Localisation of proteins of iron metabolism in the human placenta and liver. *Br. J. Haematol.* **2006**, *134*, 532–543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Ohgami, R.S.; Campagna, D.R.; McDonald, A.; Fleming, M.D. The Steap proteins are metalloductases. *Blood* **2006**, *108*, 1388–1394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Georgieff, M.K.; Wobken, J.K.; Welle, J.; Burdo, J.R.; Connor, J.R. Identification and localization of divalent metal transporter-1 (DMT-1) in term human placenta. *Placenta* **2000**, *21*, 799–804. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. McArdle, H.J.; Gambling, L.; Kennedy, C. Iron deficiency during pregnancy: The consequences for placental function and fetal outcome. *Proc Nutr. Soc.* **2014**, *73*, 9–15. [[CrossRef](#)]
80. Gunshin, H.; Fujiwara, Y.; Custodio, A.O.; Drenzo, C.; Robine, S.; Andrews, N.C. Slc11a2 is required for intestinal iron absorption and erythropoiesis but dispensable in placenta and liver. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 1258–1266. [[CrossRef](#)]
81. Wang, C.-Y.; Jenkitkasemwong, S.; Duarte, S.; Sparkman, B.K.; Shawki, A.; Mackenzie, B.; Knutson, M.D. ZIP8 is an iron and zinc transporter whose cell-surface expression is up-regulated by cellular iron loading. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 34032–34043. [[CrossRef](#)]
82. Cao, C.; Fleming, M.D. The placenta: The forgotten essential organ of iron transport. *Nutr. Rev.* **2016**, *74*, 421–431. [[CrossRef](#)]
83. Sangkhae, V.; Nemeth, E. Placental iron transport: The mechanism and regulatory circuits. *Free Radic Biol. Med.* **2019**, *133*, 254–261. [[CrossRef](#)]
84. Kohgo, Y.; Ikuta, K.; Ohtake, T.; Torimoto, Y.; Kato, J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int. J. Hematol.* **2008**, *88*, 7–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Wallace, D.F. The Regulation of Iron Absorption and Homeostasis. *Clin. Biochem. Rev.* **2016**, *37*, 51–62. [[PubMed](#)]
86. Baker, L.B. Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temp. Multidiscip Biomed. J.* **2019**, *6*, 211–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Gulec, S.; Anderson, G.J.; Collins, J.F. Mechanistic and regulatory aspects of intestinal iron absorption. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2014**, *307*, G397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Bothwell, T.H. Iron requirements in pregnancy and strategies to meet them. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *72*, 257S–264S. [[CrossRef](#)]
89. Johnson-Wimbley, T.D.; Graham, D.Y. Diagnosis and management of iron deficiency anemia in the 21st century. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **2011**, *4*, 177–184. [[CrossRef](#)]

90. Soppi, E.T. Iron deficiency without anemia—A clinical challenge. *Clin. Case Rep.* **2018**, *6*, 1082–1086. [[CrossRef](#)]
91. Rüfer, A.; Criblez, D.; Wuillemin, W.A. Iron-deficiency anemia and gastrointestinal bleeding. *Ther. Umschau.* **2006**, *63*, 339–343. [[CrossRef](#)]
92. Spottiswoode, N.; Duffy, P.E.; Drakesmith, H. Iron, anemia and hepcidin in malaria. *Front Pharmacol.* **2014**, *5*, 125. [[CrossRef](#)]
93. Smith, J.L.; Brooker, S. Impact of hookworm infection and deworming on anaemia in non-pregnant populations: A systematic review. *Trop. Med. Int. Health* **2010**, *15*, 776–795. [[CrossRef](#)]
94. Miller, J.L. Iron deficiency anemia: A common and curable disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2013**, *3*, a011866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Bartnikas, T.B. Known and potential roles of transferrin in iron biology. *Biometals* **2012**, *25*, 677–686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Naoum, F.A. Iron deficiency in cancer patients. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **2016**, *38*, 325–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Lee, A.L.; Okam, M.M. Anemia in pregnancy. *Hematol. Oncol Clin. N. Am.* **2011**, *25*, 241–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Charzewska, J. *Human Nutrition Basics of Nutrition Science*; Gawęcki, J., Ed.; Wydawnictwo Naukowe PWN: Warszawa, Poland, 2000; pp. 481–492.
99. Loréal, O.; Cavey, T.; Bardou-Jacquet, E.; Guggenbuhl, P.; Ropert, M.; Brissot, P. Iron, hepcidin, and the metal connection. *Front. Pharmacol.* **2014**, *5*, 128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Menon, A.V.; Chang, J.; Kim, J. Mechanisms of Divalent Metal Toxicity in Affective Disorders. *Toxicology* **2016**, *339*, 58–72. [[CrossRef](#)]
101. Hubbard, A.C.; Bandyopadhyay, S.; Wojczyk, B.S.; Spitalnik, S.L.; Hod, E.A.; Prestia, K.A. Effect of dietary iron on fetal growth in pregnant mice. *Comp. Med.* **2013**, *63*, 127–135.
102. Woodman, A.G.; Mah, R.; Keddie, D.; Noble, R.M.N.; Panahi, S.; Gragasin, F.S.; Lemieux, H.; Bourque, S.L. Prenatal iron deficiency causes sex-dependent mitochondrial dysfunction and oxidative stress in fetal rat kidneys and liver. *FASEB J.* **2018**, *32*, 3254–3263. [[CrossRef](#)]
103. Harrison-Findik, D.D. Gender-related variations in iron metabolism and liver diseases. *World J. Hepatol.* **2010**, *2*, 302–310. [[CrossRef](#)]
104. Dignass, A.; Farrag, K.; Stein, J. Limitations of serum ferritin in diagnosing iron deficiency in inflammatory conditions. *Int. J. Chronic Dis.* **2018**, *2018*, 9394060. [[CrossRef](#)]
105. Hallberg, L. *Vitamins and Minerals in Pregnancy and Lactation*; Berger, H., Ed.; Raven Press: New York, NY, USA, 1988; pp. 115–127.
106. Seu, M.; Mose, J.C.; Panigoro, R.; Sahiratmadja, E. Anemia prevalence after iron supplementation among pregnant women in midwives practice of primary health care facilities in eastern indonesia. *Anemia* **2019**, *2019*, 1413906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. McMahon, L.P. Iron deficiency in pregnancy. *Obstet. Med.* **2010**, *3*, 17–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Tangeda, P.R.; Patil, S.; Shastri, N.; Noorali, S.N. Maternal myocardial performance in second trimester of pregnancy with iron deficiency anaemia. *J. Clin. Diagn Res.* **2016**, *10*, CC16. [[CrossRef](#)]
109. Woodman, A.G.; Care, A.S.; Mansour, Y.; Cherak, S.J.; Panahi, S.; Gragasin, F.S.; Bourque, S.L. Modest and severe maternal iron deficiency in pregnancy are associated with fetal anaemia and organ-specific hypoxia in rats. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 46573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Tayyebi, A.; Poursadeghfard, M.; Nazeri, M.; Pousadeghfard, T. Is there any correlation between migraine attacks and iron deficiency anemia? A case-control study. *Int. J. Hematol. Stem Cell Res.* **2019**, *13*, 164–171.
111. Abu-Ouf, N.M.; Jan, M.M. The impact of maternal iron deficiency and iron deficiency anemia on child's health. *Saudi Med. J.* **2015**, *36*, 146–149. [[CrossRef](#)]
112. Lumish, R.A.; Young, S.L.; Lee, S.; Cooper, E.; Pressman, E.; Guillet, R.; O'Brien, K.O. Gestational iron deficiency is associated with pica behaviors in adolescents. *J. Nutr.* **2014**, *144*, 1533–1539. [[CrossRef](#)]
113. Breymann, C. Iron deficiency anemia in pregnancy. *Semin Hematol.* **2015**, *52*, 339–347. [[CrossRef](#)]
114. Milman, N.; Taylor, C.L.; Merkel, J.; Brannon, P.M. Iron status in pregnant women and women of reproductive age in Europe. *Am. J. Clin. Nutr.* **2017**, *106*, 1655S–1662S. [[CrossRef](#)]
115. Tandon, R.; Jain, A.; Malhotra, P. Management of iron deficiency anemia in pregnancy in india. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* **2018**, *34*, 204. [[CrossRef](#)]



116. Milman, N. Iron and pregnancy—A delicate balance. *Ann. Hematol.* **2006**, *85*, 559–565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Zimmermann, M.B.; Hurrell, R.F. Nutritional iron deficiency. *Lancet* **2007**, *370*, 511–520. [[CrossRef](#)]
118. Black, R.E. Micronutrients in pregnancy. *Br. J. Nutr.* **2001**, *85*, S193–S197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Figueiredo, A.C.M.G.; Gomes-Filho, I.S.; Silva, R.B.; Pereira, P.P.S.; Mata, F.A.F.; Da Lyrio, A.O.; Souza, E.S.; Cruz, S.S.; Pereira, M.G. Maternal anemia and low birth weight: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients* **2018**, *10*, 601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Ru, Y.; Pressman, E.K.; Cooper, E.M.; Guillet, R.; Katzman, P.J.; Kent, T.R.; Bacak, S.J.; O'Brien, K.O. Iron deficiency and anemia are prevalent in women with multiple gestations. *Am. J. Clin. Nutr.* **2016**, *104*, 1052–1060. [[CrossRef](#)]
121. Kaiser, L.; Allen, L.H.; American Dietetic Association. Position of the American Dietetic Association: Nutrition and lifestyle for a healthy pregnancy outcome. *J. Am. Diet. Assoc.* **2008**, *108*, 553–561.
122. Khayat, S.; Fanaei, H.; Ghanbarzahi, A. Minerals in pregnancy and lactation: A review Article. *J. Clin. Diagn Res.* **2017**, *11*, QE01–QE05. [[CrossRef](#)]
123. Cogswell, M.E.; Parvanta, I.; Ickes, L.; Yip, R.; Brittenham, G.M. Iron supplementation during pregnancy, anemia, and birth weight: A randomized controlled trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *78*, 773–781. [[CrossRef](#)]
124. Allen, L.H. Biological mechanisms that might underlie iron's effects on fetal growth and preterm birth. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 581S–589S. [[CrossRef](#)]
125. Peña-Rosas, J.P.; De-Regil, L.M.; Garcia-Casal, M.N.; Dowswell, T. Daily oral iron supplementation during pregnancy. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2015**, *7*, CD004736. [[CrossRef](#)]
126. Abioye, A.I.; Aboud, S.; Premji, Z.; Etheredge, A.J.; Gunaratna, N.S.; Sudfeld, C.R.; Mongi, R.; Meloney, L.; Darling, A.M.; Noor, R.A.; et al. Iron supplementation affects hematologic biomarker concentrations and pregnancy outcomes among iron-deficient Tanzanian women. *J. Nutr.* **2016**, *146*, 1162–1171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Zhao, G.; Xu, G.; Zhou, M.; Jiang, Y.; Richards, B.; Clark, K.M.; Kaciroti, N.; Georgieff, M.K.; Zhang, Z.; Tardif, T.; et al. Prenatal iron supplementation reduces maternal anemia, iron deficiency, and iron deficiency anemia in a randomized clinical trial in rural china, but iron deficiency remains widespread in mothers and neonates. *J. Nutr.* **2015**, *145*, 1916–1923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Peña-Rosas, J.P.; De-Regil, L.M.; Gomez, M.H.; Flores-Urrutia, M.C.; Dowswell, T. Intermittent oral iron supplementation during pregnancy. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2015**, CD009997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Ziaei, S.; Rahman, A.; Raqib, R.; Lönnerdal, B.; Ekström, E.-C. A prenatal multiple micronutrient supplement produces higher maternal vitamin B-12 concentrations and similar folate, ferritin, and zinc concentrations as the standard 60-mg iron plus 400-µg folic acid supplement in rural bangladeshi women. *J. Nutr.* **2016**, *146*, 2520–2529. [[CrossRef](#)]
130. Ali, M.K.; Abbas, A.M.; Abdelmagied, A.M.; Mohammed, G.E.; Abdalmageed, O.S. A randomized clinical trial of the efficacy of single versus double-daily dose of oral iron for prevention of iron deficiency anemia in women with twin gestations. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **2017**, *30*, 2884–2889. [[CrossRef](#)]
131. Shinar, S.; Skornick-Rapaport, A.; Maslovitz, S. Iron supplementation in twin pregnancy—The benefit of doubling the iron dose in iron deficient pregnant women: A randomized controlled trial. *Twin Res. Hum. Genet.* **2017**, *20*, 419–424. [[CrossRef](#)]
132. Skoczynska, A.; Kwiecinska, D.; Kielbinski, M.; Lukaszewski, M. Acute iron poisoning in adult female. *Hum. Exp. Toxicol.* **2007**, *26*, 663–666. [[CrossRef](#)]
133. Wood, J.C. Guidelines for quantifying iron overload. *ASH Educ. Progr. B* **2014**, *2014*, 210–215. [[CrossRef](#)]
134. Brissot, P.; Ropert, M.; Le Lan, C.; Loréal, O. Non-transferrin bound iron: A key role in iron overload and iron toxicity. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2012**, *1820*, 403–410. [[CrossRef](#)]
135. Aydemir, T.B.; Cousins, R.J. The Multiple Faces of the Metal Transporter ZIP14 (SLC39A14). *J. Nutr.* **2018**, *148*, 174–184. [[CrossRef](#)]
136. Fibach, E.; Rachmilewitz, E.A. Iron overload in hematological disorders. *Presse Med.* **2017**, *46*, e296–e305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Pietrangelo, A. Iron and the liver. *Liver Int.* **2016**, *36*, 116–123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Silver, M.M.; Beverley, D.W.; Valberg, L.S.; Cutz, E.; Phillips, M.J.; Shaheed, W.A. Perinatal hemochromatosis. Clinical, morphologic, and quantitative iron studies. *Am. J. Pathol.* **1987**, *128*, 538. [[PubMed](#)]
139. Prus, E.; Fibach, E. Effect of iron chelators on labile iron and oxidative status of thalassaemic erythroid cells. *Acta Haematol.* **2010**, *123*, 14–20. [[CrossRef](#)]

140. Menon, R. Oxidative stress damage as a detrimental factor in preterm birth pathology. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Collins, J.F. Copper. In *Modern Nutrition in Health and Disease*, 11th ed.; Ross, A.C., Caballero, B., Cousins, R.J., Tucker, K.L., Ziegler, T.R., Eds.; Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2014; p. 206.
142. Gibson, R.S. *Principles of Nutritional Assessment*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2005; 908p.
143. Lanocha-Arendarczyk, N.; Kosik-Bogacka, D.I.; Copper, C. *Mammals and Birds as Bioindicators of Trace Element Contaminations in Terrestrial Environments: An Ecotoxicological Assessment of the Northern Hemisphere*; Kalisińska, E., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2019; pp. 125–161.
144. Uauy, R.; Olivares, M.; Gonzalez, M. Essentiality of copper in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *67*, 952S–959S. [[CrossRef](#)]
145. Cetin, I.; Berti, C.; Calabrese, S. Role of micronutrients in the periconceptual period. *Hum. Reprod Update.* **2010**, *16*, 80–95. [[CrossRef](#)]
146. Lurie, D.G.; Holden, J.M.; Schubert, A.; Wolf, W.R.; Miller-Ihli, N.J. The copper content of foods based on a critical evaluation of published analytical data. *J. Food Compos. Anal.* **1989**, *2*, 298–316. [[CrossRef](#)]
147. Squitti, R.; Siotto, M.; Polimanti, R. Low-copper diet as a preventive strategy for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2014**, *35*, S40–S50. [[CrossRef](#)]
148. Peña, M.M.O.; Lee, J.; Thiele, D.J. A delicate balance: Homeostatic control of copper uptake and distribution. *J. Nutr.* **1999**, *129*, 1251–1260. [[CrossRef](#)]
149. Krzeptowski, W.; Pierzchała, O.; Lenartowicz, M. Copper metabolism and characteristic of inherited metabolic syndromes caused by copper deficiency and lack of TP7A protein activity. *Kosmos* **2014**, *63*, 395–413.
150. Wang, F.; Jiao, P.; Qi, M.; Frezza, M.; Dou, Q.P.; Yan, B. Turning tumor-promoting copper into an anti-cancer weapon via high-throughput chemistry. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 2685–2698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Eisses, J.F.; Kaplan, J.H. The mechanism of copper uptake mediated by human CTR1, a mutational analysis. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 37159–37168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Gunshin, H.; Mackenzie, B.; Berger, U.V.; Gunshin, Y.; Romero, M.F.; Boron, W.F.; Nussberger, S.; Gollan, J.L.; Hediger, M.A. Cloning and characterization of a proton-coupled mammalian metal-ion transporter. *Nature* **1997**, *388*, 482–488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Kim, H.; Wu, X.; Lee, J. SLC31 (CTR) family of copper transporters in health and disease. *Mol. Aspects Med.* **2013**, *34*, 561–570. [[CrossRef](#)]
154. Sharp, P.A. Ctr1 and its role in body copper homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2003**, *35*, 288–291. [[CrossRef](#)]
155. Wee, N.K.Y.; Weinstein, D.C.; Fraser, S.T.; Assinder, S.J. The mammalian copper transporters CTR1 and CTR2 and their roles in development and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 960–963. [[CrossRef](#)]
156. Kuo, Y.M.; Zhou, B.; Cosco, D.; Gitschier, J. The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6836–6841. [[CrossRef](#)]
157. Kelner, G.S.; Lee, M.; Clark, M.E.; Maciejewski, D.; McGrath, D.; Rabizadeh, S.; Lyons, T.; Bredesen, D.; Jenner, P.; Maki, R.A. The copper transport protein Atox1 promotes neuronal survival. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 580–584. [[CrossRef](#)]
158. Shike, M. Copper in Parenteral Nutrition. *Gastroenterology* **2009**, *137*, S13–S17. [[CrossRef](#)]
159. Kunachowicz, H.; Przygoda, B.; Nadolna, I.K. *Food Composition and Nutrition Tables*; PZWL: Warszawa, Poland, 2017.
160. McArdle, H.J.; Bingham, M.J.; Summer, K.; Ong, T.J. Cu metabolism in the liver. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1999**, *448*, 29–37. [[PubMed](#)]
161. Pisu, P.; Bellovino, D.; Gaetani, S. Copper regulated synthesis, secretion and degradation of ceruloplasmin in a mouse immortalized hepatocytic cell line. *Cell Mol. Biol.* **2005**, *51*, OL859–OL867. [[PubMed](#)]
162. Boyer, J.L. Bile Formation and Secretion. *Compr. Physiol.* **2013**, *3*, 1035.
163. Moore, S.D.; Cox, D.W. Expression in Mouse Kidney of Membrane Copper Transporters Atp7a and Atp7b. *Nephron* **2002**, *92*, 629–634. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Frankel, D.A. Supplementation of trace elements in parenteral nutrition: Rationale and recommendations. *Nutr. Res.* **1993**, *13*, 583–596. [[CrossRef](#)]
165. Barteo, M.Y.; Lutsenko, S. Hepatic copper-transporting ATPase ATP7B: Function and inactivation at the molecular and cellular level. *Biomaterials* **2007**, *20*, 627–637. [[CrossRef](#)]

