

Katarzyna Panecka-Mysza

**Rola stresu oksydacyjnego w cholestazie ciążowej**

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

Promotor: prof. dr hab. n. med. Grzegorz H. Bręborowicz



Kolegium Nauk Medycznych  
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2021

*Składam serdeczne podziękowania*

*Promotorowi – prof. dr hab. Grzegorzowi H. Bręborowiczowi  
za nieocenione wsparcie, zaangażowanie i merytoryczną pomoc  
w trakcie przygotowywania pracy doktorskiej.*

*Dziękuję również mojej rodzinie oraz wszystkim,  
którzy wspierali mnie w procesie tworzenia niniejszej rozprawy.*

*Rozprawę doktorską dedykuję  
mojemu mężowi Jakubowi oraz dzieciom - Julii, Aleksandrowi i Maksymilianowi.*

## Spis treści

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. Wstęp</b>                                                                                    | 9  |
| 1.1. Zmiany funkcji wątroby w ciąży                                                                | 9  |
| 1.2. Zaburzenia funkcji wątroby w ciąży                                                            | 9  |
| 1.2.1. Choroby wątroby związane z ciążą                                                            | 10 |
| 1.2.2. Choroby wątroby niezwiązane z ciążą                                                         | 12 |
| 1.2.3. Ciąża u kobiet po przeszczepie wątroby                                                      | 13 |
| 1.3. Wewnątrzwątrobowa cholestaza ciężarnych (ICP - <i>intrahepatic cholestasis of pregnancy</i> ) | 13 |
| 1.3.1. Epidemiologia                                                                               | 13 |
| 1.3.2. Etiologia                                                                                   | 14 |
| 1.3.3. Rozpoznanie                                                                                 | 15 |
| 1.3.4. Postępowanie                                                                                | 16 |
| 1.4. Stres oksydacyjny                                                                             | 17 |
| 1.4.1. Reaktywne formy tlenu i azotu                                                               | 17 |
| 1.4.2. System obrony antyoksydacyjnej                                                              | 19 |
| 1.4.3. Skutki stresu oksydacyjnego                                                                 | 20 |
| 1.4.4. Markery stresu oksydacyjnego                                                                | 21 |
| 1.4.5. Stres oksydacyjny a ciąża                                                                   | 22 |
| <b>2. Cel pracy</b>                                                                                | 25 |
| <b>3. Materiał</b>                                                                                 | 26 |
| 3.1. Grupy                                                                                         | 26 |
| 3.1.1. Grupa badana                                                                                | 26 |
| 3.1.2. Grupa kontrolna                                                                             | 27 |
| <b>4. Metody badawcze</b>                                                                          | 28 |
| 4.1. Ocena parametrów klinicznych                                                                  | 28 |
| 4.2. Oznaczenie poziomu markerów stresu oksydacyjnego w surowicy krwi                              | 28 |
| 4.2.1. Oznaczenie SOD, GSH-Px, GSR, GSH, MDA, VEGF metodą ELISA                                    | 28 |
| 4.2.2. Oznaczenie TAS                                                                              | 29 |
| 4.3. Badanie łożyska                                                                               | 30 |
| 4.3.1. Przygotowanie preparatów do barwienia immunohistochemicznego                                | 30 |
| 4.3.2. Technika immunohistochemiczna                                                               | 31 |
| 4.3.3. Ocena ekspresji białek                                                                      | 33 |
| 4.4. Analiza statystyczna                                                                          | 34 |
| <b>5. Wyniki</b>                                                                                   | 35 |
| 5.1. Charakterystyka analizowanych grup                                                            | 35 |

|            |                                                                         |           |
|------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2.       | Ocena parametrów stresu oksydacyjnego w surowicy krwi .....             | 36        |
| 5.2.1.     | Stężenie TAS (mmol/l) w surowicy krwi.....                              | 36        |
| 5.2.2.     | Stężenie SOD (ng/ml) w surowicy krwi .....                              | 36        |
| 5.2.3.     | Stężenie GSH-Px (ng/ml) w surowicy krwi.....                            | 37        |
| 5.2.4.     | Stężenie GSR (ng/ml) w surowicy krwi.....                               | 37        |
| 5.2.5.     | Stężenie GSH (Uml/l) w surowicy krwi .....                              | 38        |
| 5.2.6.     | Stężenie MDA (nmol/ml) w surowicy krwi.....                             | 39        |
| 5.2.7.     | Stężenie VEGF (ng/l) w surowicy krwi .....                              | 39        |
| 5.3.       | Wyniki ekspresji wybranych białek w łożysku.....                        | 40        |
| 5.3.1.     | Wyniki ekspresji białka p16 w łożysku.....                              | 40        |
| 5.3.1.1.   | Wyniki ekspresji białka p16 w trofoblaście .....                        | 41        |
| 5.3.1.2.   | Wyniki oznaczenia białka p16 w naczyniach kosmków .....                 | 41        |
| 5.3.2.     | Wyniki ekspresji białka COX-2 w łożysku.....                            | 42        |
| 5.3.2.1.   | Wyniki ekspresji białka COX-2 w trofoblaście .....                      | 43        |
| 5.3.2.2.   | Wyniki ekspresji białka COX-2 w naczyniach kosmków .....                | 44        |
| 5.3.3.     | Wyniki ekspresji białka cyklina D1 w łożysku.....                       | 44        |
| 5.3.3.1.   | Wyniki ekspresji białka cyklina D1 w trofoblaście.....                  | 44        |
| 5.3.3.2.   | Wyniki oznaczenia białka cyklina D1 w naczyniach kosmków .....          | 45        |
| 5.3.4.     | Wyniki ekspresji białka SATB2 w łożysku .....                           | 45        |
| 5.3.4.1.   | Wyniki ekspresji białka SATB2 w trofoblaście.....                       | 46        |
| 5.3.4.2.   | Wyniki ekspresji białka SATB2 w naczyniach kosmków .....                | 46        |
| 5.3.5.     | Wyniki ekspresji białka FOXP3 w łożysku .....                           | 46        |
| 5.3.5.1.   | Wyniki ekspresji białka FOXP3 w trofoblaście.....                       | 47        |
| 5.3.5.2.   | Wyniki ekspresji białka FOXP3 w naczyniach kosmków .....                | 47        |
| <b>6.</b>  | <b>Dyskusja</b> .....                                                   | <b>48</b> |
| 6.1.       | Ocena parametrów stresu oksydacyjnego w surowicy krwi .....             | 49        |
| 6.2.       | Ocena aktywności określonych białek stresu oksydacyjnego w łożysku..... | 53        |
| <b>7.</b>  | <b>Wnioski</b> .....                                                    | <b>57</b> |
| <b>8.</b>  | <b>Streszczenie</b> .....                                               | <b>58</b> |
| <b>9.</b>  | <b>Summary</b> .....                                                    | <b>61</b> |
| <b>10.</b> | <b>Piśmiennictwo</b> .....                                              | <b>64</b> |

