

lek. Joanna Nowaczyk

***Ocena wybranych biochemicznych parametrów płytek krwi w ciąży
powikłanej IUGR***

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

Promotor: prof. dr hab. Mariola Ropacka-Lesiak

Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu



Poznań, 2021

Podziękowania

Składam serdecznie podziękowania:

*Promotorowi, prof. dr hab. Marioli Ropackiej-Lesiak za wskazanie kierunku
pracy naukowej, oraz poświęcony czas;*

Rodzinie, za miłość, cierpliwość i wsparcie;

Przyjaciółom, za wiarę w moje możliwości;

Wszystkim, którzy mieli wkład w powstanie niniejszej rozprawy

Rozprawę dedykuję

moim ukochanym dzieciom, Julii i Stanisławowi oraz mężowi, Tomaszowi

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	7
1. Wstęp	10
1.1. Wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu (IUGR/FGR)	11
1.1.1. Etiologia IUGR (FGR)	12
1.1.2. Diagnostyka i klasyfikacja IUGR (FGR) ¹	13
1.2. Płytki krwi	16
1.2.1. Fizjologiczna rola płytek krwi	17
1.2.2. Patofizjologia płytek krwi	19
1.3. Stres oksydacyjny	20
1.3.1. Wpływ stresu oksydacyjnego na płytki krwi	22
2. Cel pracy	25
3. Materiał	26
3.1.1. Grupa nieciążarnych (n=24)	27
3.1.2. Grupa pacjentek w ciąży o przebiegu niepowikłanym (n=67)	27
3.1.3. Grupa pacjentek z rozpoznaniem wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania płodu (IUGR/FGR) (n=44)	27
4. Metody badawcze	29
4.2. Agregometria impedancyjna (Multiplate®)	30
4.2.2. Metodyka badania Multiplate®	33
4.3. Ocena metabolizmu tlenowego oraz stresu oksydacyjnego	34
4.3.2. DCFDA – ocena wewnątrzkomórkowego poziomu reaktywnych form tlenu (ROS)	36
4.3.3. MitoXpress® Xtra – badanie konsumpcji tlenu	38
4.3.4. MitoXpress® Intra - wewnątrzkomórkowy test tlenowy	40
4.4. Metodyka badania krwi obwodowej	41

4.5. Ocena dobrostanu i wzrastania płodu	42
4.6. Parametry charakteryzujące przebieg ciąży, porodu i stan noworodka	43
5. Wyniki	46
5.1. Charakterystyka badanych grup w zakresie wieku, rodności, BMI oraz stopnia IUGR (FGR).....	46
5.2. Charakterystyka badanych grup w zakresie zmiennych dotyczących porodu	47
5.2.1. Czas trwania ciąży.....	47
5.2.2. Sposób ukończenia ciąży w badanych grupach ciężarnych	48
5.3. Charakterystyka badanych grup w zakresie zmiennych określających stan noworodka	49
5.4. Ocena metabolizmu tlenowego oraz stresu oksydacyjnego w płytkach krwi badanych kobiet	55
5.4.1. Poziom ROS, pomiar konsumpcji tlenu i wewnątrzkomórkowy poziom niedoboru tlenu w badanych grupach	55
5.4.1.1. Poziom ROS w badanych grupach	56
5.4.1.2. Pomiar konsumpcji tlenu w badanych grupach	57
5.4.1.3. Wewnątrzkomórkowy poziom niedoboru tlenu w badanych grupach.....	58
5.5. Agregometria impedancyjna	59
5.5.1. Wyniki testów ASPI i TRAP w badanych grupach.....	59
5.6. Wskaźniki morfologii w badanych grupach	60
5.7. Związki pomiędzy parametrem MPV a poziomem ROS, konsumpcji tlenu, wewnątrzkomórkowym poziomem niedoboru tlenu oraz wynikami agregometrii impedancyjnej (testów ASPI i TRAP).....	60
5.8. Związek pomiędzy wiekiem ciężarnych a poziomem ROS, konsumpcji tlenu, wewnątrzkomórkowym poziomem niedoboru tlenu oraz wynikami testów ASPI i TRAP	62

5.9. Związek pomiędzy stopniem IUGR a poziomem ROS, konsumpcji tlenu, wewnątrzkomórkowym poziomem niedoboru tlenu oraz wynikami testów ASPI i TRAP	63
5.10. Związek pomiędzy zaawansowaniem ciąży (tygodniem ciąży) a poziomem ROS, konsumpcji tlenu, wewnątrzkomórkowym poziomem niedoboru tlenu oraz wynikami testów ASPI i TRAP	64
6. Dyskusja	66
7. Ograniczenia pracy	76
8. Wnioski.....	77
9. Streszczenie.....	78
10. Summary	81

Wykaz stosowanych skrótów

AC- obwód brzucha (ang. *abdominal circumference*)

ACD- cytrynian sodowy z kwasem cytrynowym oraz dekstrozą (ang. *acid-citrate-dextrose*)

ACOG- Amerykańskie Kolegium Położników i Ginekologów (ang. *American College of Obstetricians and Gynecologists*)

ADP- adenozynodifosforan

AEDV- brak przepływu końcoworozkurczowego (ang. *absent end-diastolic velocity*)

AoI- cieść aorty (ang. *aortic isthmus*)

ASA- kwas acetylosalicylowy

ATIII- antytrombina III (ang. *antithrombin III*)

ATP- adenozynotryfosforan

AUC- pole pod krzywą (ang. *area under the curve*)

BE- niedobór zasad (ang. *base deficit*)

BMI- wskaźnik masy ciała (ang. *body mass index*)

BPP- biofizyczny profil płodu (ang. *biophysical profile*)

BPD- wymiar dwuciemieniowy (ang. *biparietal diameter*)

cAMP- cykliczny adenozynomonofosforan

cKTG- komputerowa kardiotokografia

CMV- cytomegalowirus (ang. *cytomegalovirus*)

COX-1- cyklooksigenaza-1

CPR- wskaźnik mózgowo-pępowinowy (ang. *cerebro-placental ratio*)

CRL- długość ciemieniowo- siedzeniowa (ang. *crown-rump length*)

DCFDA- 2',7'-dwuocian dichlorofluoresceiny (ang. *2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate*)

DV- przewód żylny (ang. *ductus venosus*)

EFW- szacowana masa płodu (ang. *estimated fetal weight*)

ETDA- kwas wersenowy (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

FGR- ograniczenie wzrastania płodu (ang. *fetal growth restriction*)

FHR- czynność serca płodu (ang. *fetal heart rate*)

FL- długość kości udowej (ang. *femoral length*)

FU- jednostka fluorescencji (ang. *fluorescence unit*)

Gp Ib- glikoproteina Ib

GP IIb/IIIa- receptor glikoproteinowy IIb/IIIa

HGB- hemoglobina

HC- obwód głowy (ang. *head circumference*)

IUFD- wewnątrzmaciczna śmierć płodu (ang. *intrauterine fetal death*)

IUGR- wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu (ang. *intrauterine growth restriction*)

KTG- kardiotokografia

MCA- tętnica środkowa mózgu (ang. *middle cerebral artery*)

MPV- średnia objętość płytek krwi (ang. *mean platelet volume*)

NADPH- dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy

NLPZ- niesteroidowe leki przeciwzapalne

NO- tlenek azotu

nSGA- za mały w stosunku do wieku ciążowego (zastosowanie w odniesieniu do noworodka)
(ang. [neonatal] *small for gestational age*)

OCR- wskaźnik zużycia tlenu (ang. *oxygen consumption rates*)

OUN- ośrodkowy układ nerwowy

PAF- czynniki aktywujące płytki krwi (ang. *platelet activating factor*)

PAR-1- receptor aktywowany przez proteazę -1 (ang. *protease-activated receptor-1*)

PCT- hematokryt płytkowy

PE- stan przedrzucawkowy, preeklampsja (ang. *preeclampsia*)

PGE₁- prostaglandyna E1

PI- wskaźnik pulsacji (ang. *pulsatility index*)

PLT- stężenie płytek krwi

POC- przyłóżkowe (dot. metody diagnostycznej/ urządzenia) (ang. *point-of-care*)

PRP- osocze bogatopłytkowe (ang. *platelet-rich plasma*)

RBC- liczba czerwonych krwinek (ang. *red blood cells*)

REDV- wsteczny przepływ końcoworozkurczowy (ang. *reversed end-diastolic velocity*)

ROS- reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

SGA- za mały w stosunku do wieku ciążowego (ang. *small for gestational age*)

SLS- laurylosiarczan sodu (ang. *sodium lauryl sulfate*)

STV- zmienność krótkoterminowa w komputerowej analizie zapisu KTG (ang. *short term variataion*)

TRAP-6- peptyd aktywujący receptor dla trombiny (ang. *thrombin receptor activating peptide-6*)

TXA2- tromboksan A2

UA- tętnica pępowinowa (ang. *umbilical artery*)

UtA- tętnica maciczna (ang. *uterine artery*)

UV- żyła pępowinowa (ang. *umbilical vein*)

vWF- czynnik von Willebranda (ang. *von Willebrand factor*)

1. Wstęp

Wśród ciąż powikłanych małą masą płodu możemy wyróżnić istnienie dwóch grup wyraźnie różniących się wynikami okołoporodowymi. Pierwszą z nich stanowią płody, które są mniejsze z przyczyn konstytucjonalnych, spełniając swój genetyczny potencjał wzrostu. Płody te często określane są w piśmiennictwie jako zbyt małe w stosunku do wieku ciążowego (ang. *small for gestational age*; SGA), a ich wyniki okołoporodowe są zbliżone do wyników płodów o prawidłowym wzrastaniu. Drugą grupę stanowią płody dotknięte patologicznym ograniczeniem wzrastania, wynikającym z niewydolności łożyska lub innych zaburzeń matczynych, płodowych lub łożyskowych. W odróżnieniu od płodów SGA, grupa ta wiąże się z występowaniem niekorzystnych wyników okołoporodowych. Zatem ważną klinicznie kwestią jest odróżnienie zdrowego, prawidłowo rozwijającego się płodu o małej masie, od płodu z zaburzonym wzrastaniem, wymagającym odpowiedniego nadzoru, oraz niejednokrotnie podjęcia decyzji dotyczącej optymalnego terminu i sposobu porodu. Jednocześnie zachowując równowagę pomiędzy zminimalizowaniem ryzyka wewnątrzmacicznego uszkodzenia i śmierci płodu, a występowaniem ryzyka jatrogennego porodu przedwczesnego ¹.

Główną przyczyną wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu (ang. *intrauterine growth restriction*; IUGR) jest niewydolność jednostki maciczno-łożyskowej, która skutkuje zmniejszonym przepływem krwi przez łożysko^{2,3}. Stan ten prawdopodobnie wynika z zaburzenia procesu prawidłowej inwazji trofoblastu w naczynia maciczne na wczesnym etapie ciąży^{4,5}. Dochodzi wówczas do upośledzenia procesu prawidłowej przemiany tętnic spiralnych w naczynia niskooporowe, co skutkuje zmniejszonym dostarczeniem tlenu i substancji odżywczych do płodu⁶. Dokładna patogeneza tego procesu pozostaje niewyjaśniona, ale w związku ze zmianami histopatologicznymi stwierdzanymi w łożysku⁷, przyczyn upatruje się między innymi w nieprawidłowej aktywacji płytek krwi⁸, która może skutkować ich nadmierną agregacją oraz tworzeniem się mikrozakrzepów w małych naczyniach łożyska, ograniczając powierzchnię matczyno-płodowej wymiany⁹. Wydaje się, że reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*; ROS), będące skutkiem stresu oksydacyjnego, mogą inicjować patologiczny proces płytkowej aktywacji, odgrywając istotną rolę w etiopatogenezie tego schorzenia⁹.

Wiedza na temat zaburzeń zachodzących w łożysku, w ciąży powikłanej IUGR (FGR) pozostaje niewystarczająca. Wpływa to na brak możliwości skutecznej profilaktyki oraz leczenia tego schorzenia, a także często wiąże się z wystąpieniem porodu przedwczesnego wraz z jego konsekwencjami. Z drugiej strony niekorzystne środowisko wewnątrzmaciczne poprzez przewlekłe niedotlenienie płodu, wpływa na stan zdrowia oraz jakość życia człowieka dorosłego. Wynika to ze zmiany ekspresji genów i przeprogramowania procesów metabolicznych¹⁰, co przyczynia się do rozwoju chorób układu sercowo-naczyniowego, nadciśnienia tętniczego, oraz zespołu polimetabolicznego w życiu dorosłym¹¹. Może również być jedną z głównych przyczyn wewnątrzmacicznej śmierci płodu (ang. *intrauterine fetal death*, IUFD) na późnym etapie ciąży^{1,12}.

1.1. Wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu (IUGR/FGR)

Wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu, nazywane również płodowym ograniczeniem wzrastania (ang. *fetal growth restriction*; FGR), zostało zdefiniowane jako niezdolność płodu do osiągnięcia swojego wewnętrznego, tj. uwarunkowanego genetycznie potencjału wzrastania¹. Powikłanie to dotyczy ok. 4-6% wszystkich ciąż¹¹. O tym jak złożoną oraz trudną klinicznie patologią jest IUGR (FGR) świadczy fakt, iż najważniejsze światowe towarzystwa zajmujące się medycyną matczyno-płodową różnią się pod względem terminologii, kryteriów diagnostycznych oraz sposobu postępowania w ciąży powikłanej tym zaburzeniem^{1,13-18}. Najczęściej stosowanym progiem służącym rozpoznaniu płodu zbyt małego jest stwierdzenie ultrasonograficznie oszacowanej masy (ang. *estimated fetal weight*, EFW) poniżej 10. percentyla w stosunku dla danego wieku ciążowego^{13,19}. W związku z powyższym w 2016 roku, na drodze międzynarodowego konsensusu wypracowano definicję płodowego ograniczenia wzrastania w oparciu o termin rozpoznania, dzieląc IUGR (FGR) na wczesny (rozpoznany $\leq$ 32. tygodnia ciąży) oraz późny (rozpoznany $>$ 32. tygodnia ciąży). Porozumienie Delfijskie o którym mowa, obejmuje zarówno EFW, jak również obwód brzucha (ang. *abdominal circumference*, AC) poniżej 3. percentyla, oraz brak przepływu końcoworozkurczowego (ang. *absent end-diastolic velocity*, AEDV) w tętnicy pępowinowej (ang. *umbilical artery*, UA) jako niezależne kryteria upoważniające do rozpoznania IUGR (FGR),

lub EFW i/lub AC poniżej 10. percentyla w skojarzeniu z nieprawidłowymi wynikami badań dopplerowskich. Parametry dopplerowskie wchodzące w skład Kryteriów Delfijskich to: wartość indeksu pulsacji (ang. *pulsatility index*, PI) powyżej 95. percentyla w tętnicach macicznych (ang. *uterine artery*, UtA) i tętnicy pępowinowej (UA), oraz wartość wskaźnika mózgowo-łożyskowego (ang. *cerebro-placental ratio*, CPR) poniżej 5. percentyla dla danego wieku ciążowego^{17,18}.

1.1.1. Etiologia IUGR (FGR)

Przyczyny wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu można najogólniej podzielić na matczyne, płodowe i łożyskowe (tabela 1).

Tabela 1. Czynniki etiologiczne IUGR (FGR)¹³

- Czynniki matczyne:
 - Cukrzyca przedciążowa
 - Niewydolność nerek
 - Choroby autoimmunologiczne (np. toczeń układowy rumieniowaty)
 - Siniczne wady serca
 - Choroby nadciśnieniowe związane z ciążą (np. nadciśnienie tętnicze przewlekłe, nadciśnienie ciążowe, stan przedrzucawkowy)
 - Zespół antyfosfolipidowy (APS)
- Stosowanie używek (np. nikotyna, alkohol, kokaina, i inne narkotyki)
- Ekspozycja na teratogeny (np. cyklofosfamid, kwas walproinowy, doustne antykoagulanty)
- Czynniki infekcyjne (np. malaria, CMV, różyczka, toksoplazmoza, kiła)
- Czynniki genetyczne i zaburzenia strukturalne (np. trisomia 13, trisomia 18, wrodzone wady serca czy wytrzewienie)
- Zburzenia łożyskowe i nieprawidłowości sznura pępowinowego
- Ciąża wielopłodowa

IUGR (FGR) będący skutkiem czynników płodowych, takich jak zaburzenia genetyczne, wrodzone malformacje czy infekcje niesie ze sobą diagnozę, której rokowania często nie można poprawić poprzez żadną interwencję. W odróżnieniu od tej grupy, IUGR (FGR) związany z niewydolnością łożyska ma nieco lepszą prognozę, lecz ryzyko niekorzystnych wyników okołoporodowych pozostaje wysokie.

Nieprawidłowa placentacja, która skutkuje ubogą perfuzją łożyskową jest najczęstszą patologią związaną z IUGR (FGR)². W tej sytuacji płody nie osiągają swojego potencjału wzrastania z powodu niedotlenienia oraz niedostatecznej ilości składników odżywczych³. Analiza próbek krwi pochodzących od płodów z IUGR (FGR), uzyskanych drogą kordocentezy wykazała, iż część z nich prezentowała hipoksemię, hiperkapnię, wysoki poziom mleczanów oraz kwasice^{20,21}. Zmniejszona liczba kapilar końcowych w kosmkach trzeciorzędowych łożyska, jest przyczyną zaburzonego transferu matczyno-płodowego⁶. Ponadto w ciążach powikłanych IUGR (FGR), niezależnie od współistnienia stanu przedrzucawkowego, badania histopatologiczne jednostki maciczno-łożyskowej wykazały występowanie zmian miażdżycopodobnych, które całkowicie lub częściowo zamykały tętnice spiralne^{3,7}.

1.1.2. Diagnostyka i klasyfikacja IUGR (FGR)¹

W 2013 roku Figueras i Gratacos, zajmujący się tematem płodowego ograniczenia wzrastania, zaproponowali nowe kryteria diagnostyczne celem odróżnienia zdrowego, konstytucjonalnie małego płodu (SGA) od ciąży powikłanej IUGR (FGR). Utworzyli oni również czterostopniową skalę ciężkości zaawansowania zmian hemodynamicznych występujących u płodu, opartą na ocenie płodowej adaptacji do niekorzystnych warunków środowiska wewnątrzmacicznego oraz zaproponowali protokół postępowania, w zależności od stopnia nasilenia tych zmian. Według Figuerasa i Gratacosa definicja IUGR (FGR) opiera się na ultrasonograficznym stwierdzeniu EFW poniżej 10. percentyla dla danego wieku ciążowego oraz w obecności nieprawidłowego z podanych parametrów, tj. wskaźnika mózgowo-łożyskowego (ang. *cerebroplacental ratio*, CPR), nieprawidłowego przepływu krwi przez tętnice maciczne (ang. *uterine artery*; UtA), wskaźnika pulsacji w tętnicy pępowinowej (ang. *umbilical artery*; UA) lub tętnicy środkowej mózgu (ang. *middle cerebral artery*; MCA). Szacunkowa masa płodu poniżej 3. percentyla stanowi niezależny parametr skorelowany z niekorzystnymi wynikami okołoporodowymi, dlatego też jako pojedyncze kryterium upoważnia do rozpoznania IUGR (FGR)¹. Po ustaleniu rozpoznania na podstawie powyższych kryteriów, zmiany przepływu krwi w tętnicy pępowinowej, tętnicy środkowej mózgu, przewodzie żylnym (ang. *ductus venosus*; DV), cieśni aorty (ang. *aortic isthmus*; AoI) oraz komputerowa ocena zapisu KTG służą określeniu stopnia ciężkości stanu płodu i stanowią podstawę do dalszego postępowania klinicznego. Protokół postępowania zaproponowany przez Figueras i Gratacosa¹ jest

prawdopodobnie, aktualnie jednym z najczęściej stosowanych klinicznych narzędzi diagnostyczno-decyzyjnych w ciąży powikłanych IUGR (FGR). Ten protokół został również przyjęty w moich badaniach.

Tabela 2. Klasyfikacja stopnia zaawansowania zaburzeń hemodynamicznych oraz sposób postępowania w ciąży powikłanej IUGR (FGR)¹

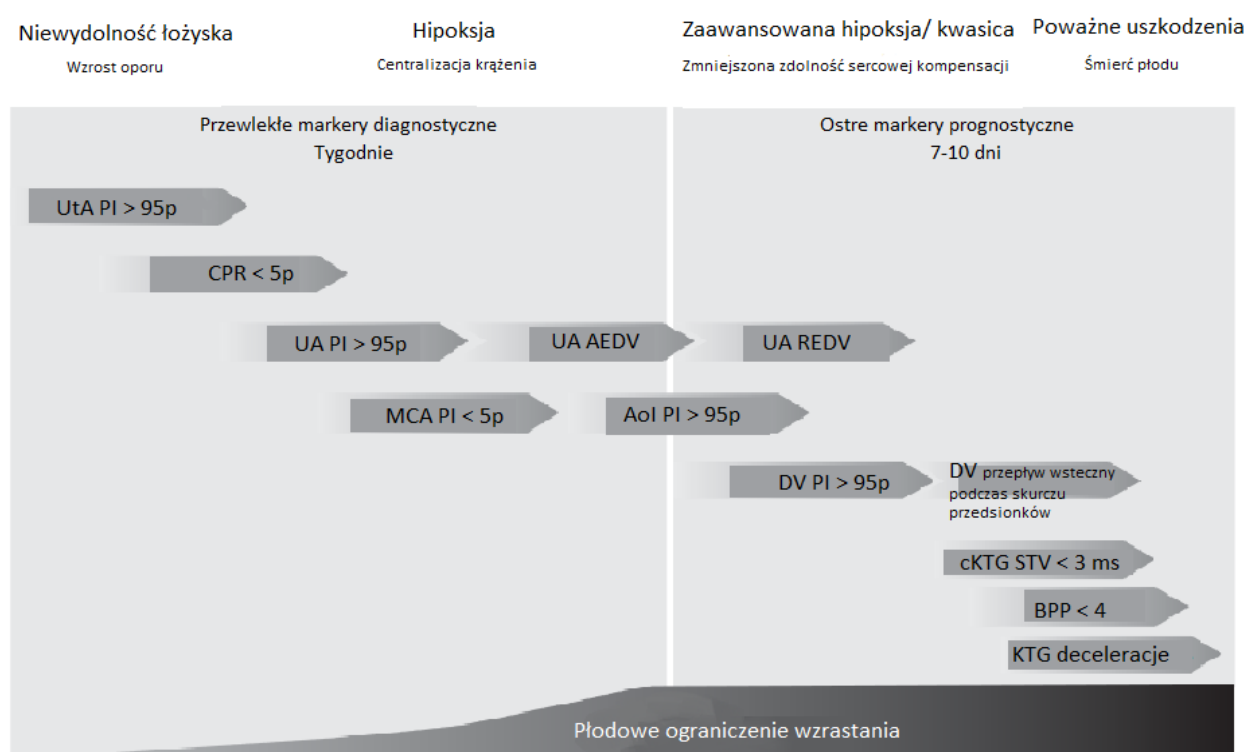
Stopień IUGR	Patofizjologia	Kryteria (min. 1)	Monitorowanie	Termin i sposób porodu
I	Łagodna niewydolność łożyska	EFW < 3 p CPR < 5 p UA PI > 95 p MCA PI < 5 p UtA PI > 95 p	1x w tygodniu	37. tydzień ciąży Indukcja porodu
II	Ciężka niewydolność łożyska	UA AEDV Reverse AoI	2x w tygodniu	34. tydzień ciąży Cięcie cesarskie
III	Niskie podejrzenie płodowej kwasicy	UA REDV DV PI > 95p	Co 24-48 godzin	30. tydzień ciąży Cięcie cesarskie
IV	Wysokie podejrzenie płodowej kwasicy	Wsteczna fala a w DV cKTG < 3 ms FHR deceleracje	Co 12 godzin	26 tydzień ciąży Cięcie cesarskie

Skróty: AEDV- zanik przepływu późnorozkurczowego (ang. *absent end diastolic velocity*); AoI- cieśń aorty (ang. *aortic isthmus*); CPR- współczynnik mózgowo-pępowinowy (ang. *cerebroplacental ratio*); cKTG- komputerowa kardiokotografia; DV- przewód żylny (ang. *ductus venosus*); EFW- szacowana masa płodu (ang. *estimated fetal weight*); FHR- czynność serca płodu (ang. *fetal heart action*); IUGR- wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrostu płodu (ang. *intrauterine fetal growth restriction*); MCA- tętnica środkowa mózgu (ang. *middle cerebral artery*); PI- indeks pulsacji (ang. *pulsatility index*); REDV- odwrócenie przepływu późnorozkurczowego (ang. *reversed end diastolic velocity*); UA- tętnica pępowinowa (ang. *umbilical artery*); UtA- tętnica maciczna (ang. *uterine artery*).

Wystąpienie, którejkolwiek nieprawidłowości w badaniu dopplerowskim, powinno być potwierdzone co najmniej dwukrotnie, najlepiej w odstępie co najmniej 12 godzin.

Płody z wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania można podzielić na dwie różne grupy w zależności od tygodnia ciąży, w którym postawiono rozpoznanie. Podział ten obejmuje płody z IUGR (FGR) o wczesnym początku (ang. *early-onset IUGR*), u których ograniczenie

wzrastania rozpoznano poniżej 32. tygodnia ciąży, oraz płody z IUGR (FGR) o późnym początku (ang. *late-onset IUGR*), u których zaburzenia wzrastania wystąpiły powyżej tego terminu. Pierwsza grupa reprezentuje 20-25% wszystkich ciąż powikłanych płodowym ograniczeniem wzrastania, oraz zazwyczaj wiąże się z jego ciężkim przebiegiem i z współwystępowaniem stanu przedrzucawkowego o wczesnym początku, nawet do 50% przypadków²². Ten typ IUGR silnie koreluje z ciężką niewydolnością łożyska, czego objawem jest nieprawidłowy przepływ krwi w tętnicy pępowinowej, występujący w tej grupie płodów w wysokim odsetku przypadków²³. Wraz z pogarszaniem się wewnątrzmacicznego stanu płodu, prowadzącego do płodowej hipoksji i kwasicy, dochodzi do zaburzeń hemodynamicznych pod postacią nieprawidłowego przepływu krwi w tętnicy pępowinowej oraz żyłach przedsercowych, głównie w przewodzie żylnym. Czas w którym dochodzi do dekompensacji stanu płodu jest indywidualny, ale zazwyczaj trwa tygodnie i często następuje kaskada zmian wg określonego wzorca (Rycina 1), co pozwala monitorować progresję pogarszania się stanu płodu²⁴.