166. Lee, J.; Prohaska, J.R.; Thiele, D.J. Essential role for mammalian copper transporter Ctrl in copper homeostasis and embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 6842–6847. [[CrossRef](#)]
167. Hardman, B.; Manuelpillai, U.; Wallace, E.M.; van de Waasburg, S.; Cater, M.; Mercer, J.F.B.; Ackland, M.L. Expression and localization of Menkes and Wilson copper transporting ATPases in human placenta. *Placenta* **2004**, *25*, 512–517. [[CrossRef](#)]
168. Hardman, B.; Michalczyk, A.; Greenough, M.; Camakaris, J.; Mercer, J.F.B.; Ackland, M.L. Hormonal regulation of the Menkes and Wilson copper-transporting ATPases in human placental Jeg-3 cells. *Biochem. J.* **2007**, *402*, 241–250. [[CrossRef](#)]
169. McArdle, H.J.; Andersen, H.S.; Jones, H.; Gambling, L. Copper and iron transport across the placenta: Regulation and Interactions. *J. Neuroendocrinol.* **2008**, *20*, 427–431. [[CrossRef](#)]
170. Collins, J.F.; Klevay, L.M. Copper. *Adv. Nutr.* **2011**, *2*, 520–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
171. Wazir, S.M.; Ghobrial, I. Copper deficiency, a new triad: Anemia, leucopenia, and myeloneuropathy. *J. Community Hosp. Intern. Med. Perspect.* **2017**, *7*, 265–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Myint, Z.W.; Oo, T.H.; Thein, K.Z.; Tun, A.M.; Saeed, H. Copper deficiency anemia: Review article. *Ann. Hematol.* **2018**, *97*, s00277–s018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Bolognin, S.; Pasqualetto, F.; Mucignat-Caretta, C.; Scancar, J.; Milacic, R.; Zambenedetti, P.; Cozzi, B.; Zatta, P. Effects of a copper-deficient diet on the biochemistry, neural morphology and behavior of aged mice. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Zatta, P.; Frank, A. Copper deficiency and neurological disorders in man and animals. *Brain Res. Rev.* **2007**, *54*, 19–33. [[CrossRef](#)]
175. Chen, Y.; Saari, J.T.; Kang, Y.J. Weak antioxidant defenses make the heart a target for damage in copper-deficient rats. *Free Radic Biol. Med.* **1994**, *17*, 529–536. [[CrossRef](#)]
176. Qu, X.; He, Z.; Qiao, H.; Zhai, Z.; Mao, Z.; Yu, Z.; Dai, K. Serum copper levels are associated with bone mineral density and total fracture. *J. Orthop. Transl.* **2018**, *14*, 34. [[CrossRef](#)]
177. Wang, H.W.; Zhou, B.H.; Zhang, S.; Guo, H.W.; Zhang, J.L.; Zhao, J.; Tian, E.J. Reproductive toxicity in male mice after exposure to high molybdenum and low copper concentrations. *Toxicol. Ind. Health* **2016**, *32*, 1598–1606. [[CrossRef](#)]
178. Li, Y.; Wang, L.; Schuschke, D.A.; Zhou, Z.; Saari, J.T.; Kang, Y.J. Marginal dietary copper restriction induces cardiomyopathy in rats. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 2130–2136. [[CrossRef](#)]
179. Jiang, Y.; Reynolds, C.; Xiao, C.; Feng, W.; Zhou, Z.; Rodriguez, W.; Tyagi, S.C.; Eaton, J.W.; Saari, J.T.; Kang, Y.J. Dietary copper supplementation reverses hypertrophic cardiomyopathy induced by chronic pressure overload in mice. *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 657. [[CrossRef](#)]
180. WHO. *Copper in Drinking-Water*; WHO/SDE/WSH/03.04/88:2004; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2004.
181. Danks, D.M. Copper Deficiency in Humans. *Annu. Rev. Nutr.* **1988**, *8*, 235–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Liu, X.-Z.; Li, M.; Huang, C.-Y.; Zhang, Y.-Z. Study of effects of copper deficiency on internal organ through a copper deficiency model in rat. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* **2007**, *41*, 127–130. [[PubMed](#)]
183. Kiilholma, P.; Grönroos, M.; Erkkola, R.; Pakarinen, P.; Nääntö, V. The role of calcium, copper, iron and zinc in preterm delivery and premature rupture of fetal membranes. *Gynecol. Obstet. Invest.* **1984**, *17*, 194–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Kardos, J.; Héja, L.; Simon, Á.; Jablonkai, I.; Kovács, R.; Jemnitz, K. Copper signalling: Causes and consequences. *Cell Commun. Signal.* **2018**, *16*, 71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Yu, L.; Liou, I.W.; Biggins, S.W.; Yeh, M.; Jalikis, F.; Chan, L.; Burkhead, J. Copper deficiency in liver diseases: A case series and pathophysiological considerations. *Hepatol. Commun.* **2019**, *3*, 1159. [[CrossRef](#)]
186. Tümer, Z. An Overview and Update of ATP7A Mutations leading to Menkes disease and occipital horn syndrome. *Hum. Mutat.* **2013**, *34*, 417–429. [[CrossRef](#)]
187. Tümer, Z.; Möller, L.B. Menkes disease. *Eur. J. Hum. Genet.* **2010**, *18*, 511–518. [[CrossRef](#)]
188. Möller, L.; Lenartowicz, M.; Zobot, M.-T.; Josiane, A.; Burglen, L.; Bennett, C.; Riconda, D.; Fisher, R.; Janssens, S.; Mohammed, S.; et al. Clinical expression of Menkes disease in females with normal karyotype. *Orphanet J. Rare Dis.* **2012**, *7*, 6. [[CrossRef](#)]
189. Gualandi, F.; Sette, E.; Fortunato, F.; Bigoni, S.; De Grandis, D.; Scotton, C.; Selvatici, R.; Neri, M.; Incensi, A.; Liguori, R.; et al. Report of a novel ATP7A mutation causing distal motor neuropathy. *Neuromuscul. Disord.* **2019**, *29*, 776–785. [[CrossRef](#)]

190. Chiplunkar, S.; Bindu, P.S.; Nagappa, M.; Bineesh, C.; Govindaraj, P.; Gayathri, N.; Srinivas Bharath, M.M.; Arvinda, H.R.; Mathuranath, P.S.; Sinha, S.; et al. Huppke-Brendel syndrome in a seven months old boy with a novel 2-bp deletion in SLC33A1. *Metab. Brain Dis.* **2016**, *31*, 1195–1198. [[CrossRef](#)]
191. Martinelli, D.; Dionisi-Vici, C. AP1S1 defect causing MEDNIK syndrome: A new adaptinopathy associated with defective copper metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2014**, *1314*, 55–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
192. Kashanian, M.; Hadizadeh, H.; Faghankhani, M.; Nazemi, M.; Sheikhsari, N. Evaluating the effects of copper supplement during pregnancy on premature rupture of membranes and pregnancy outcome. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **2018**, *31*, 39–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Jankowski, M.A.; Uriu-Hare, J.Y.; Rucker, R.B.; Rogers, J.M.; Keen, C.L. Maternal zinc deficiency, but not copper deficiency or diabetes, results in increased embryonic cell death in the rat: Implications for mechanisms underlying abnormal development. *Teratology* **1995**, *51*, 85–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Kodama, H.; Fujisawa, C.; Bhadrprasit, W. Pathology, clinical features and treatments of congenital copper metabolic disorders—Focus on neurologic aspects. *Brain Dev.* **2011**, *33*, 243–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Prohaska, J.R. Neurochemical roles of copper as antioxidant or prooxidant. In *Metals and Oxidative Damage in Neurological Disorders*; Springer: Boston, MA, USA, 1997; pp. 57–75.
196. Lewandowska, M.; Sajdak, S.; Marciniak, W.; Lubiński, J. First trimester serum copper or zinc levels, and risk of pregnancy-induced hypertension. *Nutrients* **2019**, *11*, 2479. [[CrossRef](#)]
197. Prohaska, J.R.; Brokate, B. The timing of perinatal copper deficiency in mice influences offspring survival. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 3142–3145. [[CrossRef](#)]
198. Vukelić, J.; Kapamadžija, A.; Petrović, D.; Grujić, Z.; Novakov-mikić, A.; Kopitović, V.; Bjelica, A. Variations of serum copper values in pregnancy. *Srp. Arh. za Celok. Lek.* **2012**, *140*, 42–46. [[CrossRef](#)]
199. Hao, Y.; Pang, Y.; Yan, H.; Zhang, Y.; Liu, J.; Jin, L.; Yan, L.; Chen, D.; Hu, L.; Qin, Y.; et al. Association of maternal serum copper during early pregnancy with the risk of spontaneous preterm birth: A nested case-control study in China. *Environ. Int.* **2019**, *122*, 237–243. [[CrossRef](#)]
200. Li, P.; Yin, J.; Zhu, Y.; Li, S.; Chen, S.; Sun, T.; Shan, Z.; Wang, J.; Shang, Q.; Li, X.; et al. Association between plasma concentration of copper and gestational diabetes mellitus. *Clin. Nutr.* **2019**, *38*, 2922–2927. [[CrossRef](#)]
201. Gaetke, L.M.; Chow-Johnson, H.S.; Chow, C.K. Copper: Toxicological relevance and mechanisms. *Arch. Toxicol.* **2014**, *88*, 1929. [[CrossRef](#)]
202. Pizzino, G.; Irrera, N.; Cucinotta, M.; Pallio, G.; Mannino, F.; Arcoraci, V.; Squadrito, F.; Altavilla, D.; Bitto, A. Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *2017*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
203. Rosencrantz, R.; Schilsky, M. Wilson Disease: Pathogenesis and clinical considerations in diagnosis and treatment. *Semin. Liver Dis.* **2011**, *31*, 245–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Pfeiffenberger, J.; Beinhardt, S.; Gotthardt, D.N.; Haag, N.; Freissmuth, C.; Reuner, U.; Gauss, A.; Stremmel, W.; Schilsky, M.L.; Ferenci, P.; et al. Pregnancy in Wilson’s disease: Management and outcome. *Hepatology* **2018**, *67*, 1261–1269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Reuner, U.; Dinger, J. Pregnancy and Wilson disease: Management and outcome of mother and newborns—Experiences of a perinatal centre. *Ann. Transl. Med.* **2019**, *7*, 56. [[CrossRef](#)]
206. Russ, E.M.; Raymunt, J. Influence of estrogens on total serum copper and caeruloplasmin. *Exp. Biol. Med.* **1956**, *92*, 465–466. [[CrossRef](#)]
207. Kambe, T.; Tsuji, T.; Hashimoto, A.; Itsumura, N. The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism. *Physiol. Rev.* **2015**, *95*, 749–784. [[CrossRef](#)]
208. Rink, L.; Gabriel, P. Zinc and the immune system. *Proc. Nutr. Soc.* **2000**, *59*, 541–552. [[CrossRef](#)]
209. Wessells, K.R.; Jorgensen, J.M.; Hess, S.Y.; Woodhouse, L.R.; Peerson, J.M.; Brown, K.H. Plasma zinc concentration responds rapidly to the initiation and discontinuation of short-term zinc supplementation in healthy men. *J. Nutr.* **2010**, *140*, 2128–2133. [[CrossRef](#)]
210. Hess, S.Y.; Peerson, J.M.; King, J.C.; Brown, K.H. Use of serum zinc concentration as an indicator of population zinc status. *Food Nutr. Bull.* **2007**, *28* (Suppl. 3), S403–S429. [[CrossRef](#)]
211. Sekler, I.; Sensi, S.L.; Hershinkel, M.; Silverman, W.F. Mechanism and regulation of cellular zinc transport. *Mol. Med.* **2007**, *13*, 337. [[CrossRef](#)]
212. Jackson, M.J. Physiology of zinc: General aspects. In *Zinc in Human Biology*; Mills, C.F., Ed.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany; New York, NY, USA, 1989; pp. 1–14.
213. Maret, W. *Zinc Biochemistry, Physiology, and Homeostasis*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2001.

214. Gower-Winter, S.D.; Levenson, C.W. Zinc in the central nervous system: From molecules to behavior. *BioFactors* **2012**, *38*, 186–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
215. Sandstead, H.H.; Frederickson, C.J.; Penland, J.G. History of zinc as related to brain function. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 496S–502S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
216. Merck, V.M. *The Merck Veterinary Manual: A Handbook of Diagnosis, Therapy and Disease Prevention and Control for the Veterinarian*, 6th ed.; Merck & Co., Inc.: Fort Kenalworth, NJ, USA, 1986.
217. Barceloux, D.G. Zinc. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **1999**, *37*, 279–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
218. Kay, A.R.; Toth, K. Is zinc a neuromodulator? *Sci. Signal.* **2008**, *1*, re3. [[CrossRef](#)]
219. Mochegiani, E.; Muzzioli, M.; Giacconi, R. Zinc, metallothioneins, immune responses, survival and ageing. *Biogerontology* **2000**, *1*, 133–143. [[CrossRef](#)]
220. Solomons, N.W. Update on zinc biology. *Ann. Nutr. Metab.* **2013**, *62*, 8–17. [[CrossRef](#)]
221. Hunt, C.D.; Johnson, P.E.; Herbel, J.; Mullen, L.K. Effects of dietary zinc depletion on seminal volume and zinc loss, serum testosterone concentrations, and sperm morphology in young men. *Am. J. Clin. Nutr.* **1992**, *56*, 148–157. [[CrossRef](#)]
222. Dardenne, M.; Pleau, J.M.; Nabarra, B.; Lefrancier, P.; Derrien, M.; Choay, J.; Bach, J.F. Contribution of zinc and other metals to the biological activity of the serum thymic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 5370–5373. [[CrossRef](#)]
223. Gammoh, N.Z.; Rink, L. Zinc in Infection and Inflammation. *Nutrients* **2017**, *9*, 624. [[CrossRef](#)]
224. Tainer, J.A.; Getzoff, E.D.; Richardson, J.S.; Richardson, D.C. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase. *Nature* **1983**, *306*, 284–287. [[CrossRef](#)]
225. Olechnowicz, J.; Tinkov, A.; Skalny, A.; Suliburska, J. Zinc status is associated with inflammation, oxidative stress, lipid, and glucose metabolism. *J. Physiol. Sci.* **2018**, *68*, 19–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
226. Boron, B.; Hupert, J.; Barch, D.H.; Fox, C.C.; Friedman, H.; Layden, T.J.; Mobarhan, S. Effect of zinc deficiency on hepatic enzymes regulating vitamin A status. *J. Nutr.* **1988**, *118*, 995–1001. [[CrossRef](#)]
227. Zhai, Q.; Narbad, A.; Chen, W. Dietary strategies for the treatment of cadmium and lead toxicity. *Nutrients* **2015**, *7*, 552–571. [[CrossRef](#)]
228. Gibson, R.S.; King, J.C.; Lowe, N. A review of dietary zinc recommendations. *Food Nutr. Bull.* **2016**, *37*, 443–460. [[CrossRef](#)]
229. Maret, W. Zinc biochemistry: From a single zinc enzyme to a key element of life. *Adv. Nutr.* **2013**, *4*, 82–91. [[CrossRef](#)]
230. Tian, X.; Zheng, Y.; Li, Y.; Shen, Z.; Tao, L.; Dou, X.; Qian, J.; Shen, H. Psychological stress induced zinc accumulation and up-regulation of ZIP14 and metallothionein in rat liver. *BMC Gastroenterol.* **2014**, *14*, 32. [[CrossRef](#)]
231. Sas, B.; Bremner, I. Effect of acute stress on the absorption and distribution of zinc and on zn-metallothionein production in the liver of the chick. *J. Inorg. Biochem.* **1979**, *11*, 67–76. [[CrossRef](#)]
232. Yonova, D.; Vazelov, E.; Tzatchev, K. Zinc status in patients with chronic renal failure on conservative and peritoneal dialysis treatment. *Hippokratia* **2012**, *16*, 356–359. [[PubMed](#)]
233. Mohommad, M.K.; Zhou, Z.; Cave, M.; Barve, A.; McClain, C.J. Zinc and liver disease. *Nutr. Clin. Pract.* **2012**, *27*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
234. Henderson, L.M.; Brewer, G.J.; Dressman, J.B.; Swidan, S.Z.; DuRoss, D.J.; Adair, C.H.; Barnett, J.L.; Berardi, R.R. Effect of intragastric pH on the absorption of oral zinc acetate and zinc oxide in young healthy volunteers. *J. Parenter. Enteral Nutr.* **1995**, *19*, 393–397. [[CrossRef](#)]
235. Pallauf, J.; Kramer, K.; Markwitan, A.; Ebel, D. The effect of a supplement of citric acid on the bioavailability of zinc from corn germ. *Z. Ernahr.* **1990**, *29*, 27–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
236. Sandstrom, B.; Almgren, A.; Kivisto, B.; Cederblad, A. Effect of protein level and protein source on zinc absorption in humans. *J. Nutr.* **1989**, *119*, 48–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
237. Ghishan, F.K.; Stroop, S.; Meneely, R. The effect of lactose on the intestinal absorption of calcium and zinc in the rat during maturation. *Pediatr. Res.* **1982**, *16*, 566–568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
238. Argiratos, V.; Samman, S. The effect of calcium carbonate and calcium citrate on the absorption of zinc in healthy female subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1994**, *48*, 198–204.
239. Hambidge, K.M.; Miller, L.V.; Westcott, J.E.; Sheng, X.; Krebs, N.F. Zinc bioavailability and homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *91*, 1478S–1483S. [[CrossRef](#)]

240. Krittaphol, W.; Bailey, K.B.; Pongcharoen, T.; Winichagoon, P.; Gibson, R.S. Low zinc, iron, and calcium intakes of Northeast Thai school children consuming glutinous rice-based diets are not exacerbated by high phytate. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2006**, *57*, 520–528. [\[CrossRef\]](#)
241. Sandström, B.; Davidsson, L.; Cederblad, Å.; Lönnerdal, B. Oral iron, dietary ligands and zinc absorption. *J. Nutr.* **1985**, *115*, 411–414. [\[CrossRef\]](#)
242. Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients. Dietary reference intakes for vitamin, A.; vitamin, K. In *Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*; National Academies Press (US): Washington, DC, USA, 2001.
243. Giroux, E.; Schechter, P.J.; Schoun, J. Diminished albumin binding of zinc in serum of pregnant women. *Clin. Sci. Mol. Med.* **1976**, *51*, 545–549. [\[CrossRef\]](#)
244. World Health Organization. Food and Agriculture Organization of the United Nations, International Atomic Energy Agency. In *Trace Elements in Human Nutrition and Health*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1996; 343p.
245. King, J.C.; Shames, D.M.; Woodhouse, L.R. Zinc homeostasis in humans. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1360S–1366S. [\[CrossRef\]](#)
246. Fukada, T.; Kambe, T. Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Met. Integr. Biomet. Sci.* **2011**, *3*, 662–674. [\[CrossRef\]](#)
247. Cousins, R.J.; McMahon, R.J. Integrative Aspects of Zinc Transporters. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1384S–1387S. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
248. Han, M.; Chang, J.; Kim, J. Loss of divalent metal transporter 1 function promotes brain copper accumulation and increases impulsivity. *J. Neurochem.* **2016**, *138*, 918–928. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
249. Turnlund, J.R.; King, J.C.; Keyes, W.R.; Gong, B.; Michel, M.C. A stable isotope study of zinc absorption in young men: Effects of phytate and  $\alpha$ -cellulose. *Am. J. Clin. Nutr.* **1984**, *40*, 1071–1077. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
250. Tapiero, H.; Tew, K.D. Trace elements in human physiology and pathology: Zinc and metallothioneins. *Biomed. Pharmacother.* **2003**, *57*, 399–411. [\[CrossRef\]](#)
251. Smith, K.T.; Failla, M.L.; Cousins, R.J. Identification of albumin as the plasma carrier for zinc absorption by perfused rat intestine. *Biochem. J.* **1979**, *184*, 627–633. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
252. Gachot, B.; Tauc, M.; Morat, L.; Poujeol, P. Zinc uptake by proximal cells isolated from rabbit kidney: Effects of cysteine and histidine. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **1991**, *419*, 583–587. [\[CrossRef\]](#)
253. Aiken, S.P.; Horn, N.M.; Saunders, N.R. Effects of amino acids on zinc transport in rat erythrocytes. *J. Physiol.* **1992**, *445*, 69–80. [\[CrossRef\]](#)
254. Coyle, P.; Philcox, J.C.; Carey, L.C.; Rofe, A.M. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cell Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 627–647. [\[CrossRef\]](#)
255. Drozd, A.; Wojewska, D.; Peris-Díaz, M.D.; Jakimowicz, P.; Krężel, A. Crosstalk of the structural and zinc buffering properties of mammalian metallothionein-2. *Metallomics* **2018**, *10*, 595–613. [\[CrossRef\]](#)
256. Lynes, M.A.; Zaffuto, K.; Unfricht, D.W.; Marusov, G.; Samson, J.S.; Yin, X. The physiological roles of extracellular metallothionein. *Exp. Biol. Med.* **2006**, *231*, 1548–1554. [\[CrossRef\]](#)
257. Ruttikay-Nedecky, B.; Nejdil, L.; Gumulec, J.; Zitka, O.; Masarik, M.; Eckschlager, T.; Stiborova, M.; Adam, V.; Kizek, R. The role of metallothionein in oxidative stress. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 6044–6066. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
258. Saad, A.A.; El-Sikaily, A.; Kassem, H. Metallothionein and glutathione content as biomarkers of metal pollution in mussels and local fishermen in Abu Qir Bay, Egypt. *J. Heal. Pollut.* **2016**, *6*, 50. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
259. Rice, J.M.; Zweifach, A.; Lynes, M.A. Metallothionein regulates intracellular zinc signaling during CD4+ T cell activation. *BMC Immunol.* **2016**, *17*, 13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
260. Sutherland, D.E.; Willans, M.J.; Stillman, M.J. Single domain metallothioneins: Supermetalation of human MT 1a. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3290–3299. [\[CrossRef\]](#)
261. Krężel, A.; Maret, W. The functions of metamorphic metallothioneins in zinc and copper metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1237. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
262. Nicolas, G.; Bennoun, M.; Porteu, A.; Mativet, S.; Beaumont, C.; Grandchamp, B.; Siritto, M.; Sawadogo, M.; Kahn, A.; Vaulont, S. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 4596–4601. [\[CrossRef\]](#)
263. Baltaci, A.K.; Yuce, K. Zinc transporter proteins. *Neurochem. Res.* **2018**, *43*, 517–530. [\[CrossRef\]](#)

