



mgr Konrad Grzeszczak

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

Streszczenie

W ostatnich latach wzrosła liczba ciąży mnogich. Jest to związane ze stosowaniem technik wspomaganego rozrodu, w tym indukowanej owulacji oraz zapłodnienia *in vitro*. Cięższe mnogie są zawsze ciążami podwyższonego ryzyka i częściej niż w przypadku ciąży pojedynczych występują powikłania ciążowe, wady rozwojowe płodu oraz zachorowalność i śmiertelność okołoporodowa. Cięża mnoga może być przyczyną porodu przedwczesnego, poronienia, hipotrofii jednego lub więcej płodów, wewnątrzmacicznego obumarcia lub zespołu zanikającego płodu. Stan przedzucawkowy (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 stężeń 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.



mgr Konrad Grzeszczak

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

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 ($\rho=0.36$), weight of newborn ($\rho=0.35$) and between Fe concentration in the placenta and its weight ($\rho=0.35$). 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.