Rycina 1.¹ Rycina przedstawia pogarszanie się stanu płodu i sposób jego monitorowania w przypadku wystąpienia ciężkiego IUGR (FGR) o wczesnym początku (*early-severe FGR*), będącego skutkiem ciężkiej niewydolności łożyska. W sposób uproszczony i schematyczny została przedstawiona typowa kaskada następujących po sobie zmian w badaniu ultrasonograficznym i KTG, uzależniona od stopnia zaburzeń perfuzji łożyska oraz zmian adaptacyjnych występujących u płodu.

Ciężki IUGR (FGR) o wczesnym początku, często wiąże się z poważnymi uszkodzeniami płodów oraz wysoką śmiertelnością występującą przed terminem porodu²⁵. Natomiast grupa płodów z IUGR (FGR) o późnym początku, reprezentuje 70-80 % wszystkich cięż powikłanych IUGR (FGR), a ich związek z stanem przedzucawkowym jest niewielki²². W tej grupie płodów, w odróżnieniu od poprzedniej, stopień zaburzeń łożyskowych jest łagodny, w związku z czym przepływ krwi przez tętnicę pępowinową pozostaje prawidłowy prawie we wszystkich przypadkach. Pomimo prawidłowych wartości UA PI, w tej grupie płodów często występują nieprawidłowe wartości CPR, będące odzwierciedleniem mózgowej wazodylatacji, sugerując uaktywnienie się mechanizmów adaptacyjnych płodu. Natomiast zmiany w przepływie przez DV, praktycznie nie są obserwowane²⁶. W związku z czym typowa, hemodynamiczna sekwencja zmian (przedstawiona na Rycinie 1), pogarszającego się stanu płodu nie występuje w grupie IUGR (FGR) o późnym początku, co wiąże się ze zdecydowanie trudniejszym monitorowaniem tego procesu¹. W konsekwencji, pomimo łagodniejszej natury zaburzeń, płody z IUGR o późnym początku są narażone na ryzyko ostrego i niespodziewanego pogorszenia się stanu płodu tuż przed porodem, co może skutkować nagłą i nieoczekiwaną, wewnątrzmaciczną śmiercią płodu lub prowadzić do wystąpieniem śródporodowych objawów stanu zagrożenia płodu i noworodkowej kwasicy^{27,28}. Podsumowując, w ciąży powikłanej IUGR (FGR) o późnym początku może dojść do szybkiego pogorszenia stanu płodu bez wyraźnie widocznych objawów w badaniu dopplerowskim¹.

Obecnie nie ma skutecznych metod leczenia zaburzeń wzrastania w ciążach powikłanych IUGR (FGR). Dlatego też, ocena dobrostanu płodu oraz wybranie odpowiedniego czasu porodu pozostają główną strategią postępowania^{29,30}.

1.2. Płytki krwi

Płytki krwi odgrywają kluczową rolę w procesie hemostazy, stanowiąc pierwszą linię obrony organizmu przed krwawieniem. Trombocyty to najmniejsze, pozbawione jądra komórki o kształcie dysku, krążące we krwi. Powstają przez fragmentację cytoplazmy megakariocytów w szpiku kostnym. Ich średnica wynosi 3 - 4 μm , a liczba PLT u zdrowego, dorosłego człowieka

znajduje się w zakresie 150 - 400 tys./mm³. Średnia objętość płytki krwi (ang. *mean platelet volume*; MPV) wynosi 7,5 - 10,5 fl. Zmniejszenie zarówno liczby płytek (ang. *platelet count*; PLT), jak również ich objętości wskazuje na upośledzenie procesu trombopojezy. Odsetek dużych płytek (>12 fl) fizjologicznie nie przekracza 30% ich całkowitej liczby. Natomiast małopłytkowość, której towarzyszy podwyższona liczba dużych płytek przemawia za zwiększoną ich utratą. Średni czas życia trombocytów wynosi fizjologicznie 8 - 12 dni, następnie są usuwane z krwi i niszczone przez układ fagocytarny śledziony.

Płytką krwi otoczona jest trójwarstwową błoną, której najbardziej zewnętrzną warstwę stanowi glikokaliks, bogaty w glikoproteiny o właściwościach receptorów dla czynników aktywujących i hamujących czynność płytek. Trombocyty posiadają charakterystyczny cytoszkielet, który pozwala im na utrzymanie dyskoidalnego kształtu oraz umożliwia jego zmianę w następstwie aktywacji³¹. Wewnątrz płytek znajdują się trzy rodzaje ziarnistości: lizosomy, ziarnistości α oraz ziarnistości gęste, a także nieliczne mitochondria. Ziarnistości gęste są bogate w ADP, serotoninę i jony wapnia. Substancje te należą do płytkowych agonistów i służą wzmacnianiu procesu płytkowej aktywacji. W ziarnistościach α zmagazynowane są m.in. białka adhezyjne takie jak fibrynogen, czynnik von Willebranda, a także liczne czynniki wzrostu, krzepnięcia i fibrynolizy³².

1.2.1. Fizjologiczna rola płytek krwi

Płytki krwi odpowiadają za inicjację procesów krzepnięcia, naprawiając uszkodzenia śródbłonna naczyniowego. Są odpowiedzialne przede wszystkim za pierwszą fazę hemostazy, określaną jako hemostaza pierwotna³³. Proces ten składa się z następujących etapów: adhezji, aktywacji, sekrecji, agregacji oraz interakcji z czynnikami krzepnięcia. Krążące we krwi trombocyty nie mają bezpośredniego kontaktu z tkanką łączną, która leży pod komórkami śródbłonna naczyniowego. Gdy dochodzi do przerwania ciągłości tej bariery, płytki ekspozowane na kontakt z włóknami kolagenowymi tkanki łącznej zaczynają z nimi oddziaływać. Oddziaływanie to nie tylko dostarcza powierzchni dla płytkowej adhezji, ale służy także jako silny bodziec ich aktywacji³¹. Proces płytkowej aktywacji następuje nie tylko w wyniku adhezji do macierzy pozakomórkowej, ale również pod wpływem działania licznych agonistów m. in. trombiny, ADP, tromboksanu A2 (TXA₂), adrenaliny, serotonininy, czynnika

aktywującego płytki krwi (ang. *platelet activating factor*; PAF), które inicjują ten proces głównie poprzez ich receptory błonowe. Trombina jest jednym z najsilniejszych płytkowych agonistów i łączy się z receptorem PAR 1 (ang. *Protease – Activated Receptor – 1*)³⁴. ADP aktywuje płytki przez receptory P2Y1 i P2Y12³⁵. TXA2 jest produkowany z kwasu arachidonowego w płytkach przez wrażliwą na aspirynę ścieżkę cyklooksygenazy. Raz uformowany TXA2 może biernie się rozprzestrzeniać przez błonę plazmatyczną i aktywować pozostałe płytki przez receptor znany jako receptor dla tromboksanu. TXA2 podobnie jak ADP wzmacnia sygnał płytkowej aktywacji. Proces ten jest efektywny lokalnie i ogranicza go krótki czas półtrwania tromboksanu, co pomaga ograniczyć rozprzestrzenianie się aktywacji płytek do pierwotnego miejsca uszkodzenia³¹.

Proces płytkowej aktywacji jest zjawiskiem bardzo dynamicznym, w czasie którego dochodzi w płytkach do reorganizacji cytoszkieletu, ekspozycji receptorów dla fibrynogenu oraz sekrecji ziarnistości w procesie egzocytozy. W konsekwencji płytki tracą swój wyraźny dyskowidowy kształt i nabywają nieregularną morfologię z wieloma wystającymi wypustkami. W tym samym czasie następuje wewnątrzkomórkowa fosforylacja białek, dochodzi do przemieszczenia jonów wapnia [Ca^{2+}] wewnątrz cytoplazmy, oraz zmniejszenia stężenia cAMP. Pobudzone zostają również przemiany kwasu arachidonowego³¹. Wysokie stężenie jonów wapnia wewnątrz płytki powoduje aktywację niektórych enzymów, które są nieaktywne przy ich niskim stężeniu³⁶. Zasadniczą rolę w tych procesach odgrywają szlaki metaboliczne inicjowane przez hydrolizę fosfolipidów błonowych. W wyniku płytkowej aktywacji dochodzi do zmiany konformacji receptorów glikoproteinowych IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), tak iż zyskują one zdolność wiązania fibrynogenu, będącego białkowym czynnikiem krzepnięcia krążącym we krwi³⁵, w ten sposób dochodzi do utworzenia połączenia pomiędzy dwoma płytkami. Powstałe w ten sposób mostki fibrynogenowe są warunkiem koniecznym do wystąpienia procesu płytkowej agregacji³³. Jest to końcowy etap szlaku aktywacji trombocytów wspólny dla wszystkich agonistów. Pierwotna agregacja jest procesem odwracalnym, lecz w wyniku aktywacji kaskady krzepnięcia wytwarzana trombina przekształca fibrynogen w obrębie czopa płytkowego w nierozpuszczalny włóknik, który unieruchamia płytki krwi³⁷. Usieciowany skrzep fibrynowy ostatecznie stabilizuje rosnący agregat płytkowy. Płytki ułatwiają ten proces przez dostarczenie prozakrzepowych fosfolipidów, które przyspieszają generację trombiny. W

związku z czym aktywacja płytkowa i odkładanie fibryny są ściśle powiązane, maksymalizując wzrost i siłę czopu hemostatycznego.

W obrębie czopów hemostatycznych znajdują się również pozostałe elementy morfotyczne krwi jak erytrocyty i leukocyty, które przywierają do płytek i komórek śródbłonna za pomocą cząsteczek adhezyjnych i przyczyniają się do powstania odpowiedzi zapalnej towarzyszącej zakrzepicy³⁷. Proces płytkowej aktywacji jest hamowany przez produkowany w komórkach śródbłonna tlenek azot (NO), prostacyklinę PGI₂ oraz śródbłonkową ADP-azę³⁷.

1.2.2. Patofizjologia płytek krwi

Chociaż podstawową funkcją płytek jest utrzymanie hemostazy, to biorą one także udział w procesach zapalnych, tworzeniu odpowiedzi immunologicznej, jak również są przyczyną określonych zaburzeń wynikających z ich lokalnej lub uogólnionej aktywacji³⁸. Zdolność płytek do magazynowania i uwalniania mediatorów stanu zapalnego, substancji przeciwzapalnych, czynników wzrostu i innych biologicznie aktywnych mikrocząsteczek, pozwala odgrywać istotną rolę w modulowaniu funkcji innych komórek. Potrafią inicjować wystąpienie stanu zapalnego poprzez rekrutację leukocytów i komórek progenitorowych do miejsca ich aktywacji. Podczas tego procesu dochodzi na ich powierzchni do ekspresji selektyny P, która jest głównym mediatorem początkowej interakcji leukocytów z aktywowanymi płytkami³⁸. Niektóre z dodatkowych funkcji płytek są mediowane przez substancje wydzielane z ich ziarnistości. Dodatkowe role biologiczne płytek obejmują m. in. ich udział w rozprzestrzenianiu się przerzutów nowotworowych, gojeniu ran, regeneracji wątroby czy tworzeniu odporności przeciwko patogenom. Trombocyty odgrywają również istotną rolę w patogenezie sepsy, zapalenia wątroby, naczyniowej restenozy, ostrym uszkodzeniu płuc oraz procesie odrzucenia przeszczepów³⁸. Płytki krwi uczestniczą także we wszystkich etapach rozwoju blaszki miażdżycowej, poprzez stymulację lokalnego procesu zapalnego oraz uwalnianie licznych chemokin i czynników wzrostu, które nasilają proliferację komórek mięśni gładkich³⁹.

Ponieważ płytki nie mają zdolności syntezy znacznych ilości białek, dlatego nieodwracalna inaktywacja cyklooksygenazy-1 (COX-1) przez aspirynę blokuje syntezę tromboksanu A₂ (TXA₂) na całe życie płytki. Trombocyty, które nie syntetyzują TXA₂ wykazują upośledzoną odpowiedź na stymulację przez część płytkowych agonistów. W związku z tym

aspiryna jest najczęściej używanym lekiem w terapii przeciwplatekcyjnej. W przeciwieństwie do aspiryny inne niesteroidowe leki przeciwzapalne hamują ten enzym w sposób odwracalny⁴⁰.

1.3. Stres oksydacyjny

Metabolizm tlenowy jest dla organizmu bardzo korzystny energetycznie, pozwala na wyprodukowanie znacznie większych ilości energii niż metabolizm beztlenowy. Jednak ów komfort energetyczny naraża komórkę na ryzyko toksycznego oddziaływania tlenu i jego metabolitów. Mitochondria są głównym miejscem w komórce, w którym zużywany jest tlen. Dzięki zdolności do wytwarzania ATP w procesie oddychania komórkowego mitochondria stały się siłą napędową ewolucji. Działając wraz z cyklem Krebsa, łańcuch oddechowy tworzy elektrochemiczny gradient poprzez sprzężone przenoszenie elektronów do tlenu i transport protonów z macierzy przez błonę wewnętrzną do przestrzeni międzybłonowej⁴¹. Tlen cząsteczkowy, który jest utleniaczem, reaguje ze związkami organicznymi, utleniając je, pobiera od nich elektrony, natomiast sam ulega procesowi redukcji. Podstawą procesu oddychania komórkowego, jest pełna redukcja cząsteczki tlenu z wytworzeniem cząsteczki wody, która jest nieaktywna w stosunku do składników komórki. Energia uwalniana podczas tego procesu wykorzystywana jest do syntezy ATP. Jednak cząsteczka tlenu nie zawsze ulega pełnej, czteroelektronowej redukcji. Proces ten może przebiegać w etapach jednoelektronowych, podczas których powstają bardzo aktywne biologicznie metabolity, zwane reaktywnymi formami tlenu (ang. *reactive oxygen species*; ROS)⁴². Z uwagi na obecność jednego lub więcej niesparowanych elektronów ROS zaliczane są do wolnych rodników. Wolne rodniki „dążą” do szybkiego sparowania swoich elektronów, mogą wchodzić w niespecyficzne reakcje z wieloma różnymi cząsteczkami oraz składnikami komórek (lipidami, białkami, enzymami, kwasami nukleinowymi) zmieniając ich funkcje biologiczne⁴². Fizjologiczną funkcją ROS w komórkach jest głównie sygnalizacja komórkowa, ale mają one również wpływ na wrodzoną odpowiedź immunologiczną. Są wykorzystywane do walki z patogenami m. in. poprzez „wybuch oddechowy” fagocytów^{42,43}. W warunkach fizjologicznych wyzwanie oksydacyjne występuje w wielu typach komórek, ale samo to nie stanowi jeszcze stresu oksydacyjnego⁴⁴. Organizmy wykorzystując możliwość bardzo wydajnego posługiwania się

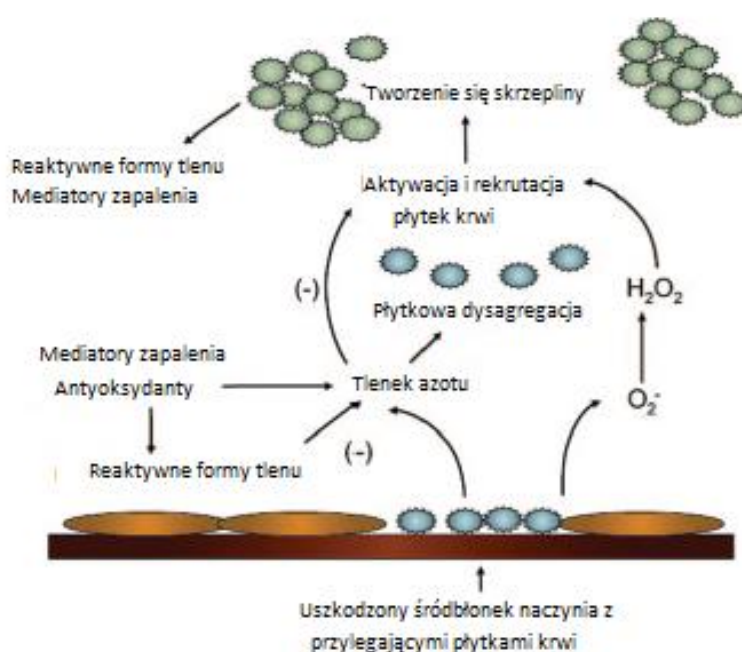
tlenem w procesie oddychania i innych procesach metabolicznych musiały także wykształcić mechanizmy obronne przed jego uszkadzającym działaniem. Stężenie ROS w komórkach jest zatem regulowane przez szlaki enzymatyczne i nieenzymatyczne.⁴² „Stresem oksydacyjnym” nazywamy wobec tego brak równowagi pomiędzy wytwarzaniem reaktywnych form tlenu, a zdolnością układu biologicznego do ich szybkiej utylizacji lub naprawy uszkodzeń powstałych pod wpływem ich działania⁴⁵. Zaburzenie równowagi pomiędzy utleniaczami i przeciwutleniaczami na korzyść utleniaczy, prowadzi do zakłócenia sygnalizacji i kontroli procesów oksydacyjno-redukcyjnych w komórkach, co może być przyczyną uszkodzenia molekularnego⁴⁶. Uważa się, że zjawiska te stanowią podstawę wielu fizjologicznych i patofizjologicznych zjawisk. Uczestniczą w procesach zapalenia, apoptozy, wytwarzania blaszki miażdżycowej, kancerogenezy. Stres oksydacyjny odgrywa również rolę w procesie starzenia się⁴⁶. Reaktywne formy tlenu są heterogenną grupą związków, obejmują jony tlenu, wolne rodniki i nadtlenki. Większość wewnątrzkomórkowych ROS pochodzi z anionu ponadtlenkowego. Do istotnych fizjologicznie ROS należy zaliczyć: nadtlenek wodoru (H_2O_2), anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroksylowy ($\cdot OH$), tlenek azotu, nadtlenoazotyn, rodniki organiczne oraz tlen singletowy⁴⁶. Najbardziej niebezpieczną formą, która powstaje w toku tych przemian jest rodnik hydroksylowy, którego powstanie zależy od dostępności jonów żelaza i miedzi⁴². Rodnik hydroksylowy wydaje się być najbardziej reaktywnym tworem chemicznym jaki występuje w układach biologicznych. Wolne rodniki substancji organicznych: białek, lipidów, kwasów nukleinowych i cukrów, także charakteryzują się wysoką i niespecyficzną reaktywnością. Najbardziej znaną reakcją łańcuchową powstawania wolnych rodników jest peroksydacja lipidów, polegająca na procesie utleniania nienasyconych kwasów tłuszczowych lub innych lipidów, podczas którego powstają nadtlenki tych związków. *In vivo* peroksydacji ulegają przede wszystkim reszty wielonienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzące w skład fosfolipidów błon komórkowych. Procesowi peroksydacji lipidów towarzyszy zjawisko reinicjacji, polegające na tym, że nadtlenki lipidów, czyli produkty peroksydacji, które nie są już wolnymi rodnikami, mogą ulegać rozkładowi prowadząc do powstania produktów znów będących wolnymi rodnikami. Proces ten będący reakcją łańcuchową inicjowany jest przez jony metali przejściowych, zwłaszcza żelaza i miedzi. Proces peroksydacji lipidów zmienia właściwości fizyczne błon komórkowych, powodując zahamowanie aktywności enzymów błonowych i białek transportujących, co w konsekwencji może prowadzić do utraty integralności błon komórkowych^{42,47}. Natomiast aldehydowe

produkty peroksydacji mogą reagować z resztami aminokwasów zmieniając właściwości antygenowe białek, hamować aktywność enzymów oraz zaburzać proces replikacji DNA⁴². Zarówno nadtlenki kwasów tłuszczowych jak i aldehydowe produkty peroksydacji są czynnikami rozprzegającymi fosforylację oksydacyjną w mitochondriach. Zazwyczaj uszkodzenie oksydacyjne prowadzi do szybkiej utraty aktywności biologicznej białka. Jednak w przeciwieństwie do procesu utleniania tłuszczów, peroksydacja białek i kwasów nukleinowych nie ma charakteru reakcji łańcuchowej. Do metabolicznych skutków stresu oksydacyjnego można zaliczyć obniżenie poziomu ATP, zwiększenie stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie, uszkodzenie DNA, zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych, oraz uszkodzenie cytoszkieletu prowadzące do zmiany kształtu komórki, co ma istotne znaczenie w funkcjonowaniu takich komórek jak erytrocyty i trombocyty^{42,48,49}.

1.3.1. Wpływ stresu oksydacyjnego na płytki krwi

Fizjologiczne procesy zachodzące w aktywowanych płytkach krwi wiążą się z zwiększonym zużyciem tlenu powodując zmianę ich potencjału redoks⁵⁰. Reaktywne formy tlenu, które oddziałują na trombocyty mogą pochodzić z źródeł egzogennych, jak również być generowane przez same płytki. Poza ich toksycznym oddziaływaniem, istnieje coraz więcej dowodów, że ROS razem z tlenkiem azotu, adenozyną i prostacykliną, spełniają funkcje regulatorowe w procesie płytkowej aktywacji⁵¹. Nie mniej jednak w warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi do uszkodzania trombocytów, prowadząc do zmiany ich funkcji. Zmiany te mogą skutkować nadmierną aktywacją płytek krwi oraz wzmacniać proces patologicznej agregacji. Stres oksydacyjny może stać się również przyczyną zatrzymania cyklu komórkowego, w konsekwencji wywołując śmierć komórki, niejednokrotnie prowadząc do jej rozpadu. Wyciek produktów rozpadu komórkowego w przypadku trombocytów jest silnym stymulatorem stanu zapalnego, gdyż powoduje napływ leukocytów i makrofagów w poszkodowane regiony⁵². Obecna w płytkach krwi oksydaza NADPH jest kluczowym enzymem generującym ROS w tych komórkach. Produkowany przez nią anion ponadtlenkowy obniża próg dla płytkowej aktywacji, a nawet może indukować spontaniczną agregację⁵¹. Oprócz bezpośredniej aktywacji trombocytów oraz wzmacniania procesu rekrutacji kolejnych płytek krwi do rosnącego skrzepu, anion ponadtlenkowy reaguje również z tlenkiem azotu (NO), zmniejszając

jego działanie antyagregacyjne⁵¹. Następnie w wyniku reakcji enzymatycznych lub nieenzymatycznych anion ponadtlenkowy zostaje przekształcany w inne, fizjologicznie istotne ROS⁵³ m. in. w nadtlenek wodoru (H_2O_2), który jest stosunkowo stabilny i dyfunduje przez błony komórkowe⁵¹. ROS są ważnymi mediatorami zarówno nieprawidłowej funkcji płytek krwi, jak również przyczyniają się do zaburzenia procesu wazodylatacji zależnego od śródbłónka⁵⁴. A zatem procesy utleniania zachodzące w trombocytach mają daleko idący wpływ na homeostazę naczyń⁵⁵. Ponadto wykazano, iż stany niedotlenienia wywołują podwyższone wytwarzanie ROS, mogą zatem wyzwać aktywację i agregację płytek krwi, co zostało udowodnione doświadczalnie i zaobserwowane u pilotów samolotów⁵⁶. Ocena zużycia tlenu i stężenia tlenu wewnątrzkomórkowego w płytkach krwi może być szczególnie przydatna w połączeniu z analizą markerów stresu oksydacyjnego i/lub testów oceniających stopień płytkowej agregacji np. VerifyNow® lub Multiplate®. Powyższe badania mają istotne znaczenie w celu zrozumienia roli trombocytów w patogenezie różnych chorób⁵² oraz potwierdzeniu głębokiej roli ROS w patofizjologii płytek krwi, co wskazuje na uzasadnioną potrzebę rozszerzenia badań klinicznych oceniających i monitorujących stan płytkowej równowagi redoks.



Rycina 2. Schemat przedstawiający rolę stresu oksydacyjnego, antyoksydantów, reaktywnych form tlenu i azotu w procesie uszkodzenia śródbłónka naczyń i powstawania skrzepliny⁵⁰.

Wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu stanowi ważną patologię wikłającą przebieg ciąży, skutkując wzrostem płodowej śmiertelności oraz zachorowalności. Chociaż pierwotne przyczyny IUGR (FGR) nadal nie zostały dokładnie poznane, jednostka ta charakteryzuje się nieprawidłową perfuzją łożyska, która może być skutkiem nadmiernej aktywacji oraz agregacji płytek krwi w naczyniach łożyska, powodując powstawanie mikrozakrzepów, lokalnego stanu zapalnego oraz zmian miażdżycopodobnych, zamykających światło naczyń łożyskowych i skutkując zmniejszonym przepływem krwi. Jedną z możliwych przyczyn lub konsekwencji tego zjawiska może być proces patologicznej aktywacji płytek krwi pod wpływem reaktywnych form tlenu, będących skutkiem lokalnego stresu oksydacyjnego. Poszerzenie wiedzy na temat patomechanizmu zaburzeń zachodzących w łożysku oraz zbadanie roli płytek krwi i markerów stresu oksydacyjnego, w ciąży powikłanej IUGR (FGR) może w przyszłości doprowadzić do wprowadzenia metod skutecznej profilaktyki i leczenia. Stanowiło to stymulację do podjęcia badań w tym zakresie, wyniki których zostały przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej.