264. Liuzzi, J.P.; Cousins, R.J. Mammalian zinc transporters. *Annu. Rev. Nutr.* **2004**, *24*, 151–172. [\[CrossRef\]](#)
265. Huang, L.; Tepasorndech, S. The SLC30 family of zinc transporters—A review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Mol. Aspects Med.* **2013**, *34*, 548–560. [\[CrossRef\]](#)
266. Grüngreiff, K.; Reinhold, D.; Wedemeyer, H. The role of zinc in liver cirrhosis. *Ann. Hepatol.* **2016**, *15*, 7–16. [\[CrossRef\]](#)
267. Faa, G.; Nurchi, V.M.; Ravarino, A.; Fanni, D.; Nemolato, S.; Gerosa, C.; Eyken, P.V.; Geboes, K. Zinc in gastrointestinal and liver disease. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 1257–1269. [\[CrossRef\]](#)
268. Paterson, P.G.; Mas, A.; Sarkar, B.; Zlotkin, S.H. The influence of zinc-binding ligands in fetal circulation on zinc clearance across the in situ perfused guinea pig placenta. *J. Nutr.* **1991**, *121*, 338–344. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
269. Ford, D. Intestinal and placental zinc transport pathways. *Proc. Nutr. Soc.* **2004**, *63*, 21–29. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
270. Carey, L.C.; Coyle, P.; Philcox, J.C.; Rofe, A.M. Ethanol decreases zinc transfer to the fetus in normal but not metallothionein-null mice. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **2000**, *24*, 1236–1240. [\[CrossRef\]](#)
271. Cousins, R.J.; Liuzzi, J.P.; Lichten, L.A. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 24085–24089. [\[CrossRef\]](#)
272. Lewicka, I.; Kocylowski, R.; Grzesiak, M.; Gaj, Z.; Oszukowski, P.; Suliburska, J. Selected trace elements concentrations in pregnancy and their possible role—Literature review. *Ginekol. Pol.* **2017**, *88*, 509–514. [\[CrossRef\]](#)
273. Mocchegiani, E.; Romeo, J.; Malavolta, M.; Costarelli, L.; Giacconi, R.; Diaz, L.E.; Marcos, A. Zinc: Dietary intake and impact of supplementation on immune function in elderly. *Age (Dordr)* **2013**, *35*, 839–860. [\[CrossRef\]](#)
274. Caulfield, L.E.; Zavaleta, N.; Shankar, A.H.; Meriardi, M. Potential contribution of maternal zinc supplementation during pregnancy to maternal and child survival. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *68*, 499S–508S. [\[CrossRef\]](#)
275. Gapys, B.; Raszaja-Specht, A.; Bielarczyk, H. Role of zinc in physiological and pathological processes of the body. *J. Lab. Diagn. Diagn. Lab.* **2014**, *50*, 45–52.
276. Prasad, A.S. Discovery of human zinc deficiency: Its impact on human health and disease. *Adv. Nutr.* **2013**, *4*, 176–190. [\[CrossRef\]](#)
277. Buamah, P.K.; Russell, M.; Bates, G.; Ward, A.M.; Skillen, A.W. Maternal zinc status: A determination of central nervous system malformation. *BJOG An. Int. J. Obstet. Gynaecol.* **1984**, *91*, 788–790. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
278. Lehti, K.K. Stillbirth rates and folic acid and zinc status in low-socioeconomic pregnant women of brazilian amazon. *Nutrition* **1993**, *9*, 156–158. [\[PubMed\]](#)
279. Scholl, T.O.; Hediger, M.L.; Schall, J.I.; Fischer, R.L.; Khoo, C.-S. Low zinc intake during pregnancy: Its association with preterm and very preterm delivery. *Am. J. Epidemiol.* **1993**, *137*, 1115–1124. [\[CrossRef\]](#)
280. Siva, S.; Rubin, D.T.; Gulotta, G.; Wroblewski, K.; Pekow, J. Zinc deficiency is associated with poor clinical outcomes in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2017**, *23*, 152. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
281. Osna, N.A.; Donohue, T.M., Jr.; Kharbanda, K.K. Alcoholic liver disease: Pathogenesis and current management. *Alcohol Res.* **2017**, *38*, 147.
282. Mahajan, S.K. Zinc in kidney disease. *J. Am. Coll Nutr.* **1989**, *8*, 296–304. [\[CrossRef\]](#)
283. Russell, R.M. Vitamin and mineral supplements in the management of liver disease. *Med. Clin. North. Am.* **1979**, *63*, 537–544. [\[CrossRef\]](#)
284. Donangelo, C.M.; King, J.C. Maternal zinc intakes and homeostatic adjustments during pregnancy and lactation. *Nutrients* **2012**, *4*, 782–798. [\[CrossRef\]](#)
285. Terrin, G.; Berni Canani, R.; Di Chiara, M.; Pietravallo, A.; Aleandri, V.; Conte, F.; Curtis, M.D. Zinc in early life: A key element in the fetus and preterm neonate. *Nutrients* **2015**, *7*, 10427–10446. [\[CrossRef\]](#)
286. Karimi, A.; Bagheri, S.; Nematy, M.; Saeidi, M. Zinc deficiency in pregnancy and fetal—neonatal outcomes and impact of the supplements on pregnancy outcomes. *Mashhad Univ Med. Sci.* **2012**, *3*, 77–83.
287. Sultana, M.; Jahan, N.; Sultana, N.; Quraishi, S.B.; Chowdhury, T.R. Preterm delivery: Role of zinc. *J. Bangladesh Soc. Physiol.* **2010**, *5*, 27–33. [\[CrossRef\]](#)

288. Appgar, J. Effect of zinc deficiency on maintenance of pregnancy in the rat. *J. Nutr.* **1970**, *100*, 470–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
289. McKenzie, J.M.; Fosmire, G.J.; Sandstead, H.H. Zinc deficiency during the latter third of pregnancy: Effects on fetal rat brain, liver, and placenta. *J. Nutr.* **1975**, *105*, 1466–1475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
290. Golub, M.S.; Keen, C.L.; Gershwin, M.E.; Hendrickx, A.G. Developmental zinc deficiency and behavior. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 2263S–2271S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
291. Nossier, S.A.; Naeim, N.E.; El-Sayed, N.A.; Abu Zeid, A.A. The effect of zinc supplementation on pregnancy outcomes: A double-blind, randomised controlled trial, Egypt. *Br. J. Nutr.* **2015**, *114*, 274–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
292. Prawirohartono, E.P.; Nyström, L.; Nurdianti, D.S.; Hakimi, M.; Lind, T. The impact of prenatal vitamin A and zinc supplementation on birth size and neonatal survival—A double-blind, randomized controlled trial in a rural area of Indonesia. *Int. J. Vitam Nutr. Res.* **2013**, *83*, 14–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
293. Wang, H.; Hu, Y.-F.; Hao, J.-H.; Chen, Y.-H.; Su, P.-Y.; Wang, Y.; Yu, Z.; Fu, L.; Xu, Y.Y.; Zhang, C.; et al. Maternal zinc deficiency during pregnancy elevates the risks of fetal growth restriction: A population-based birth cohort study. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11262. [[CrossRef](#)]
294. Merialdi, M.; Caulfield, L.E.; Zavaleta, N.; Figueroa, A.; Dominici, F.; DiPietro, J.A. Randomized controlled trial of prenatal zinc supplementation and the development of fetal heart rate. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2004**, *190*, 1106–1112. [[CrossRef](#)]
295. Merialdi, M.; Caulfield, L.E.; Zavaleta, N.; Figueroa, A.; DiPietro, J.A. Adding zinc to prenatal iron and folate tablets improves fetal neurobehavioral development. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1999**, *180*, 483–490. [[CrossRef](#)]
296. Merialdi, M.; Caulfield, L.E.; Zavaleta, N.; Figueroa, A.; Costigan, K.A.; Dominici, F.; DiPietro, J.A. Randomized controlled trial of prenatal zinc supplementation and fetal bone growth. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 826–830. [[CrossRef](#)]
297. Wilson, R.L.; Leemaqz, S.Y.; Goh, Z.; McAninch, D.; Jankovic-Karasoulos, T.; Leghi, G.E.; Phillips, J.A.; Colafella, K.M.; Tran, C.; O’Leary, S.; et al. Zinc is a critical regulator of placental morphogenesis and maternal hemodynamics during pregnancy in mice. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
298. Reynolds, L.P.; Caton, J.S.; Redmer, D.A.; Grazul-Bilska, A.T.; Vonnahme, K.A.; Borowicz, P.P.; Luther, J.S.; Wallace, J.M.; Wu, G.; Spencer, T.E. Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *J. Physiol.* **2006**, *572*, 51–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
299. Ota, E.; Mori, R.; Middleton, P.; Tobe-Gai, R.; Mahomed, K.; Miyazaki, C.; Bhutta, Z.A. Zinc supplementation for improving pregnancy and infant outcome. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2015**, *2015*, CD000230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
300. Karamali, M.; Heidarzadeh, Z.; Seifati, S.-M.; Samimi, M.; Tabassi, Z.; Talaei, N.; Bahardoost, H.; Asemi, Z. Zinc supplementation and the effects on pregnancy outcomes in gestational diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **2015**, *124*, 28–33. [[CrossRef](#)]
301. Zahiri sorouri, Z.; Sadeghi, H.; Pourmarzi, D. The effect of zinc supplementation on pregnancy outcome: A randomized controlled trial. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **2016**, *29*, 2194–2198. [[CrossRef](#)]
302. Chaffee, B.W.; King, J.C. Effect of zinc supplementation on pregnancy and infant outcomes: A systematic review. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* **2012**, *26*, 118–137. [[CrossRef](#)]
303. Mori, R.; Ota, E.; Middleton, P.; Tobe-Gai, R.; Mahomed, K.; Bhutta, Z.A. Zinc supplementation for improving pregnancy and infant outcome. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*; Mori, R., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2012.
304. King, J.C. Determinants of maternal zinc status during pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 1334S–1343S. [[CrossRef](#)]
305. Goodnight, W.; Newman, R. Society of maternal-fetal medicine. Optimal nutrition for improved twin pregnancy outcome. *Obstet. Gynecol.* **2009**, *114*, 1121–1134. [[CrossRef](#)]
306. Mahomed, K.; Bhutta, Z.A.; Middleton, P. Zinc supplementation for improving pregnancy and infant outcome. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*; Mahomed, K., Ed.; John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK, 2007.
307. Campbell, D.M.; MacGillivray, I.; Tuttle, S. Maternal nutrition in twin pregnancy. *Acta Genet. Med. Gemellol (Roma)* **1982**, *31*, 221–227. [[CrossRef](#)]
308. Fosmire, G.J. Zinc toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* **1990**, *51*, 225–227. [[CrossRef](#)]



309. Plum, L.M.; Rink, L.; Haase, H. The essential toxin: Impact of zinc on human health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2010**, *7*, 1342–1365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
310. *Environmental Health Criteria 221. Zinc*; FIRST Draft Prepared; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2001.
311. Scheers, N. Regulatory effects of Cu, Zn, and Ca on Fe absorption: The intricate play between nutrient transporters. *Nutrients* **2013**, *5*, 957–970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
312. Ha, J.-H.; Doguer, C.; Wang, X.; Flores, S.R.; Collins, J.F. High-iron consumption impairs growth and causes copper-deficiency anemia in weanling Sprague-Dawley rats. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0161033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
313. Chen, H.; Huang, G.; Su, T.; Gao, H.; Attieh, Z.K.; McKie, A.T.; Anderson, G.A.; Vulpe, C.D. Decreased hephaestin activity in the intestine of copper-deficient mice causes systemic iron deficiency. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 1236–1241. [[CrossRef](#)]
314. Reeves, P.G.; DeMars, L.C.S.; Johnson, W.T.; Lukaski, H.C. Dietary copper deficiency reduces iron absorption and duodenal enterocyte hephaestin protein in male and female Rats. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 92–98. [[CrossRef](#)]
315. Muckenthaler, M.U.; Rivella, S.; Hentze, M.W.; Galy, B. A red carpet for iron metabolism. *Cell* **2017**, *168*, 344–361. [[CrossRef](#)]
316. Toxqui, L.; Vaquero, M.P. Chronic iron deficiency as an emerging risk factor for osteoporosis: A hypothesis. *Nutrients* **2015**, *7*, 2324–2344. [[CrossRef](#)]
317. Ha, J.-H.; Doguer, C.; Collins, J.F. Consumption of a high-iron diet disrupts homeostatic regulation of intestinal copper absorption in adolescent mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2017**, *313*, G353. [[CrossRef](#)]
318. Collins, J.F.; Prohaska, J.R.; Knutson, M.D. Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutr. Rev.* **2010**, *68*, 133–147. [[CrossRef](#)]
319. Chan, W.Y.; Rennert, O.M. The role of copper in iron metabolism. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **1980**, *10*, 338–344.
320. Gulec, S.; Collins, J.F. Molecular mediators governing iron-copper interactions. *Annu. Rev. Nutr.* **2014**, *34*, 95–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
321. Harris, E.D. The iron-copper connection: The link to ceruloplasmin grows stronger. *Nutr. Rev.* **1995**, *53*, 170–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
322. Ha, J.-H.; Doguer, C.; Flores, S.R.L.; Wang, T.; Collins, J.F. Progressive increases in dietary iron are associated with the emergence of pathologic disturbances of copper homeostasis in growing rats. *J. Nutr.* **2018**, *148*, 373–378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
323. Klevay, L.M. IHD from copper deficiency: A unified theory. *Nutr. Res. Rev.* **2016**, *29*, 172–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
324. Kedzierska, K.; Bober, J.; Ciechanowski, K.; Golembiewska, E.; Kwiatkowska, E.; Nocen, I.; Dolegowska, B.; Dutkiewicz, G.; Chlubek, D. Copper modifies the activity of sodium-transporting systems in erythrocyte membrane in patients with essential hypertension. *Biol. Trace Elem. Res.* **2005**, *107*, 021–032. [[CrossRef](#)]
325. Broderius, M.; Mostad, E.; Wendroth, K.; Prohaska, J.R. Levels of plasma ceruloplasmin protein are markedly lower following dietary copper deficiency in rodents. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **2010**, *151*, 473. [[CrossRef](#)]
326. Fields, M.; Lewis, C.G. Hepatic iron overload may contribute to hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia in copper-deficient rats. *Metabolism* **1997**, *46*, 377–381. [[CrossRef](#)]
327. Zhao, M.; Matter, K.; Laissue, J.A.; Zimmermann, A. Copper/zinc and manganese superoxide dismutase immunoreactivity in hepatic iron overload diseases. *Histol Histopathol.* **1995**, *10*, 925–935.
328. Patel, B.N.; David, S. A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 20185–20190. [[CrossRef](#)]
329. Sebio, R.M.; Ferrarotti, N.; Lairion, F.; Magriñá, C.S.; Fuda, J.; Torti, H.; Boveris, A.; Repetto, M.G. Brain oxidative stress in rat with chronic iron or copper overload. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *199*, 110799. [[CrossRef](#)]
330. Lan, A.P.; Chen, J.; Chai, Z.F.; Hu, Y. The neurotoxicity of iron, copper and cobalt in Parkinson's disease through ROS-mediated mechanisms. *BioMetals* **2016**, *29*, 665–678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
331. Troost, F.J.; Brummer, R.-J.M.; Dainty, J.R.; Hoogewerf, J.A.; Bull, V.J.; Saris, W.H. Iron supplements inhibit zinc but not copper absorption in vivo in ileostomy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *78*, 1018–1023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

332. Christian, P.; Khatri, S.K.; LeClerq, S.C.; Ram Shrestha, S.; Kimbrough-Pradhan, E.; West, K.P. Iron and zinc interactions among pregnant Nepali women. *Nutr. Res.* **2001**, *21*, 141–148. [[CrossRef](#)]
333. Saaka, M. Combined iron and zinc supplementation improves haematologic status of pregnant women in Upper West Region of Ghana. *Ghana Med. J.* **2012**, *46*, 225–233.
334. Saaka, M.; Oosthuizen, J.; Beatty, S. Effect of prenatal zinc supplementation on birthweight. *J. Health Popul. Nutr.* **2009**, *27*, 619–631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
335. Harvey, L.J.; Dainty, J.R.; Hollands, W.J.; Bull, V.J.; Hoogewerff, J.A.; Foxall, R.J.; McAnena, L.; Strain, J.J.; Fairweather-Tait, S. Effect of high-dose iron supplements on fractional zinc absorption and status in pregnant women. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 131–136. [[CrossRef](#)]
336. Peters, A.J.; Keen, C.L.; Lönnerdal, B.; Hurley, L.S. Zinc-vitamin a interaction in pregnant and fetal rats: Supplemental vitamin a does not prevent zinc-deficiency-induced teratogenesis. *J. Nutr.* **1986**, *116*, 1765–1771. [[CrossRef](#)]
337. O'Brien, K.O.; Zavaleta, N.; Caulfield, L.E.; Wen, J.; Abrams, S.A. Prenatal iron supplements impair zinc absorption in pregnant Peruvian women. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2251–2255. [[CrossRef](#)]
338. Whittaker, P. Iron and zinc interactions in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *68*, 442S–446S. [[CrossRef](#)]
339. Bodiga, S.; Krishnapillai, M.N. Concurrent repletion of iron and zinc reduces intestinal oxidative damage in iron- and zinc-deficient rats. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 5707–5717. [[CrossRef](#)]
340. Garrick, M.D.; Singleton, S.T.; Vargas, F.; Kuo, H.C.; Zhao, L.; Knöpfel, M.; Davidson, T.; Costa, M.; Paradkar, P.; Roth, J.A.; et al. DMT-1, Which metals does it transport? *Biol. Res.* **2006**, *39*, 79–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
341. Kordas, K.; Stoltzfus, R.J. New evidence of iron and zinc interplay at the enterocyte and neural tissues. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 1295–1298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
342. Bowers, K.; Srail, S.K.S. The trafficking of metal ion transporters of the Zrt- and Irt-like protein family. *Traffic* **2018**, *19*, 813–822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
343. Solomons, N.W.; Jacob, R.A. Studies on the bioavailability of zinc in humans: Effects of heme and nonheme iron on the absorption of zinc. *Am. J. Clin. Nutr.* **1981**, *34*, 475–482. [[CrossRef](#)]
344. Solomons, N.W.; Pineda, O.; Viteri, F.; Sandstead, H.H. Studies on the bioavailability of zinc in humans: Mechanism of the intestinal interaction of nonheme iron and zinc. *J. Nutr.* **1983**, *113*, 337–349. [[CrossRef](#)]
345. Khoushabi, F.; Shadan, M.R.; Miri, A.; Sharifi-Rad, J. Determination of maternal serum zinc, iron, calcium and magnesium during pregnancy in pregnant women and umbilical cord blood and their association with outcome of pregnancy. *Mater. Sociomed* **2016**, *28*, 104–107. [[CrossRef](#)]
346. Campbell-Brown, M.; Ward, R.J.; Haines, A.P.; North, W.R.; Abraham, R.; McFadyen, I.R.; Turnlund, J.R.; King, J.C. Zinc and copper in Asian pregnancies—is there evidence for a nutritional deficiency? *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **1985**, *92*, 875–885. [[CrossRef](#)]
347. Breskin, M.W.; Worthington-Roberts, B.S.; Knopp, R.H.; Brown, Z.; Plovie, B.; Mottet, N.K.; Mills, J.L. First trimester serum zinc concentrations in human pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* **1983**, *38*, 943–953. [[CrossRef](#)]
348. Ziaei, S.; Janghorban, R.; Shariatdoust, S.; Faghihzadeh, S. The effects of iron supplementation on serum copper and zinc levels in pregnant women with high-normal hemoglobin. *Int. J. Gynecol. Obstet.* **2008**, *100*, 133–135. [[CrossRef](#)]
349. Andersen, H.S.; Gambling, L.; Holtrop, G.; McArdle, H.J. Effect of dietary copper deficiency on iron metabolism in the pregnant rat. *Br. J. Nutr.* **2007**, *97*, 239–246. [[CrossRef](#)]
350. Gambling, L.; Danzeisen, R.; Fosset, C.; Andersen, H.S.; Dunford, S.; Srail, S.K.S.; McArdle, H.J. Iron and copper interactions in development and the effect on pregnancy outcome. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 1554S–1556S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
351. Shidfar, F.; Ameri, A.; Keshavarz, S.; Djalali, M. Effect of iron supplements on serum copper status in pregnant women in Islamshahr. *Iran. J. Endocrinol. Metab.* **2003**, *5*, 299–305.
352. Donangelo, C.M.; Woodhouse, L.R.; King, S.M.; Viteri, F.E.; King, J.C. Supplemental zinc lowers measures of iron status in young women with low iron reserves. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 1860–1864. [[CrossRef](#)]
353. de Brito, N.J.N.; Rocha, É.D.; de Araújo Silva, A.; Costa, J.B.S.; França, M.C.; das Graças Almeida, M.; Brandão-Neto, J. Oral zinc supplementation decreases the serum iron concentration in healthy schoolchildren: A pilot study. *Nutrients* **2014**, *6*, 3460–3473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