2. Cel pracy

W etiologii IUGR (FGR) za główną przyczynę jego powstawania uznaje się niewydolność łożyska wynikająca z procesu nieprawidłowej inwazji trofoblastu w tętnice maciczne. Niemniej dokładna patogeneza tego procesu nie została precyzyjnie wyjaśniona. Biorąc pod uwagę wyniki badań histopatologicznych jednostki maciczno-łożyskowej, oraz zmiany jakim ulegają płytki krwi w trakcie ciąży, uznaje się że mogą one odgrywać ważną rolę w tym procesie.

W związku z powyższym podjęłam badania mające na celu przybliżyć rolę płytek krwi w patogenezie IUGR. Ich **zasadniczym celem** była ocena wybranych parametrów płytek krwi w ciąży powikłanej IUGR. Cel ten realizowano poprzez cele szczegółowe przedstawione poniżej:

- ocenę standardowych parametrów charakteryzujących płytki krwi (PLT, MPV);
- analizę poziomu reaktywnych form tlenu w płytkach krwi;
- ocenę oddychania komórkowego w płytkach krwi;
- ocenę agregacji płytek krwi z zastosowaniem Analizatora Multiplate®.

Uzyskane wyniki odniosłam do stopnia zaawansowania zaburzeń hemodynamicznych w ciąży powikłanej IUGR zdefiniowanych przez Figuerasa i Gratacosa¹.

3. Materiał

W badaniu uczestniczyło 171 kobiet. W ocenianej grupie znalazło się 147 kobiet ciężarnych, (pomiędzy 24. a 41. t. c.), diagnozowanych w Ginekologiczno-Położniczym Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, oraz 24 zdrowe kobiety nieciężarne. Materiał do badań zbierano w latach 2015 - 2020. W badanej populacji wyodrębniono 3 grupy. Grupę zdrowych kobiet, nie będących w ciąży, grupę kontrolną kobiet w ciąży niepowikłanej, oraz grupę pacjentek, u których w ciąży rozpoznano wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu (IUGR/FGR).

Grupa badana (IUGR/FGR) i grupy kontrolne (nieciężarne oraz kobiety w ciąży niepowikłanej) zostały utworzone w oparciu o dobór celowy pacjentek na podstawie kryteriów kwalifikacji i wykluczenia (patrz poniżej) po przeprowadzeniu badania podmiotowego, przedmiotowego, badań laboratoryjnych; w grupie ciężarnych dodatkowo wykonano położnicze badanie ultrasonograficzne oraz badanie kardiotokograficzne. Od wszystkich pacjentek została pobrana krew obwodowa w celu przeprowadzenia badań laboratoryjnych oceniających wybrane parametry płytek krwi.

Po porodzie przeanalizowano wyniki noworodkowe, w związku z czym łącznie zdyskwalifikowano z badania 24 pacjentki. Najczęściej stwierdzanymi przyczynami dyskwalifikacji były rozpoznane po porodzie u noworodka poważne wady strukturalne, zespoły wad, zakażenie wewnątrzmaciczne wywołane przez CMV, rozpoznanie lub podejrzenie zespołu genetycznego, a w jednym przypadku przyczyną dyskwalifikacji był duży guz łożyska. Wśród innych przyczyn dyskwalifikacji znalazły się choroby matki, nie ujawnione przez ciężarną podczas kwalifikacji włączenia do badania, oraz stosowanie przez pacjentkę kwasu acetylosalicylowego w dawce profilaktycznej (n=9), a w 3 przypadkach postawiono ostatecznie rozpoznanie SGA.

3.1. Badana populacja

3.1.1. Grupa nieciężarnych (n=24)

Do grupy kobiet nieciężarnych zakwalifikowano 24 zdrowe kobiety w wieku rozrodczym, które pod względem wieku nie różniły się istotnie od pacjentek z pozostałych grup.

Kryterium wykluczenia w tej grupie stanowiły: ciąża, obecność chorób przewlekłych, stosowanie leków oraz palenie papierosów.

3.1.2. Grupa pacjentek w ciąży o przebiegu niepowikłanym (n=67)

Grupa pacjentek w ciąży o przebiegu fizjologicznym liczyła 67 zdrowych kobiet pomiędzy 24. a 41. tygodniem ciąży. Pacjentki te nie różniły się istotnie pod względem wieku, rodności, masy ciała od pacjentek z grup badanych.

Do kryteriów dyskwalifikacji z tej grupy badawczej należały: ciąża wielopłodowa, choroby przewlekłe i powikłania w przebiegu ciąży, stosowanie leków mogących mieć wpływ na układ hemostazy, oraz choroby i zaburzenia psychiczne uniemożliwiające wyrażenie świadomej zgody na udział w badaniu.

3.1.3. Grupa pacjentek z rozpoznaniem wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania płodu (IUGR/FGR) (n=44)

Kwalifikacja pacjentek do grupy badawczej opierała się na kryteriach diagnostycznych IUGR, zaproponowanych przez Figueras i Gratacosa w *Update on the Diagnosis and Classification of Fetal Growth Restriction and Proposal of a Stage-Based Management Protocol* w 2013 roku¹. Podstawowym kryterium włączenia do tej grupy było stwierdzenie ultrasonograficznie szacowanej masy płodu (EFW) poniżej 3. percentyla dla danego wieku ciążowego lub poniżej 10. percentyla, z współwystępowaniem nieprawidłowości w dopplerowskiej ocenie przepływu krwi w UA, MCA i/lub Uta. Następnie określano stopień zaawansowania zaburzeń hemodynamicznych (tabela 1).

Do kryteriów dyskwalifikacji z badania należały: ciąża wielopłodowa, obecność istotnych chorób przewlekłych i powikłań ciąży mogących wiązać się z zaburzeniami wzrastania płodu (w tym zaburzenia genetyczne, wady strukturalne płodu, choroby autoimmunologiczne, hematologiczne, niewyrównana niedoczynność tarczycy, zakażenia wirusowe i inne).

W grupie pacjentek z rozpoznaniem IUGR (FGR), wyodrębniono grupę kobiet przyjmujących kwas acetylosalicylowy (ASA) w dawce profilaktycznej 150 mg, doustnie (n=9), którą ostatecznie zdyskwalifikowano z badania, w związku z powyższym ostatecznie w badanej grupie pozostały 44 pacjentki.

Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 524/2017). Przed włączeniem do badania uzyskano świadomą, pisemną zgodę od wszystkich pacjentek, zgodną ze wzorem zatwierdzonym przez Komisję Bioetyczną.

4. Metody badawcze

4.1. Podstawowe założenia projektu badawczego

Projekt badawczy podzielono na dwa etapy, z których pierwszy został przeprowadzony w latach 2016 – 2017 we współpracy z Zakładem Medycyny Środowiskowej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Badanie polegało na przeprowadzeniu analizy poziomu reaktywnych form tlenu oraz ocenie poziomu konsumpcji tlenu i wewnątrzkomórkowego poziomu niedoboru tlenu w płytkach krwi badanych kobiet. Drugi etap projektu badawczego przeprowadzono w latach 2019 – 2020, w Klinice Perinatologii i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, polegał na ocenie procesu płytkowej agregacji z zastosowaniem Analizatora Multiplate®.

W badanej populacji kobiet zebrano wywiad ginekologiczny i położniczy, wywiad odnośnie chorób przewlekłych, aktualnie przyjmowanych leków oraz palenia tytoniu. U ciężarnych kobiet przeprowadzono badanie przedmiotowe oraz oceniono dobrostan i wzrastanie płodu w oparciu o badania biofizyczne, ultrasonograficzne z szczegółową oceną parametrów dopplerowskich oraz kardiokograficzne. Następnie odnotowano informacje dotyczące przebiegu porodu, skupiając się przede wszystkim na tygodniu ciąży oraz sposobie ukończenia ciąży. Oceniono również masę urodzeniową ciała, płeć noworodka, a jego stan zdrowia został określony w oparciu o punktację w skali wg. V. Apgar, pH i niedobór zasad we krwi z naczyń pępowinowych pobranej po porodzie. Określono także występowanie powikłań u noworodka takich jak: niewydolność oddechowa, krwawienia dokomorowe, obecność zakażenia oraz długość hospitalizacji po porodzie.

4.2. Agregometria impedancyjna (Multiplate®)

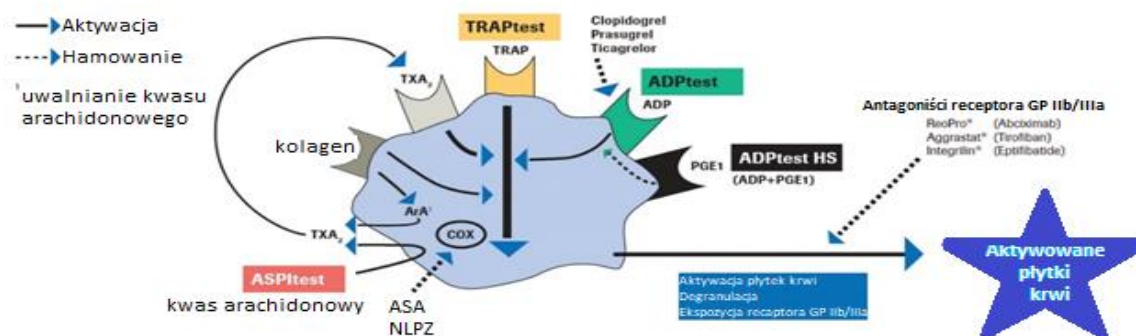
4.2.1. Zasada działania systemu Multiplate

System Multiplate® (ang. *multiple platelet function analyzer*, Rycina 3.) jest wielokanałowym analizatorem czynności płytek krwi, którego działanie opiera się na metodzie agregacji impedancyjnej. Należy do tak zwanych metod przyłózkowych (ang. *point-of-care*; POC), ponieważ daje wyniki po krótkim czasie od rozpoczęcia badania.



Rycina 3. Aparat Multiplate Electrode Analyser

System Multiplate® ocenia czynność płytek w pełnej krwi lub osoczu bogatopłytkowym w ciągu 10 minut od rozpoczęcia analizy. Krew pełną pobiera się do probówek z cytrynianem lub hirudyną, a następnie rozcieńcza się solą fizjologiczną i po dodaniu testów zawierających aktywatory lub inhibitory płytek, poddaje się analizie (Rycina 4).



Rycina 4.⁵⁷ Schemat aktywacji i hamowania funkcji płytki

ADP – adenozyndifosforan, ASA - kwas acetylosalicylowy, COX – cyklooksygenaza, NLPZ - niesteroidowe leki przeciwzapalne, PGE₁ – prostaglandyna E1, TRAP - peptyd aktywujący receptor dla trombiny, TXA₂ – tromboksan A2.

Rodzaje testów zawierające płytkowych agonistów i antagonistów, stosowanych celem oceny funkcji płytek krwi w trakcie analizy z zastosowaniem Analizatora Multiplate® przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Rodzaje testów zawierające płytkowych agonistów i antagonistów

Test/Odczynnik	Stosowany agonista/ Antagonista	Efekt
ADPtest	ADP	Aktywacja płytek indukowana przez ADP, wrażliwa na kłopidogrel, prasugrel i innych antagonistów receptora ADP.
ASPItest	Kwas arachidonowy	Agregacja zależna od COX1, wrażliwa na ASA, NLPZ i inne inhibitory cyklooksygenazy płytkowej
COLtest	Kolagen	Agregacja indukowana kolagenem
RISTOtest	Ristocetyna	Agregacja zależna od vWF i GpIb
TRAPtest	TRAP-6	Stymulacja płytek przez receptor trombiny, wrażliwa na antagonistów receptora IIb/IIIa
Odczynnik ASA	Inhibitor cyklooksygenazy	Dodanie odczynnika ASA do próbki krwi prowadzi do zmniejszenia odpowiedzi agregacji w testach ASPItest i COLtest
Odczynnik będący antagonistą receptora GpIIb/IIIa	Inhibitor płytkowego receptora GpIIb/IIIa	Jego dodanie do próbki krwi prowadzi do silnie zredukowanej agregacji w teście TRAPtest
Odczynnik Prostaglandyna E1	PGE1	Zahamowanie agregacji następuje w wyniku wzrostu cAMP w płytkach poprzez aktywację cyklicznej adenylozylcyklicznej. Służy do oceny dodatniej (tj. nieprawidłowej) kontroli testu ADPtest. Jest testem tzw. wysokiej czułości (ang. <i>High Sensitivity</i> ; HS)

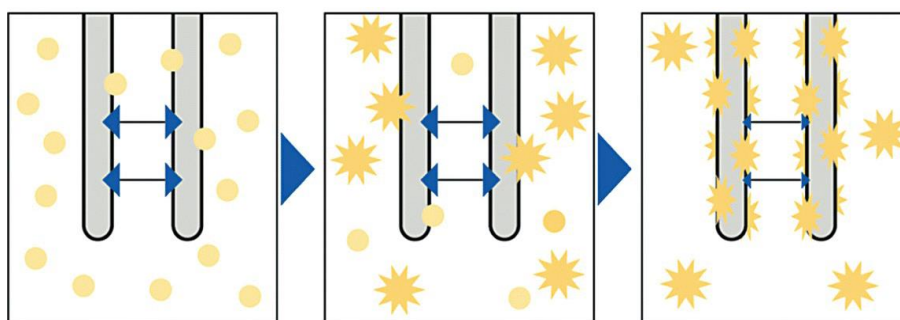
Skróty: ADP- adenozyndifosforan, ASA- kwas acetylosalicylowy, cAMP- cykliczny adenozyndifosforan, COX1- cyklooksygenaza 1, GpIb- glikoproteina Ib, NLPZ- niesteroidowe leki przeciwzapalne, PGE1- prostaglandyna E1, TRAP-6- peptyd aktywujący receptor dla trombiny (ang. *thrombin receptor activating peptide-6*), vWF- czynnik von Willebranda.

W trakcie analizy dwie elektrody są zanurzone w próbce krwi z mieszałem (Rycina 5).



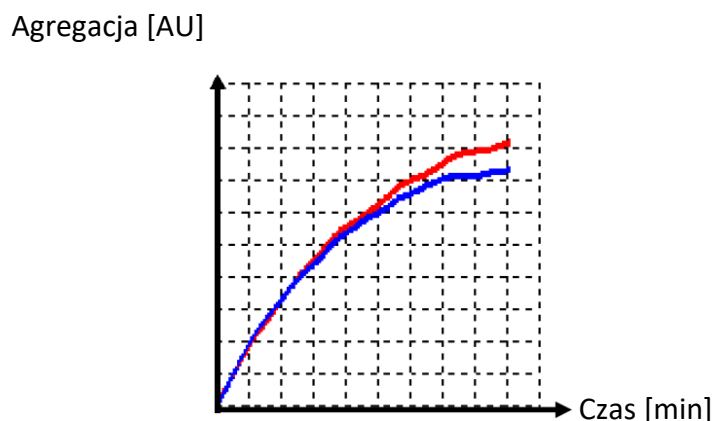
Rycina 5. Schemat komory testowej Multiplate® Test Cells⁵⁸

Podczas procesu agregacji płytki gromadzą się na elektrodach, co powoduje zmianę oporu elektrycznego pomiędzy nimi (Rycina 6).



Rycina 6.⁵⁸ Schemat przedstawiający gromadzenia się płytek na elektrodach aparatu.

System wykrywa zmianę przewodnictwa elektrycznego na dwóch niezależnych elektrodach, a zmiana oporu podczas analizy jest zapisywana w sposób ciągły. System Multiplate® wykorzystuje innowacyjną „wielokrotną agregację elektrodową”, co oznacza, że podczas każdego pomiaru wykonywane jest podwójne oznaczenie (Rycina 7).



Rycina 7.⁵⁸ Pole pod krzywą jest miarą agregacji w czasie (AU*min)

W trakcie pomiaru badane są takie parametry jak agregacja (ang. *aggregation*), która zdefiniowana została jako wzrost impedancji w trakcie analizy oraz prędkość (ang. *velocity*), odpowiadająca maksymalnemu nachyleniu krzywej agregacji. Wyniki wyrażane są w jednostkach pola pod krzywą (ang. *area under the curve*; AUC)⁵⁹, jako średnie wartości z dwóch niezależnych pomiarów (dwóch elektrod). Parametr AUC zależy zarówno od całkowitego zwiększenia impedancji, jak i od kinetyki procesu agregacji i stanowi parametr najlepiej charakteryzujący proces agregacji podczas badania w urządzeniu Multiplate®. Dane statystyczne dwóch pomiarów: „odchylenie od średniej” i „współczynnik zmienności” są obliczane przez wewnętrzne oprogramowanie systemu Multiplate®.

4.2.2. Metodyka badania Multiplate®

W celu wykonania badania Multiplate® od każdej pacjentki pobiera się krew z żyły obwodowej z zastosowaniem minimalnego ucisku stazy. Krew pobiera się bezpośrednio do probówek z systemem zamkniętym zawierającym hirudynę w stężeniu > 15µg/ml (S-Monovette® Hirudin 1,6 ml). Stosuje się igły o dużej średnicy, 21 G lub większym, w skali Gauge, celem redukcji ryzyka potencjalnej aktywacji płytek krwi w trakcie pobierania próbek. Zwraca się uwagę, aby próbówka była wypełniona krwią do oznaczonego przez producenta poziomu. Następnie krew miesza się z antykoagulantem poprzez łagodne odwracanie próbówki 4-5 razy, bez wytrząsania. Oznaczenia wykonuje się pomiędzy 30. a 180. minutą od pobrania krwi. Procedura pomiaru odbywała się zgodnie z zaleceniami producenta odczynników przez osoby

odpowiednio przeszkolone w Klinice Perinatologii i Ginekologii UM im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Stopień płytkowej agregacji został określony za pomocą agregometru impendancyjnego Multiplate®. Analizy firmy Dynabyte, MEA (ang. *Multiplate Electrode Aggregometry*) z użyciem testów ASPItest oraz TRAPtest. Za pomocą pipety automatycznej odmierza się 300 µl krwi pełnej zmieszanej z antykoagulantem (hirudyną) i umieszcza się ją w kuwecie pomiarowej Multiplate® Test Cells zawierającej dwie elektrody oraz mieszadło magnetyczne. Po rozcieńczeniu krwi taką samą objętością roztworu 0,9% NaCl, całość poddaje się 3- minutowej inkubacji w temperaturze 37 °C. Następnie dodaje się 20 µl roztworu zawierającego płytkowego agonistę, używając w tym celu ASPItest lub TRAPtest, a zapis zmian impedancji elektrod rejestrowany jest przez aparat w sposób ciągły przez 6 minut⁵⁹. W trakcie badania elektrody pokrywają się płytkami, z dalszą adhezją agregatów po dodaniu agonistów. Masa płytek przylegająca do elektrod zmienia ich opór wraz z czasem trwania badania, który jest monitorowany i zapisywany. Próbkę krwi od każdej pacjentki zakwalifikowanej do badania poddano dwóm analizom, z zastosowaniem testów ASPItest i TRAPtest, a wyniki obu pomiarów zostały wyrażone w jednostkach AUC.

System Multiplate® zawiera jednorazowe kuwety i znormalizowane odczynniki⁶⁰. W połączeniu z komorami testowymi jednorazowego użytku pozwala to na osiągnięcie dużej niezawodności i bezpieczeństwa.

4.3. Ocena metabolizmu tlenowego oraz stresu oksydacyjnego

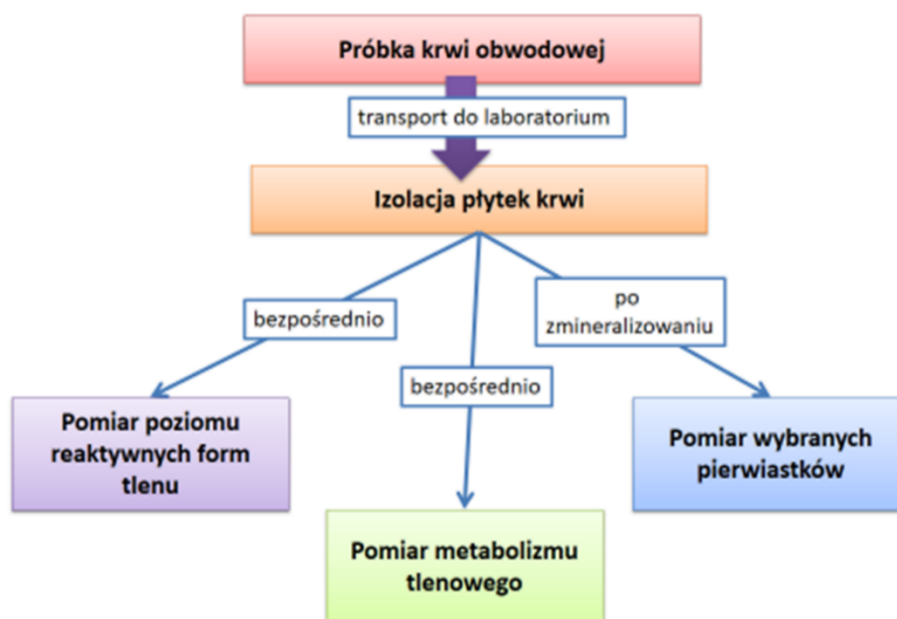
Ogólna zasada działania większości metod wykrywających oraz monitorujących wewnątrzkomórkowy poziom ROS polega na zamianie związku niefluorescencyjnego, przepuszczalnego przez błonę komórkową, na związek dający fluorescencję pod wpływem działania ROS wewnątrz komórki. Sygnał fluorescencji jest więc proporcjonalny do wewnątrzkomórkowego poziomu ROS i może zostać wykryty z zastosowaniem czynnika wielopłytkowego wyposażonego w detektor wzbudzenia i emisji sygnału o określonej długości fali^{52,61,62}. Istotne znaczenie ma fakt, że ROS mają bardzo niską stabilność, dlatego analizy

należy przeprowadzać wyłącznie na świeżych komórkach i możliwie jak najszybciej po ich pobraniu. Obecnie najszerzej stosowanym związkiem wykorzystywanym do monitorowania wewnątrzkomórkowego poziomu ROS jest diacetat dichlorodihydrofluoresceiny (DCFDA)^{63–65}.

4.3.1. Metoda izolacji płytek

Od każdej pacjentki, celem wykonania badań pobrano krew z żyły obwodowej, z zastosowaniem minimalnego ucisku stazy. Krew pobierano bezpośrednio do probówek z systemem zamkniętym zawierających aktywny antykoagulant w postaci cytrynianu sodowego z kwasem cytrynowym oraz dekstrozą (ang. *acid-citrate-dextrose*; ACD) w objętości 2 x 6ml (probówki BD Vacutainer® z ACD). Końcowe stężenia antykoagulantów we krwi wynosiły odpowiednio: cytrynian sodowy 1/89 mg/m; kwas cytrynowy 0,69 mg/m; glukoza 2,1 mg/mL; sorbinian potasowy 0,03 mg/mL. Stosowano igły o dużej średnicy, 21 G lub większym, w skali Gauge, celem redukcji ryzyka potencjalnej aktywacji płytek krwi w trakcie pobierania próbek. Zwracano uwagę, aby probówka była wypełniona krwią do oznaczonego przez producenta poziomu. Następnie krew mieszano z antykoagulantem poprzez łagodne odwracanie probówki 4-5 razy, bez wytrząsania. Niezwłocznie po pobraniu krwi, probówki z materiałem do badań transportowano w temperaturze pokojowej, między 20 a 25 °C , w pojemniku izotermicznym, w pozycji pionowej, do laboratorium Zakładu Medycyny Środowiskowej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, gdzie bezpośrednio po dostarczeniu materiału wykonano dalsze oznaczenia, nie przekraczając 40 minut pomiędzy godziną pobrania krwi, a godziną rozpoczęcia badania. Analizy wykonane były zgodnie z zaleceniami producenta odczynników przez przeszkolony, doświadczony zespół Zakładu Medycyny Środowiskowej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu.

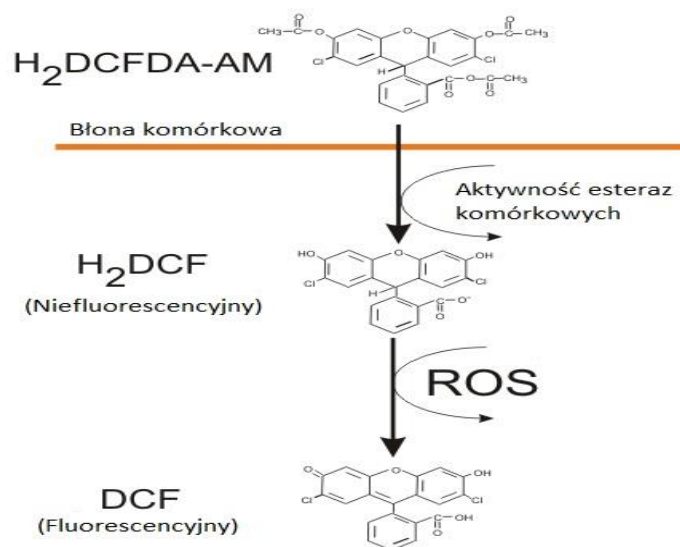
Niezwłocznie po przekazaniu materiału do laboratorium, w wyniku procesu wirowania przygotowywano osocze bogatopłytkowe (ang. *platelet-rich plasma*; PRP), z którego następnie wyizolowano płytki krwi.



Rycina 8. Metodyka dotycząca oceny metabolizmu tlenowego oraz stresu oksydacyjnego w płytkach.

4.3.2. DCFDA – ocena wewnątrzkomórkowego poziomu reaktywnych form tlenu (ROS)

W celu zbadania poziomu reaktywnych form tlenu w płytkach krwi pacjentek wykorzystano metodę opartą o 2',7'- dwuocian dichlorofluoresceiny (DCFDA) dostępny wraz z zestawem Cellular ROS Assay Kit® (Abcam, Wielka Brytania). DCFDA jest barwnikiem fluorogennym, który przenika przez błonę komórkową i umożliwia pomiar aktywności hydroksylowej, nadtlenkowej oraz aktywności innych reaktywnych form tlenu (ROS) w komórce. Związek ten po przedyfundowaniu przez błonę komórkową jest trawiony do zredukowanej formy przez esterazy komórkowe. Następnie cząsteczka ta jest utleniana przez szereg reaktywnych form tlenu do 2',7'- dichlorofluoresceiny (DCF). DCF jest związkiem o wysokiej fluorescencji, który można wykryć za pomocą spektroskopii fluorescencyjnej przy maksymalnych widmach wzbudzenia i emisji wynoszących odpowiednio 485 nm i 535 nm (Ryciny 8 i 9).



Rycina 9. Schemat metabolizmu wewnątrzkomórkowego DCFDA.

Badanie z zastosowaniem DCFDA mierzy poziom ROS w komórkach ilościowo - poziom fluorescencji może zostać zmierzony za pomocą oceny mikropłytkowej, cytometrii przepływowej lub mikroskopu fluorescencyjnego. Podczas analizy wyników podaje się wartość intensywności fluorescencji w danym punkcie czasowym. Wyniki wyrażane są w jednostkach fluorescencji (ang. *fluorescence units*; FU), które uzyskuje się na podstawie pomiaru fluorescencji w określonym punkcie czasowym, zmierzonym 30 minut po inkubacji w ciemności z DCFDA. DCFDA nie jest kompatybilny z próbkami utrwalonymi, dlatego zabarwione komórki muszą być mierzone przyżyciowo⁶⁶.

Wyizolowane płytki krwi, w stężeniu 1×10^6 komórek/ml umieszczono w buforze i odwirowano, następnie poddano inkubacji z $20 \mu M$ roztworu DCFDA w temperaturze $37^\circ C$ przez 30 minut, w ciemności. Następnie ponownie odwirowano płytki i usunięto supernatant w celu pozbycia się nadmiaru DCFDA. Komórki umieszczono na płytce 96-dołkowej ($1,5 \times 10^5$ komórek/50 μL /dołek). Natychmiast po wysianiu komórek na płytkę zmierzono poziom fluorescencji używając multidetekcyjnego czytnika, wyposażonego w detektory fluorescencji z sygnałem odczytu Ex/Em: 485/535 nm. Wyniki wyrażono w jednostkach fluorescencji (ang. *fluorescence units*; FU) (ryc. 10)⁶⁶.

Wyizolowane komórki



Barwienie komórek roztworem DCFDA na płytce 96 – dołkowej, w temp. 37 st. C, w ciemności



Pomiar fluorescencji (Ex/Em = 485/535 nm) w czytniku multidetekcyjnym wyposażonym w detektory fluorescencji⁶⁶

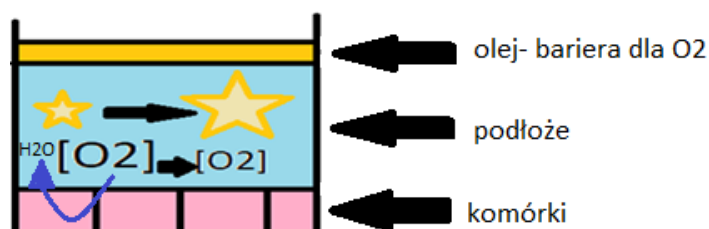
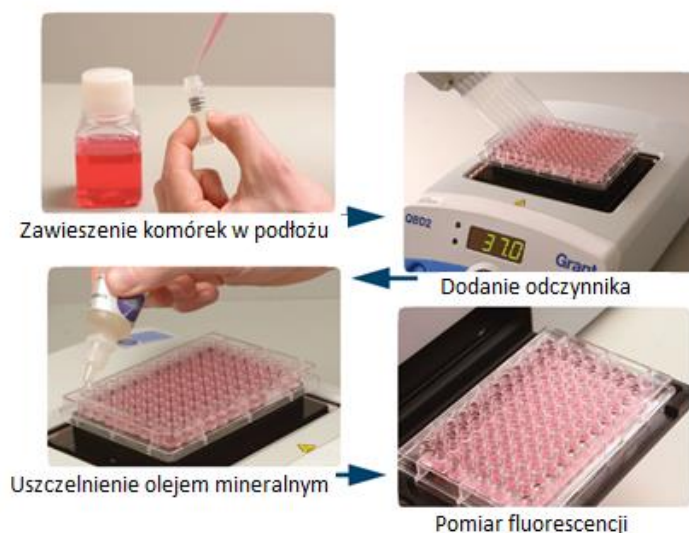
Rycina 10. Schemat oceny wewnątrzkomórkowego poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) ⁶¹

4.3.3. MitoXpress® Xtra – badanie konsumpcji tlenu

MitoXpress® Xtra umożliwia ocenę oddychania komórkowego poprzez pomiar pozakomórkowego zużycia tlenu (ang. *oxygen consumption rates*; OCR) przez komórki lub wyizolowane mitochondria w czasie rzeczywistym. Metoda ta pozwala określić tempo oddychania komórkowego dla charakterystyki metabolicznej. Badanie metabolizmu żywych komórek zapewnia wgląd w funkcje komórkowe, oraz pozwala określić rolę zaburzonego metabolizmu w patogenezie choroby. W miarę oddychania komórkowego zmniejsza się stężenie tlenu rozpuszczonego w płynie zewnątrzkomórkowym w badanej próbce, powoduje to wzrost sygnału w teście MitoXpress® Xtra, który jest miarą zużycia tlenu, przy czym tempo wzrostu fluorescencji odzwierciedla tempo zużycia tlenu. Odczynnik wykorzystywany w teście jest fluoroforescencją wrażliwym na tlen, opartym na biopolimerach. Jest chemicznie stabilny i obojętny, rozpuszczalny w wodzie i nieprzepuszczalny dla komórek⁶⁷. Sygnał fluorescencyjny uwalniany przez sondę jest wygaszany przez tlen, a zatem im mniejsze stężenie tlenu cząsteczkowego (O₂) dookoła komórki, tym większy jest sygnał fluorescencyjny, rejestrowany przez czytnik wielopłytkowy wyposażony w odpowiednie filtry wzbudzenia/emisji. Im wyższy sygnał fluorescencyjny sondy, tym więcej komórka konsumuje i zużywa tlenu, co odzwierciedla aktywność mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Pomiar konsumpcji tlenu przez komórkę jest więc ważnym wskaźnikiem jej funkcji. W stanie chorobowym związanym z zaburzonym metabolizmem lub dysfunkcją mitochondriów może zwiększyć się

podatność komórki na stres, co prowadzi do upośledzenia jej funkcji i wiąże się z występowaniem niektórych chorób^{68,69}.

Wyizolowane płytki krwi, zawieszone w roztworze, umieszczano na mikropłytkce 96-dołkowej, o gęstości $5-6 \times 10^5$ komórek/dołek. Po dodaniu 10 μ l roztworu MitoXpress® Xtra do każdego dołka, niezwłocznie uszczelniono każdy dołek poprzez delikatnie nałożenie 100 μ l oleju mineralnego HS, który został wstępnie ogrzany do temperatury pomiaru 37 °C. Następnie dokonano pomiaru poziomu fluorescencji używając multidetekcyjnego czytnika, wyposażonego w detektory fluorescencji. O stopieniu zużycia tlenu świadczyła intensywność sygnału fluorescencyjnego w chwili pomiaru. Podczas odczytu temperatura czytnika płytek wynosiła 37°C. Długości fal wynosiły odpowiednio 380 ± 20 nm dla wzbudzenia i 650 ± 20 nm dla emisji⁶⁷.



Rycina 11. Schemat przedstawiający sposób przygotowania oraz przebieg badania oceniającego pomiar konsumpcji tlenu z zastosowaniem MitoXpress® Xtra⁶⁷

4.3.4. MitoXpress® Intra - wewnątrzkomórkowy test tlenowy

Dostępność tlenu na poziomie komórkowym ma znaczący wpływ na fizjologię komórek, wewnątrzkomórkową transdukcję sygnałów oraz metabolizm. Test MitoXpress® Intra służy do ilościowego oznaczania wewnątrzkomórkowego stężenia tlenu (O_2) w żywych komórkach, w czasie rzeczywistym. Pomiar ten pozwala na określenie stanu natlenienia lub niedotlenienia wewnątrzkomórkowego. Metoda badania oparta jest na zastosowaniu opatentowanej nanocząsteczkowej sondy wrażliwej na działanie tlenu (O_2), która przenikając przez błonę komórkową ma zdolność penetrowania do wnętrza komórki. Fluorofor wykorzystywany w teście jest chemicznie stabilny i obojętny. Tlen tłumi fosforyzującą emisję sondy, dlatego sygnał pomiarowy (Ex/Em: 380 nm/650 nm) jest odwrotnie proporcjonalny do wewnątrzkomórkowego stężenia tlenu. Emisja fosforu przez sondę MitoXpress®-Intra jest tłumiona przez tlen molekularny w taki sposób, że zmniejszenie stężenia tlenu powoduje wzrost mierzonego sygnału. Emisja sondy może być monitorowana za pomocą fluorescencyjnych czytników płytek. Pomiar wewnątrzkomórkowego stężenia tlenu ma istotne znaczenie w badaniach dotyczących stanu hipoksji, stresu oksydacyjnego oraz metabolizmu nowotworów⁷⁰.

Wyizolowane płytki krwi umieszczono na 96- dołkowej mikropłytkce, tak aby gęstość komórek wynosiła zazwyczaj 30 000 - 80 000 na dołek. Dwa dołki pozostawiono wolne od dodatku odczynnika MitoXpress® Intra, jako ślepe próby kontrolne. Używając pipety wielokanałowej lub pipety typu repeater, dodano 100 μ l podgrzanego, odpowiednio przygotowanego roztworu MitoXpress® Intra do każdego dołka. Następnie ogrzano urządzenie do temperatury 37 °C. Czas przygotowywania płytek został ograniczony do minimum. Niezwłocznie dokonano pomiaru poziomu fluorescencji używając multidetekcyjnego czytnika, wyposażonego w detektory fluorescencji. Mierzono sygnał wyjściowy fluorescencji.

4.4. Metodyka badania krwi obwodowej

W celu wykonania morfologii krwi obwodowej, krew pobierano do probówek o objętości 2,7 ml z antykoagulantem EDTA (wersenian dwupotasowy). Użyto zestawów aspiracyjno-próżniowych jednorazowego użytku typu Monovette®. Probówki po pobraniu krwi, kilkakrotnie obracano w celu zmieszania krwi z antykoagulantem.

Do wykonywania oznaczeń zastosowano Aparat SYSMEX XN-1000. Krwinki białe oznaczone zostały metodą fluorescencyjnej cytometrii przepływowej w bloku detektora optycznego. Podczas analizy z zastosowaniem cytometrii przepływowej z wykorzystaniem lasera półprzewodowego znakowane komórki otoczone były płynem spłaszczającym, tak by przechodziły pojedynczo przez strefę pomiaru. Komórki naświetlano zogniskowaną/spolaryzowaną wiązką lasera. Podczas badania światło ulega rozproszeniu wzbudzając przy tym przyłączone do komórek fluorochromy. Intensywność czołowego światła rozproszonego wskazuje na objętość komórki, a intensywność bocznego światła rozproszonego wskazuje na strukturę wewnętrzną komórki, tj.: jądro oraz ziarnistości. Intensywność bocznej fluorescencji wskazuje na zawartość DNA i RNA. Powstałe sygnały mierzone są za pomocą detektorów i przekształcane na impulsy elektryczne tzw. metoda impedancyjna, lub oceniane optycznie. Dioda laserowa emituje falę $\lambda = 633 \text{ nm}$.

Liczbę czerwonych krwinek (ang. *red blood cells*; RBC) i płytek krwi (ang. *platelet count*; PLT) oznaczono przy pomocy metody impedancyjnej/konduktometrycznej. Analizator hematologiczny rutynowo zlicza płytki metodą impedancyjną (PLT-I).

Stężenie hemoglobiny (HGB) oznaczone zostało przez detektor przy użyciu środka powierzchniowo czynnego siarczanu laurylu sodu (ang. *sodium lauryl sulfate*; SLS) metodą fotometryczną. W trakcie analizy krwinki czerwone są hemolizowane, a następnie zachodzi zmiana konformacji cząsteczki globiny przy 535 nm oraz drugi pik przy 560 nm.

Średnia objętość płytek krwi (ang. *mean platelet volume*; MPV) jest parametrem wyliczanym z następującego wzoru:

$$\text{MPV [fl]} = (\text{PCT [\%]} / \text{PLT [tys./mm}^3]) \times 10000,$$

gdzie PCT oznacza hematokryt płytkowy, będący wskaźnikiem objętości płytek krwi, który wyliczany jest z częstotliwości rozkładu płytek krwi.

4.5. Ocena dobrostanu i wzrastania płodu

Pierwszym krokiem w ocenie wzrastania płodu była weryfikacja wieku ciążowego na podstawie daty ostatniej miesiączki oraz wyników badania ultrasonograficznego długości ciemieniowo-siedzeniowej (ang. *crown rump length*; CRL) z pierwszego trymestru ciąży, jeśli były dostępne¹⁶. Pomiar długości ciemieniowo-siedzeniowej wykonany do 13. tygodnia ciąży + 6 dni jest najdokładniejszą metodą służącą ustaleniu lub potwierdzeniu wieku ciążowego, a jej dokładność wynosi ± 5 -7 dni⁷¹⁻⁷³.

Szacowaną masę ciała płodu (ang. *estimated fetal weight*; EFW) wyznaczano ultrasonograficznie wg reguły Hadlock'a na podstawie pomiarów głowy: obwodu (ang. *head circumference*; HC) i wymiaru dwuciemieniowego (ang. *biparietal diameter*; BPD), obwodu brzucha (ang. *abdominal circumference*; AC) i długości kości udowej (ang. *femoral length*; FL)⁷⁴. Następnie wynik EFW odnoszono do wartości referencyjnych dla danego wieku ciążowego.

Badania dopplerowskie przepływu krwi wykonywano przy pomocy aparatu firmy GE Voluson E8, zaopatrzonego w głowice o zmiennej częstotliwości 3.5 oraz 5.0 MHz, pracujące w czasie rzeczywistym z opcją fali pulsacyjnej oraz kodowania kolorem. Ciężarna w trakcie badania znajdowała się w pozycji półleżącej, z lekko uniesionym prawym bokiem, celem uniknięcia zmian hemodynamicznych wywołanych uciskiem na żyłę główną dolną. Wszystkie badania dopplerowskie wykonywane były podczas nieobecności aktywności ruchowej i oddechowej płodu. Przeanalizowano przepływy krwi w tętnicy macicznej (ang. *uterine artery*; UtA) obustronnie, w tętnicy pępowinowej (ang. *umbilical artery*; UA), żyłę pępowinową (ang. *umbilical vein*; UV) i tętnicy środkowej mózgu płodu (ang. *middle cerebral artery*; MCA), przewodzie żylnym (ang. *ductus venosus*; DV) oraz cieśni aorty płodu (ang. *aortic isthmus*; AoI), jeśli były dostępne. Wyznaczano współczynnik pulsacji (ang. *pulsatility index*; PI) w UA oraz MCA i obliczano wskaźnik mózgowo-pępowinowy (ang. *cerebro-placental ratio*; CPR) będący stosunkiem MCA-PI do UA-PI. Zgodnie z protokołem zaproponowanym przez Figueras i Gratacosa, za wartości nieprawidłowe w UtA, UA oraz DV przyjęto wartości PI powyżej 95 percentyla, natomiast w MCA poniżej 5 percentyla¹. Wskaźnik CPR określano jako nieprawidłowy jeśli jego wartości znajdowały się poniżej 5 percentyla. Oceniono również występowanie: przepływu wstecznego w AoI, wstecznej lub zerowej fali a w DV, braku

przepływu końcoworozkurczowego (ang. *absent end-diastolic velocity*; AEDV) lub obecność wstecznego przepływu końcoworozkurczowego (ang. *reversed end-diastolic velocity*; REDV) w UA.

IUGR (FGR), czyli wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu, stwierdzano, gdy szacowana masa płodu znajdowała się poniżej 3. percentyla lub gdy znajdowała się poniżej 10. percentyla wraz z towarzyszącymi nieprawidłowościami w badaniach Dopplerowskich, tj. UA-PI powyżej 95. percentyla i/lub MCA-PI poniżej 5. percentyla i/lub CPR poniżej 5. percentyla i/lub UtA-PI powyżej 95. percentyla. SGA, czyli płód zbyt mały w stosunku do wieku ciążowego, rozpoznawano, gdy szacowana masa płodu znajdowała się pomiędzy 3. a 10. percentylem bez towarzyszących nieprawidłowości w przepływie krwi ocenionych metodą Dopplera.

Dobrostan płodu oceniano również na podstawie analizy zapisu badania kardiotokograficznego (KTG). Jako nieprawidłowy uznawano zapis KTG, w którym pojawiały się deceleracje bez występowania czynności skurczowej macicy¹.

Rozpoznanie IUGR (FGR) oraz stopień ciężkości zaawansowania klinicznego określano na podstawie protokołu zaproponowanego przez Figueras i Gtaracosa¹, korzystając ze stworzonego w tym celu kalkulatora, zamieszczonego na stronie <https://medicinafetalbarcelona.org/calc/>⁷⁵.

4.6. Parametry charakteryzujące przebieg ciąży, porodu i stan noworodka

W ocenie przebiegu ciąży przeanalizowano między innymi wiek ciążowy w czasie porodu, który został wyznaczony na podstawie reguły Naeglego, czyli pierwszego dnia ostatniej miesiączki lub w oparciu o pomiar CRL w pierwszym trymestrze ciąży. Określono czy poród odbył się o czasie czy przedwcześnie. Poród przedwczesny zdefiniowano jako poród, który nastąpił przed skończonym 37. tygodniem trwania ciąży⁷⁶.

Analizie poddano sposób ukończenia ciąży (poród siłami natury, operacja kleszczowa, próżnociąg położniczy lub cięcie cesarskie). Jeśli poród ukończono drogą cięcia cesarskiego analizie poddano rodzaj wskazań, tj. pilne lub elektywne.

Stan noworodka bezpośrednio po porodzie oceniano w oparciu o metodę zaproponowaną przez V. Apgar, na podstawie której, w pierwszej, piątej i dziesiątej minucie życia dziecka określano następujące parametry: kolor skóry, czynność serca, reakcję na bodźce, napięcie mięśniowe oraz oddech. Za każdą cechę można było przyznać 2, 1 lub 0 punktów. Noworodek, który otrzymał 8-10 punktów urodził się w stanie dobrym, 4-7 punktów definiowało stan średni, a punktacja w zakresie 0-3 punkty oznaczała zły stan ogólny⁷⁷. Ocena stanu noworodka w oparciu o skalę Apgar wykonywana zawsze była przez lekarza uczestniczącego przy porodzie. Celem oceny kondycji metabolicznej noworodka przeanalizowano status kwasowo-zasadowy, określony na podstawie wartości pH oraz niedoboru zasad (ang. *base deficit*; BE) we krwi z naczyń pępowinowych, pobranej bezpośrednio po porodzie^{78,79}.

Masę urodzeniową każdego noworodka odnoszono do wartości referencyjnych. Za noworodki za małe w stosunku do wieku ciążowego (ang. *neonate Small for Gestational Age*; nSGA) uznawano te, których masa mieściła się poniżej 10. percentyla; obliczeń dokonano na podstawie kalkulatora dla populacji europejskiej zamieszczonego na stronie <https://medicinafetalbarcelona.org/calc/>⁷⁵.

Analizie poddano również całkowitą długość pobytu noworodka w szpitalu, oraz występowanie określonych powikłań noworodkowych (m. in. niewydolności oddechowej, krwawień do ośrodkowego układu nerwowego, niedokrwistości, zakażenia, sepsy, całkowitej długości sztucznej wentylacji, retinopatii).

4.7. Metody statystyczne

W celu weryfikacji postawionych pytań badawczych przeprowadzono analizy statystyczne przy użyciu pakietu IBM SPSS Statistics 23. Przy jego pomocy wykonano analizy podstawowych statystyk opisowych wraz z testem Kołmogorowa-Smirnowa, który sprawdza normalność rozkładu badanych zmiennych. Dla zmiennych, których rozkład nie został potwierdzony jako normalny, dodatkowe zweryfikowanie poziomu skośności. W przypadku, gdy wartość skośności mieści się w przedziale od -2 do +2 można przyjąć, że rozkłady te nie są znacząco

asymetryczne względem średniej⁸⁰. Taką sytuację odnotowałam w przypadku zdecydowanej większości badanych zmiennych. Jedynie w przypadku długości pobytu noworodka w szpitalu po porodzie, czasu trwania sztucznej wentylacji noworodka oraz wewnątrzkomórkowego poziomu niedoboru tlenu stwierdziłam przekroczenie wspomnianego przedziału. Analizy statystyczne przy użyciu testów parametrycznych wykonałam dla zmiennych o charakterze symetrycznym, zaś dla trzech wymienionych powyżej zmiennych konieczne było wykonanie analiz statystycznych przy użyciu testów nieparametrycznych.

W pracy zastosowałam między innymi test t Studenta dla prób niezależnych, test U Manna-Whitney'a dla zmiennych asymetrycznych, analizę korelacji ze współczynnikiem r Pearsona, analizę korelacji rangowej ρ Spearmana, jednoczynnikową analizę wariancji w schemacie międzygrupowym, test Kruskala-Wallisa, test χ^2 oraz dokładne testy Fishera.

Za poziom istotności uznałam klasyczny próg $\alpha = 0,05$; wyniki prawdopodobieństwa statystyki testu na poziomie $0,05 < p < 0,1$ interpretowano jako istotne na poziomie tendencji statystycznej.

5. Wyniki

5.1. Charakterystyka badanych grup w zakresie wieku, rodności, BMI oraz stopnia IUGR (FGR)

Po przeanalizowaniu wieku, rodności oraz BMI badanych pacjentek, a więc zmiennych ilościowych odnotowano jedną różnicę istotną statystycznie. Liczba ciąż była wyższa w grupie kontrolnej. Siła odnotowanego efektu była umiarkowanie duża. W zakresie BMI nie odnotowano wyniku nawet na poziomie tendencji statystycznej.

W tabeli 4 przedstawiłam rozkład wartości stopnia zaawansowania IUGR (FGR) w badanej grupie, pozostałe wyżej wymienione zmienne zamieściłam w tabeli 5.

Tabela 4. Stopień IUGR (FGR) w badanej grupie

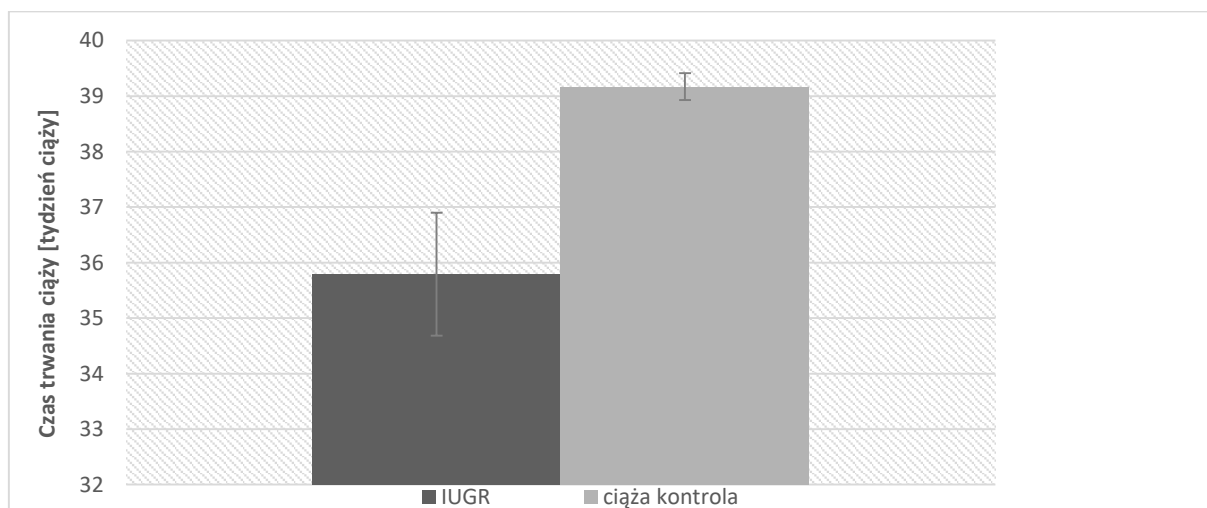
IUGR (FGR)	
1	79,10%
2	7,00%
3	11,60%
4	2,30%

Dodatkowo, sprawdzono jaki był udział IUGR (FGR) w kontekście terminu rozpoznania. Okazało się, że dokładnie po 50% zostało rozpoznanych przed końcem 32. tygodnia i po tym terminie.

5.2. Charakterystyka badanych grup w zakresie zmiennych dotyczących porodu

5.2.1. Czas trwania ciąży

Czas trwania ciąży w grupie kontrolnej był istotnie dłuższy niż u ciężarnych należących do grupy IUGR ($p < 0,001$). Siła odnotowanego efektu była bardzo duża.



Rycina 12. Czas trwania ciąży w badanych grupach.

Sprawdzono także w jakim procencie poród w badanych grupach odbył się o czasie (tabela 5). Wykonano test χ^2 , który okazał się istotny statystycznie, $\chi^2(1) = 19,74$; $p < 0,001$. W grupie IUGR wyraźnie częściej dochodziło do porodu przed czasem. Siła odnotowanego efektu, mierzona współczynnikiem V Cramera, była umiarkowanie duża, $V = 0,43$.

5.2.2. Sposób ukończenia ciąży w badanych grupach ciężarnych

W tabeli 5 zostały przedstawione wyniki analizy sposobu ukończenia ciąży w poszczególnych grupach pacjentek. W grupie IUGR wyraźnie częściej dochodziło do ukończenia ciąży na drodze cięcia cesarskiego. Siła odnotowanego efektu, mierzona współczynnikiem V Cramera, była umiarkowanie duża, $V = 0,33$. W grupie ciąż ukończonych cięciem cesarskim, dodatkowo przeprowadzono analizę co do charakteru wykonanej operacji. Istotnie mniej pilnych cięć ($p = 0,002$) było w grupie kontrolnej (tabela 5). Siła odnotowanego efektu, mierzona współczynnikiem V Cramera, była umiarkowanie duża, $V = 0,46$.