354. Antunes, M.F.R.; Leite, L.D.; Rocha, É.D.M.; Brito, N.J.N.; França, M.C.; Silva, C.A.B.; Almeida, M.G.; de Rezende, A.A.; Marchini, J.S.; Brandão-Neto, J. Competitive interaction of zinc and iron after venous and oral zinc administration in eutrophic children. *Trace Elem. Electrolytes*. **2010**, *27*, 185–191. [\[CrossRef\]](#)
355. Wieringa, F.T.; Berger, J.; Dijkhuizen, M.A.; Hidayat, A.; Ninh, N.X.; Utomo, B.; Wasantwisut, E.; Winichagoon, P. Combined iron and zinc supplementation in infants improved iron and zinc status, but interactions reduced efficacy in a multicountry trial in southeast Asia. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 466–471.
356. Holmes, J.B.; Kroeun, H.; Houghton, L.A.; Gibson, R.S.; Harding, K.B.; De-Regil, L.M.; Kraemer, K.; Barr, S.I.; Karakochuk, C.D. Including 60 mg elemental iron in a multiple micronutrient supplement blunts the increase in serum zinc after 12 weeks of daily supplementation in predominantly anemic, nonpregnant Cambodian women of reproductive age. *J. Nutr.* **2019**, *149*, 1503–1510. [\[CrossRef\]](#)
357. Nguyen, P.; Grajeda, R.; Melgar, P.; Marcinkevage, J.; Flores, R.; Ramakrishnan, U.; Martorell, R. Effect of zinc on efficacy of iron supplementation in improving iron and zinc status in women. *J. Nutr. Metab.* **2012**, *2012*, 216179. [\[CrossRef\]](#)
358. Davidsson, L.; Almgren, A.; Sandström, B.; Hurrell, R.F. Zinc absorption in adult humans: The effect of iron fortification. *Br. J. Nutr.* **1995**, *74*, 417–425. [\[CrossRef\]](#)
359. Shaw, C.F.; Savas, M.M.; Petering, D.H. Ligand substitution and sulfhydryl reactivity of metallothionein. *Methods Enzymol.* **1991**, *205*, 401–414.
360. Merza, H.; Sood, N.; Sood, R. Idiopathic hyperzincemia with associated copper deficiency anemia: A diagnostic dilemma. *Clin. Case Rep.* **2015**, *3*, 819–822. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
361. Sutton, L.; Vusirikala, M.; Chen, W. Hematogone hyperplasia in copper deficiency. *Am. J. Clin. Pathol.* **2009**, *132*, 191–199. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
362. Prasad, R.; Hawthorne, B.; Durai, D.; McDowell, I. Zinc in denture adhesive: A rare cause of copper deficiency in a patient on home parenteral nutrition. *BMJ Case Rep.* **2015**, *2015*, bcr2015211390. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
363. Deur, C.J.; Stone, M.J.; Frenkel, E.P. Trace metals in hematopoiesis. *Am. J. Hematol.* **1981**, *11*, 309–331. [\[CrossRef\]](#)
364. Percival, S.S. Neutropenia caused by copper deficiency: Possible mechanisms of action. *Nutr. Rev.* **1995**, *53*, 59–66. [\[CrossRef\]](#)
365. Paik, H.Y.; Joung, H.; Lee, J.Y.; Lee, H.K.; King, J.C.; Keen, C.L. Serum extracellular superoxide dismutase activity as an indicator of zinc status in humans. *Biol. Trace Elem. Res.* **1999**, *69*, 45–57. [\[CrossRef\]](#)
366. Davis, C.D.; Milne, D.B.; Nielsen, F.H. Changes in dietary zinc and copper affect zinc-status indicators of postmenopausal women, notably, extracellular superoxide dismutase and amyloid precursor proteins. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 781–788. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
367. Aggarwal, A.; Bhatt, M. Advances in treatment of Wilson disease. *Tremor Other Hyperkinet. Mov.* **2018**, *8*, 525. [\[CrossRef\]](#)
368. Kathawala, M.; Hirschfield, G.M. Insights into the management of Wilson’s disease. *Therap. Adv. Gastroenterol.* **2017**, *10*, 889–905. [\[CrossRef\]](#)
369. Wiggelinkhuizen, M.; Tilanus, M.E.C.; Bollen, C.W.; Houwen, R.H.J. Systematic review: Clinical efficacy of chelator agents and zinc in the initial treatment of Wilson disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2009**, *29*, 947–958. [\[CrossRef\]](#)
370. Walshe, J.M.; Munro, N.A.R. Zinc-induced deterioration in Wilson’s disease aborted by treatment with penicillamine, dimercaprol, and a novel zero copper diet. *Arch. Neurol.* **1995**, *52*, 10–11. [\[CrossRef\]](#)
371. Malik, A.; Khawaja, A.; Sheikh, L. Wilson’s disease in pregnancy: Case series and review of literature. *BMC Res. Notes*. **2013**, *6*, 421. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
372. Wu, X.; Liu, Z.; Guo, J.; Wan, C.; Zhang, T.; Cui, H.; Yang, F.; Gao, X. Influence of dietary zinc and copper on apparent mineral retention and serum biochemical indicators in young male mink (*Mustela vison*). *Biol. Trace Elem. Res.* **2015**, *165*, 59–66. [\[CrossRef\]](#)
373. Eckert, G.E.; Greene, L.W.; Carstens, G.E.; Ramsey, W.S. Copper status of ewes fed increasing amounts of copper from copper sulfate or copper proteinate. *J. Anim. Sci.* **1999**, *77*, 244–249. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
374. Du, Z.; Hemken, R.W.; Jackson, J.A.; Trammell, D.S. Utilization of copper in copper proteinate, copper lysine, and cupric sulfate using the rat as an experimental model. *J. Anim. Sci.* **1996**, *74*, 1657–1667. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

375. Zetzsche, A.; Schunter, N.; Zentek, J.; Pieper, R. Accumulation of copper in the kidney of pigs fed high dietary zinc is due to metallothionein expression with minor effects on genes involved in copper metabolism. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2016**, *35*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
376. Baecker, T.; Mangus, K.; Pfaender, S.; Chhailqbra, R.; Boeckers, T.M.; Grabrucker, A.M. Loss of COMMD1 and copper overload disrupt zinc homeostasis and influence an autism-associated pathway at glutamatergic synapses. *BioMetals* **2014**, *27*, 715–730. [[CrossRef](#)]
377. Reinstein, N.H.; Lönnerdal, B.; Keen, C.L.; Hurley, L.S. Zinc-copper interactions in the pregnant rat: Fetal outcome and maternal and fetal zinc, copper and iron. *J. Nutr.* **1984**, *114*, 1266–1279. [[CrossRef](#)]
378. Kinnamon, K.E. Some independent and combined effects of copper, molybdenum, and zinc on the placental transfer of zinc-65 in the Rat. *J. Nutr.* **1963**, *81*, 312–320. [[CrossRef](#)]
379. Garg, H.K.; Singhal, K.C.; Arshad, Z. Effect of oral zinc supplementation on copper and haemoglobin levels in pregnant women. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* **1994**, *38*, 272–276.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

# Załącznik nr 2. Calcium, Potassium, Sodium, and Magnesium Concentrations in the Placenta, Umbilical Cord, and Fetal Membrane from Women with Multiple Pregnancies



Article

## Calcium, Potassium, Sodium, and Magnesium Concentrations in the Placenta, Umbilical Cord, and Fetal Membrane from Women with Multiple Pregnancies

Konrad Grzeszczak <sup>1</sup>, Patrycja Kapczuk <sup>2</sup>, Patrycja Kupnicka <sup>2</sup>, Elżbieta Cecerska-Heryć <sup>3</sup>, Sebastian Kwiatkowski <sup>4</sup>, Dariusz Chlubek <sup>2</sup> and Danuta Kosik-Bogacka <sup>5,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Biology and Medical Parasitology, Pomeranian Medical University in Szczecin, Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin, Poland
  - <sup>2</sup> Department of Biochemistry and Medical Chemistry, Pomeranian Medical University in Szczecin, Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin, Poland
  - <sup>3</sup> Department of Laboratory Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin, Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin, Poland
  - <sup>4</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Pomeranian Medical University in Szczecin, Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin, Poland
  - <sup>5</sup> Independent Laboratory of Pharmaceutical Botany, Pomeranian Medical University in Szczecin, Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin, Poland
- \* Correspondence: danuta.kosik.bogacka@pum.edu.pl; Tel.: +48-91-466-1672



**Citation:** Grzeszczak, K.; Kapczuk, P.; Kunicka, P.; Cecerska-Heryć, E.; Kwiatkowski, S.; Chlubek, D.; Kosik-Bogacka, D. Calcium, Potassium, Sodium, and Magnesium Concentrations in the Placenta, Umbilical Cord, and Fetal Membrane from Women with Multiple Pregnancies. *Life* **2023**, *13*, 153. <https://doi.org/10.3390/life13010153>

Academic Editors: Małgorzata Lewandowska, Stefan Sajdak and Monika Englert-Golon

Received: 12 October 2022  
Revised: 22 December 2022  
Accepted: 30 December 2022  
Published: 5 January 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Calcium (Ca), potassium (K), sodium (Na), and magnesium (Mg) are the elements responsible for the fundamental metabolic and biochemical processes in the cells of the body. The demand for these elements increases significantly during pregnancy, where an adequate supply protects women from the hypertension common in pre-eclampsia and preterm labor. This study aimed to evaluate the association between macro-elements (Ca, Mg, Na, and K) in the placenta, fetal membrane, and umbilical cord and the morphometric parameters of newborns from multiple pregnancies. The study involved 57 pregnant European women with healthy uncomplicated twin pregnancies ( $n = 52$ ) and triple pregnancies ( $n = 5$ ); 40 pairs of dichorionic diamniotic twins, 11 pairs of monochorionic diamniotic twins, 1 pair of monochorionic monoamniotic twins, 3 trichorionic triamniotic triplets, and 2 dichorionic triamniotic triplets. Placentas ( $n = 107$ ), umbilical cords ( $n = 114$ ), and fetal membranes ( $n = 112$ ) were collected immediately following delivery, and then weighed and measured. The levels of Ca, K, Na, and Mg were determined using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-OES) in a Thermo Scientific ICAP 7400 Duo (Waltham, MA, USA). The respective mean concentrations of Ca, K, Na, and Mg ( $\text{mg}/\text{kg}^{-1}$  dry mass) were: 2466, 8873, 9323, and 436 in the placenta; 957, 6173, 26,757, and 326 in the umbilical cord, and 1252, 7460, 13,562, and 370 in the fetal membrane. In the studied materials from northwestern Poland, we found strong positive correlations between Ca and Mg concentrations in both the umbilical cord ( $r = 0.81$ ,  $p = 0.00$ ) and the fetal membrane ( $r = 0.73$ ,  $p = 0.00$ ); between K and Mg concentrations in the umbilical cord ( $r = 0.73$ ,  $p = 0.00$ ); between Ca and K concentrations in the fetal membrane ( $r = 0.73$ ,  $p = 0.00$ ), and we found moderately positive correlations between placental Ca concentration and placental weight ( $\rho = 0.42$ ,  $p = 0.00$ ) and between umbilical cord Mg concentrations and the length of the pregnancy ( $\rho = 0.42$ ,  $p = 0.00$ ). Negative correlations were found between Na and Ca concentrations in the fetal membrane ( $r = -0.40$ ,  $p = 0.00$ ) and Na concentrations in the fetal membrane and Mg concentrations in the placenta ( $r = -0.16$ ,  $p = 0.02$ ). Negative correlations were confirmed between the length of pregnancy and head circumference ( $\rho = -0.42$ ;  $p = 0.00$ ), infant weight ( $\rho = -0.42$ ;  $p = 0.00$ ), infant length ( $\rho = -0.49$ ;  $p = 0.00$ ), shoulder width ( $\rho = -0.49$ ;  $p = 0.00$ ); and between the infant weight and head circumference ( $\rho = -0.62$ ;  $p = 0.00$ ), weight before delivery ( $\rho = -0.36$ ;  $p = 0.00$ ), infant length ( $\rho = -0.45$ ;  $p = 0.00$ ), shoulder width ( $\rho = -0.63$ ;  $p = 0.00$ ), and weight gain during pregnancy ( $\rho = -0.31$ ;  $p = 0.01$ ). We found statistically significant correlations between cigarette smoking before pregnancy and the women's weight before delivery ( $\rho = 0.32$ ,  $p = 0.00$ ), and a negative correlation between the women's ages and infant head circumference ( $\rho = -0.20$ ,  $p = 0.02$ ). This is probably the first study to evaluate Ca, Na, K, and Mg concentrations in the afterbirth tissues of multiple

pregnancies. It adds to the knowledge of elemental concentrations in multiple pregnancies and their possible effects on fetal morphometric parameters.

**Keywords:** calcium; potassium; sodium; magnesium; pregnancy complications; preeclampsia; pregnancy

## 1. Introduction

Essential and non-essential elements ensure normal human development, reproduction, and health throughout life [1]. Among them, calcium (Ca), potassium (K), sodium (Na), and magnesium (Mg) are responsible for metabolic and biochemical processes in the cells of the body and the maintenance of proper pH, osmotic pressure, nerve conduction, muscle contraction, and heart rhythm [2,3].

During pregnancy, the mineral metabolism of the mother must adapt to the increased demand for elements created by the fetus and placenta. As a key micronutrient, Ca plays different roles during fetus growth and development [4]. According to current recommendations, the average requirements (AR) for Ca for pregnant women aged between 18 and 24 and those above 25 are, respectively, 860 and 750 mg/day, and the population reference intake (PRI) is 1000 and 950 mg/day, respectively. For pregnant and lactating women, the Tolerable Upper Intake Level (UL) should be 2500 mg of Ca from both the diet and supplementation (EFSA) [5]. During pregnancy, there is a significant increase in intestinal  $\text{Ca}^{2+}$  absorption, which is mediated by the active metabolite of vitamin  $\text{D}_3$  1,25-dihydroxycholecalciferol ( $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ , calcitriol), parathyroid hormone (PTH), and calcitonin [6,7]. In the second trimester, Ca absorption is 57% higher, increasing to 72% higher (250–350 mg) in the third trimester—the period of intense fetal bone growth [4]. The fetal Ca concentration increases exponentially during pregnancy [8]. Calcium is delivered to the fetus via three routes: transport to the placental syncytiotrophoblast from the maternal blood via the epithelial calcium channel; Ca transfer to the fetal-facing basal membrane by Ca-binding proteins, including calbindin-D9K; and via the cell membrane calcium ATPase, which transports Ca across the fetal-facing basal membrane [9]. Jankowska et al. [10] have shown that the majority of women in Poland do not satisfy the need for the most necessary dietary elements, such as Ca. Polish recommendations in 2011 for Ca stated 1200 mg per day; however, these are recommendations for women with a single pregnancy [11]. Inadequate Ca intake during pregnancy leads to decreased bone density in both the mother and child. It can also lead to pregnancy-induced hypertension, a risk factor for preterm delivery, low birth weight, and prenatal and maternal deaths [12].

Potassium (K) is an essential element for a normal pregnancy, with a recommended adequate intake (AI) for pregnant women above 18 of 3500 mg/day (EFSA) [5]. It is mainly absorbed in the small intestine and distal colon with ATPase [13]. There is no proven effect of maternal hypokalemia on fetal parameters in humans, due to the efficient compensation of K deficiency by the placenta. However, animal model studies have shown that K deficiency impairs fetal growth [14]. Hyperkalemia, on the other hand, can cause the development of gestational diabetes mellitus (GDM) and severe pre-eclampsia [15]. Gestational diabetes mellitus impairs normal fetal growth, and pre-eclampsia limits fetal growth and can result in preterm labor [16].

Sodium is the most important electrolyte in extracellular fluids [17]. An intake of 2 g/day is considered a safe and adequate level, consistent with the reference value set for adults (EFSA) [5]. It is absorbed from the intestines along with glucose and amino acids by  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange and then is transported to enterocytes [18]. To the fetus, Na is transferred via the syncytiotrophoblast  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase of the placenta [19]. Maternal hyponatremia has been found to affect the occurrence of low birth weight, spontaneous abortion, or impaired fetal growth [20].

Magnesium (Mg), a Ca antagonist [21], is the second most important intracellular cation after potassium [22]. The recommended intake of Mg for pregnant women over 18 is 300 mg/day, while the maximum UL should not exceed 250 mg/day (EFSA) [5]. The Polish recommendations from 2011 are 200–1000 Mg per day, but only concern women with a single pregnancy [11]. Magnesium is absorbed in the jejunum and ileum via passive transport related to the electrochemical gradient and diffusion via the transient receptor potential melastatin type 6 (TRPM6) ion channel [23]. High Mg concentrations in the placenta may reduce Ca transport to the fetus [24]. Magnesium influences potassium channels and can regulate its placental transport. Despite the use of supplementation, many women have inadequate Mg levels [10]. Magnesium deficiency during pregnancy can result in hypertension, pre-eclampsia, painful muscle contraction, and migraines [25]. In addition, Mg deficiency increases the risk of premature birth, gestational diabetes, and fetal growth disorders [26]. Increased Mg intake during pregnancy is associated with increased birth weight [27]. Magnesium supplementation is associated with lower incidences of both preterm births and low birth weight [28]. However, hypermagnesemia has toxic effects on pregnancy, leading to diminished deep tendon reflexes, apnoea, and electromechanical dissociation [29].

The number of multiple pregnancies has increased significantly in recent years. This is related to the use of assisted reproductive techniques—induced ovulation and in vitro fertilization. The average duration of a single pregnancy is 39 weeks, while multiple pregnancies last, respectively, for twins 36 weeks, for triplets 32 weeks, and for quadruplets 30 weeks [30,31]. The variation in multiple birth rates across Europe in 2010 was classified based on four groups of countries defined by multiple birth rates. The lowest group (less than 15 twin births per 1000 women) included Central and Eastern European countries (Romania, Latvia, Lithuania, Poland, and Slovakia) and some Scandinavian countries (Iceland and Sweden). The second group (15.0 to 16.9 per 1000) included Estonia, Portugal, Finland, the United Kingdom, Italy, Norway, and Ireland, and the third group (17.0 to 18.9 per 1000) included Austria, France, the Netherlands, Luxembourg, Switzerland, Slovenia, and Germany. The highest group ( $\geq 19$  per 1000) comprised Belgium, Malta, Spain, Denmark, the Czech Republic, and Cyprus [32].

Multiple pregnancies are always higher-risk pregnancies. Women with multiple pregnancies have a higher rate of pregnancy complications, fetal malformations, and perinatal morbidity and mortality than women with single pregnancies [30]. Multiple pregnancies can result in preterm labor, miscarriage, hypotrophy of both or one fetus, intrauterine fetal demise, or fetal atrophy syndrome [33]. Preeclampsia is at least 2–3 times more common and is generally more severe in twin pregnancies than in singleton pregnancies [34].

As micronutrient deficiencies can lead to serious long-term health consequences for both mother and baby, it is very important to identify women at risk of these complications as early as possible. Many studies address the role of Ca during pregnancy, but there are fewer data on Ca supplementation in patients with multiple pregnancies. Also, there are few available studies on Mg, Na, and K, and the results are inconclusive. That is why this study aimed at evaluating the concentration of elements that play an important role during pregnancy (Ca, Mg, Na, and K) in the placenta, fetal membrane, and umbilical cord collected from women with multiple pregnancies from northwest Poland, as well as evaluating associations between the studied elements and the morphometric parameters of newborns from multiple pregnancies. The analysis of elemental concentrations in the afterbirth can contribute to a better understanding of pregnancy disorders and the possibility of using such data as a means of predicting the course of a pregnancy.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Ethics Statement

This study was conducted from 2015 to 2021. The research was carried out with the approval of the Biometric Committee of the Pomeranian Medical University in Szczecin (KB-0012/76/14 from 13 October 2014). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Patients gave written consent to participate and were informed that they could withdraw their consent at any stage of the study.

### 2.2. Study Population

The study involved pregnant women from north-west Poland ( $n = 57$ ), comprising healthy un-complicated twin pregnancies ( $n = 52$ ) and triple pregnancies ( $n = 5$ ), and newborns ( $n = 114$ ), delivered at the Obstetrics and Gynecology Clinic of the independent Public Clinical Hospital No. 2 of the Pomeranian Medical University of Szczecin, Szczecin, The West Pomeranian Voivodeship, Poland. The West Pomeranian area is moderate in terms of environmental conditions. This region is characterized by developed agriculture and the food production industry. Other important industries mainly include wood processing, chemicals, metallurgy, shipbuilding, and electricity production.

All of these births were resolved by cesarean section. The inclusion criteria for the study were multiple pregnancies and newborns without perinatal illness, and the group was randomly collected. All the women were without risk factors that could affect neonatal parameters. Infants with anemia and chromosomal abnormalities and/or birth defects were also excluded from the study.

The study comprised 40 pairs of dichorionic diamniotic twins, 11 pairs of mono-chorionic diamniotic twins, 1 pair of mono-chorionic monoamniotic twins, 3 trichorionic triamniotic triplets, and 2 dichorionic triamniotic triplets. The characteristics of the mothers and their newborns are shown in Tables 1 and 2. Birth weight, length, and head circumference were registered at the time of birth using standard anthropometric procedures. The length of pregnancy was calculated based on the first day of the last menstrual period according to Naegel's rule and determined by the crown-rump length (CRL) measured using ultrasonography in the first trimester. The anthropometric and biological characteristics of the mothers (age, weight, morphological blood analysis) and the infants (shoulder width, weight, length, head circumference, length of pregnancy, and sex) and the weight were taken from medical records.

**Table 1.** Maternal and neonatal characteristics (AM, arithmetic mean; SD, standard deviation; Med, median;  $n$ , number of participants).

Parameter	AM $\pm$ SD	Med	Range
maternal characteristics:			
age (years)	31.0 $\pm$ 4.8	31	21–41
weight (kg) before pregnancy	66.7 $\pm$ 16.4	63	45–134
weight (kg) before delivery	84.4 $\pm$ 18.3	82	58–140
weight gain during pregnancy	18.7 $\pm$ 8.6	16.0	8–38
neonatal characteristics:			
length of pregnancy (weeks)	34.6 $\pm$ 2.5	35	26–38
birth weight (g)	2247 $\pm$ 497	2330	690–3350
length (cm)	47.8 $\pm$ 4.3	48	29–55
head circumference (cm)	31.9 $\pm$ 2.2	32	24–37
shoulder width (cm)	29.1 $\pm$ 3.0	29	18–36



Table 1. Cont.

Parameter		AM $\pm$ SD	Med	Range
placenta weight (g)	dichorionic diamniotic twins pregnancy ( $n = 40$ )	1102 $\pm$ 293	1200	510–1300
	monochorionic diamniotic twins pregnancy ( $n = 11$ )	1160 $\pm$ 230	1200	800–1400
	monochorionic monoamniotic twins pregnancy ( $n = 1$ )	420	420	420
	dichorionic triamniotic triplets pregnancy ( $n = 3$ )	700 $\pm$ 57.7	700	650–750
	trichorionic triamniotic triplets pregnancy ( $n = 2$ )	571 $\pm$ 212	642	280–780

Table 2. Smoothed centiles for birth weight and birth length of the boys ( $n = 54$ ) and girls ( $n = 65$ ) (Fenton Growth Chart).

Centiles for Length (cm)	Boys	Girls	Total	Centiles for Birth Weight (kg)	Boys	Girls	Total
>3 or <97	40	50	90	>3 or <97	51	59	110
<3 or >97	14	15	29	<3 or >97	3	6	9

Information about socio-demographic characteristics, cigarette smoking before pregnancy, the use of dietary supplements, and obstetrical and gynecological histories, including parity (number of deliveries) was gathered through general questionnaires. Most women ( $n = 40$ ) took the supplement Prenatal DUO<sup>®</sup>, consumed once daily, as assessed during medical interviews at periodic meetings. Information on maternal diet during pregnancy was not available. In our study, 73.7% of the women never smoked and 26.3% reported they had stopped smoking either before pregnancy or during the first trimester.

Placentas were collected immediately after delivery, and then weighed and measured. A representative 10–15 cm-long sample was excised from the middle of the radius (distance between the insertion of the umbilical cord and the periphery) without fetal and maternal membranes. Fetal membranes and umbilical cords were taken in their entirety for the study.

### 2.3. Determination of Metals in Afterbirths

The placentas ( $n = 107$ ), umbilical cords ( $n = 114$ ), and fetal membranes ( $n = 112$ ) were collected immediately after delivery, and then weighed and measured, and stored at  $-30$  °C until the study group had been gathered. Before the analysis, the samples were restored to room temperature, dried for three weeks at 55 °C, and later at 105 °C for seven days to a constant weight. The prepared material was ground into a powder in a porcelain mortar and 0.2 g was added to 5 mL of 65% HNO<sub>3</sub> Suprapur (Merck, Kenilworth, NJ, USA) and 1 mL of non-stabilized 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution Suprapur (Merck, Kenilworth, NJ, USA) in clean polypropylene tubes. The reagents were added to 333 vials, and each sample was allowed a 30 min pre-reaction time in a clean room. Once the addition of all the reagents was complete, the 333 samples were placed in Teflon vessels and heated in a microwave digestion system (MARS 5, CEM). The samples were then transferred to acid-washed 15 mL polypropylene tubes. The Ca, K, Na, and Mg levels were determined using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-OES) using an ICAP 7400 Duo, Thermo Scientific (Waltham, MA, USA). Analysis was performed in axial mode. Final 25-fold and 5-fold dilutions were performed before ICP-OES measurement. Blank samples were prepared by adding concentrated nitric acid to tubes without a sample and diluting them in the same manner as the test samples. Multi-element calibration standards (ICP multi-element standard solution IV, Merck, Germany) were prepared with different concentrations of inorganic elements in the same manner as the blanks and samples. Deionized water Direct

Q UV (Millipore, Burlington, MA, USA) approximately 18.0 MΩ was used to prepare all solutions. The reliability of the analytical procedure was controlled by the determination of elements in reference material with a known concentration: Bovine Muscle NIST-SRM 8414 reference material (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) and the recovery of internal standard (yttrium; Y) (Table 3). The concentration values of the reference materials given by the manufacturers and our determinations are shown in Table 3. The recovery of Y was 89–105%. The  $r^2$  values for all standard curves ranged between 0.998 and 1.000. To eliminate possible interference, the emission lines were selected empirically in pilot measurements. The wavelengths (nm) were Ca = 315.887, K = 766.490, Na = 589.592, and Mg = 280.270. The Ca, K, Na, and Mg concentrations in the placenta, the umbilical cord, and the fetal membrane are presented in  $\text{mg}/\text{kg}^{-1}$  dry mass (dw).

**Table 3.** Analysis of reference material Bovine Muscle NIST-SRM 8414.

Element	Reference Values (mg/L)	Percentage of Reference Values
Ca	145 ± 20	95.9
K	15,170 ± 370	100.9
Na	2100 ± 80	103.5
Mg	960 ± 95	102.7

#### 2.4. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using Statistica v13.0 (Stat Soft). Shapiro–Wilk analysis was performed to test the normal distribution of the data. Spearman’s ( $\rho$ ,  $\rho$ ) correlation coefficient was used for nonparametric data, and Pearson correlation coefficients for parametric data were used to determine the statistical significance of differences between groups. The significance level was  $p < 0.05$ .

### 3. Results

The mean water constituents in the placenta, fetal membrane, and umbilical cord were approximately 83%, 85%, and 88%, respectively. The concentrations of Ca, K, Na, and Mg in the placenta are presented in Table 4. In the pairs of newborns, the total concentrations of Ca, K, Na, and Mg in the tissues can be arranged (according to the AM) in the following descending order:

- for Ca, K, Mg: placenta > fetal membrane > umbilical cord;
- for Na: umbilical cord > fetal membrane > placenta.

The correlations between Ca, K, Na, and Mg concentrations in the tissues are shown in Table 5. In the studied tissues from northwestern Poland, we found strong positive correlations between:

- Ca and Mg concentrations in the umbilical cord ( $r = 0.81$ ,  $p = 0.00$ ) and fetal membrane ( $r = 0.73$ ,  $p = 0.00$ );
- K and Mg concentrations in the placenta ( $r = 0.73$ ,  $p = 0.00$ );
- Ca and K concentrations in the fetal membrane ( $r = 0.73$ ,  $p = 0.00$ ).

Negative correlations were found between Na and Ca concentrations in the fetal membrane ( $r = -0.40$ ,  $p = 0.00$ ) and between Na concentrations in the fetal membrane and Mg concentrations in the placenta ( $r = -0.16$ ,  $p = 0.02$ ).

**Table 4.** Concentrations of sodium (Na), magnesium (Mg), calcium (Ca), and potassium (K) in the placenta, umbilical cord, and fetal membrane (AM, arithmetic mean; Med., median; Max, maximum; Min, minimum; SD, standard deviation) (in mg/kg<sup>-1</sup> dry mass, dw).

	Placenta			Umbilical Cord			Fetal Membrane		
	AM ± SD	Med.	Range	AM ± SD	Med.	Range	AM ± SD	Med.	Range
Twins (n = 52)									
Ca	2498 ± 2020	1659	531–8802	937 ± 223	913	539–1571	1206 ± 1088	764	403–7448
K	8895 ± 2038	8991	3928–14,466	6147 ± 1530	6015	3195–11,094	7440 ± 1999	7427	2959–12,713
Na	9272 ± 1915	8899	4493–16,519	25,850 ± 6949	25,267	10,773–48,850	13,385 ± 3484	13,207	7913–21,879
Mg	436 ± 110	421	229–808	322 ± 62.0	321	215–560	373 ± 112	362	180–839
Triplets (n = 5)									
Ca	2269 ± 1794	2004	823–7753	1140 ± 219	1192	774–1463	1544 ± 955	1313	486–3367
K	8736 ± 1871	9317	5969–12,329	6410 ± 1440	5875	4874–9900	7589 ± 2111	7685	3511–11,177
Na	9647 ± 1528	7267	7267–12,520	35,085 ± 8155	31,735	26,606–48,539	14,711 ± 4259	13,893	9835–22,296
Mg	438 ± 79	473	326–530	369 ± 48.3	378	288–430	354 ± 61.2	349	278–450
Total (n = 57)									
Ca	2466 ± 1983	1748	530–8802	957 ± 230	927	539–1571	1 252 ± 1073	791	403–7448
K	8873 ± 2009	8992	3928–14,466	6173 ± 1517	5985	3195–11,094	7460 ± 2005	7655	2959–12,713
Na	9323 ± 1865	9007	4493–16,519	26,757 ± 7558	26,616	10,773–48,850	13,562 ± 3602	13,231	7913–22,296
Mg	436 ± 106	423	229–808	326 ± 62.2	324	215–560	370 ± 107	362	180–839

**Table 5.** Pearson’s coefficients for correlations between Ca, K, Na, and Mg concentrations in the placenta (P), umbilical cord (UC), and fetal membrane (FM).

	Ca <sub>UC</sub> (p)	Ca <sub>FM</sub> (p)	K <sub>P</sub> (p)	K <sub>UC</sub> (p)	K <sub>FM</sub> (p)	Mg <sub>P</sub> (p)	Mg <sub>UC</sub> (p)	Mg <sub>FM</sub> (p)
Ca <sub>FM</sub>		x	0.47 (0.00)		0.73 (0.00)	0.27 (0.01)		0.73 (0.00)
Ca <sub>P</sub>			0.20 (0.00)			0.78 (0.00)		
K <sub>UC</sub>			0.67 (0.00)	x	0.32 (0.00)	0.33 (0.00)	0.39 (0.00)	0.45 (0.00)
K <sub>FM</sub>		0.73 (0.00)		0.32 (0.00)	x	0.62 (0.00)		0.45 (0.00)
Na <sub>P</sub>			0.36 (0.00)	0.34 (0.00)	0.39 (0.00)	0.50 (0.00)	0.21 (0.04)	0.48 (0.00)
Na <sub>UC</sub>	0.34 (0.00)			0.22 (0.02)			0.52 (0.00)	
Na <sub>FM</sub>		−0.40 (0.00)				−0.16 (0.02)		
Mg <sub>P</sub>		0.27 (0.01)	0.73 (0.00)	0.33 (0.00)	0.62 (0.00)	x		
Mg <sub>UC</sub>	0.81 (0.00)		0.27 (0.00)	0.39 (0.00)			x	0.23 (0.02)
Mg <sub>FM</sub>		0.73 (0.00)	0.55 (0.00)	0.45 (0.00)	0.45 (0.00)		0.23 (0.02)	x

Negative correlations were confirmed between the length of pregnancy and: (i) head circumference ( $\rho = -0.42$ ;  $p = 0.00$ ), (ii) infant weight ( $\rho = -0.42$ ;  $p = 0.00$ ), (iii) infant length ( $\rho = -0.49$ ;  $p = 0.00$ ), (iv) shoulder width ( $\rho = -0.49$ ;  $p = 0.00$ ), and between the infant weight and (i) head circumference ( $\rho = -0.62$ ;  $p = 0.00$ ), (ii) weight before delivery ( $\rho = -0.36$ ;  $p = 0.00$ ), (iii) infant length ( $\rho = -0.45$ ;  $p = 0.00$ ), (iv) shoulder width ( $\rho = -0.63$ ;

$p = 0.00$ ), and (v) weight gain during pregnancy ( $\rho = -0.31; p = 0.01$ ). We found statistically significant correlations between cigarette smoking before pregnancy and the women’s weight before delivery ( $\rho = 0.32, p = 0.00$ ), and a negative correlation between the women’s ages and infant head circumference ( $\rho = -0.20, p = 0.02$ ) (Table 6).

In the study, we determined correlations between Ca, K, Na, and Mg concentration in the placenta, umbilical cord, and fetal membrane and the parameters of the infants, length of pregnancy, and cigarette smoking before pregnancy (Table 7). We found a moderately positive correlation between:

- placental Ca concentration and placental weight ( $\rho = 0.42, p = 0.00$ );
- umbilical cord Mg concentrations and the length of the pregnancy ( $\rho = 0.42, p = 0.00$ ).

**Table 6.** Spearman’s coefficients for correlations between anthropometric parameters of the infants, intake of supplements, and selected characteristics of the mothers.

	Head Circumference (p)	Infant Weight (p)	Infant Length (p)	Shoulder Width (p)	Centiles for Length (p)	Length of Pregnancy (p)	Placenta Weight (p)	Weight before Delivery (p)	Weight Gain during Pregnancy (p)	Weight before Pregnancy (p)
<b>Neonatal characteristics</b>										
centiles for birth weight	-0.34 (0.00)	0.21 (0.02)	-0.34 (0.00)	-0.35 (0.00)	0.28 (0.00)			-0.19 (0.04)	-0.25 (0.04)	
head circumference	x	-0.62 (0.00)	0.57 (0.00)	0.76 (0.00)		-0.42 (0.00)	0.18 (0.05)	0.21 (0.02)	0.31 (0.01)	
infant weight	-0.62 (0.00)	x	-0.45 (0.00)	-0.63 (0.00)		-0.42 (0.00)		-0.36 (0.00)	-0.31 (0.01)	
infant length	0.57 (0.00)	-0.45 (0.00)	x	0.66 (0.00)		-0.49 (0.00)		0.20 (0.03)	0.28 (0.02)	
shoulder width	0.76 (0.00)	-0.63 (0.00)	0.66 (0.00)	x		-0.49 (0.00)	0.23 (0.01)	0.25 (0.01)		
<b>Maternal characteristics</b>										
weight before delivery	0.21 (0.02)	-0.36 (0.00)	0.20 (0.03)	0.25 (0.01)			0.22 (0.02)	x	0.64 (0.00)	0.81 (0.00)
cigarette smoking before pregnancy								0.32 (0.00)		
age of the women	-0.20 (0.02)									

**Table 7.** Spearman’s coefficients for correlations between the Ca, K, Na, and Mg concentrations in the placenta (P), umbilical cord (UC), and fetal membrane (FM) and anthropometric parameters of the infants, length of pregnancy, placenta weight, and cigarette smoking.

	Ca <sub>P</sub> (p)	Ca <sub>UC</sub> (p)	Ca <sub>FM</sub> (p)	K <sub>P</sub> (p)	K <sub>UC</sub> (p)	K <sub>FM</sub> (p)	Na <sub>P</sub> (p)	Na <sub>UC</sub> (p)	Mg <sub>FM</sub> (p)	Mg <sub>UC</sub> (p)
length of pregnancy		0.34 (0.00)		0.34 (0.00)	0.24 (0.01)	0.22 (0.02)		0.25 (0.01)	0.20 (0.04)	0.42 (0.00)
infant weight					0.20 (0.03)			0.20 (0.03)		0.26 (0.01)
shoulder width			-0.23 (0.01)	-0.21 (0.03)	-0.26 (0.01)	-0.24 (0.01)	-0.23 (0.01)	-0.29 (0.01)	-0.25 (0.01)	-0.25 (0.01)
infant length				-0.24 (0.01)	-0.20 (0.04)		-0.24 (0.01)	-0.22 (0.02)	-0.21 (0.03)	-0.20 (0.04)
centiles for length							0.24 (0.01)			0.22 (0.02)
placenta weight		0.42 (0.00)								
head circumference								-0.22 (0.02)		
cigarette smoking before pregnancy				-0.24 (0.01)				-0.24 (0.01)		

#### 4. Discussion

Intracellular ions (K and Mg) and extracellular ions (Na and Ca) affect pregnancy and child development. The determination of the concentrations of essential elements in the afterbirth allows a retrospective assessment of their effect on pregnancy and has been the subject of research. Most often, the concentration of these elements is determined in maternal blood and umbilical cord blood; there are limited data on the concentration of these elements in the afterbirth tissues.

In the study presented here, a negative correlation was found between head circumference and the mother's age (Table 6). A similar correlation was found by Di Gravio et al. [35], who showed reduced brain growth in the newborns of younger mothers. Despite the notable differences in fetal head size between younger and older mothers, the authors concluded that this did not affect the children's health.

##### 4.1. The Ca, K, Na, and Mg Concentrations in Afterbirth Tissues

###### 4.1.1. Calcium

In the presented study, the average Ca concentration in the placenta from multiple pregnancies was  $1748 \text{ mg/kg}^{-1} \text{ dw}$ . In singleton pregnancies, lower Ca levels were found in women around 30 years of age from Poland ( $1004 \text{ mg/kg}^{-1} \text{ dw}$ ) [24] and Jamaica ( $846 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) [36]. This may indicate that placental Ca concentrations are higher in multiple pregnancies than in singleton pregnancies, confirming the findings by de Angelis et al. [37], where the concentrations of Ca in the placenta of women with single and multiple pregnancies were 92 and  $206 \text{ mg/kg}^{-1} \text{ dw}$ , respectively. This could suggest that women with multiple pregnancies are more likely to use dietary supplements and are more concerned with a proper diet. However, Kot et al. [38] found a much higher concentration of Ca in the placenta in women with a singleton pregnancy from the same area ( $3474 \text{ mg/kg}^{-1} \text{ dw}$ ). The concentration of Ca in the placenta may also be influenced by the woman's age. De Moraes et al. [39] noted that in the placenta of teenage women with singleton pregnancies, Ca concentrations were lower than in adult women, med. at 512 and  $2035 \text{ mg/kg}^{-1}$ , respectively.