Tabela 5.

Cecha/parametr	IUGR (n=44)	Ciąża niepowikłana (n=67)	P
Wiek [lata]; średnia +- SD mediana (min.-maks.)	28,64 5,07 29 (18-41)	30,39 5,01 31 (19-42)	0,075
Liczba ciąż; średnia +- SD mediana (min.-maks.)	1,48 0,85 1 (1-4)	2,13 1,2 2 (1-6)	0,001
BMI; średnia +- SD mediana (min.-maks.)	27,67 5,73 25,6 (18,38-44,14)	26,66 3,31 26,66 (19,2-33,6)	0,298
Poród [tydzień ciąży]; średnia +- SD mediana (min.-maks.)	35,79 3,71 37 (25-40)	39,17 0,99 39 (36-41)	<0,001
Poród o czasie [%]	65,10%	96,90%	<0,001
Poród samoistny [%]	30,20%	52,30%	0,003
Cięcie cesarskie [%]	67,40%	35,40%	
Wyciągacz próżniowy/ operacja kleszczowa [%]	2,30%	12,30%	
Cięcie cesarskie ze wskazań pilnych [%]	44,00%	4,30%	0,002

5.3. Charakterystyka badanych grup w zakresie zmiennych określających stan noworodka

W badanej populacji nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie płci noworodków (tabela 6).

Tabela 6. Płeć dziecka w badanych grupach

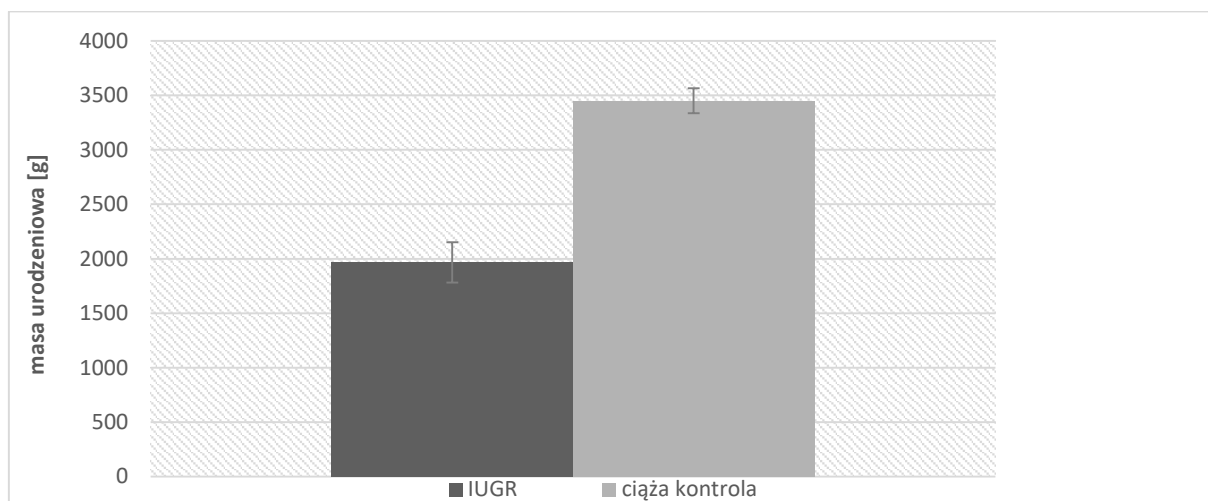
		IUGR	cięża niepowikłana
Płeć dziecka	żeńską	52,40 %	64,60 %
	męską	47,60%	35,40%

W tabeli 7 przedstawiono wyniki analizy szeregu zmiennych ilościowych, takich jak masa urodzeniowa, pH tętnicze i żylny, punktacja w skali Apgar, niedobór zasad (BE) w tętnicy i żyły pępowinowej, długości ciała noworodków, długości pobytu noworodków w szpitalu po porodzie oraz długości sztucznej wentylacji u noworodków. Wykonano testy *t* Studenta dla prób niezależnych oraz testy *U* Manna-Whitney'a dla długości pobytu w szpitalu i czasu sztucznej wentylacji noworodka (ze względu na znaczną asymetryczność rozkładu). Dzieci z grupy IUGR cechowały się niższą masą urodzeniową, niższym wynikiem w skali Apgar po 5 minutach, wyższym (mniej ujemnym) poziomem niedoboru zasad (BE) żylnego, mniejszą długością ciała po porodzie, dłuższym pobytem w szpitalu oraz dłuższym czasem sztucznej wentylacji. Siła odnotowanych efektów była bardzo duża dla masy urodzeniowej, długości ciała i długości pobytu w szpitalu i umiarkowanie duża dla pozostałych trzech zmiennych. Dodatkowo, odnotowano dwie różnice na poziomie tendencji statystycznej (tabela 7). Noworodki z grupy IUGR cechowały się niższymi wartościami skali Apgar po 1. minucie oraz wyższym (mniej ujemnym) niedoborem zasad (BE) tętniczym. Siła obu tych efektów była jednak niska. Dla poziomu pH nie odnotowano różnic nawet na poziomie tendencji statystycznej. Wyniki istotne statystycznie i bliskie istotności statystycznej zestawiono na rycinach 13-17.

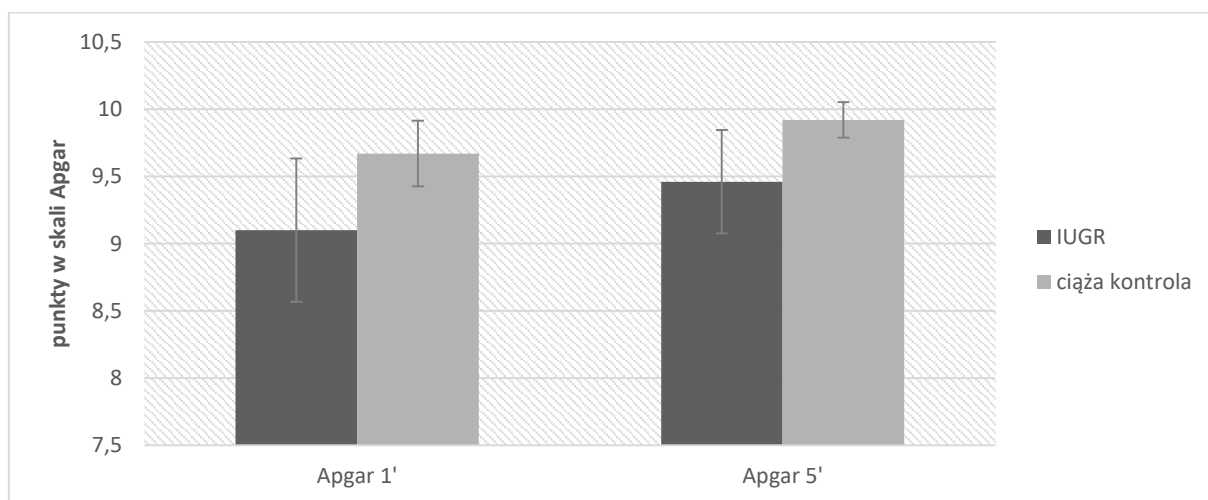
Tabela 7. Masa urodzeniowa, pH tętnicze i żyłne, punktacja w skali Apgar, niedobór zasad (BE) w tętnicy i żyłce pępowinowej oraz długość ciała noworodków w badanych grupach

	IUGR		cięża niepowikłana		<i>P</i>
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	
masa ur. [g]	1966,35	614,90	3449,92	468,94	0,000
Apgar 1'	9,10	1,76	9,67	0,99	0,059
Apgar 5'	9,46	1,19	9,92	0,53	0,032
pH tętnicze	7,29	0,08	7,27	0,07	0,137
pH żyłne	7,33	0,05	7,33	0,06	0,680
BE tętnicze	-2,72	2,56	-3,78	3,22	0,079
BE żyłne	-2,55	2,22	-4,00	3,05	0,013
długość ciała u noworodka po porodzie [cm]	46,01	5,75	54,93	2,68	0,000
długość pobytu w szpitalu [dni]	18,88	22,71	3,81	1,87	0,000
czas sztucznej wentylacji u noworodka [doby]	6,86	19,60	0,00	0,00	0,000

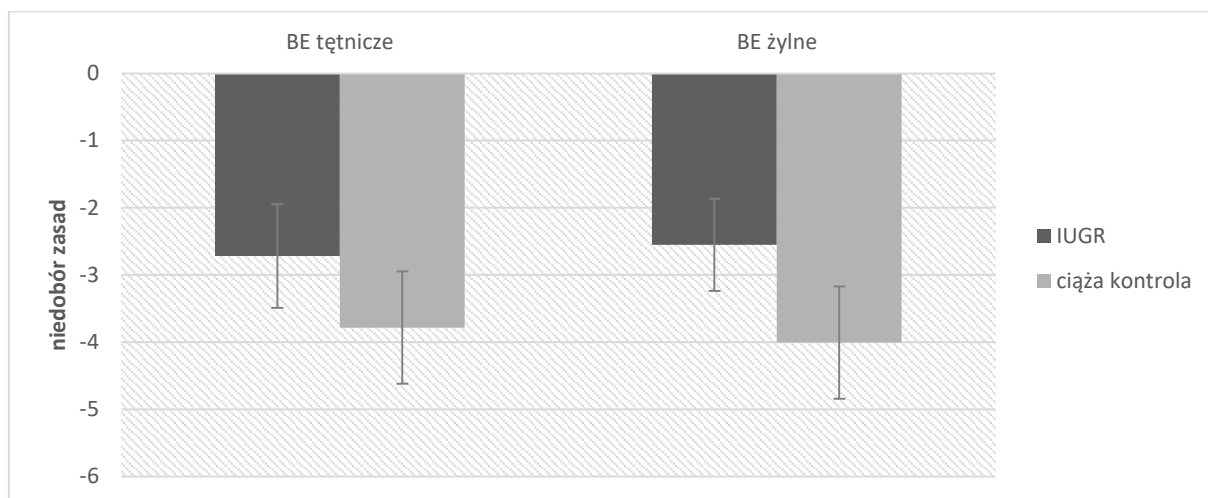
M – średnia; *SD* – odchylenie standardowe; *p* – istotność



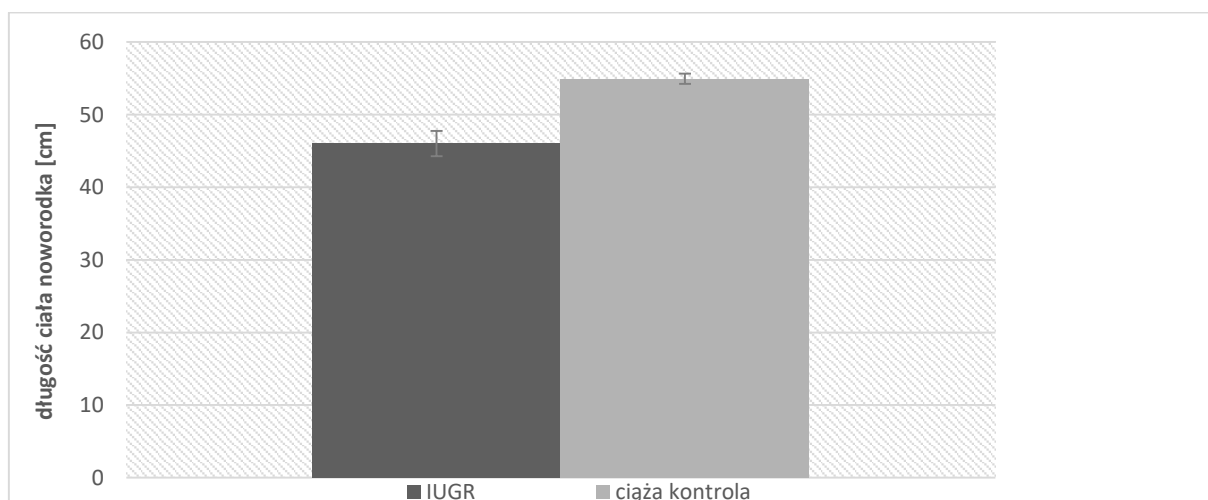
Rycina 13. Masa urodzeniowa dzieci w badanych grupach.



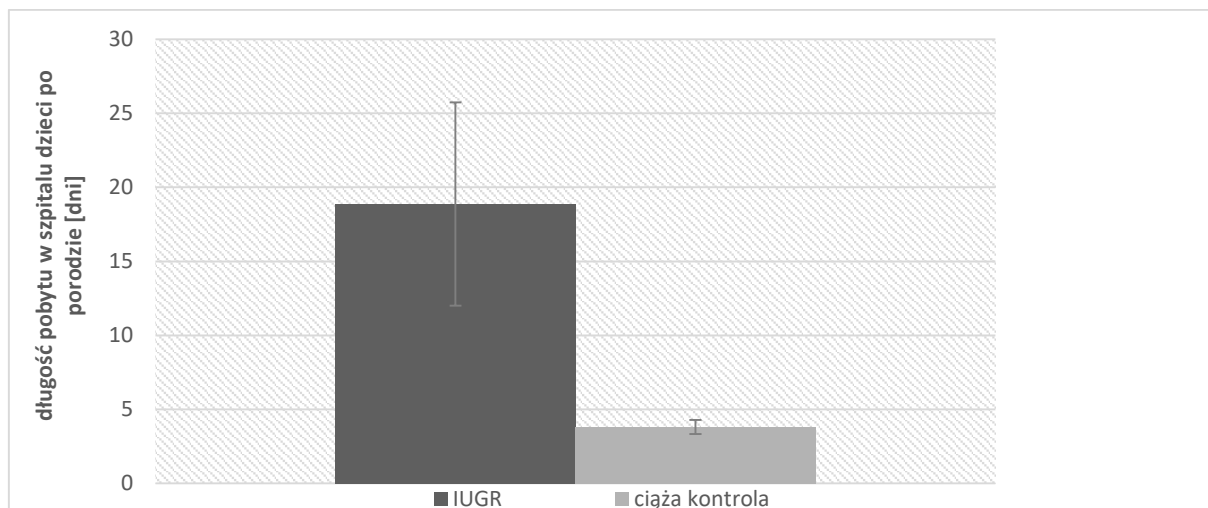
Rycina 14. Wyniki skali Apgar w badanych grupach.



Rycina 15. Niedobór zasad (BE) w tętnicy i w żyłę pępowinowej w badanych grupach.



Rycina 16. Długość ciała dzieci w badanych grupach.



Rycina 17. Długość pobytu w szpitalu dzieci w badanych grupach.

W tabeli 8 przedstawiono najczęściej rozpoznawane powikłania noworodkowe. Najczęściej rozpoznawanym powikłaniem był zespół zaburzeń oddychania (ZZO): IUGR 23,8%, grupa kontrolna 4,7% ($p = 0,003$). Rzadziej stwierdzano martwicze zapalenie jelit (NEC); rozpoznano je jedynie u noworodków z cięż powikłanych IUGR 2,3% ($p=0,398$).

Tabela 8. Najczęstsze powikłania stwierdzane u noworodków w badanych grupach

	IUGR	cięża niepowikłana	
			$\chi^2(1) = 8,62$
ZZO (%)	23,80%	4,70%	$p = 0,003$
			$V = 0,29$
Krwawienie do CUN (%)	4,70%	0,00%	Exact Fisher Test
			$p = 0,156$
Krwawienie ¼ (%)	4,70%	0,00%	Exact Fisher Test
			$p = 0,156$
NEC (%)	2,30%	0,00%	Exact Fisher Test
			$p = 0,398$
Sepsa (%)	0,00%	0,00%	X
Zgon okołoporodowy (%)	0,00%	0,00%	X
Zgon później (%)	2,30%	0,00%	Exact Fisher Test
			$p = 0,405$

5.4. Ocena metabolizmu tlenowego oraz stresu oksydacyjnego w płytkach krwi badanych kobiet

5.4.1. Poziom ROS, pomiar konsumpcji tlenu i wewnątrzkomórkowy poziom niedoboru tlenu w badanych grupach

W tabeli 9 przedstawiono wyniki analiz poziomu ROS, pomiaru konsumpcji tlenu oraz wewnątrzkomórkowy poziom niedoboru tlenu w badanych grupach. Wykonano jednoczynnikowe analizy wariancji w schemacie międzygrupowym bądź też – w przypadku niespełnienia założenia o homogeniczności wariancji – mocne testy równości średnich Browna-Forsytha; uzyskane wyniki okazały się istotne statystycznie. Wykonano więc analizy *post-hoc* przy użyciu testów Sidaka (ROS, wewnątrzkomórkowy poziom niedoboru tlenu) i Dunnetta (poziom konsumpcji tlenu).

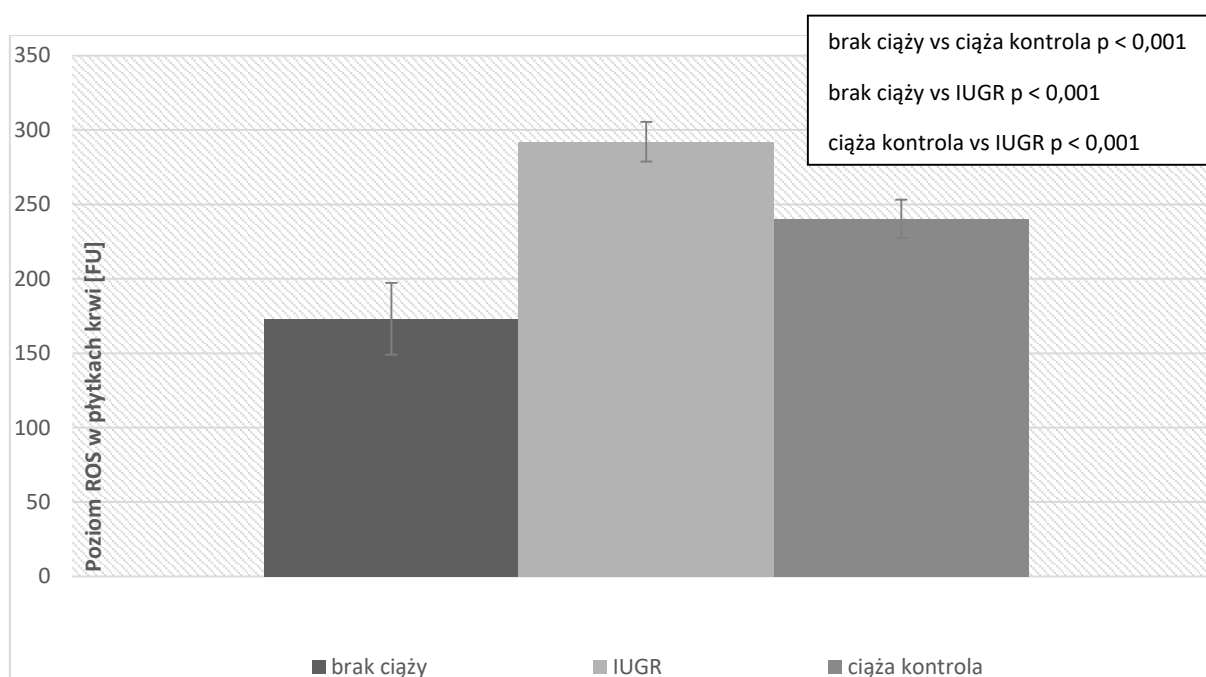
Tabela 9. Poziom ROS, pomiar konsumpcji tlenu oraz wewnątrzkomórkowy poziom niedoboru tlenu w badanych grupach

	brak ciąży		IUGR		cięża niepowikłana		<i>p</i>
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	
ROS (FU)	173,12	60,09	292,11	32,76	240,28	33,07	<0,001
Konsumpcja tlenu [FU]	35818,29	2730,78	26191,84	4925,69	36722,86	4525,54	<0,001
Wewnątrzkomórkowy poziom tlenu (FU)	949,23	119,82	1130,98	248,21	980,55	104,08	0,002

M – średnia; *SD* – odchylenie standardowe; *p* – istotność; FU – jednostki fluorescencji

5.4.1.1. Poziom ROS w badanych grupach

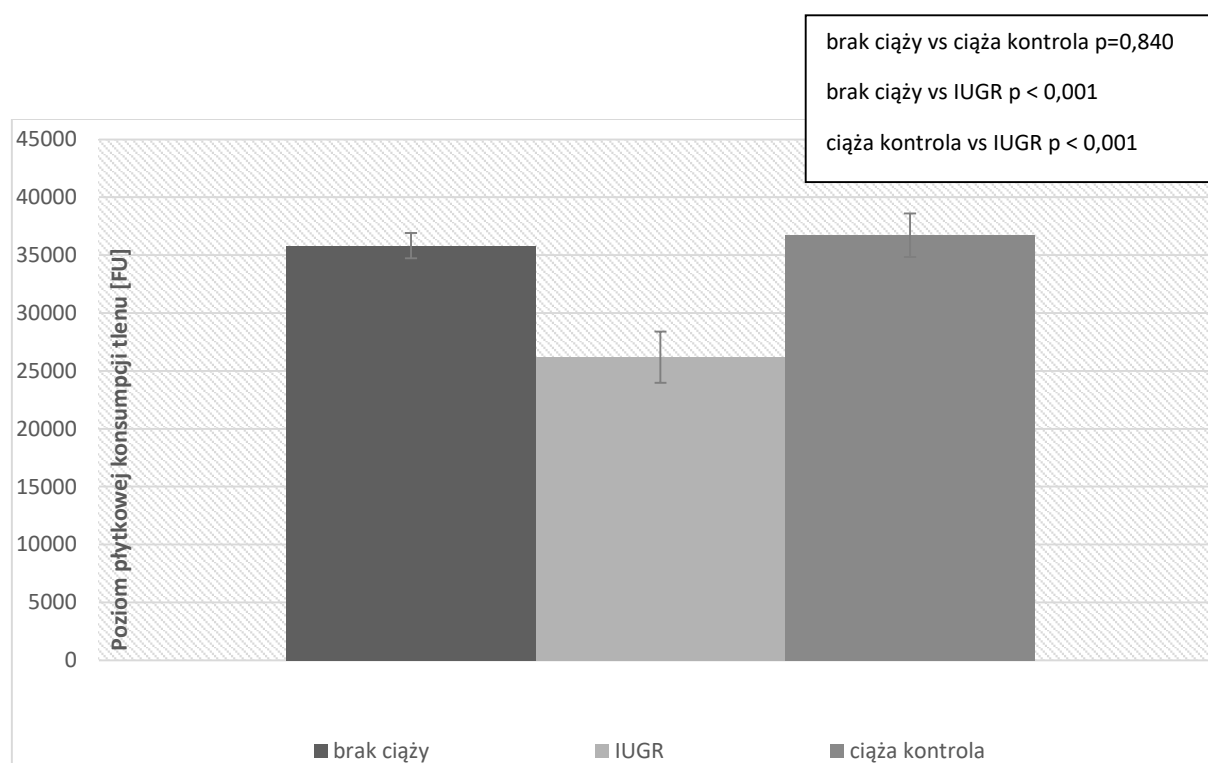
W zakresie poziomu ROS odnotowano szereg istotnych statystycznie różnic na poziomie $p < 0,001$ pomiędzy wszystkimi trzema grupami. Najniższy poziom odnotowano w grupie nieciężarnych: wyniki te były statystycznie niższe od pozostałych dwóch grup. Najwyższy poziom , ROS odnotowano w grupie IUGR, a w grupie ciąża – kontrola, poziom ROS był niższy niż w grupie IUGR, ale wyższy niż w grupie kobiet nie ciężarnych.



Rycina 19. Poziom ROS w badanych grupach.

5.4.1.2. Pomiar konsumpcji tlenu w badanych grupach

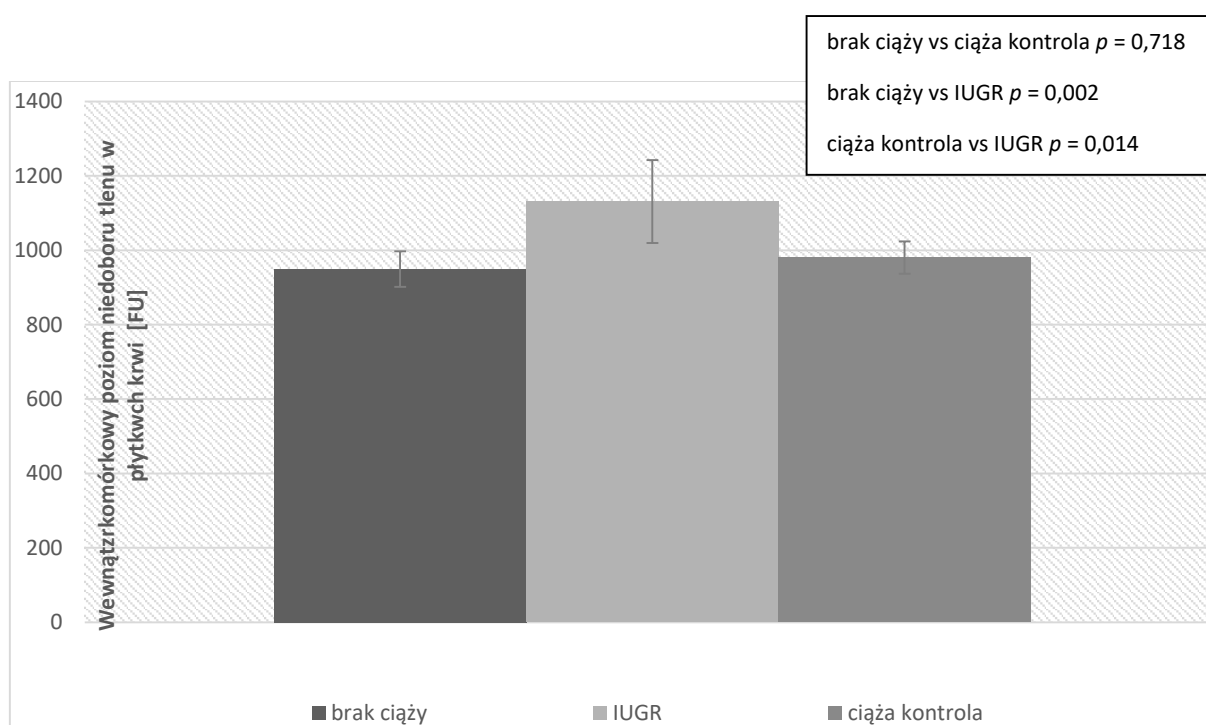
W zakresie pomiaru konsumpcji tlenu odnotowano dwie różnice istotne statystycznie. Grupa IUGR cechowała się niższym poziomem badanej zmiennej od dwóch pozostałych grup ($p < 0,001$). Te zaś nie różniły się między sobą nawet na poziomie tendencji statystycznej, $p = 0,840$) (rycina 20).