In the study presented here, Ca concentrations in the fetal membrane and umbilical cords were 791 and  $927 \text{ mg/kg}^{-1} \text{ dw}$ , respectively. In contrast, Kot et al. [38] found much higher Ca levels in the fetal membrane ( $1665 \text{ mg/kg}^{-1} \text{ dw}$ ) and lower Ca levels in the umbilical cord ( $852 \text{ mg/kg}^{-1} \text{ dw}$ ) in singleton pregnancies.

The present study showed an indirect effect of Ca level on weight, shoulder width, head circumference, and baby length (Table 7). In a similar study conducted on women with singleton pregnancies, Grant et al. [36] found a positive correlation between placental Ca levels and newborn weight. Doi et al. [40] showed that Ca concentration in the umbilical cord blood is related to birth length and fetal growth. Khoushabi et al. [41] showed that maternal serum Ca concentration relates to the newborn's birth weight. The studies by Elizabeth et al. [42] and Bogden et al. [43] confirmed that low birth weight is associated with low Ca concentration in umbilical cord blood. Although hypocalcemia is not a significant problem during pregnancy, the need to develop regimens for managing such patients has been noted [44]. Insufficient Ca concentrations, most often caused by primary hyperparathyroidism (PHPT), can lead to intrauterine growth restriction, the death of the offspring, and severe neonatal hypocalcemia [45]. On the other hand, Liebgotta and Srebroła [46] showed in a laboratory study on rats that continuous access to a Ca-rich diet resulted in reduced fetal weight and delayed skeletal calcification in the fetus.

The present study also found a positive correlation between the umbilical cord Ca concentration and the duration of the pregnancy. Thus, it can be speculated that Ca deficiency may shorten pregnancy time, but no other studies confirm these observations. Malas and Shurideh [47] showed that low Ca levels during pregnancy can result in postpartum hypertension. Ephraim et al. [48] showed that low Ca levels significantly affect the occurrence of pregnancy-induced hypertension and pre-eclampsia. The experimental study by DeSouse et al. [49], on trophoblastic debris taken from the placentas of women with

pre-eclampsia, confirmed the effect of Ca in preventing endothelial cell activation induced by trophoblastic debris from pre-eclamptic placentae. In contrast, hypercalcemia, a rare condition and most often occurring during primary hyperparathyroidism (PHPT) [50,51], can also significantly shorten a pregnancy, termination in the course of pre-eclampsia, or neonatal death due to hypoparathyroidism [45,52].

#### 4.1.2. Potassium

In the study presented here, average K concentrations in placentas collected from multiple pregnancies were  $8873 \text{ mg/kg}^{-1}$ , and those in the fetal membrane and umbilical cord were  $6173$  and  $7460 \text{ mg/kg}^{-1}$ , respectively. Similar results for K concentrations in the placenta were shown by Mazurek et al. [24], ranging from  $1138$  to  $10,093 \text{ mg/kg}^{-1}$ .

The concentrations of K in the placenta, the umbilical cord, and the fetal membrane significantly correlated with the physical parameters of the infants (Table 7). However, there are not many scientific studies on the direct effects of K on the fetus. In a similar study involving women with singleton pregnancies, Grant et al. [36] found no correlation between placental K concentration and infant weight. In contrast, the authors found a negative correlation between K concentration and neonatal birth weight, which may have been related to low arterial blood pressure. Bell et al. [53] showed that an unregulated supply of K (especially from the environment) could affect an infant's birth weight and, thus, its morphometric parameters. Similar results were obtained by Mazurek et al. [24], who proved that higher concentrations of K in the mother's placenta resulted in a low birth weight. In the present study, K concentration was found to significantly affect the pregnancy's duration, an effect that has been linked to the association of K with severe pre-eclampsia [54]. Low K concentrations, especially in the first half of a pregnancy, are significantly associated with a lower risk of severe pre-eclampsia [55].

#### 4.1.3. Sodium

In the present study, average Na concentrations in the placenta in multiple pregnancies were  $9323 \text{ mg/kg}^{-1} \text{ dw}$ , and in the fetal membrane and umbilical cord,  $26,757$  and  $26,616 \text{ mg/kg}^{-1} \text{ dw}$ , respectively.

Sodium affects fetal growth, increases cell mass, and stimulates cell proliferation and protein synthesis. The direct effect of Na deficiency on child development is confirmed by studies in pregnant women [56] and laboratory animals [57,58]. In the study presented here, we found that the Na concentration in the umbilical cord significantly influenced fetal weight, shoulder width, body length, and the head circumference of the baby (Table 7). Similarly, the placental Na concentration greatly affected the weight, body length, shoulder width, and length of the baby (Table 7). Likewise, Lagiou et al. [59] found that the pregnant woman's optimal Na intake significantly affected the baby's morphometric parameters, especially the baby's birth weight. In contrast, Grant et al. [36], studying women with singleton pregnancies, found no relationship between placental Na concentration and the newborn's weight.

Na concentration in the umbilical cord showed a positive linear correlation with the duration of the pregnancy. A low level of Na (hyponatremia) is the most common electrolyte abnormality that may pose a risk to pregnancy [60] and contribute to pre-eclampsia, which can result in a shorter pregnancy [61–63]. Hsu et al. [64] showed that hyponatremia in pre-eclampsia can lead to maternal respiratory and circulatory arrest. This is also confirmed by Powel et al. [65], based on a case report of a twin pregnancy and data from the literature showing that pregnant women should be screened for water–electrolyte balance as part of a risk assessment for pre-eclampsia, as elevated Na levels can also be a risk factor for this condition [66].

#### 4.1.4. Magnesium

In the study presented here, the average concentration of Mg in the placenta taken from women with multiple pregnancies was  $436 \text{ mg/kg}^{-1}$  dw. In singleton pregnancies, a much lower concentration of Mg was found by Mazurek et al. [24] in placentas, ranging from 66 to  $377 \text{ mg/kg}^{-1}$ . In comparison, in a study conducted in the US, de Angelis et al. [37] found that the concentration of Mg in placentas from multiple pregnancies ( $56 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) was higher than for singleton pregnancies ( $23 \text{ mg/kg}^{-1}$ ). In the study by Osada et al. [67], conducted on a group of singleton pregnancies with an appropriate gestational age (AGA), the Mg concentration was  $18 \text{ }\mu\text{mol/l}$ , while in a group of singleton pregnancies with intrauterine growth retardation (IGUR), the Mg concentration was  $21 \text{ }\mu\text{mol/l}$ . In our study, Mg concentrations in the fetal membrane and umbilical cords were  $326$  and  $324 \text{ mg/kg}^{-1}$ , respectively.

In the present study, we found that Mg concentrations in the fetal membrane and umbilical cord significantly correlated with the baby's weight, length, shoulder width, and body length centile (Table 7). Hypomagnesemia in pregnancy is quite common, especially in developing countries [68], which significantly increases the chances of low birth weight [69] and intrauterine fetal growth retardation (IUGR) [70–72]. Laboratory studies in mice have confirmed the adverse effects of Mg deficiency on placental and fetal development [73,74]. Kazemi-Darabadi and Akbari [75] confirmed in a rat model a difference between an Mg-supplemented animal group and a control group in morphometric parameters, such as weight, length, and the shoulder width of the fetuses. Enaruna et al. [68] studied pregnancies in a university hospital in Benin and showed that hypomagnesemia significantly contributes to pre-eclampsia and preterm labor. In the present study, the results indirectly showed that Mg substantially influenced the length of a pregnancy. Preterm labor is associated with uterine muscle cell hyper-reactivity [26,76] or endothelial dysfunction [77]. Kovo et al. [78] confirmed the significant anti-inflammatory effect of Mg in an experimental study on placentas, and selected cotyledons were cannulated. Additionally, they showed that Mg administered in the form of magnesium sulfate ( $\text{MgSO}_4$ ) blocked an increase in the levels of proteins involved in the inflammatory cascade, including the nuclear factor K light chain enhancer of the activated B cells (NF- $\kappa$ B), interleukin (IL) 6, adrenocorticotrophic hormone (ACTH), and nitric oxide synthase (NOS).

#### 4.2. The Influence of Tobacco Smoke

The mother's lifestyle during pregnancy has a significant impact on her own and her child's health [79]. Smoking cigarettes during pregnancy has been found to shorten the gestation period and cause lower birth weight and body length [80–82]. The most serious consequences of smoking during pregnancy are intrauterine fetal death and an increased risk of sudden infant death syndrome (SIDS) in the first months of life [83]. In the present study, none of the women smoked cigarettes during pregnancy, but 15 women had smoked cigarettes before pregnancy. The present study found an association between smoking cigarettes before pregnancy and women's higher weight just before delivery. Hulman et al. [84] and Adegboye et al. [85] noted that quitting smoking during pregnancy results in significant weight gain for pregnant women. Unfortunately, none of these studies apply to women who ceased smoking before pregnancy. Smoking women had higher Ca, P, K, Mg, Fe, Cu, and Cd concentrations in the placental tissue than non-smokers [24].

#### 4.3. Limitations of This Study

The limitations of this study are associated with its design, which was intended to present general trends and provide hypotheses for further research in this field. It evaluated Ca, K, Na, and Mg concentrations in the placenta, umbilical cord, and fetal membrane, to obtain information on the influence of the elements on the morphometric parameters of the baby and the duration of the pregnancy, as well as mutual correlations showing their antagonistic/non-antagonistic effects. However, it lacks the determination

of the parameters of the renin-angiotensin-aldosterone system responsible for controlling potassium–sodium balance.

This paper did not analyze the parameters responsible for Ca absorption, such as vitamin D3 1,25-dihydroxycholecalciferol (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, calcitriol), parathyroid hormone (PTH), and calcitonin. In addition, the data on dietary supplements and smoking were collected through a voluntary questionnaire. Diet was not strictly controlled. Further limitations include the lack of assessment of the uterine position, vascularization, and function by Doppler and biochemical tests, i.e., PLGF.

Twin data provide a unique opportunity to analyze data related to pregnancies. However, using appropriate statistical methods is fundamental for exploiting such potential. However, in this study, we mainly wanted to show the correlation between the concentration of calcium, potassium, sodium, and magnesium in the placenta, umbilical cord, and fetal membrane of women with multiple pregnancies. The main limitations of using selected “simple” statistical methodology are that it requires a binary exposure, adaptations for binary outcomes and sub-optimal inference, confounders cannot be included, and it is unsuitable for repeated measurements. Moreover, samples were treated as independent.

The primary intention was to illustrate approaches for further research on micronutrients in multiple pregnancies, which are just beginning to be studied due to the annual increase in the percentage of multifetal pregnancies compared to singleton pregnancies [86]. Our research may indicate the way for further studies, but it should be taken into consideration that all those elements are under homeostatic control in body fluids and are influenced by underlying (patho)physiological factors of the organism as well as personal nutritional and lifestyle habits

## 5. Conclusions

The conclusions of this study should be interpreted conservatively/carefully, due to the many limitations of the study and the simple statistics. However, it adds to the knowledge of elemental concentrations in multiple pregnancies and their possible effects on fetal morphometric parameters.

**Author Contributions:** K.G.: literature search and review, manuscript draft preparation, writing manuscript, conceptualization, formal analysis, investigation, resources and preparation of manuscript revision. P.K. (Patrycja Kapczuk): methodology. P.K. (Patrycja Kupnicka): validation methodology. E.C.-H.: formal analysis. S.K.: participation in writing the manuscript. D.C.: participation in writing the manuscript. D.K.-B.: writing the manuscript, preparation of manuscript revision, supervision, and final acceptance of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The Pomeranian Medical University in Szczecin provided financial support (WFB-431-02/S/12/2021).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Biometric Committee of the Pomeranian Medical University in Szczecin (KB-0012/76/14 from 10/13/2014).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. Written informed consent has been obtained from the patient(s) to publish this paper.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** This study was supported by the statutory budget of the Department of Biology and Medical Parasitology, Pomeranian Medical University.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.



## References

- World Health Organization; International Atomic Energy Agency & Food and Agriculture Organization of the United Nations. Trace Elements in Human Nutrition and Health; World Health Organization. 1996. Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/37931> (accessed on 29 December 2022).
- Baj, J.; Flieger, W.; Teresiński, G.; Buszewicz, G.; Sitarz, R.; Forma, A.; Karakula, K.; Maciejewski, R. Magnesium, Calcium, Potassium, Sodium, Phosphorus, Selenium, Zinc, and Chromium Levels in Alcohol Use Disorder: A Review. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 1901. [CrossRef] [PubMed]
- Jabłoński Edward, S.M. Mineral Elements in Diet of Pregnant and Breast-Feeding Women. Part II. Micro Minerals: Iron, Zinc, Copper, Selenium, Iodine, Fluorine, Manganese, Molybdenum, Chromium. *Przegl. Lek.* **2007**, *64*, 170–174. [PubMed]
- Kumar, A.; Kaur, S. Calcium: A Nutrient in Pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. India* **2017**, *67*, 313. [CrossRef] [PubMed]
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of calcium. *EFSA J.* **2012**, *10*, 2814. [CrossRef]
- Christakos, S. Mechanism of Action of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on Intestinal Calcium Absorption. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2012**, *13*, 39–44. [CrossRef]
- Areco, V.A.; Kohan, R.; Talamoni, G.; Tolosa De Talamoni, N.G.; Peralta López, M.E. Intestinal Ca<sup>2+</sup> Absorption Revisited: A Molecular and Clinical Approach. *World J. Gastroenterol.* **2020**, *26*, 3344. [CrossRef]
- Brunette, M.G. Calcium Transport through the Placenta. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1988**, *66*, 1261–1269. [CrossRef]
- Belkacemi, L.; Bédard, I.; Simoneau, L.; Lafond, J. Calcium Channels, Transporters and Exchangers in Placenta: A Review. *Cell Calcium*. **2005**, *37*, 1–8. [CrossRef]
- Jankowska, A.; Grzesiak, M.; Krekora, M.; Dominowska, J.; Jerzyńska, J.; Kałużny, P.; Wesołowska, E.; Szadkowska-Stańczyk, I.; Trafalska, E.; Kaleta, D.; et al. Determinants of the Essential Elements and Vitamins Intake and Status during Pregnancy: A Descriptive Study in Polish Mother and Child Cohort. *Nutrients* **2021**, *13*, 949. [CrossRef]
- Poreba, R.; Drews, K.; Karowicz-Bilińska, A.; Oszukowski, P.; Pawelczyk, L.; Radowski, S.; Spaczyński, M.; Szczapa, J. Expert review of Polish Gynecological Society regarding micronutrient supplementation in pregnancy. *Ginekol. Pol.* **2011**, *82*, 550–553.
- Hofmeyr, G.J.; Lawrie, T.A.; Atallah, A.N.; Duley, L.; Torloni, M.R. Calcium Supplementation during Pregnancy for Preventing Hypertensive Disorders and Related Problems. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, *10*, CD001059. [CrossRef] [PubMed]
- McKeating, D.R.; Fisher, J.J.; Perkins, A.V. Elemental Metabolomics and Pregnancy Outcomes. *Nutrients* **2019**, *11*, 73. [CrossRef] [PubMed]
- Mohammed, T.; Štulc, J.; Sibley, C.P.; Boyd, R.D.H. Effect of Maternal Hypokalaemia on Unidirectional Maternofetal and Net Potassium Fluxes across the Placenta of the Anaesthetized Rat. *Placenta* **1992**, *13*, 231–240. [CrossRef] [PubMed]
- Wolak, T.; Shoham-Vardi, I.; Sergienko, R.; Sheiner, E. High Potassium Level during Pregnancy Is Associated with Future Cardiovascular Morbidity. *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.* **2016**, *29*, 1021–1024. [CrossRef] [PubMed]
- Mol, B.W.J.; Roberts, C.T.; Thangaratnam, S.; Magee, L.A.; De Groot, C.J.M.; Hofmeyr, G.J. Pre-Eclampsia. *Lancet* **2016**, *387*, 999–1011. [CrossRef]
- Terry, J. The Major Electrolytes: Sodium, Potassium, and Chloride. *J. Infus. Nurs.* **1993**, *17*, 240–247.
- Gurney, M.A.; Laubitz, D.; Ghishan, F.K.; Kiela, P.R. Pathophysiology of Intestinal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange. *Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *3*, 27. [CrossRef]
- Sibley, C.P.; Glazier, J.D.; Greenwood, S.L.; Lacey, H.; Mynett, K.; Speake, P.; Jansson, T.; Johansson, M.; Powell, T.L. Regulation of Placental Transfer: The Na(+)/H(+) Exchanger—A Review. *Placenta* **2002**, *23*, S39–S46. [CrossRef]
- Sakuyama, H.; Katoh, M.; Wakabayashi, H.; Zulli, A.; Kruzliak, P.; Uehara, Y. Influence of Gestational Salt Restriction in Fetal Growth and in Development of Diseases in Adulthood. *J. Biomed. Sci.* **2016**, *23*, 12. [CrossRef]
- Touyz, R.M. Magnesium Supplementation as an Adjuvant to Synthetic Calcium Channel Antagonists in the Treatment of Hypertension. *Med. Hypotheses* **1991**, *36*, 140–141. [CrossRef]
- de Baaij, J.H.F.; Hoenderop, J.G.J.; Bindels, R.J.M. Magnesium in Man: Implications for Health and Disease. *Physiol. Rev.* **2015**, *95*, 1–46. [CrossRef] [PubMed]
- Al Alawi, A.M.; Al Badi, A.; Al Huraizi, A.; Falhammar, H. Magnesium: The Recent Research and Developments. *Adv. Food Nutr. Res.* **2021**, *96*, 193–218. [CrossRef] [PubMed]
- Mazurek, D.; Łoźna, K.; Bronkowska, M. The Concentration of Selected Elements in the Placenta According to Selected Sociodemographic Factors and Their Effect on Birth Mass and Birth Length of Newborns. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2020**, *58*, 126425. [CrossRef] [PubMed]
- Altura, B.M.; Altura, B.T.; Carella, A. Magnesium Deficiency-Induced Spasms of Umbilical Vessels: Relation to Preeclampsia, Hypertension, Growth Retardation. *Science* **1983**, *221*, 376–378. [CrossRef]
- Dalton, L.M.; Ni Fhloinn, D.M.; Gaydadzhieva, G.T.; Mazurkiewicz, O.M.; Leeson, H.; Wright, C.P. Magnesium in Pregnancy. *Nutr. Rev.* **2016**, *74*, 549–557. [CrossRef]
- Zarean, E.; Tarjan, A. Effect of Magnesium Supplement on Pregnancy Outcomes: A Randomized Control Trial. *Adv. Biomed. Res.* **2017**, *6*, 109. [CrossRef]
- Makrides, M.; Crowther, C.A. Magnesium Supplementation in Pregnancy. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2000**, *2*, CD000937. [CrossRef]