Rycina 20. Poziom konsumpcji tlenu w badanych grupach.

5.4.1.3. Wewnątrzkomórkowy poziom niedoboru tlenu w badanych grupach

W zakresie wewnątrzkomórkowego poziomu niedoboru tlenu także odnotowano dwie istotne statystycznie różnice. Poziom badanej zmiennej w grupie IUGR był wyższy niż w grupie nieciążarnych ($p = 0,002$) i w grupie ciąża – kontrola ($p = 0,014$). Te zaś nie różniły się między sobą nawet na poziomie tendencji statystycznej, $p = 0,718$ (rycina 21).



Rycina 21. Wewnątrzkomórkowy poziom niedoboru tlenu w badanych grupach.

5.5. Agregometria impendacyjna

5.5.1. Wyniki testów ASPI i TRAP w badanych grupach

Podstawowe wyniki badania agregometrii impendacyjnej przedstawiono w tabeli 10. Jak wynika z analizy zawartych w tabeli wyników nie odnotowano różnic między badanymi grupami nawet na poziomie tendencji statystycznej (tabela 10).

Tabela 10. Wskaźniki agregometrii w badanych grupach

	IUGR		cięża niepowikłana		<i>T</i>	<i>p</i>	95% <i>CI</i>		<i>d</i> Cohena
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>			<i>LL</i>	<i>UL</i>	
ASPI test [AU*min]	252,62	161,37	217,60	117,25	0,98	0,330	-36,24	106,28	0,26
TRAP test [AU*min]	434,79	212,62	403,23	162,87	0,63	0,534	-69,53	132,65	0,17

M – średnia; *SD* – odchylenie standardowe; *p* – istotność

5.6. Wskaźniki morfologii w badanych grupach

W kolejnym kroku postanowiono porównać wybrane parametry morfologii w badanych grupach. Wykonano testy *t* Studenta dla prób niezależnych. Nie odnotowano jednak żadnych wyników nawet na poziomie tendencji statystycznej (tabela 11).

Tabela 11. Wybrane parametry morfologii w badanych grupach

	IUGR		cięża niepowikłana		<i>t</i>	<i>p</i>	95% <i>CI</i>		<i>d</i> Cohena
	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>			<i>LL</i>	<i>UL</i>	
Leu [G/L]	10,89	2,49	10,36	2,47	1,07	0,286	-0,44	1,49	0,21
PLT [G/L]	220,65	50,32	212,63	50,61	0,81	0,422	-11,72	27,77	0,16
Limf [G/L]	2,15	0,81	1,95	0,54	1,44	0,155	-0,08	0,49	0,31
MPV [fL]	11,31	0,95	10,95	1,23	1,73	0,086	-0,05	0,79	0,33

M – średnia; *SD* – odchylenie standardowe; *p* – istotność

5.7. Związki pomiędzy parametrem MPV a poziomem ROS, konsumpcji tlenu, wewnątrzkomórkowym poziomem niedoboru tlenu oraz wynikami agregometrii impendancyjnej (testów ASPI i TRAP)

W kolejnym kroku postanowiono sprawdzić, czy zachodzą korelacje pomiędzy wielkością parametru MPV, oznaczanym w morfologii krwi pacjentki badanej a poziomem ROS, konsumpcji tlenu, wewnątrzkomórkowym poziomem niedoboru tlenu oraz wynikami testów ASPI i TRAP w agregometrii impendancyjnej. Postanowiono wykonać serię analiz korelacji ze

współczynnikiem r Pearsona oraz analizę korelacji rangowej ρ Spearmana dla zmiennej wewnątrzkomórkowego poziomu niedoboru tlenu. Analizy wykonano oddzielnie dla grupy IUGR i grupy ciąża-kontrola. Jak widać w tabeli 12 odnotowano jeden istotny statystycznie związek. Konsumpcja tlenu była ujemnie skorelowana z poziomem MPV w grupie ciąża – kontrola. Siła odnotowanego związku była duża.

Tabela 12. Związki pomiędzy poziomem MPV a poziomem ROS, konsumpcji tlenu, wewnątrzkomórkowym poziomem niedoboru tlenu oraz wynikami testów ASPI i TRAP

		MPV	
		IUGR	ciąża kontrola
ROS (FU)	r Pearsona	-0,095	0,018
	Istotność	0,676	0,936
Konsumpcja tlenu [FU]	r Pearsona	0,197	-0,459
	Istotność	0,433	0,042
Wewnątrzkomórkowy poziom niedoboru tlenu (FU)	ρ Spearmana	-0,444	-0,145
	Istotność	0,065	0,543
ASPI test [AU*min]	r Pearsona	-0,083	0,067
	Istotność	0,720	0,684
TRAP test [AU*min]	r Pearsona	0,191	0,035
	Istotność	0,433	0,841

5.8. Związek pomiędzy wiekiem ciężarnych a poziomem ROS, konsumpcji tlenu, wewnątrzkomórkowym poziomem niedoboru tlenu oraz wynikami testów ASPI i TRAP

W kolejnym kroku postanowiono sprawdzić, czy zachodzą korelacje pomiędzy wiekiem kobiet badanych a poziomem ROS, konsumpcji tlenu, wewnątrzkomórkowym poziomem niedoboru tlenu oraz wynikami testów ASPI i TRAP. Postanowiono wykonać serię analiz korelacji ze współczynnikiem r Pearsona oraz analizę korelacji rangowej ρ Spearmana dla zmiennej wewnątrzkomórkowego poziomu niedoboru tlenu. Analizy wykonano oddzielnie dla grupy IUGR i grupy ciąża-kontrola. Jak jednak widać w tabeli 13 nie odnotowano żadnych związków istotnych statystycznie ani nawet bliskich istotności statystycznej.

Tabela 13. Związki pomiędzy wiekiem badanej osoby a poziomem ROS, konsumpcji tlenu, wewnątrzkomórkowym poziomem niedoboru tlenu oraz wynikami testów ASPI i TRAP

		Wiek badanej osoby	
		IUGR	ciąża kontrola
ROS (FU)	r Pearsona	-0,136	-0,064
	istotność	0,535	0,762
Konsumpcja tlenu [FU]	r Pearsona	-0,209	-0,084
	istotność	0,390	0,709
Wewnątrzkomórkowy poziom niedoboru tlenu (FU)	ρ Spearmana	-0,167	0,141
	istotność	0,493	0,531
ASPI test [AU*min]	r Pearsona	-0,279	-0,163
	istotność	0,221	0,302
TRAP test [AU*min]	r Pearsona	-0,199	-0,027
	istotność	0,414	0,869

5.9. Związek pomiędzy stopniem IUGR a poziomem ROS, konsumpcji tlenu, wewnątrzkomórkowym poziomem niedoboru tlenu oraz wynikami testów ASPI i TRAP

W kolejnym kroku postanowiono sprawdzić, czy zachodzą korelacje pomiędzy stopniem IUGR a poziomem ROS, konsumpcji tlenu, wewnątrzkomórkowym poziomem niedoboru tlenu oraz wynikami testów ASPI i TRAP. Postanowiono wykonać serię analiz korelacji rangowej ρ Spearmana. Jak jednak widać w tabeli 14 nie odnotowano żadnych związków istotnych statystycznie ani nawet bliskich istotności statystycznej.

Tabela 14. Związki pomiędzy stopniem IUGR a poziomem ROS, konsumpcji tlenu, wewnątrzkomórkowym poziomem niedoboru tlenu oraz wynikami testów ASPI i TRAP

		Stopień IUGR
ROS (FU)	r Pearsona	0,109
	istotność	0,630
Konsumpcja tlenu [FU]	r Pearsona	0,199
	istotność	0,415
Wewnątrzkomórkowy poziom niedoboru tlenu (FU)	ρ Spearmana	-0,138
	istotność	0,572
ASPI test [AU*min]	r Pearsona	-0,034
	istotność	0,883
TRAP test [AU*min]	r Pearsona	0,124
	istotność	0,612

5.10. Związek pomiędzy zaawansowaniem ciąży (tygodniem ciąży) a poziomem ROS, konsumpcji tlenu, wewnątrzkomórkowym poziomem niedoboru tlenu oraz wynikami testów ASPI i TRAP

W kolejnym kroku postanowiono sprawdzić, czy zachodzą korelacje pomiędzy zaawansowaniem ciąży (tygodniem ciąży) a poziomem ROS, konsumpcji tlenu, wewnątrzkomórkowym poziomem niedoboru tlenu oraz wynikami testów ASPI i TRAP. Postanowiono wykonać serię analiz korelacji ze współczynnikiem r Pearsona oraz analizę korelacji rangowej ρ Spearmana dla zmiennej wewnątrzkomórkowego poziomu niedoboru tlenu. Analizy wykonano oddzielnie dla grupy IUGR (FGR) i grupy ciąży-kontrola. Jak widać w tabeli 15 odnotowano jeden istotny statystycznie związek. Wynik testu ASPI był ujemnie skorelowany z tygodniem ciąży w grupie powikłanej IUGR (FGR). Siła odnotowanego związku była duża. Odnotowano także jeden związek na poziomie tendencji statystycznej. Wynik testu TRAP był ujemnie skorelowany z tygodniem ciąży w grupie ciąż niepowikłanych (cięża-kontrola). Siłą tego związku była umiarkowanie duża. Pozostałe związki nie były nawet bliskich istotności statystycznej.

Tabela 15. Związki pomiędzy zaawansowaniem ciąży (tydzień ciąży) a poziomem ROS, konsumpcji tlenu, wewnątrzkomórkowym poziomem niedoboru tlenu oraz wynikami testów ASPI i TRAP

		Tydzień ciąży	
		IUGR	cięża niepowikłana
ROS (FU)	<i>r</i> Pearsona	0,096	-0,099
	Istotność	0,662	0,639
Konsumpcja tlenu [FU]	<i>r</i> Pearsona	-0,198	-0,328
	Istotność	0,417	0,136
Wewnątrzkomórkowy poziom niedoboru tlenu (FU)	<i>rho</i> Spearmana	0,379	0,052
	Istotność	0,109	0,818
ASPI test [AU*min]	<i>r</i> Pearsona	-0,552	-0,229
	Istotność	0,009	0,144
TRAP test [AU*min]	<i>r</i> Pearsona	-0,200	-0,304
	Istotność	0,412	0,060

6. Dyskusja

Wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu (IUGR/FGR) jest jedną z głównych przyczyn zachorowalności i śmiertelności okołoporodowej oraz noworodkowej, stanowi również jedną z najczęstszych przyczyn niekorzystnych wyników długoterminowych. Postępowanie kliniczne w przypadku rozpoznania IUGR (FGR) jest nadal bardzo trudne pomimo postępów w opiece położniczej oraz neonatologicznej. Bezpośrednio po porodzie u noworodka z IUGR (FGR) mogą pojawić się takie komplikacje jak: hipotermia, hipoglikemia, polycytemia, martwicze zapalenie jelit (NEC) czy zespół zaburzeń oddychania. W tej grupie noworodków istnieje również wyższe ryzyko okołoporodowej asfiksji⁸¹. Może to wynikać z niedotlenienia okołoporodowego nałożonego na przewlekłe niedotlenienie płodu spowodowane niewydolnością łożyska. Należy podkreślić również fakt, iż niekorzystne środowisko wewnątrzmaciczne poprzez wpływ na programowanie prenatalne predysponuje do występowania u noworodka z IUGR (FGR) długoterminowych problemów zdrowotnych, takich jak upośledzenie rozwoju neurologicznego, oraz zwiększone ryzyko wystąpienia chorób układu krążenia⁸² i zespołu metabolicznego⁸³, trwających przez całe życie⁸¹. A zatem IUGR (FGR), którego przyczyną jest niewydolność łożyska w konsekwencji stanowi ważny problem zdrowia publicznego w przyszłości.

Najważniejszą funkcją łożyska jest wymiana składników odżywczych i tlenu pomiędzy matką i płodem. Aby stworzyć zdrowo funkcjonujące łożysko, konieczne jest wystąpienie odpowiedniej przebudowy tętnic spiralnych w naczynia niskooporowe o wysokim przepływie krwi, wskutek inwazji komórek trofoblastu we wczesnej ciąży. Gdy proces ten zostaje zaburzony, wynikająca z tego nieoptymalna i nieprawidłowa funkcja łożyska skutkuje pojawieniem się określonych powikłań ciążowych, w tym IUGR (FGR). Dokładne ścieżki patofizjologiczne leżące u podstaw tego zaburzenia nie są w pełni poznane, chociaż zaproponowano kilka teorii⁸⁴. Teorie te wiążą się m. in. z obecnością stresu oksydacyjnego⁸⁵ oraz lokalnego stanu nadkrzepliwości, cechującego się powstawaniem mikrozakrzepów w naczyniach łożyska, mogącego wynikać z nadmiernej aktywacji oraz agregacji płytek krwi⁸⁶. Zbadanie tych zależności było przedmiotem niniejszej rozprawy.

Obecnie przyjmuje się, że prawidłowy rozwój łożyska następuje przy stosunkowo niskim stężeniu tlenu. Komórki cytotrofoblastu, które wnikają do wnętrza tętnic spiralnych w

toku ich fizjologicznej przebudowy powodują zamknięcie światła tych naczyń, ograniczając w ten sposób dopływ utlenowanej krwi w rozwijającym się łożysku. Powoduje to niskie stężenie tlenu w tworzącym się łożysku, co jest niezbędne do prawidłowej embriogenezy i organogenezy. Rozwijający się zarodek ma niewystarczające mechanizmy obronne zapobiegające uszkodzeniu wywołanemu przez wolne rodniki tlenowe. Transfer składników odżywczych od matki do rozwijającego się zarodka odbywa się na tym etapie za pośrednictwem dyfuzji. Krążenie łożyskowe zostaje w pełni ustalone dopiero pod koniec pierwszego trymestru ciąży, gdy „korki” z komórek cytotrofoblastu ulegają rozpuszczeniu w nieznanym obecnie mechanizmie, a rozpoczęcie krążenia łożyskowego wiąże się z trzykrotnym wzrostem stężenia tlenu w łożysku⁸⁵. Należy podkreślić, iż zarówno zbyt wysokie stężenie tlenu, jak również obecność niedotlenienia podczas procesu inwazji trofoblastu mogą indukować wystąpienie stresu oksydacyjnego, rozumianego jako brak równowagi pomiędzy reaktywnymi formami tlenu, takimi jak anion nadtlenny ($O_2^{\bullet-}$) i nadtlenek wodoru (H_2O_2) a antyoksydantami⁸⁴. Jedną z teorii próbującą wyjaśnić rolę stresu oksydacyjnego w powstawaniu nieprawidłowo funkcjonującego łożyska jest teoria urazu niedokrwienno – reperfuzyjnego. Zjawisko niedokrwienia i następującej reoksygenacji, zaobserwowano po przerywanej perfuzji łożyska, spowodowanej okresowym zwężeniem naczyń krwionośnych. Obecny podczas tego procesu wzrost napięcia tlenowego może prowadzić do nadmiernego tworzenia się ROS. Podkreślić należy fakt, iż fizjologicznie ROS są zaangażowane w komórkowe szlaki sygnałowe przyczyniając się do normalnego rozwoju i funkcji komórek. Aby osiągnąć i utrzymać fizjologiczny poziom ROS, istnieje dynamiczna równowaga pomiędzy wytwarzaniem ROS a aktywnością antyoksydantów w celu ich zmniejszenia. Jeśli jednak dojdzie do zaburzenia tej równowagi, wówczas stres oksydacyjny prowadzi do uszkodzenia DNA, białek oraz peroksydacji lipidów. Uszkodzone białka mogą prowadzić m. in. do utraty funkcji enzymu lub receptora. DNA jest podatne na uszkodzenia oksydacyjne w wyniku pęknięć nici i wiązań krzyżowych zakłócając transkrypcję i naprawę DNA. Natomiast peroksydacja lipidów wpływa na utratę integralności błony komórkowej. Wszystkie te efekty mogą prowadzić do nieprawidłowej funkcji, uszkodzenia i śmierci komórek. Watson i wsp. stwierdzili negatywny wpływ obecności wysokiego poziomu tlenu na komórki syncytiotrofoblastu. W innym badaniu ci sami autorzy wykazali, że syncytiotrofoblast we wczesnej ciąży wykazuje niskie stężenie antyoksydantów⁸⁴.

Chociaż wiele badań dotyczących powikłań ciąży o etiologii łożyskowej koncentrowało się na upośledzonej przebudowie tętnic spiralnych na wczesnym etapie ciąży, nieprawidłowe wzrastanie płodu może wynikać również z pierwotnych zmian stwierdzanych w samych kosmkach, które zmniejszają ich zdolność dyfuzyjną. Upośledzona perfuzja łożyskowa może wynikać z niedrożności naczyń spowodowanej przez zakrzepicę kosmków, której przyczyną upatruje się m. in. w nadmiernej aktywacji oraz hiperagregacji płytek krwi. Wśród zmian stwierdzanych w łożyskach pochodzących z ciąż powikłanych IUGR (FGR) stwierdza się ostre lub przewlekłe zapalenie naczyń w kosmkach charakteryzujące się histologicznie naciekiem limfohistiocytarnym, który może być przyczyną ich uszkodzenia i zatarcia, w konsekwencji prowadząc do zaburzenia krążenia płodowego⁸⁴. Ponadto w ciążach powikłanych IUGR (FGR) badania histopatologiczne wykazały występowanie zmian miażdżycopodobnych, które całkowicie lub częściowo zamykały tętnice spiralne⁷, co stanowi poparcie wyżej wymienionej hipotezy o roli płytek krwi w patogenezie powikłań ciąży o etiologii łożyskowej.

W ciąży o przebiegu prawidłowym pewne parametry płytek krwi ulegają fizjologicznym zmianom. Do takich zmian należy m. in. obniżanie się liczby płytek krwi (PLT) wraz z czasem trwania ciąży w efekcie hemodylucji, nasilonej ich aktywacji i niszczenia podczas przechodzenia przez łożysko, poczynając od drugiego trymestru ciąży. Mimo, iż liczba płytek krwi ulega obniżeniu wraz z zaawansowaniem ciąży, w porównaniu do stanu przed ciążą, to zazwyczaj nadal mieści się w granicach normy. Ciąża jest stanem zwiększonego obrotu płytkowego, wynikającego ze zwiększonej aktywacji płytek, ich zużycia i wymiany. W konsekwencji przyspieszona produkcja płytek krwi celem utrzymania prawidłowej hemostazy powoduje zwiększenie ich objętości (MPV)⁸⁷. Mine Kanat – Pektas i wsp. podjęli badania celem ustalenia, czy średnia objętość płytek krwi (MPV) określona w późnym pierwszym trymestrze ciąży może być wykorzystana do predykcji wystąpienia stanu przedrzucawkowego oraz wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu (IUGR/FGR). W swojej pracy wykazali, że wartości MPV wynoszące 10,5 fl lub więcej pozwalają przewidzieć IUGR (FGR) z 82% czułością i 60% swoistością. A zatem zwiększone MPV w późnym pierwszym trymestrze ciąży odzwierciedla zwiększoną aktywację płytek krwi, która może być przyczyną upośledzenia krążenia maciczno-łożyskowego⁸⁸. W warunkach fizjologicznych w trzecim trymestrze ciąży liczba płytek krwi (PLT) nieznacznie spada, w związku z czym aby skompensować tę fizjologiczną zmianę dochodzi do zwiększonej aktywacji trombocytów. Wykazano, iż w czasie

prawidłowo przebiegającej ciąży czulszym parametrem służącym do oceny funkcji płytek krwi jest ich objętość (MPV) niż liczba (PLT)^{88,89}. Nadmierna aktywacja płytek krwi prowadzi do zwiększonej ich produkcji, co w konsekwencji powoduje wzrost ich objętości (MPV)⁹⁰. W toku moich badań przeanalizowano zarówno parametr MPV, jak również PLT. Parametry te nie różniły się istotnie pomiędzy grupą kobiet w ciąży powikłanej IUGR, a grupą kontrolną kobiet w ciąży niepowikłanej. Nie mniej jednak, należy podkreślić fakt, iż moje badania zostały przeprowadzone w późnym II oraz III trymestrze ciąży, w porównaniu do badania przeprowadzonego przez Mine Kanat – Pektas i wsp., które wykonano w późnym pierwszym trymestrze ciąży. Rozbieżności pomiędzy uzyskanymi przez mnie wynikami, a danymi z literatury można przypisać także różnicom w metodach pomiaru MPV. Różne techniki przyjęte do pomiaru MPV mogą powodować różnice w pomiarach nawet do 40%. Pomimo, że MPV powinno być mierzone w klinicznych analizatorach hematologicznych z użyciem cytrynianu sodu, w rutynowej praktyce klinicznej MPV jest zwykle oznaczane jako składowa pełnej morfologii krwi w probówkach z kwasem etylenodiaminotetraoctowym (EDTA). Antykoagulant EDTA powoduje zmianę kształtu płytek krwi, natomiast MPV wzrasta w sposób zależny od czasu⁸⁸. W moim badaniu w przeciwieństwie do Mine Kanat – Pektas i wsp.⁸⁸, MPV było analizowane jako składowa pełnej morfologii krwi z użyciem EDTA, w sposób opisany powyżej.

Reaktywność płytek krwi w prawidłowej, niepowikłanej ciąży nie jest w pełni wyjaśniona i pozostaje kwestią kontrowersyjną. Potencjalny związek pomiędzy nadmierną aktywacją płytek krwi i późniejszym rozwojem IUGR (FGR) nadal pozostaje niewyjaśniony.

Zmieniona funkcja płytek krwi może mieć udział w rozwoju niewydolności łożyska biorąc pod uwagę wyniki osiągnięte podczas terapii antypłytkowej^{55,91}. Jednak opublikowane dane dotyczące związku pomiędzy poszczególnymi parametrami płytek krwi, a niekorzystnymi wynikami położniczymi są nadal nieliczne. Płytki krwi mogą być zaangażowane w nieprawidłowy proces placencji poprzez kilka mechanizmów, w tym proces matczynej przebudowy tętnic spiralnych, angiogenezie łożyskowej i lokalnej zakrzepicy. Podczas aktywacji płytek krwi dochodzi do uwolnienia bioaktywnych peptydów, które sprzyjają migracji komórek zapalnych. Nadmierna lub przedłużona aktywacja płytek krwi może mieć szkodliwy wpływ na funkcjonowanie śródbłonna. Tak więc aktywacja płytek wyzwała lokalną reakcję zapalną charakteryzującą się uwalnianiem chemokin, zwiększoną prezentacją

receptorów powierzchniowych i zwiększonymi interakcjami pomiędzy komórkami. Obecność nadmiernej aktywacji płytek krwi przed i we wczesnym okresie ciąży może sprzyjać zmianie fenotypu komórek śródbłona, zwiększonej rekrutacji leukocytów i wystąpieniu zapalenia na granicy matki i płodu, co może prowadzić do rozwoju powikłań ciąży o etiologii łożyskowej, jak stan przedrzucawkowy czy FGR⁸⁶.

Badanie Multiplate[®] zostało wykorzystane do tej pory podczas ciąży tylko kilkakrotnie. Blomqvist i wsp. zastosowali je do oceny agregacji płytek krwi u zdrowych kobiet w prawidłowo przebiegającej ciąży, zakończonej urodzeniem zdrowego dziecka. Podczas tego badania porównywano agregację w trakcie ciąży czterokrotnie u tej samej pacjentki oraz 3 miesiące po porodzie, wykazując zmniejszenie agregacji po zastosowaniu kwasu arachidonowego (test ASPI) oraz peptydu aktywującego receptor dla trombiny (test TRAP) podczas ciąży w porównaniu do okresu poporodowego. Agregacja została również porównana u kobiet w ciąży i połogu w stosunku do zdrowych kobiet w wieku rozrodczym nie będących w ciąży, gdzie wykazano zmniejszenie agregacji pod wpływem kwasu arachidonowego (test ASPI) oraz peptydu aktywującego receptor dla trombiny (test TRAP) w grupie kobiet ciężarnych oraz w trakcie połogu⁹². Ponadto Mustafa Can i wsp. zastosowali Multiplate[®] celem porównania agregacji płytek krwi pod wpływem kolagenu w czasie prawidłowo przebiegającej ciąży z ciążą powikłaną stanem przedrzucawkowym, wykazując, iż badanie to nie pozwala na wykrycie różnic pomiędzy badanymi grupami⁹³. Kolejnym badaniem z zastosowaniem Multiplate[®] była podjęta przez Navaratnam i wsp. ocena występowania zjawiska oporności płytek krwi na kwas acetylosalicylowy (ASA) stosowany profilaktycznie u kobiet w ciążach wysokiego ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego. W toku tego badania nie stwierdzono braku odpowiedzi lub zmniejszonej wrażliwości na kwas acetylosalicylowy u kobiet ciężarnych z grupy wysokiego ryzyka wystąpienia stanu przedrzucawkowego^{92,94}.

W toku przeprowadzonych badań z zastosowaniem agregometrii impedancyjnej (Multiplate[®]) wykazałam brak istotnej statystycznie różnicy w stopniu agregacji płytek krwi ocenianym w krwi pełnej uzyskanej od kobiet ciężarnych w odpowiedzi na kwas arachidonowy (test ASPI) oraz na peptyd aktywujący receptor dla trombiny (test TRAP) pomiędzy pacjentkami w ciąży powikłanej IUGR (FGR), a kobietami w ciąży o przebiegu prawidłowym. Stwierdzono istotny statystycznie związek pomiędzy tygodniem ciąży w momencie badania, a stopniem płytkowej agregacji w odpowiedzi na kwas arachidonowy (test ASPI) u kobiet w ciąży

powikłanej IUGR (FGR). W grupie tej agregacja płytek krwi zależna od kwasu arachidonowego malała wraz zaawansowaniem ciąży, co jest zgodne z wynikami badań przeprowadzonymi w stanie przedrzucawkowym i może stanowić potwierdzenie hipotezy o zwiększonej aktywacji płytek krwi na początku ciąży w przebiegu tego powikłania^{87,95}. Zgodnie z aktualną literaturą nie przeprowadzono do tej pory badań z zastosowaniem agregometrii impedancyjnej (Multiplate®) w ciążach powikłanych wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania płodu (IUGR/FGR). Jedynym badaniem oceniającym agregację płytek krwi w ciążach powikłanych IUGR (FGR) była praca porównująca agregację płytek w ciążach IUGR (FGR) powikłanych nadciśnieniem tętniczym z ciążami powikłanymi IUGR (FGR) bez towarzyszącego nadciśnienia tętniczego z zastosowaniem licznika płytek Ultra-Flo 100⁸. W grupie IUGR (FGR) z nadciśnieniem poziom agregacji pod wpływem kolagenu i ADP przed porodem był o prawie 50% niższy niż w ciąży prawidłowej. W przeciwieństwie do grupy IUGR z nadciśnieniem, grupa IUGR z normotensją wykazywała podobne poziomy agregacji zależnej od ADP i kolagenu do tych stwierdzanych w 36 tygodniu prawidłowo przebiegającej ciąży⁸.

W przeprowadzonych badaniach nie odnotowano korelacji pomiędzy stopniem płytkowej agregacji w odpowiedzi na kwas arachidonowy (test ASPI) oraz na peptyd aktywujący receptor dla trombiny (test TRAP), a wiekiem badanej kobiety, średnią objętością płytek krwi (MCV) oraz stopniem zaawansowania klinicznego wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu (IUGR/FGR).

Obecnie coraz częściej wskazuje się na istotną rolę stresu oksydacyjnego w patofizjologii wielu powikłań ciąży, takich jak nawracające poronienia, przedwczesne pęknięcie błon płodowych, stan przedrzucawkowy czy występowanie IUGR (FGR)^{85,96}. Do tej pory wiele badań miało na celu poznanie mechanizmów wyzwalających kaskadę aktywacji płytek krwi, a ostatnio coraz więcej dowodów wskazuje na istotną rolę reaktywnych form tlenu (ROS) w tym procesie. Wiadomo, iż zmiany oksydacyjne występują podczas prawidłowej aktywacji płytek krwi, jednak modulacja stanu oksydacyjnego w trombocytach poprzez obecność nadmiernej ilości reaktywnych form tlenu, będących wykładnikiem stresu oksydacyjnego mogą wywoływać ich nadmierną i nieprawidłową aktywację działając protrombotycznie. Dotychczas wykazano, że ekspozycja płytek krwi na nadtlenek wodoru (H₂O₂), który jest najczęściej badanym ROS w komórkach, wspomaga aktywację płytek,

indukowaną kwasem arachidonowym oraz kolagenem⁹⁷. W warunkach stresu oksydacyjnego dochodzi do ogólnego wzrostu metabolizmu kwasu arachidonowego, którego utlenianie w płytkach krwi powoduje przekształcenie w silnie labilny TXA₂, który indukuje proces płytkowej agregacji⁹⁸. Ponadto, nadtlenek wodoru ma również zdolność do wyzwalania niezależnego mechanizmu aktywacji trombocytów⁹⁷. Ocena produkcji ROS i metabolizmu komórkowego może mieć zatem istotne znaczenie w zrozumieniu roli płytek krwi w ciążach powikłanych IUGR (FGR). W trakcie moich badań z zastosowaniem DCFDA wykazałam, że największy poziom ROS występował w płytkach krwi pochodzących od kobiet w ciąży powikłanej IUGR (FGR). Był on wyższy niż w płytkach krwi pochodzących od kobiet w ciąży o przebiegu prawidłowym oraz wyższy niż w płytkach krwi pochodzących od kobiet nie będących w ciąży. Poziom ROS był również wyższy w płytkach krwi pochodzących od kobiet w ciąży niepowikłanej w porównaniu do nieciężarnych. Może to być potwierdzeniem tezy, że poziom stresu oksydacyjnego w ciąży, również o przebiegu fizjologicznym, wzrasta^{85,99}. W odniesieniu do ciąży powikłanej IUGR (FGR), podwyższony poziom ROS w płytkach krwi może stanowić przyczynę ich nadmiernej aktywacji, która może leżeć u podłoża tej patologii.

Tlen jest kluczowym substratem i źródłem energii dla komórki, reguluje jej metabolizm oraz ekspresję genów. Odpowiednie zaopatrzenie w tlen komórek ssaków jest ważne dla ich prawidłowego funkcjonowania, a nieprawidłowości w tym zakresie mogą prowadzić do stanu chorobowego. Tlen molekularny jest ostatecznym akceptorem łańcucha transportu elektronów i dlatego jest wysoce informacyjnym znacznikiem metabolizmu komórkowego i funkcji mitochondriów. Funkcja mitochondriów jest ściśle związana z procesami utleniania biologicznego dlatego to właśnie te organella komórkowe odgrywają istotną rolę w generowaniu wewnątrzkomórkowych ROS, będąc odpowiedzialne za 90% ich endogennej produkcji¹⁰⁰. Pomiar zużycia tlenu przez komórkę jest prawdopodobnie najbardziej informacyjnym parametrem służącym do oceny jej metabolizmu, ponieważ pozwala na bezpośrednią i specyficzną ocenę funkcjonowania łańcucha transportu elektronów, będącego podstawą fosforylacji oksydacyjnej i metabolizmu komórkowego^{68,101,102}. Tradycyjnie zużycie tlenu zarówno w izolowanych mitochondriach, jak i całych komórkach przeprowadzano przy użyciu elektrody Clarka¹⁰³. Aktualnie w tym celu stosuje się wygodne i szybkie metody z wykorzystaniem sond fluorescencyjnych (MitoXpress-Xtra®) służące do pomiaru pozakomórkowego stężenia tlenu, dzięki którym można monitorować wartości średnie w

obszarach bezpośrednio otaczających komórkę po uprzednim uszczelnieniu zawiesiny komórkowej olejem mineralnym^{69,104,105}.

W trakcie badań z zastosowaniem sondy MitoXpress-Xtra® stwierdziłam mniejszą aktywność oddechową trombocytów, wyrażoną poprzez zmniejszoną konsumpcję tlenu przez płytki krwi pochodzące od kobiet w ciąży powikłanej IUGR (FGR) w stosunku do grupy kobiet w ciąży o przebiegu prawidłowym oraz zdrowych nieciężarnych. Wyniki, które uzyskałam mogą być odzwierciedleniem zaburzeń występujących w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym prowadząc do nieprawidłowej funkcji płytek krwi w tej patologii ciąży. Natomiast pomiar zużycia tlenu w trombocytach pochodzących od kobiet w ciąży o przebiegu prawidłowym nie różnił się statystycznie od konsumpcji tlenu w grupie kobiet nie będących w ciąży.

Kolejnym testem, który może dostarczyć cennych informacji o stanie bioenergetycznym komórek, w tym także płytek krwi jest pomiar wewnątrzkomórkowego stężenia tlenu. Rozwój w opracowaniu nanocząsteczkowych sond penetrujących do wnętrza komórek, służących do detekcji O₂, takich jak MitoXpress-Intra®, które barwią różne rodzaje komórek ssaków, umożliwił analizę poziomu natleniania komórek in situ^{106,107}. Emisja fosforu przez sondę MitoXpress-Intra® (podobnie jak w przypadku testu MitoXpress-Xtra®) jest tłumiona przez tlen molekularny w taki sposób, że spadek stężenia tlenu powoduje wzrost mierzonego sygnału. Sonda MitoXpress-Intra® jest pobierana przez komórkę w procesie endocytozy, a poziom natężenia luminancji sondy mierzony na czytniku płytek skorelowany jest z poziomem wewnątrzkomórkowego stężenia O₂ (zależność odwrotna)^{107–109}. Przejście od dobrze utlenowanej komórki do anoksji powoduje znaczny wzrost fosforescencji. W komórkach ssaków, stężenie tlenu na odpowiednim poziomie musi być utrzymywane celem zachowania homeostazy komórkowej. Nawet umiarkowane zmniejszenie wewnątrzkomórkowego stężenia tlenu utrudnia komórkom spełnienie ich fizjologicznej funkcji^{110,111}. W przypadku płytek krwi ocena wysycenia tych komórek tlenem z użyciem sondy MitoXpress-Intra® może mieć znaczenie kliniczne, ponieważ udowodniono, że stany hipoksji wyzwalają zwiększoną produkcję TXA₂, a zatem mogą wywoływać oraz nasilać aktywację i agregację płytek krwi, co zostało udowodnione doświadczalnie⁵⁶.

W toku prowadzonych przez mnie badań z zastosowaniem sondy MitoXpress-Intra® wykazałam, iż płytki krwi kobiet w ciąży powikłanej IUGR (FGR) cechują się niższym poziomem wewnątrzkomórkowego stężenia tlenu w porównaniu do płytek krwi kobiet w ciąży niepowikłanej oraz kobiet nieciążarnych, co może świadczyć o stanie płytkowej hipoksji w tym powikłaniu ciąży oraz może być przyczyną nieprawidłowej funkcji trombocytów indukując ich nadmierną aktywację oraz agregację. Poziom natlenienia płytek krwi pochodzących do kobiet w ciąży niepowikłanej nie różnił się znacząco od kobiet nie będących w ciąży.

Słabym punktem tej pracy jest brak oceny badanych biochemicznych parametrów płytek krwi w grupie kobiet obciążonych wysokim ryzykiem wystąpienia IUGR i z tego powodu stosujących podczas ciąży profilaktyczną dawkę kwasu acetylosalicylowego (ASA). Ponieważ nawet niskie dawki ASA skutecznie zmniejszają produkcję TXA_2 , który jest silnym środkiem obkurczającym naczynia krwionośne oraz nasilającym płytkową agregację. W ostatnim czasie podkreśla się również dodatkowe, cytoprotekcyjne i antyoksydacyjne działanie ASA, które jest niezależne od zahamowania COX-1, a mianowicie wpływ ASA m.in. na uwalnianie tlenu azotu z śródbłonna naczyniowego, prowadząc do zmniejszenia stresu oksydacyjnego¹¹². Dotychczasowe badania potwierdziły, że zastosowanie ASA zapewnia umiarkowane zmniejszenie ryzyka wystąpienia IUGR (FGR), u kobiet z grupy ryzyka, gdy terapię włączono przed 16. tygodniem ciąży^{112–114}. Podczas analizy danych na początek niniejszej rozprawy wydzieliłam grupę kobiet w ciąży powikłanej IUGR (FGR) stosujących w chwili pobrania krwi do badań ASA, ale z uwagi na małą liczebność grupy ($n=9$), zostały one wyłączone z dalszych analiz.

Celem niniejszej pracy była ocena biochemicznych parametrów płytek krwi w ciąży powikłanej IUGR (FGR), w których zmienionej funkcji upatruje się potencjalnej przyczyny biorącej udział w etiopatogenezie IUGR (FGR). Cel ten zrealizowano poprzez zbadanie wykładników stresu oksydacyjnego w trombocytach oceniając wewnątrzkomórkowy poziom ROS, badając proces oddychania komórkowego (konsumpcji tlenu) oraz określając poziom wewnątrzkomórkowego niedoboru tlenu. Różnice stwierdzone w wyżej wymienionych parametrach, które zostały wykazane sugerują występowanie warunków stresu oksydacyjnego na poziomie płytek krwi w ciążach powikłanych IUGR (FGR). Może to być przyczyną ich zmienionej funkcji, która prowadzi do indukcji procesu ich nadmiernej aktywacji

oraz agregacji. Dodatkowo w pracy podjęto próbę oceny wpływu stresu oksydacyjnego na funkcję płytek krwi poprzez ocenę agregacji zależnej od kwasu arachidonowego (test ASPI) oraz peptydu aktywującego receptor dla trombiny (test TRAP) z użyciem systemu Multiplate®. Jednak w tym zakresie nie wykazano różnic pomiędzy badanymi grupami. Jak wykazały dotychczas prowadzone badania z zastosowaniem tej metody, nie jest ona czuła w odniesieniu do niewielkich dysfunkcji płytek krwi, co może być potencjalną przyczyną uzyskanych wyników. Potencjalnie nie wyklucza również występowania dyskretnych patofizjologicznych zmian w działaniu płytek, które mogą mieć patofizjologiczne znaczenie w mikrokrażeniu. Uzyskane wyniki należy bardzo ostrożnie korelować ze sobą oraz interpretować, ponieważ z powodu trudności organizacyjnych oraz technicznych jak: konieczność przeprowadzenia wszystkich analiz w krótkim czasie po pobraniu krwi, przyżyciowo w komórkach, brak możliwości zabezpieczenia oraz przechowywania materiału celem wykonania analiz w późniejszym terminie, a także z przyczyn technicznych w trakcie prowadzenia analiz dotyczących oceny stresu oksydacyjnego, nie było możliwości wykonania wszystkich analiz (oceny parametrów stresu oksydacyjnego oraz agregometrii) na materiale pobranym od tych samych pacjentek. W związku z powyższym pomiar wewnątrzkomórkowego poziomu ROS, konsumpcji tlenu oraz pomiar poziomu wewnątrzkomórkowego niedoboru tlenu w trombocytach przeprowadzono w innej grupie kobiet niż analizy oceniające agregację płytek krwi. Kryteria kwalifikacji pacjentek do badanych grup pozostały takie same na każdym etapie prowadzonych badań. Dodatkowo podczas badań oceniających parametry stresu oksydacyjnego dla porównania przeanalizowano również grupę kobiet nie będących w ciąży, czego nie wykonano podczas analizy agregometrii.

Obserwacje wynikające z przeprowadzonych badań klarownie pokazały, że zmieniony metabolizm płytek krwi, podwyższony poziom ROS w tych komórkach oraz inne biochemiczne parametry trombocytów mogą być zmienione w ciążach powikłanych IUGR (FGR), co może wpływać na zmianę ich funkcji oraz być przyczyną wyżej wymienionej patologii. Przemawia to za potrzebą przeprowadzenia dalszych badań w tym kierunku.

7. Ograniczenia pracy

Poziom ROS w komórkach jest parametrem zmiennym i nietrwałym, dlatego uzyskane przeze mnie wyniki nie mają bezpośredniego przełożenia na praktykę kliniczną, a wnioski należy wyciągać bardzo ostrożnie. Ponadto nie wiemy czy podwyższony poziom ROS zaobserwowany w płytkach krwi badanych pacjentek w ciąży powikłanej IUGR (FGR), oraz pozostałe zaburzenia metabolizmu tlenowego występujące w tychże komórkach są przyczyną czy konsekwencją zaburzeń stwierdzanych w ciążach powikłanych tą patologią. Ocena parametrów metabolizmu tlenowego została wykonana tylko w jednym punkcie czasowym, co również stanowi ograniczenie niniejszej pracy.

Pomimo stwierdzenia zmian w metabolizmie tlenowym w płytkach krwi w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej, w trakcie niniejszych badań nie stwierdzono istotnych różnic w agregacji w obu grupach badanych. Należy jednak podkreślić fakt, iż badanie to wykonano z zastosowaniem tylko dwóch agonistów płytkowej agregacji. Nie oceniono bardzo istotnej agregacji płytek krwi zależnej od ADP oraz kolagenu. W związku z powyższym badanie należałoby w przyszłości rozszerzyć o pozostałych agonistów.

Oba etapy projektu badawczego opierały się na jednokrotnej ocenie badanego parametru u danej pacjentki, w związku z czym analizy nie miały charakteru badania podłużnego.

8. Wnioski

1. Nie stwierdzono różnic w zakresie standardowych parametrów charakteryzujących płytki krwi (PLT, MPV) pomiędzy analizowanymi grupami.
2. Najwyższy poziom ROS w trombocytach obserwowano w ciążach powikłanych IUGR (FGR), co może sugerować występowanie stresu oksydacyjnego i sprzyjać aktywacji oraz agregacji trombocytów, powodować ich rozpad, a tym samym inicjować rozwój stanu zapalnego.
3. Wzrost poziomu ROS w ciąży powikłanej IUGR może również wiązać się z upośledzeniem wazodylatacji, a tym samym zaburzeniem przepływu krwi i potencjalnym rozwojem niedotlenienia
4. Najniższą konsumpcję tlenu w trombocytach obserwowano w ciąży powikłanej IUGR, co może sugerować zaburzenia metabolizmu w płytce w tej grupie
5. W grupie pacjentek z IUGR odnotowano największy niedobór wewnątrzkomórkowego poziomu tlenu w trombocytach, co może być związane z występowaniem zaburzeń utlenowania i/lub wysokiego poziomu stresu oksydacyjnego w tych ciążach
6. W ciąży powikłanej IUGR nie stwierdzono istotnych zaburzeń agregacji płytek krwi przy zastosowaniu wyżej opisanych metod badania agregacji.
7. W ciąży powikłanej IUGR nie wykazano korelacji zaburzeń metabolizmu tlenowego w płytkach krwi kobiet ciężarnych ze stopniem zaawansowania zaburzeń hemodynamicznych u płodu.

9. Streszczenie

Wstęp: Główną przyczyną wewnątrzmacicznego ograniczenia wzrastania płodu (IUGR) jest niewydolność łożyska, która skutkuje zmniejszonym przepływem krwi od matki do płodu. Stan ten prawdopodobnie wynika z zaburzenia procesu prawidłowej inwazji trofoblastu w naczynia maciczne na wczesnym etapie ciąży. Dochodzi wówczas do upośledzenia procesu prawidłowej przemiany tętnic spiralnych w naczynia niskooporowe, co skutkuje zmniejszonym dostarczeniem tlenu i substancji odżywczych do płodu. Dokładna patogeneza tego procesu pozostaje niewyjaśniona, ale w związku ze zmianami histopatologicznymi stwierdzanymi w łożysku, przyczyn upatruje się m.in. w nieprawidłowej aktywacji płytek krwi, która może skutkować ich nadmierną agregacją oraz tworzeniem się mikrozakrzepów w małych naczyniach łożyska, ograniczając powierzchnię matczyno-płodowej wymiany. Wydaje się, że reaktywne formy tlenu (ROS), będące skutkiem stresu oksydacyjnego, mogą inicjować patologiczny proces płytkowej aktywacji, odgrywając istotną rolę w etiopatogenezie tego schorzenia.

Wiedza na temat zaburzeń zachodzących w łożysku, w ciąży powikłanej IUGR (FGR) pozostaje niewystarczająca. Wpływa to na brak możliwości skutecznej profilaktyki oraz leczenia tego schorzenia, a także często wiąże się z wystąpieniem porodu przedwczesnego wraz z jego konsekwencjami. Z drugiej strony niekorzystne środowisko wewnątrzmaciczne poprzez przewlekłe niedotlenienie płodu, wpływa na stan zdrowia oraz jakość życia człowieka w przyszłości. IUGR może również być jedną z głównych przyczyn wewnątrzmacicznej śmierci płodu (IUFD) na późnym etapie ciąży.

Cele: Zasadniczym celem pracy była ocena wybranych parametrów płytek krwi w ciąży powikłanej IUGR. Cel ten realizowano poprzez cele szczegółowe: 1) Ocenę standardowych parametrów charakteryzujących płytki krwi (PLT, MPV); 2) Analizę poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) w płytkach krwi; 3) Ocenę oddychania komórkowego w płytkach krwi; 4) Ocenę agregacji płytek krwi z zastosowaniem Analizatora Multiplate®. Uzyskane wyniki odniesiono do stopnia zaawansowania zaburzeń hemodynamicznych w ciąży powikłanej IUGR zdefiniowanych przez Figueras i Gratacosa.

Materiał i metody badawcze: Do badania zakwalifikowano 171 kobiet. Wyodrębniono trzy grupy badane: 1) grupę kobiet w ciąży powikłanej IUGR (n=44); 2) grupę zdrowych kobiet nie

będących w ciąży (n=24); 3) grupę kontrolną kobiet w ciąży niepowikłanej (n=67). Łącznie wykluczono z badania 24 pacjentki. Materiał do badań stanowiła krew żylna oraz osocze bogatopłytkowe (PRP), a głównymi metodami badawczymi były: morfologia krwi obwodowej, ze szczególnym uwzględnieniem parametrów charakteryzujących płytki krwi (PLT, MPV), badania oceniające metabolizm tlenowy i stres oksydacyjny w płytkach krwi (DCFDA, MitoXpress® Xtra, MitoXpress® Intra) oraz agregometria impedancyjna (Multiplate®), z zastosowaniem testów ASPI i TRAP. Zebrane dane poddano analizie statystycznej, a poziom istotności wyznaczono dla $p < 0,05$.

Główne wyniki: W zakresie poziomu ROS odnotowano szereg istotnych statystycznie różnic pomiędzy wszystkimi trzema grupami. Najniższy poziom ROS występował w grupie kobiet niebędących w ciąży, a najwyższy w grupie IUGR. W grupie kontrolnej kobiet w ciąży niepowikłanej poziom ROS był niższy niż w grupie IUGR, ale wyższy niż w grupie kobiet nieciężarnych. Pomiar konsumpcji tlenu przez płytki krwi był istotnie statystycznie niższy w grupie IUGR w porównaniu do dwóch pozostałych grup, natomiast wewnątrzkomórkowy poziom niedoboru tlenu w płytkach krwi był istotnie statystycznie wyższy w grupie IUGR w porównaniu do dwóch pozostałych grup. Pomiedzy grupą kobiet w ciąży niepowikłanej oraz nieciężarnymi nie odnotowano różnic na poziomie istotności statystycznej zarówno w ocenie pomiaru konsumpcji tlenu, jak również w zakresie wewnątrzkomórkowego poziomu niedoboru tlenu w płytkach krwi. W ocenie agregometrii impedancyjnej, w zakresie testów ASPI i TRAP, nie odnotowano różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą IUGR oraz grupą kontrolną kobiet w ciąży o przebiegu niepowikłanym. W testach ASPI i TRAP nie analizowano grupy kobiet nieciężarnych. Nie odnotowano również istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami podczas analizy parametrów charakteryzujących płytki krwi (PLT, MPV) uzyskanymi z morfologii krwi obwodowej. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności pomiędzy stopniem zaawansowania zaburzeń hemodynamicznych obserwowanych u płodów w ciążach powikłanych IUGR, zaproponowanych przez Figueras i Gratacosa, a: poziomem ROS, konsumpcji tlenu, wewnątrzkomórkowym poziomem niedoboru tlenu w płytkach krwi oraz wynikami testów ASPI i TRAP, uzyskanych podczas oceny agregacji płytek krwi z zastosowaniem agregometrii impedancyjnej

Główne wnioski: Najwyższy poziom ROS w trombocytach obserwowano w ciążach powikłanych IUGR, co może wskazywać na występowanie stresu oksydacyjnego i sprzyjać

aktywacji i agregacji trombocytów oraz powodować ich rozpad, a tym samym inicjować rozwój stanu zapalnego. Wzrost poziomu ROS w ciąży powikłanej IUGR może również wiązać się z upośledzeniem wazodylatacji, a tym samym rozwojem niedotlenienia. Najniższą konsumpcję tlenu w trombocytach obserwowano w ciąży powikłanej IUGR, co może sugerować zaburzenia metabolizmu w płytkach krwi w tej grupie. W grupie pacjentek z IUGR odnotowano największy niedobór wewnątrzkomórkowego poziomu tlenu w trombocytach, co może być związane z występowaniem niedotlenienia lub wysokiego poziomu stresu oksydacyjnego w tych ciążach. Agregacja płytek krwi wywoływana kwasem arachidonowym oraz stymulacją trombocytów przez receptor dla trombiny (TRAP-6) nie różniły się istotnie pomiędzy badanymi grupami.

10. Summary

Introduction: The main cause of intrauterine fetal growth restriction (IUGR) is placental insufficiency, which results in decreased blood flow from the mother to the fetus. This condition probably results from impaired normal trophoblast invasion into the uterine vasculature early in pregnancy. There is then an impairment in the process of normal transformation of the spiral arteries into low resistance vessels, resulting in reduced delivery of oxygen and nutrients to the fetus. The exact pathogenesis of this process remains unclear, but in view of the histopathological changes found in the placenta, the cause is thought to be related to abnormal platelet activation, which may result in excessive platelet aggregation and microthrombus formation in small vessels of the placenta, limiting the area of maternal-fetal exchange. It appears that reactive oxygen species (ROS), a consequence of oxidative stress, may initiate the pathological process of platelet activation, playing an important role in the etiopathogenesis of this condition.

Knowledge of placental abnormalities in pregnancies complicated by FGR remains insufficient. This results in a lack of effective prophylaxis and treatment of this condition, and is often associated with the occurrence of preterm labor with its consequences. On the other hand, unfavorable intrauterine environment through chronic fetal hypoxia affects the health status and quality of life in the future. IUGR can also be one of the main causes of intrauterine fetal death (IUFD) late in pregnancy.

Objectives: The primary objective of this study was to evaluate selected platelet parameters in pregnancy complicated by IUGR. This objective was realized through specific objectives: 1) Assessment of standard parameters characterizing platelets (PLT, MPV); 2) Analysis of reactive oxygen species (ROS) levels in platelets; 3) Assessment of cellular respiration in platelets; 4) Assessment of platelet aggregation using the Multiplate® Analyzer. The results obtained were related to the severity of hemodynamic abnormalities in pregnancy complicated by IUGR as defined by Figueras and Gratacos.