29. Sherwin, C.M.T.; Balch, A.; Campbell, S.C.; Fredrickson, J.; Clark, E.A.S.; Varner, M.; Stockmann, C.; Korgenski, E.K.; Bonkowsky, J.L.; Spigarelli, M.G. Maternal Magnesium Sulphate Exposure Predicts Neonatal Magnesium Blood Concentrations. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *114*, 318–322. [CrossRef]
30. Dudenhausen, J.W.; Maier, R.F. Perinatal Problems in Multiple Births. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2010**, *107*, 663. [CrossRef]
31. Latar, I.L.M.; Razali, N. The Desire for Multiple Pregnancy among Patients with Infertility and Their Partners. *Int. J. Reprod. Med.* **2014**, *2014*, 301452. [CrossRef]
32. Heino, A.; Gissler, M.; Hindori-Mohangoo, A.D.; Blondel, B.; Klungsoyr, K.; Verdenik, I.; Mierzejewska, E.; Velebil, P.; Ólafsdóttir, H.S.; Macfarlane, A.; et al. Variations in Multiple Birth Rates and Impact on Perinatal Outcomes in Europe. *PLoS ONE* **2016**, *11*, 149252. [CrossRef] [PubMed]
33. Siddiqui, F.; McEwan, A. Twins. *Obstet. Gynaecol. Reprod. Med.* **2007**, *17*, 289–295. [CrossRef]
34. Chantanahom, N.; Phuongi, V. Clinical Risk Factors for Preeclampsia in Twin Pregnancies. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0249555. [CrossRef]
35. Di Gravio, C.; Lawande, A.; Potdar, R.D.; Sahariah, S.A.; Gandhi, M.; Brown, N.; Chopra, H.; Sane, H.; Kehoe, S.H.; Marley-Zagar, E.; et al. The Association of Maternal Age With Fetal Growth and Newborn Measures: The Mumbai Maternal Nutrition Project (MMNP). *Reprod. Sci.* **2019**, *26*, 918. [CrossRef] [PubMed]
36. Grant, C.; Lalor, G.; Fletcher, H.; Potter, T.; Vutchkov, M.; Reid, M. Elements in Human Placentae in Jamaica. *West Indian Med. J.* **2010**, *59*, 479–485.
37. de Angelis, P.; Miller, R.K.; Darrah, T.H.; Katzman, P.J.; Pressman, E.K.; Kent, T.R.; O'Brien, K.O. Elemental Content of the Placenta: A Comparison between Two High-Risk Obstetrical Populations, Adult Women Carrying Multiples and Adolescents Carrying Singletons. *Environ. Res.* **2017**, *158*, 553–565. [CrossRef]
38. Kot, K.; Kosik-Bogacka, D.; Lanocha-Arendarczyk, N.; Malinowski, W.; Szymański, S.; Mularczyk, M.; Tomska, N.; Rotter, I.I. Interactions between 14 Elements in the Human Placenta, Fetal Membrane and Umbilical Cord. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 1615. [CrossRef]
39. De Moraes, M.L.; De Faria Barbosa, R.; Santo, R.E.; Da Silva Santos, F.; De Jesus, E.F.O.; Sardinha, F.L.D.C.; Tavares Do Carmo, M.D.G. Maternal-Fetal Distribution of Calcium, Iron, Copper, and Zinc in Pregnant Teenagers and Adults. *Biol. Trace Elem. Res.* **2011**, *139*, 126–136. [CrossRef]
40. Doi, M.; Sultana Rekha, R.; Ahmed, S.; Okada, M.; Kumar Roy, A.; El Arifeen, S.; Ekström, E.C.; Raqib, R.; Wagatsuma, Y. Association between Calcium in Cord Blood and Newborn Size in Bangladesh. *Br. J. Nutr.* **2011**, *106*, 1398–1407. [CrossRef]
41. Khoushabi, F.; Shadan, M.R.; Miri, A.; Sharifi-Rad, J. Determination of Maternal Serum Zinc, Iron, Calcium and Magnesium During Pregnancy in Pregnant Women and Umbilical Cord Blood and Their Association with Outcome of Pregnancy. *Mater. Sociomed.* **2016**, *28*, 104. [CrossRef]
42. Elizabeth, K.; Krishnann, V.; Vijayakumar, T. Umbilical Cord Blood Nutrients in Low Birth Weight Babies in Relation to Birth Weight & Gestational Age. *Indian J. Med. Res.* **2008**, *128*, 128–134. [PubMed]
43. Bogden, J.D.; Thind, I.S.; Louria, D.B.; Caterini, H. Maternal and Cord Blood Metal Concentrations and Low Birth Weight—A Case-Control Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **1978**, *31*, 1181–1187. [CrossRef] [PubMed]
44. Vuralli, D. Clinical Approach to Hypocalcemia in Newborn Period and Infancy: Who Should Be Treated? *Int. J. Pediatr.* **2019**, *2019*, 4318075. [CrossRef] [PubMed]
45. Appelman-Dijkstra, N.M.; Ertl, D.A.; Carola Zillikens, M.; Rjenmark, L.; Winter, E.M. Hypercalcemia during Pregnancy: Management and Outcomes for Mother and Child. *Endocrine* **2021**, *71*, 604–610. [CrossRef] [PubMed]
46. Liebgott, B.; Srebrolov, G. Fetal Toxicity Caused by Excessive Maternal Dietary Calcium. *J. Can Dent Assoc.* **1989**, *55*, 129–133.
47. Malas, N.; Shurideh, Z.M. Does Serum Calcium in Pre-Eclampsia and Normal Pregnancy Differ? *Saudi Med. J.* **2001**, *22*, 868–871.
48. Ephraim, R.K.D.; Osakunor, D.N.M.; Denkyira, S.W.; Eshun, H.; Amoah, S.; Anto, E.O. Serum Calcium and Magnesium Levels in Women Presenting with Pre-Eclampsia and Pregnancy-Induced Hypertension: A Case-Control Study in the Cape Coast Metropolis, Ghana. *BMC Pregnancy Childbirth* **2014**, *14*, 1–8. [CrossRef]
49. DeSousa, J.; Tong, M.; Wei, J.; Chamley, L.; Stone, P.; Chen, Q. The Anti-Inflammatory Effect of Calcium for Preventing Endothelial Cell Activation in Preeclampsia. *J. Hum. Hypertens.* **2016**, *30*, 303–308. [CrossRef]
50. Norman, J.; Politz, D.; Politz, L. Hyperparathyroidism during Pregnancy and the Effect of Rising Calcium on Pregnancy Loss: A Call for Earlier Intervention. *Clin. Endocrinol.* **2009**, *71*, 104–109. [CrossRef]
51. Pal, R.; Bhadada, S.K.; Gupta, N.; Behera, A.; Aggarwal, N.; Aggarwal, A.; Raviteja, K.V.; Saikia, U.N.; Kaur, G.; Arvindbhai, S.M.; et al. Primary Hyperparathyroidism in Pregnancy: Observations from the Indian PHPT Registry. *J. Endocrinol. Investig.* **2021**, *44*, 1425–1435. [CrossRef]
52. Rey, E.; Jacob, C.; Koolian, M.; Morin, F. Hypercalcemia in Pregnancy—A Multifaceted Challenge: Case Reports and Literature Review. *Clin. Case Rep.* **2016**, *4*, 1001. [CrossRef]
53. Bell, M.L.; Belanger, K.; Ebisu, K.; Gent, J.F.; Leaderer, B.P. Relationship Between Birth Weight and Exposure to Airborne Fine Particulate Potassium and Titanium During Gestation. *Environ. Res.* **2012**, *117*, 83. [CrossRef]
54. Wei, X.; Zhang, Y.; Yin, B.; Wen, J.; Cheng, J.; Fu, X. The Expression and Function of KCNQ Potassium Channels in Human Chorionic Plate Arteries from Women with Normal Pregnancies and Pre-Eclampsia. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0192122. [CrossRef]

55. Wolak, T.; Sergienko, R.; Wiznitzer, A.; Ben Shlush, L.; Paran, E.; Sheiner, E. Low Potassium Level during the First Half of Pregnancy Is Associated with Lower Risk for the Development of Gestational Diabetes Mellitus and Severe Pre-Eclampsia. *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.* **2010**, *23*, 994–998. [[CrossRef](#)]
56. Shirazki, A.; Weintraub, Z.; Reich, D.; Gershon, E.; Leshem, M. Lowest Neonatal Serum Sodium Predicts Sodium Intake in Low Birth Weight Children. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2007**, *292*, 1683–1689. [[CrossRef](#)]
57. Roy-Clavel, E.; Picard, S.; St-Louis, J.; Brochu, M. Induction of Intrauterine Growth Restriction with a Low-Sodium Diet Fed to Pregnant Rats. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1999**, *180*, 608–613. [[CrossRef](#)]
58. Vidonho, A.F.; Da Silva, A.A.; Catanozi, S.; Rocha, J.C.; Beutel, A.; Carillo, B.A.; Furukawa, L.N.S.; Campos, R.R.; De Toledo Bergamaschi, C.M.; Carpinelli, A.R.; et al. Perinatal Salt Restriction: A New Pathway to Programming Insulin Resistance and Dyslipidemia in Adult Wistar Rats. *Pediatr. Res.* **2004**, *56*, 842–848. [[CrossRef](#)]
59. Lagiou, P.; Mucci, L.; Tamimi, R.; Kuper, H.; Lagiou, A.; Hsieh, C.C.; Trichopoulos, D. Micronutrient Intake during Pregnancy in Relation to Birth Size. *Eur. J. Nutr.* **2005**, *44*, 52–59. [[CrossRef](#)]
60. Pazhayattil, G.S.; Rastegar, A.; Brewster, U.C. Approach to the Diagnosis and Treatment of Hyponatremia in Pregnancy. *Am. J. Kidney Dis.* **2015**, *65*, 623–627. [[CrossRef](#)]
61. Dunne, J.; Tessema, G.A.; Pereira, G. The Role of Confounding in the Association between Pregnancy Complications and Subsequent Preterm Birth: A Cohort Study. *BJOG* **2022**, *129*, 890–899. [[CrossRef](#)]
62. Antonia Dröge, L.; Eidmann, J.; Aigner, A.; Frank, L.; Perschel, F.H.; Henrich, W.; Verlohren, S. Relevance of Maternal Sodium Level for Preeclampsia-Associated Adverse Pregnancy Outcomes. *Pregnancy Hypertens.* **2021**, *25*, 110–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Anglim, B.; Levins, K.; Bussmann, N.; Imcha, M. Case Report: Severe Hyponatraemia Associated with Pre-Eclampsia. *BMJ Case Rep.* **2016**, *2016*, bcr2016215036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Hsu, R.; Tong, A.; Hsu, C.D. Hypervolemic Hyponatremia as a Reversible Cause of Cardiopulmonary Arrest in a Postpartum Patient with Preeclampsia. *Case Rep. Obstet. Gynecol.* **2021**, *2021*, 8850725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Powel, J.E.; Rosenthal, E.; Roman, A.; Chasen, S.T.; Berghella, V. Preeclampsia and Low Sodium (PALS): A Case and Systematic Review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2020**, *249*, 14–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Birukov, A.; Andersen, L.B.; Herse, F.; Rakova, N.; Kitlen, G.; Kyhl, H.B.; Golic, M.; Haase, N.; Kräker, K.; Müller, D.N.; et al. Aldosterone, Salt, and Potassium Intakes as Predictors of Pregnancy Outcome, Including Preeclampsia. *Hypertension* **2019**, *74*, 391–398. [[CrossRef](#)]
67. Osada, H.; Watanabe, Y.; Nishimura, Y.; Yukawa, M.; Seki, K.; Sekiya, S. Profile of Trace Element Concentrations in the Feto-Placental Unit in Relation to Fetal Growth. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2002**, *81*, 931–937. [[CrossRef](#)]
68. Enaruna, N.O.; Ande, A.B.A.; Okpere, E.E. Clinical Significance of Low Serum Magnesium in Pregnant Women Attending the University of Benin Teaching Hospital. *Niger. J. Clin. Pract.* **2013**, *16*, 448–453. [[CrossRef](#)]
69. Takaya, J.; Yamato, F.; Kaneko, K. Possible Relationship between Low Birth Weight and Magnesium Status: From the Standpoint of “Fetal Origin” Hypothesis. *Magnes. Res.* **2006**, *19*, 63–72.
70. Komiya, Y.; Su, L.T.; Chen, H.C.; Habas, R.; Runnels, L.W. Magnesium and Embryonic Development. *Magnes. Res.* **2014**, *27*, 8. [[CrossRef](#)]
71. Morton, A. Hypomagnesaemia and Pregnancy. *Obstet. Med.* **2018**, *11*, 67. [[CrossRef](#)]
72. Fanni, D.; Gerosa, C.; Nurchi, V.M.; Manchia, M.; Saba, L.; Coghe, F.; Crisponi, G.; Gibo, Y.; Van Eyken, P.; Fanos, V.; et al. The Role of Magnesium in Pregnancy and in Fetal Programming of Adult Diseases. *Biol. Trace Elem. Res.* **2021**, *199*, 3647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Schlegel, R.N.; Cuffe, J.S.M.; Moritz, K.M.; Paravicini, T.M. Maternal Hypomagnesemia Causes Placental Abnormalities and Fetal and Postnatal Mortality. *Placenta* **2015**, *36*, 750–758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Rosner, J.Y.; Gupta, M.; McGill, M.; Xue, X.; Chatterjee, P.K.; Yoshida-Hay, M.; Robeson, W.; Metz, C.N. Magnesium Deficiency during Pregnancy in Mice Impairs Placental Size and Function. *Placenta* **2016**, *39*, 87–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Kazemi-Darabadi, S.; Akbari, G. Evaluation of Magnesium Sulfate Effects on Fetus Development in Experimentally Induced Surgical Fetal Growth Restriction in Rat. *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.* **2020**, *33*, 2459–2465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Durlach, J.; Pagès, N.; Bac, P.; Bara, M.; Guiet-Bara, A. New Data on the Importance of Gestational Mg Deficiency. *J. Am. Coll. Nutr.* **2004**, *23*, 694S–700S. [[CrossRef](#)]
77. Zhang, Y.; Xun, P.; Chen, C.; Lu, L.; Shechter, M.; Rosanoff, A.; He, K. Magnesium Levels in Relation to Rates of Preterm Birth: A Systematic Review and Meta-Analysis of Ecological, Observational, and Interventional Studies. *Nutr. Rev.* **2021**, *79*, 188. [[CrossRef](#)]
78. Kovo, M.; Mevorach-Zussman, N.; Khatib, N.; Ginsberg, Y.; Divon, M.; Weiner, Z.; Bar, J.; Beloosesky, R. The Effects of Magnesium Sulfate on the Inflammatory Response of Placentas Perfused With Lipopolysaccharide: Using the Ex Vivo Dual-Perfused Human Single-Cotyledon Model. *Reprod. Sci.* **2018**, *25*, 1224–1230. [[CrossRef](#)]
79. Goossens, J.; Beekman, D.; Van Hecke, A.; Delbaere, I.; Verhaeghe, S. Preconception Lifestyle Changes in Women with Planned Pregnancies. *Midwifery* **2018**, *56*, 112–120. [[CrossRef](#)]
80. Jaddoe, V.W.V.; Troe, E.J.W.M.; Hofman, A.; Mackenbach, J.P.; Moll, H.A.; Steegers, E.A.P.; Witteman, J.C.M. Active and Passive Maternal Smoking during Pregnancy and the Risks of Low Birth weight and Preterm Birth: The Generation R Study. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* **2008**, *22*, 162–171. [[CrossRef](#)]

81. Ko, T.J.; Tsai, L.Y.; Chu, L.C.; Yeh, S.J.; Leung, C.; Chen, C.Y.; Chou, H.C.; Tsao, P.N.; Chen, P.C.; Hsieh, W.S. Parental Smoking during Pregnancy and Its Association with Low Birth Weight, Small for Gestational Age, and Preterm Birth Offspring: A Birth Cohort Study. *Pediatr. Neonatol.* **2014**, *55*, 20–27. [[CrossRef](#)]
82. Soneji, S.; Beltrán-Sánchez, H. Association of Maternal Cigarette Smoking and Smoking Cessation With Preterm Birth. *JAMA Netw. Open.* **2019**, *2*, e192514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Bednarczuk, N.; Milner, A.; Greenough, A. The Role of Maternal Smoking in Sudden Fetal and Infant Death Pathogenesis. *Front. Neurol.* **2020**, *11*, 1256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Hulman, A.; Lutsiv, O.; Park, C.K.; Krebs, L.; Beyene, J.; McDonald, S.D. Are Women Who Quit Smoking at High Risk of Excess Weight Gain throughout Pregnancy? *BMC Pregnancy Childbirth* **2016**, *16*, 263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Adegboye, A.R.A.; Rossner, S.; Neovius, M.; Lourenço, P.M.C.; Linné, Y. Relationships between Prenatal Smoking Cessation, Gestational Weight Gain and Maternal Lifestyle Characteristics. *Women Birth* **2010**, *23*, 29–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Collins, J. Global Epidemiology of Multiple Birth. *Reprod. Biomed.* **2007**, *15* (Suppl. 3), 45–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.


## XII. Oświadczenia współautorów

Prof. dr hab. n. med. Danuta Kosik-Bogacka  
Samodzielna Pracownia Botaniki Farmaceutycznej  
Katedra Biologii i Parazytologii Medycznej  
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Szczecin, 12.04.2023 r.


### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Grzeszczak K, Kwiatkowski S, Kosik-Bogacka D. The Role of Fe, Zn, and Cu in pregnancy. *Biomolecules*. 2020;10(8):1176 mój udział polegał na pomocy w zaprojektowaniu badań i nadzorze nad ich wykonaniem, korekcie manuskryptu i ostatecznej jego akceptacji



.....  
Podpis

Oświadczam, że w pracy: Grzeszczak K, Kapczuk P, Kupnicka P, Cecerska-Heryć E, Kwiatkowski S, Chlubek D, Kosik-Bogacka D. Calcium, potassium, sodium, and magnesium concentrations in the placenta, umbilical cord, and fetal membrane from women with multiple pregnancies. *Life (Basel)*. 2023;13(1):153 mój udział polegał na pomocy w zaprojektowaniu badań i nadzorze nad ich wykonaniem, korekcie manuskryptu i ostatecznej jego akceptacji.



.....  
Podpis

Prof. dr hab. n. med. Sebastian Kwiatkowski  
Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii  
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Szczecin, 12.04.2023 r.

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Grzeszczak K, Kwiatkowski S, Kosik-Bogacka D. The Role of Fe, Zn, and Cu in pregnancy. *Biomolecules*. 2020;10(8):1176 mój udział polegał na pomocy w pisaniu manuskryptu.

prof. dr hab. n. med. Sebastian Kwiatkowski  
specjalista położnictwa-ginekologii  
specjalista perinatologii  
2953540  
.....  
Podpis

Oświadczam, że w pracy: Grzeszczak K, Kapczuk P, Kupnicka P, Cecerska-Heryć E, Kwiatkowski S, Chlubek D, Kosik-Bogacka D. Calcium, potassium, sodium, and magnesium concentrations in the placenta, umbilical cord, and fetal membrane from women with multiple pregnancies. *Life (Basel)*. 2023;13(1):153 mój udział polegał na pomocy w pisaniu manuskryptu.

prof. dr hab. n. med. Sebastian Kwiatkowski  
specjalista położnictwa-ginekologii  
specjalista perinatologii  
2953540  
.....  
Podpis

Dr n. med. Elżbieta Cecerska-Heryć  
Zakład Medycyny Laboratoryjnej  
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Szczecin, 12.04.2023 r.

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Grzeszczak K, Kapczuk P, Kupnicka P, Cecerska-Heryć E, Kwiatkowski S, Chlubek D, Kosik-Bogacka D. Calcium, potassium, sodium, and magnesium concentrations in the placenta, umbilical cord, and fetal membrane from women with multiple pregnancies. *Life (Basel)*. 2023;13(1):153 udział polegał na analizie formalnej artykułu.

ADIUNKT  
Zakładu Medycyny Laboratoryjnej

dr n. med. Elżbieta Cecerska-Heryć

Podpis

Prof. dr hab. n. med. Dariusz Chlubek  
Katedra i Klinika Biochemii i Chemii Klinicznej  
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Szczecin, 12.04.2023 r.

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Grzeszczak K, Kapczuk P, Kupnicka P, Cecerska-Heryć E, Kwiatkowski S, Chlubek D, Kosik-Bogacka D. Calcium, potassium, sodium, and magnesium concentrations in the placenta, umbilical cord, and fetal membrane from women with multiple pregnancies. *Life (Basel)*. 2023;13(1):153 mój udział polegał na pomocy w pisaniu manuskryptu.

KIEROWNIK  
Zakładu Biochemii

  
Prof. dr hab. n. med. Dariusz Chlubek

.....  
Podpis



Dr n. med. Patrycja Kupnicka  
Katedra i Klinika Biochemii i Chemii Klinicznej  
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Szczecin, 12.04.2023 r.

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Grzeszczak K, Kapczuk P, Kupnicka P, Cecerska-Heryć E, Kwiatkowski S, Chlubek D, Kosik-Bogacka D. Calcium, potassium, sodium, and magnesium concentrations in the placenta, umbilical cord, and fetal membrane from women with multiple pregnancies. *Life (Basel)*. 2023;13(1):153 mój udział polegał na walidacji metodyki.

.....  
Podpis

Dr n. med. Patrycja Kapczuk  
Katedra i Klinika Biochemii i Chemii Klinicznej  
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Szczecin, 12.04.2023 r.