Material and methods: A total of 171 women were enrolled in the study. Three study groups were identified: 1) a group of women with pregnancies complicated by IUGR (n=44); 2) a group of healthy nonpregnant women (n=24); 3) a control group of women with uncomplicated pregnancies (n=67). A total of 24 patients were excluded from the study. The material for the

study was venous blood and platelet-rich plasma (PRP), and the main investigative methods were: peripheral blood morphology, with particular emphasis on the parameters characterizing platelets (PLT, MPV), oxygen metabolism and oxidative stress in platelets (DCFDA, MitoXpress® Xtra, MitoXpress® Intra) and impedance aggregometry (Multiplate®), using ASPI and TRAP tests. The collected data were subjected to statistical analysis, and the level of significance was determined for $p < 0.05$.

Main results: There were a number of statistically significant differences between all three groups in terms of ROS levels. The lowest level of ROS was in the non-pregnant women group and the highest in the IUGR group. In the control group of women with uncomplicated pregnancy, ROS levels were lower than in the IUGR group but higher than in the nonpregnant group. The measurement of platelet oxygen consumption was statistically significantly lower in the IUGR group compared to the other two groups, while platelet intracellular oxygen deprivation was statistically significantly higher in the IUGR group compared to the other two groups. There were no differences at the level of statistical significance between the uncomplicated pregnancy group and the non-pregnant group in either the assessment of oxygen consumption measurement or the intracellular platelet oxygen deficiency level. In the assessment of impedance aggregometry, in terms of ASPI and TRAP tests, there were no statistically significant differences between the IUGR group and the control group of women with uncomplicated pregnancy. In the ASPI and TRAP tests, the group of non-pregnant women was not analyzed. No statistically significant differences were noted between the studied groups during analysis of platelet parameters (PLT, MPV) obtained from peripheral blood morphology. No statistically significant relationships were found between the degree of hemodynamic abnormalities observed in fetuses in pregnancies complicated by IUGR, proposed by Figueras and Gratacos, and: ROS levels, oxygen consumption, platelet intracellular oxygen deficiency, and ASPI and TRAP test results obtained during platelet aggregation assessment using impedance aggregometry.

Main conclusions: The highest levels of ROS in thrombocytes were observed in pregnancies complicated by IUGR, which may indicate the presence of oxidative stress and promote the activation and aggregation of thrombocytes and cause their breakdown, thereby initiating the development of inflammation. Increased levels of ROS in pregnancy complicated by IUGR may also be associated with impaired vasodilation and thus the development of hypoxia. The

lowest thrombocyte oxygen consumption was observed in pregnancies complicated by IUGR, which may suggest metabolic disturbances in platelets in this group. The group of patients with IUGR had the greatest deficiency in intracellular oxygen levels in thrombocytes , which may be related to the presence of hypoxia or high levels of oxidative stress in these pregnancies. Platelet aggregation induced by arachidonic acid and thrombin receptor activating peptide-6 (TRAP-6) stimulation of thrombocytes were not significantly different between the study groups.

1. Figueras F, Gratacós E. Update on the diagnosis and classification of fetal growth restriction and proposal of a stage-based management protocol. *Fetal Diagn Ther.* 2014;36(2):86-98. doi:10.1159/000357592
2. Salafia CM, Minior VK, Pezzullo JC, Popek EJ, Rosenkrantz TS, Vintzileos AM. Intrauterine growth restriction in infants of less than thirty-two weeks' gestation: Associated placental pathologic features. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173(4):1049-1057. doi:10.1016/0002-9378(95)91325-4
3. Nicolaides K, Rizzo G. Doppler studies in fetal hypoxemic hypoxia. *Placent Fetal Doppler.* 2000:67-88. doi:10.1201/b14685-6
4. Brosens I, Dixon HG, Robertson WB. Fetal Growth Retardation and the Arteries of the Placental Bed. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 1977;84(9):656-663. doi:10.1111/j.1471-0528.1977.tb12676.x
5. Khong TY, De Wolf F, Robertson WB, Brosens I. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by preeclampsia and by small-for-gestational age infants. *Obstet Gynecol Surv.* 1987;42(8):503-506. doi:10.1097/00006254-198708000-00009
6. GILES WB, TRUDINGER BJ, BAIRD PJ. Fetal umbilical artery flow velocity waveforms and placental resistance: pathological correlation. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 1985;92(1):31-38. doi:10.1111/j.1471-0528.1985.tb01045.x
7. Sheppard BL, Bonnar J. An ultrastructural study of utero-placental spiral arteries in hypertensive and normotensive pregnancy and fetal growth retardation. *Obstet Gynecol Surv.* 1982;37(3):164-166. doi:10.1097/00006254-198203000-00003
8. Norris LA, Sheppard BL, Burke G, Bonnar J. Platelet activation in normotensive and hypertensive pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 1994;101(3):209-214. doi:10.1111/j.1471-0528.1994.tb13111.x
9. Burton GJ, Jauniaux E. Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;218(2):S745-S761. doi:10.1016/j.ajog.2017.11.577
10. Ellison P, Jasienska G. Constraint, pathology, and adaptation. *Am J Hum Biol.*

- 2006;19(2):165-180. doi:10.1002/ajhb
11. Gagnon R. Placental insufficiency and its consequences. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003;110(SUPPL.):99-107. doi:10.1016/S0301-2115(03)00179-9
 12. Gardosi J, Madurasinghe V, Williams M, Malik A, Francis A. Maternal and fetal risk factors for stillbirth: Population based study. *BMJ.* 2013;346(7893):1-14. doi:10.1136/bmj.f108
 13. ACOG. Practice Bulletin No 204:Fetal growth restriction. *Am Coll Obstet Gynecol.* 2019;133(1):1-25.
 14. Gynaecologists RC of O and. the Investigation and Management of the Small-for-Gestational-Age Fetus. *R Coll Obstet Gynaecol - Guidel No 31.* 2013;(31):1-16. https://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/gtg_31.pdf.
 15. Nicolaides KH, Wright D, Syngelaki A, Wright A, Akolekar R. Fetal Medicine Foundation fetal and neonatal population weight charts. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018;52(1):44-51. doi:10.1002/uog.19073
 16. Crane J, John S, Roggensack A, Ab C, Sanderson F, Nb SJ. Intrauterine Growth Restriction : Screening , Diagnosis , and Management. *J Obstet Gynaecol Canada.* 2013;35(8):741-748. doi:10.1016/S1701-2163(15)30865-3
 17. Gordijn SJ, Beune IM, Thilaganathan B, et al. Consensus definition of fetal growth restriction: a Delphi procedure. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016;48(3):333-339. doi:10.1002/uog.15884
 18. Kwiatkowski S, Torbe A, Borowski D, et al. Rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników w zakresie diagnostyki i postępowania w ciążach powikłanych ograniczeniem wzrastania płodu Polish Society of Gynecologists and Obstetricians fetal growth restriction. 2020;(3):119-130. doi:10.5603/GP.2020.0158.Nale
 19. Figueras F, Caradeux J, Crispi F, Eixarch E, Peguero A, Gratacos E. Diagnosis and surveillance of late-onset fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;218(2):S790-S802.e1. doi:10.1016/j.ajog.2017.12.003

20. Nicolaides KH, Economides DL, Soothill PW. Blood gases, pH, and lactate in appropriate- and small-for-gestational-age fetuses. *Am J Obstet Gynecol.* 1989;161(4):996-1001. doi:10.1016/0002-9378(89)90770-9
21. Soothill PW, Nicolaides KH, Campbell S. Prenatal asphyxia, hyperlacticaemia, hypoglycaemia, and erythroblastosis in growth retarded fetuses. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1987;294(6579):1051-1053. doi:10.1136/bmj.294.6579.1051
22. Crovetto F, Crispi F, Scazzocchio E, et al. First-trimester screening for early and late small-for-gestational-age neonates using maternal serum biochemistry, blood pressure and uterine artery Doppler. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;43(1):34-40. doi:10.1002/uog.12537
23. Turan OM, Turan S, Gungor S, et al. Progression of Doppler abnormalities in intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;32(2):160-167. doi:10.1002/uog.5386
24. Pirnareva E. Monitoring of fetuses with intrauterine growth restriction: A longitudinal study. *Comptes Rendus L'Academie Bulg des Sci.* 2018;71(3):431-436. doi:10.7546/CRABS.2018.03.17
25. Baschat AA, Cosmi E, Bilardo CM, Wolf H. Predictors of Neonatal Outcome in Early-. 2007;109(2):253-261.
26. Oros D, Figueras F, Cruz-Martinez R, Meler E, Munmany M, Gratacos E. Longitudinal changes in uterine, umbilical and fetal cerebral Doppler indices in late-onset small-for-gestational age fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;37(2):191-195. doi:10.1002/uog.7738
27. Kady SM, Gardosi J. Perinatal mortality and fetal growth restriction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004;18(3):397-410. doi:10.1016/j.bpobgyn.2004.02.009
28. Figueras F, Eixarch E, Meler E, et al. Small-for-gestational-age fetuses with normal umbilical artery Doppler have suboptimal perinatal and neurodevelopmental outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;136(1):34-38. doi:10.1016/j.ejogrb.2007.02.016

29. Say L, Gülmezoglu AM, Hofmeyr GJ. Plasma volume expansion for suspected impaired fetal growth. *Cochrane Database Syst Rev*. 1996;(4). doi:10.1002/14651858.cd000167
30. Say L, Gülmezoglu AM, Hofmeyr GJ. Maternal oxygen administration for suspected impaired fetal growth. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(4). doi:10.1002/14651858.CD000137
31. *Interna Szczeklika 2021*. Kraków: Medycyna Praktyczna; 2021.
32. Reed GL. Platelet Secretory Mechanisms. 2004;(1).
33. Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*. 2007;109(12):5087-5095. doi:10.1182/blood-2006-12-027698
34. Brass LF, Vassallo RR, Belmonte E, Ahuja M, Cichowski K, Hoxie JA. Structure and function of the human platelet thrombin receptor. Studies using monoclonal antibodies directed against a defined domain within the receptor N terminus. *J Biol Chem*. 1992;267(20):13795-13798.
35. Kunapuli SP, Dorsam RT, Kim S, Quinton TM. Platelet purinergic receptors. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3(2):175-180. doi:10.1016/S1471-4892(03)00007-9
36. Gryglewski RJ. Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Reports*. 2008;60(1):3-11.
37. Vinay Kumar, Ramzi S. Cotran SLR. *Robbins Patologia*. 7th ed. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner Wrocław; 2003.
38. Smyth SS, Mcever RP, Weyrich AS, et al. Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2009;7(11):1759-1766. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03586.x
39. Gawaz M, Langer H, May AE, Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis Find the latest version : Review series Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3378-3384. doi:10.1172/JCI27196.3378
40. Stanford N, Roth GJ, Shen TY, Majerus PW. Lack of covalent modification of prostaglandin synthetase (cyclo-oxygenase) by indomethacin. *Prostaglandins*. 1977;13(4):669-675. doi:10.1016/0090-6980(77)90237-4
41. Sandy M, Butler A. Microbial iron acquisition: Marine and terrestrial siderophores.

- Chem Rev.* 2009;109(10):4580-4595. doi:10.1021/cr9002787
42. Bartosz G. *Druga Twarz Tlenu*. Warszawa: Wydawnictwo Naukowe PWN SA Sp. z o.o.; 2013.
 43. Clark RA. Activation of the Neutrophil Respiratory Burst Oxidase. *J Infect Dis.* 1999;179(s2):S309-S317. doi:10.1086/513849
 44. Cook C, Petrucelli L. Oxidative stress. *Park Dis Second Ed.* 2012:559-582. doi:10.1201/b12948
 45. SIES H. *Oxidative Stress: Introductory Remarks*. PERGAMON PRESS INC.; 1985. doi:10.1016/b978-0-12-642760-8.50005-3
 46. Pompella A, Sies H, Wacker R, et al. The use of total antioxidant capacity as surrogate marker for food quality and its effect on health is to be discouraged. *Nutrition.* 2014;30(7-8):791-793. doi:10.1016/j.nut.2013.12.002
 47. Zdolsek JM, Svensson I. Effect of reactive oxygen species on lysosomal membrane integrity - A study on a lysosomal fraction. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1993;64(1):401-406. doi:10.1007/BF02915141
 48. Baskurt OK, Temiz A, Meiselman HJ. Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. *Free Radic Biol Med.* 1998;24(1):102-110. doi:10.1016/S0891-5849(97)00169-X
 49. Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat Res - Rev Mutat Res.* 2001;488(1):65-76. doi:10.1016/S1383-5742(00)00059-4
 50. Freedman JE. Oxidative stress and platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(3). doi:10.1161/ATVBAHA.107.159178
 51. Kro F, Sohn H, Pohl U. Players in the Platelet Game. 2004:1988-1996. doi:10.1161/01.ATV.0000145574.90840.7d
 52. Komosa A, Rzymiski P, Perek B, et al. Platelets redox balance assessment: Current evidence and methodological considerations. *Vascul Pharmacol.* 2017;93-95:6-13. doi:10.1016/j.vph.2017.06.002

53. Stokes KY, Russell JM, Jennings MH, Alexander JS, Neil D. the Thrombogenic Phenotype Induced By. 2008;43(1):22-30.
54. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production. 1993;91(June):2546-2551.
55. Risk Factors for Cardiovascular Disease in Women with a History of Pregnancy Complicated by Preeclampsia or Intrauterine Growth. 2007:39-50.
doi:10.1080/10641950601146574
56. Ponické SFK, Aggregatíon of OF, Platelet H, Hypoxia TBY, Lenínalée S. Stimulation of aggregation and thromboxane A₂ formation of human platelets by hypoxia. Prostaglandins. 1987:49-59.
57. *Multiplate, Ulotka Informacyjna.*; 2015.
58. *Instrukcja Obsługi Multiplate, Wersja Podręcznika V. 060403PL.* Dynabyte medical; 2006.
59. Mackie IJ, Jones R, Machin SJ. Platelet impedance aggregation in whole blood and its inhibition by antiplatelet drugs. *J Clin Pathol.* 1984;37(8):874-878.
doi:10.1136/jcp.37.8.874
60. Seyfert UT, Haubelt H, Vogt A, Hellstern P. Variables influencing Multiplate™ whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals. *Platelets.* 2007;18(3):199-206. doi:10.1080/09537100600944277
61. Dikalov SI, Harrison DG. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxidants Redox Signal.* 2014;20(2):372-382.
doi:10.1089/ars.2012.4886
62. Gomes A, Fernandes E, Lima JLFC. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J Biochem Biophys Methods.* 2005;65(2-3):45-80.
doi:10.1016/j.jbbm.2005.10.003
63. Wang Z, Cai F, Chen X, Luo M, Hu L, Lu Y. The Role of Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species in Hyperthermia-Induced Platelet Apoptosis. *PLoS One.* 2013;8(9):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0075044

64. Walsh TG, Berndt MC, Carrim N, Cowman J, Kenny D, Metharom P. The role of Nox1 and Nox2 in GPVI-dependent platelet activation and thrombus formation. *Redox Biol.* 2014;2(1):178-186. doi:10.1016/j.redox.2013.12.023
65. Carrim N, Arthur JF, Hamilton JR, et al. Thrombin-induced reactive oxygen species generation in platelets: A novel role for protease-activated receptor 4 and GPIb α . *Redox Biol.* 2015;6:640-647. doi:10.1016/j.redox.2015.10.009
66. <https://www.abcam.com/dcfda--h2dcfda-cellular-ros-assay-kit-ab113851.html>.
67. https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/MitoXpress_Xtra_Oxygen_Consumption_Assay.pdf.
68. Dmitriev RI, Zhdanov A V., Jasione G, Papkovsky DB. Assessment of cellular oxygen gradients with a panel of phosphorescent oxygen-sensitive probes. *Anal Chem.* 2012;84(6):2930-2938. doi:10.1021/ac3000144
69. Hynes J, Marroquin LD, Ogurtsov VI, et al. Investigation of drug-induced mitochondrial toxicity using fluorescence-based oxygen-sensitive probes. *Toxicol Sci.* 2006;92(1):186-200. doi:10.1093/toxsci/kfj208
70. Agilent Technologies. Intracellular Oxygen Assay Manual Part Number. 2018. https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/MitoXpress_Intra_Intracellular_Oxygen_Assay.pdf.
71. Committee on Obstetric Practice. Methods for Estimating the Due Date. *Obstet Gynecol.* 2017;129(5):e150-e154.
72. Ropacka-Lesiak M, Breborowicz G. Management of pregnancy complicated by intrauterine fetal growth restriction TT - Postepowanie w ciąży powikłanej wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania płodu. *Ginekol Pol.* 2012;83(5):373-376. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22708336>.
73. Robinson HP, Fleming JE. A critical evaluation of sonar "crown-rump length" measurements. *Br J Obstet Gynaecol.* 1975;82(9):702-710. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1182090>.

74. Salomon LJ, Bernard JP, Ville Y. Estimation of fetal weight: Reference range at 20-36 weeks' gestation and comparison with actual birth-weight reference range. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007;29(5):550-555. doi:10.1002/uog.4019
75. <http://medicinafetalbarcelona.org/calc/>.
76. Spong CY. Defining "term" pregnancy: Recommendations from the defining "term" pregnancy workgroup. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2013;309(23):2445-2446. doi:10.1001/jama.2013.6235
77. Watterberg KL, Aucott S, Benitz WE, et al. The apgar score. *Pediatrics.* 2015;136(4):819-822. doi:10.1542/peds.2015-2651
78. De Souza Medeiros TK, Dobre M, Da Silva DMB, Brateanu A, Baltatu OC, Campos LA. Intrapartum fetal heart rate: A possible predictor of neonatal acidemia and APGAR score. *Front Physiol.* 2018;9(OCT):1-6. doi:10.3389/fphys.2018.01489
79. Blickstein I, Green T. Umbilical Cord Blood Gases. *Clin Perinatol.* 2007;34(3):451-459. doi:10.1016/j.clp.2007.05.001
80. George D, Mallery P. *IBM SPSS Statistics 26 Step by Step: A Simple Guide and Reference.*; 2019.
81. Kesavan K, Devaskar SU. Intrauterine Growth Restriction: Postnatal Monitoring and Outcomes. *Pediatr Clin North Am.* 2019;66(2):403-423. doi:10.1016/j.pcl.2018.12.009
82. Barker DJP, Osmond C, Law CM. The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. *J Epidemiol Community Health.* 1989;43(3):237-240. doi:10.1136/jech.43.3.237
83. De Jong M, Cranendonk A, Van Weissenbruch MM. Components of the metabolic syndrome in early childhood in very-low-birth-weight infants and term small and appropriate for gestational age infants. *Pediatr Res.* 2015;78(4):457-461. doi:10.1038/pr.2015.118
84. Schoots MH, Gordijn SJ, Scherjon SA, van Goor H, Hillebrands JL. *Oxidative Stress in Placental Pathology.* Vol 69. Elsevier Ltd; 2018. doi:10.1016/j.placenta.2018.03.003
85. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*

2011;25(3):287-299. doi:10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016

86. Theilen LH, Campbell HD, Mumford SL, et al. Platelet activation and placenta-mediated adverse pregnancy outcomes: an ancillary study to the Effects of Aspirin in Gestation and Reproduction trial. *Am J Obstet Gynecol*. 2020;223(5):741.e1-741.e12. doi:10.1016/j.ajog.2020.05.026
87. Valera MC, Parant O, Vayssiere C, Arnal JF, Payrastre B. Physiologic and pathologic changes of platelets in pregnancy. *Platelets*. 2010;21(8):587-595. doi:10.3109/09537104.2010.509828
88. Kanat-Pektas M, Yesildager U, Tuncer N, Arioz DT, Nadirgil-Koken G, Yilmazer M. Could mean platelet volume in late first trimester of pregnancy predict intrauterine growth restriction and pre-eclampsia? *J Obstet Gynaecol Res*. 2014;40(7):1840-1845. doi:10.1111/jog.12433
89. Kleijer WJ, van der Sterre MLT, Garritsen VH, Raams A, Jaspers NGJ. Evolution of prenatal detection of neural tube defects in the pregnant population of the city of Barcelona from 1992 to 2006. *Prenat Diagn*. 2011;31(10):1184-1188. doi:10.1002/pd
90. Piazze J, Gioia S, Maranghi L, Anceschi M. Mean platelet and red blood cell volume measurements to estimate the severity of hypertension in pregnancy [1]. *J Perinat Med*. 2006;34(3):246-247. doi:10.1515/JPM.2006.044
91. Prevention of Preeclampsia and Intrauterine. 2010;116(2):402-414.
92. Blomqvist LRF, Strandell AM, Baghaei F, Hellgren MSE. Platelet aggregation in healthy women during normal pregnancy - a longitudinal study. *Platelets*. 2019;30(4):438-444. doi:10.1080/09537104.2018.1492106
93. Mustafa Can M, Kaymaz C, Can E, et al. Whole blood platelet aggregation failed to detect differences between preeclampsia and normal pregnancy. *Platelets*. 2010;21(6):496-497. doi:10.3109/09537101003797275
94. Navaratnam K, Alfirevic A, Jorgensen A, Alfirevic Z. Aspirin non-responsiveness in pregnant women at high-risk of pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2018;221:144-150. doi:10.1016/j.ejogrb.2017.12.052

95. Norris LA, Gleeson N, Sheppard BL, Bonnar J. Whole blood platelet aggregation in moderate and severe pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1993;100(7):684-688. doi:10.1111/j.1471-0528.1993.tb14239.x
96. Burton GJ, Yung HW, Cindrova-Davies T, Charnock-Jones DS. Placental Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in the Pathophysiology of Unexplained Intrauterine Growth Restriction and Early Onset Preeclampsia. *Placenta.* 2009;30(SUPPL.):43-48. doi:10.1016/j.placenta.2008.11.003
97. Pratico D, Iuliano L, Pulcinelli FM et al. Hydrogen peroxide triggers activation of human platelets selectively exposed to nonaggregating concentrations of arachidonic acid and collagen. *J Lab Clin Med* 119. 1992:364-70.
98. Lagarde M, Guichardant M, Bernoud-Hubac N, Calzada C, Véricel E. Oxygenation of polyunsaturated fatty acids and oxidative stress within blood platelets. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2018;1863(6):651-656. doi:10.1016/j.bbalip.2018.03.005
99. Belo L, Caslake M, Santos-Silva A, et al. LDL size, total antioxidant status and oxidised LDL in normal human pregnancy: A longitudinal study. *Atherosclerosis.* 2004;177(2):391-399. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.07.023
100. Oparka M, Walczak J, Malinska D, et al. Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and HyPer. *Methods.* 2016;109:3-11. doi:10.1016/j.ymeth.2016.06.008
101. Perry CGR, Kane DA, Lanza IR, Neufer PD. Methods for assessing mitochondrial function in diabetes. *Diabetes.* 2013;62(4):1041-1053. doi:10.2337/db12-1219
102. Somkhit J, Loyant R, Brenet A, et al. A fast, simple, and affordable technique to measure oxygen consumption in living zebrafish embryos. *Zebrafish.* 2020;17(4):268-270. doi:10.1089/zeb.2020.1878
103. CLARK LC, WOLF R, GRANGER D, TAYLOR Z. Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J Appl Physiol.* 1953;6(3):189-193. doi:10.1152/jappl.1953.6.3.189
104. Will Y, Hynes J, Ogurtsov VI, Papkovsky DB. Analysis of mitochondrial function using

- phosphorescent oxygen-sensitive probes. *Nat Protoc.* 2007;1(6):2563-2572.
doi:10.1038/nprot.2006.351
105. Weissig V, Edeas M. Mitochondrial Medicine. *Mitochondrial Med.* 2015;2:1-447.
doi:10.1007/978-1-4939-2288-8
 106. Kondrashina A V., Ogurtsov VI, Papkovsky DB. Comparison of the three optical platforms for measurement of cellular respiration. *Anal Biochem.* 2015;468:1-3.
doi:10.1016/j.ab.2014.09.001
 107. Fercher A, Borisov SM, Zhdanov A V., Klimant I, Papkovsky DB. Intracellular O₂ sensing probe based on cell-penetrating phosphorescent nanoparticles. *ACS Nano.* 2011;5(7):5499-5508. doi:10.1021/nn200807g
 108. Weissig V, Edeas M. Mitochondrial Medicine. *Mitochondrial Med.* 2015;1:1-480.
doi:10.1007/978-1-4939-2257-4
 109. Fercher A, O’Riordan TC, Zhdanov A V., Dmitriev RI, Papkovsky DB. Imaging of cellular oxygen and analysis of metabolic responses of mammalian cells. *Methods Mol Biol.* 2010;591:257-273. doi:10.1007/978-1-60761-404-3_16
 110. Rumsey WL, Vanderkooi JM, Wilson DF. Imaging of phosphorescence: A novel method for measuring oxygen distribution in perfused tissue. *Science (80-).* 1988;241(4873):1649-1651. doi:10.1126/science.3420417
 111. O’Riordan TC, Fitzgerald K, Ponomarev G V., et al. Sensing intracellular oxygen using near-infrared phosphorescent probes and live-cell fluorescence imaging. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2007;292(4):1613-1621. doi:10.1152/ajpregu.00707.2006
 112. Groom KM, David AL. The role of aspirin, heparin, and other interventions in the prevention and treatment of fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;218(2):S829-S840. doi:10.1016/j.ajog.2017.11.565
 113. Meher S, Duley L, Hunter K, Askie L. Antiplatelet therapy before or after 16 weeks’ gestation for preventing preeclampsia: an individual participant data meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2017;216(2):121-128.e2. doi:10.1016/j.ajog.2016.10.016
 114. Roberge S, Nicolaides K, Demers S, Hyett J, Chaillet N, Bujold E. The role of aspirin

dose on the prevention of preeclampsia and fetal growth restriction: systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2017;216(2):110-120.e6.
doi:10.1016/j.ajog.2016.09.076