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy: Grzeszczak K, Kapczuk P, Kupnicka P, Cecerska-Heryć E, Kwiatkowski S, Chlubek D, Kosik-Bogacka D. Calcium, potassium, sodium, and magnesium concentrations in the placenta, umbilical cord, and fetal membrane from women with multiple pregnancies. *Life (Basel)*. 2023;13(1):153 mój udział polegał na pomocy w opracowaniu metodologii oraz realizacji badań naukowych.



.....  
Podpis

### XIII. Dodatkowe załączniki

#### Załącznik 3

#### ZGODA NA PRZETWARZANIE DANYCH OSOBOWYCH DLA UCZESTNICZKI BADANIA

**Wyrażam zgodę** na przetwarzanie moich danych osobowych obejmujących: imię, nazwisko, wiek, zawód, grupę krwi, informacje dotyczące stanu zdrowia, informacje o nałogach. Dane te zbierane będą do badania naukowego wymaganego do przygotowania rozprawy wymaganej do uzyskania stopnia naukowego, w celu realizacji badań do pracy doktorskiej zgodnie z rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r. w sprawie ochrony osób fizycznych w związku z przetwarzaniem danych osobowych i w sprawie swobodnego przepływu takich danych oraz uchylenia dyrektywy 95/46/WE (ogólne rozporządzenie o ochronie danych) (Dz.Urz. EE L 119 z 04.05.2016, str. 1).

W zakresie w jakim dane przetwarzane są na podstawie Pani/Pana zgody w każdej chwili przysługuje Pani/Panu prawo do wycofania zgody na przetwarzanie danych osobowych, ale cofnięcie zgody nie wpływa na zgodność z prawem przetwarzania, którego dokonano na podstawie tej zgody przed jej wycofaniem.

.....

Data

Czytelny podpis

Zgodnie z art. 13 ogólnego rozporządzenia o ochronie danych osobowych z dnia 27 kwietnia 2016 r. (Dz. Urz. UE L 119 z 04.05.2016) informuje Panią/Pana, że:

- 1) administratorem Pani/Pana danych jest Konrad Grzeszczak. Kontakt możliwy jest pod numerem Tel: 782 828 049 lub adres e-mail: konrad.grzeszczak@pum.edu.pl,
- 2) celem przetwarzania Pani danych osobowych jest udział w badaniu naukowym, w tym przygotowanie rozprawy wymaganej do uzyskania stopnia naukowego,
- 3) podstawa przetwarzania Pani danych jest art. 6 ust. 1 lit a - w przypadku danych zwykłych oraz art. 9 ust. 2 lit j - w przypadku przetwarzania danych szczególnej kategorii ogólnego rozporządzenia o ochronie danych osobowych z dnia 27 kwietnia 2016 r.,
- 4) podane dane osobowe przechowywane będą do czasu uzyskania celu, o którym mowa w pkt 2 lub do czasu odwołania przez Panią/Pana zgody,
- 5) podanie przez Panią danych osobowych jest dobrowolne, jednakże brak zgody na ich przetwarzanie lub niepodanie danych w zakresie wymaganym przez Administratora uniemożliwi udział w badaniu,
- 6) odbiorcami Pani danych osobowych będą wyłącznie podmioty uprawnione do uzyskania danych osobowych na podstawie przepisów prawa, podmiot świadczące usługi dla Administratora,
- 7) posiada Pani prawo żądania od Administratora dostępu do swoich danych osobowych, prawo do ich sprostowania, usunięcia lub ograniczenia przetwarzania, prawo do przenoszenia danych oraz prawo do cofnięcia zgody w dowolnym momencie bez wpływu na zgodność z prawem przetwarzanie, którego dokonano na podstawie zgód przed ich cofnięciem,
- 8) ma Pani prawo wniesienia skargi do organu nadzorczego, tj. Prezesa Urzędu Ochrony Danych

.....

Data

Czytelny podpis



## INFORMACJA DLA PACJENTKI

### Załącznik 4

#### **Na temat badania: Stężenia pierwiastków śladowych oraz makroelementów we krwi matki i pępowinowej oraz poptodów na tle warunków środowiskowych**

Zanim podejmiecie Panie decyzję o uczestnictwie w badaniu proszę o dokładne przeczytanie podanych informacji. **Udział w niniejszym badaniu jest całkowicie dobrowolny, w związku z tym, decyzja negatywna w żaden sposób nie wpłynie na dalsze Pani leczenie. Do badań użyty zostanie materiał pooperacyjny, który przeznaczony jest do utylizacji, a nie pobrany celowo do zaplanowanych badań.**

Wraz z postępującym zanieczyszczeniem środowiska oraz równoczesnym rozwojem medycyny większą uwagę zwraca się na przeciwdziałanie skutków degradacji środowiska, a także poszukiwaniu przyczyn między innymi niepowodzeń położniczych. Wśród różnych rodzajów materiałów biologicznych przy określeniu narażenia płodu na pierwiastki śladowe najczęściej stosuje się łożysko. Stwierdzono, że narażenie kobiet na występujące w środowisku ksenobiotyki, w tym rtęć (Hg), ołów (Pb) i arsen (As) zwiększa ryzyko poronienia. Do organizmu człowieka rtęć dostaje się głównie wraz z dietą rybną, a także z amalgamatowych wypełnień stomatologicznych.

Palenie tytoniu należy do najpoważniejszych współczesnych zagrożeń cywilizacyjnych. Dym tytoniowy zawiera między innymi około 30 jonów metali, w tym kadm (Cd) i ołów (Pb). Kadm wpływa na procesy rozrodu zaburzając miesiączkowanie, zmniejszając płodność i masę urodzeniową noworodków, a zwiększa częstość

samoistnych poronień i przedwczesnych porodów. Natomiast wzrastający poziom ołowiu podczas ciąży może być przyczyną zwiększonego ryzyka przedwczesnego porodu, poronień samoistnych, nadciśnienia indukowanego ciążą oraz zespołu przedwczesnego pęknięcia pęcherza płodowego.

Dla prawidłowego rozwoju płodu bardzo ważna jest też odpowiednia ilość mikro- i makroelementów. Stwierdzono, że niedobór żelaza (Fe) w przebiegu ciąży może wiązać się z wzrostem ryzyka wystąpienia powikłań w postaci niskiej masy urodzeniowej, wystąpienia porodu przedwczesnego, przedwczesnego pęknięcia pęcherza płodowego oddzielenia łożyska, zaburzeń czynności skurczowej macicy oraz infekcji w przebiegu porodu. Niedobór cynku (Zn) podczas ciąży objawiają się zaburzeniami w rozwoju i funkcjonowaniu układu nerwowego u płodu. Natomiast duże stężenie tego pierwiastka w surowicy obniża wchłanianie żelaza (Fe) i miedzi (Cu).

#### **CEL PROJEKTU**

Ocena stężenia pierwiastków, w tym kadmu (Cd), ołowiu (Pb), rtęci (Hg), cynku (Zn), miedzi (Cu), chromu (Cr), żelaza (Fe), niklu (Ni), wanadu (V), selenu (Se), srebra (Ag), wapnia (Ca), magnezu (Mg), molibdenu (Mo) i związków fluoru (F<sup>-</sup>), we krwi matki i pępowinowej oraz łożysku, pępowinie i błonach płodowych.

#### **POUFNOŚĆ**

Otrzymane wyniki są całkowicie poufne. Od momentu wyrażenia przez Panią zgody na badanie, wszystkie próbki zostaną oznaczone wyłącznie numerem kodowym, który będzie tajnie i ściśle chroniony przed osobami trzecimi.

#### **KORZYŚCI WYNIKAJĄCE Z UDZIAŁU W BADANIU**

Oczekuje się, że badania pozwolą lepiej poznać stężenie pierwiastków we krwi matki i pępowinowej, w łożysku, pępowinie i błonach płodowych, przy uwzględnieniu pewnych warunków

środowiskowych. Wiele wskazuje na to, że informacja o ryzyku narażenia wewnątrzmacicznego na niskie dawki np. ołowiu, rtęci związane z narażeniem środowiskowym w tym: paleniem papierosów podczas ciąży, dietą rybną może być przydatna w praktyce ginekologiczno-położniczej.

Żadna z osób, od której pozyskiwany będzie materiał badany nie odniesie bezpośrednio korzyści z udziału w tych badaniach, gdyż mają one charakter wyłącznie naukowy. Nie będą Państwo informowani o wynikach badań. Zebrane informacje mogą mieć natomiast istotne znaczenie w przyszłej profilaktyce i ocenie wpływu pierwiastków metalicznych na organizm człowieka.

#### **ODPŁATNOŚĆ**

Udział w badaniu jest całkowicie bezpłatny.

**Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (uchwała nr KB-0012/76/14; 13.10.2014 r ).**



POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
W SZCZECINIE  
KOMISJA BIOETYCZNA  
70-204 Szczecin, ul. Rybacka 1  
tel. +48 91 4800 773, fax +48 91 4800 842  
e-mail: bioetyka@pum.edu.pl



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

**Uchwała nr KB-0012/76/14  
Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego  
w Szczecinie z dnia 13.10.2014 r.**

Na podstawie art. 29 ust. 1 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza i lekarza dentysty (Dz. U. z 05.11.2008 r. Nr 136, poz. 857) oraz § 6 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. Nr 47, poz. 480) uchwała się, co następuje:

§ 1

Komisja Bioetyczna Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie /obradująca i wydająca opinię zgodnie z zasadami GCP Good Clinical Practice/ w składzie według listy dołączonej do uchwały, po zapoznaniu się z dokumentacją projektu badawczego pt.:

*"Stężenia pierwiastków śladowych oraz makroelementów we krwi matki i pępowinowej oraz płodów na tle warunków środowiskowych".*

stwierdza:

1. ośrodek, w którym ma być przeprowadzone badanie spełnia wymogi dla jego przeprowadzenia,
2. kwalifikacje zawodowe i naukowe kierownika badania gwarantują właściwe przeprowadzenie badania,
3. osoby poddane badaniu zostaną szczegółowo zapoznane z celami i zasadami przeprowadzenia doświadczenia, ze spodziewanymi dla nich korzyściami leczniczymi oraz o ryzyku związanym z poddaniem się eksperymentowi,
4. zagwarantowano w badaniu obowiązek uzyskania świadomej zgody od wszystkich badanych osób lub ich przedstawicieli ustawowych, ochronę danych osobowych uczestników badania oraz możliwości odstąpienia od udziału w eksperymencie w każdym jego stadium.

W związku z powyższym Komisja Bioetyczna PUM wyraża pozytywną opinię o zaprezentowanym badaniu.

§ 2

Wydana opinia dotyczy tylko rozpatrywanego wniosku i przedstawionego projektu; każda zmiana i modyfikacja projektu badawczego wymaga uzyskania odrębnej opinii. Wnioskodawca zobowiązany jest do informowania o wszelkich poprawkach, które mogłyby mieć wpływ na opinię Komisji, o ciężkich lub niespodziewanych zdarzeniach niepożądanych i nieprzewidzianych okolicznościach, o zakończeniu badania i o jego wynikach.



POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
W SZCZECINIE  
KOMISJA BIOETYCZNA  
70-204 Szczecin, ul. Rybacka 1  
tel. +48 91 4800 773, fax +48 91 4800 842  
e-mail: bioetyka@pum.edu.pl

§ 3

**Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia i obowiązuje na okres badania.**

Główny Badacz:

- dr hab. n. med. Danuta Kosik-Bogacka - Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Medycznej.

Współbadacze:

- dr n. med. Natalia Łanocha,
- prof. dr hab. Witold Malinowski,
- dr n. med. Sławomir Szymański,
- prof. dr hab. n. med. Elżbieta Kalisińska,
- mgr Natalia Tomska.

Recenzent badania:

- prof. dr hab. n. med. Jacek Rudnicki.

Lista dokumentów załączonych do wniosku:

- Wniosek do Komisji Bioetycznej PUM w Szczecinie o wyrażenie opinii o projekcie badawczym,
- Opis projektu badawczego,
- Notki biograficzne głównego badacza oraz współbadaczy,
- Informacja dla pacjenta,
- Formularz pisemnej zgody pacjenta,
- Ankieta dla pacjenta,
- Zgoda lek. med. Jerzego Subczyńskiego - „Kutnowski Szpital Samorządowy” na przeprowadzenie badań.

PRZEWODNICZĄCY  
Komisji Bioetycznej  
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

prof. dr hab. n. med. Marek Drożdżik



POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
W SZCZECINIE  
KOMISJA BIOETYCZNA  
70-204 Szczecin, ul. Rybacka 1  
tel. +48 91 4800 773, fax +48 91 4800 842  
e-mail: bioetyka@pum.edu.pl



## Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Lista członków Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie uczestniczących  
w posiedzeniu w dniu 13 października 2014 r.

Przewodniczący:

1. prof. dr hab. Marek Drożdżik

*M. Drożdżik*

Wiceprzewodnicząca:

2. mgr Maria Matusiak

*M. Matusiak*

3. prof. dr hab. Dariusz Chlubek

*D. Chlubek*

4. dr hab. Marek Myślak

*M. Myślak*

5. dr hab. Maciej Żukowski

*M. Żukowski*

6. prof. dr hab. Zdzisława Kornacewicz-Jach

*Z. Kornacewicz-Jach*

7. prof. dr hab. Dariusz Bielicki

*D. Bielicki*

8. dr hab. prof. nadzw. PUM Andrzej Brodkiewicz

*A. Brodkiewicz*

9. dr hab. Krystyna Lisiecka

*K. Lisiecka*

10. prof. dr hab. Piotr Prowans

*P. Prowans*

11. prof. dr hab. Jacek Rudnicki

*J. Rudnicki*

12. ks. prof. Henryk Wejman

*H. Wejman*

13. ks. dr hab. prof. US Wiesław Dyk

*W. Dyk*

14. mgr Witold Frankiewicz

*W. Frankiewicz*

15. mgr Bernadeta Łęga

*B. Łęga*





Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

**Uchwała nr KB-0012/76/14/A-1  
Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego  
w Szczecinie z dnia 09 marca 2020 r.**

Na podstawie art. 29 ust. 1 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 roku o zawodzie lekarza i lekarza dentysty (j.t. z 2019 r., Dz.U. poz. 537 z późn. zm.) oraz § 6 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. Nr 47, poz. 480) uchwała się, co następuje:

§ 1

Komisja Bioetyczna Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, w składzie według dołączonej do niniejszej Uchwały listy, po zapoznaniu się z dokumentacją dotyczącą zmian w projekcie badawczym pt.:

*"Stężenia pierwiastków śladowych oraz makroelementów we krwi matki i pępowinowej oraz płodów na tle warunków środowiskowych"*

który uzyskał pozytywną opinię Komisji, wyrażoną w Uchwale Nr KB-0012/76/14 z dnia 13.10.2014 r.

**wyraża pozytywną opinię na wprowadzenie następujących zmian:**

- przedłużenie zgody na badanie do 12.2022 r.;
- poszerzenie zespołu badawczego o mgr Konrada Grzeszczaka

§ 2

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

**PRZEWODNICZĄCY**  
Komisji Bioetycznej  
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie  
prof. dr hab. n. med. Marek Drożdżalik

**Pouczenie:**

1. Odwołanie od niniejszej uchwały może wnieść:
  - 1) podmiot zamierzający przeprowadzić eksperyment medyczny,
  - 2) kierownik zakładu opieki zdrowotnej, w którym eksperyment medyczny ma być przeprowadzony,
  - 3) komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wielośrodkowym eksperymencie medycznym.
2. Odwołanie, o którym mowa w ust. 1, wnosi się za pośrednictwem Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministrze Zdrowia, w terminie 14 dni od dnia otrzymania uchwały.

Lista obecności członków Komisji Bioetycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

09 marca 2020 r.

	Imię i nazwisko	Miejsce pracy	
1.	prof. dr hab. n. med. Marek Drożdżik (choroby wewnętrzne)	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 2 PUM w Szczecinie 70-111 Szczecin, al. Powstańców Wielkopolskich 72 Kierownik: Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej	
2.	mgr Gabriela Hofman położna	Szczecińska Izba Pielęgniarek i Położnych ul. Kusocińskiego 16LU1 70-237 Szczecin Przewodnicząca Rady Szczecińskiej Izby Pielęgniarek i Położnych	
3.	dr hab. n. med. prof. PUM Anita Chudecka – Głaz (ginekologia i położnictwo, ginekologia onkologiczna)	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 2 PUM w Szczecinie 70-111 Szczecin, al. Powstańców Wielkopolskich 72 Klinika Ginekologii Operacyjnej i Onkologii Ginekologicznej Dorosłych i Dziewcząt	
4.	dr hab. n. med. prof. PUM Marek Mysłak Choroby wewnętrzne, nefrologia, transplantologia	Samodzielny Publiczny Wojewódzki Szpital Zespolony im. Marii Skłodowskiej – Curie 71-455 Szczecin, ul. Arkońska 4 Ordynator: Oddział Nefrologii i Transplantacji Nerak Stacja Dializ Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie 70-103 Szczecin, ul. gen. Dąbrowskiego Chłapowskiego 11 Kierownik: Zakład Interwencji Klinicznych i Medycyny Katastrof	
5.	dr n. med. Anita Horodnicka – Józwa specjalista pediatra, diabetolog, endokrynolog i diabetolog dziecięcy	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie im. prof. Tadeusza Sokolowskiego 71-252 Szczecin, ul. Unii Lubelskiej 1 Klinika Pediatrii, Endokrynologii, Diabetologii, Chorób Metabolicznych i Kardiologii Wzrostu i Rozwoju	—
6.	dr n. med. Edyta Zagrodnik anestezjologia i intensywne terapia	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie im. prof. Tadeusza Sokolowskiego w Szczecinie 72-010 Police, ul. Siedlecka 2 Oddział Kliniczny Anestezjologii i Intensywnej Terapii Dorosłych i Dzieci	
7.	prof. dr hab. n. med. Dariusz Bielicki choroby wewnętrzne, gastroenterologia	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie im. prof. Tadeusza Sokolowskiego 71-252 Szczecin, ul. Unii Lubelskiej 1 Katedra i Klinika Gastroenterologii	—
8.	dr hab. n. med. prof. PUM Andrzej Brodkiewicz pediatria, nefrologia dziecięca	Samodzielny Publiczny Specjalistyczny Zakład Opieki Zdrowotnej „Zdroje” 70-780 Szczecin, ul. Mączna 4 PUM w Szczecinie Kierownik: Oddział Kliniczny Pediatrii, Nefrologii Dziecięcej, Dializoterapii i Leczenia Ostrego Zatrucia	
9.	dr hab. n. med. Krystyna Lisecka stomatologia zachowawcza	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 2 PUM w Szczecinie 70-111 Szczecin, al. Powstańców Wielkopolskich 72 Zakład Stomatologii Dziecięcej Emeryt	
10.	prof. dr hab. n. med. Piotr Prowans chirurgia ogólna specjalista chirurgii plastycznej	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie im. prof. Tadeusza Sokolowskiego 72-010 Police, ul. Siedlecka 2 Kierownik: Klinika Chirurgii Plastycznej, Endokrynologicznej i Ogólnej	—
11.	prof. dr hab. n. med. Jacek Rudnicki pediatria, neonatologia	Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie 70-103 Szczecin, ul. gen. Dąbrowskiego Chłapowskiego 11 Kierownik: Zakład Nauk Humanistycznych w Medycynie	
12.	ks. dr Arkadiusz Wieczorek teologia moralna, bioetyka	Arcybiskupie Wyższe Seminarium Duchowne, ul. Papieża Pawła VI, 2, 71-459 Szczecin	
13.	ks. dr hab. prof. US Wiesław Dyk filozofia, filozofia przyrody	Uniwersytet Szczeciński Wydział Humanistyczny Instytut Filozofii, Szczecin, ul. Krakowska 71	
14.	mgr Witold Frankiewicz prawnik	Samodzielny Publiczny Szpital Kliniczny Nr 1 Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie im. prof. Tadeusza Sokolowskiego 71-252 Szczecin, ul. Unii Lubelskiej 1 Sekcja Organizacyjno - Prawna	
15.	mgr Bernadeta Łęga farmacja apteczna	Zachodniopomorskie Centrum Kształcenia Zawodowego i Ustawicznego w Szczecinie ul. Broniewskiego 9, 71-460 Szczecin Nauczyciel przedmiotów zawodowych (nauczyciel dyplomowany)	