## **Wykaz stosowanych w pracy skrótów**

8-iso-PGF2 $\alpha$  - produkt peroksydacji kwasu arachidonowego (ang. *8-epimer of prostaglandin F2alpha*)

ABCB11 - gen kodujący białko BSEP (ang. *ATP binding cassette subfamily B member 11*)

ABCB4 - gen kodujący białko MDR3 (ang. *ATP binding cassette subfamily B member 4*)

ABTS<sup>®</sup> - zarezerwowany znak handlowy firmy Boehringer Mannheim

ABTS<sup>®</sup> - 2,2'-Azino-di-[siarczan 3-ethylbenzthiazoliny]

ABTS<sup>®\*</sup> - reaktywna forma 2,2'-Azino-di-[siarczan 3-ethylbenzthiazoliny]

ADAMTS-12 - łożyskowa metaloproteinaza (ang. *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif 12*)

AFLP - ostre stłuszczenie wątroby w ciąży (ang. *acute fatty liver of pregnancy*)

ALAT - aminotransferaza alaninowa (ang. *alanine aminotransferase*)

ARES - aryloesteraza (ang. *arylesterase*)

ASPAT - aminotransferaza asparaginianowa (ang. *aspartate aminotranferase*)

ATP8B1 - gen kodujący enzym ATP-azę transportującą fosfolipidy

BM - badany materiał - surowica krwi

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

BSEP - transporter ABC, pompa eksportująca sole kwasów żółciowych (ang. *bile salt export pump*)

CDK - kinaza zależna od cyklin (ang. *cyclin-dependent kinase*)

CDKN2A - gen kodujący białko p16, inhibitor kinazy zależnej od cykliny 2A (ang. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)

CMV - cytomegalowirus (ang. *cytomegalovirus*)

COX 2 – cyklooksygenaza 2 (ang. *cyclooxygenase-2*)

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

ELISA - test immunoenzymatyczny (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

FIC1 - rodzinna cholestaza wewnątrzwątrobową typ 1 (ang. *familiar intrahepatic cholestatis type 1*)

FOXP3 - białko biorące udział w odpowiedzi odpornościowej (ang. *forkhead box P3*)

GGT -  $\gamma$ -glutamylotransferaza/gamma-glutamylotransferaza (ang.  *$\gamma$ -glutamyltrasferase*)

GSH - glutation (ang. *glutathione*)

GSH-Px - peroksydaza glutationowa (ang. *glutathione peroxidase*)

GSR - reduktaza glutationowa (ang. *glutathione-disulfide reductase*)

HAV - wirus zapalenia wątroby typu A (ang. *hepatitis A virus*)  
HBV - wirus zapalenia wątroby typu B (ang. *hepatitis B virus*)  
HCV - wirus zapalenia wątroby typu C (ang. *hepatitis C virus*)  
HELLP - zespół objawów: hemoliza, podwyższone aktywności aminotransferaz wątrobowych, trombocytopenia (ang. *hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count*)  
HEV - wirus zapalenia wątroby typu E (ang. *hepatitis E virus*)  
HG - niepowściągliwe wymioty ciężarnych (ang. *hyperemesis gravidarum*)  
HOCl - kwas podchlorawy (ang. *hypochlorous acid*)  
HRP - peroksydaza chrzanowa (ang. *horseradish peroxidase*)  
HSV - wirus opryszczki pospolitej (ang. *herpes simplex virus*)  
HX - Fe III Metmyoglobina  
ICP - wewnątrzwątrobowa cholestaza ciężarnych (ang. *intrahepatic cholestasis of pregnancy*)  
IPEX - sprzężony z chromosomem X zespół dysregulacji immunologicznej, poliendokrynopatii i enteropatii (ang. *immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*)  
IRS - skala wykorzystywana do oceny reakcji immunohistochemicznych (ang. *immunoreactive score*)  
LDL - lipoproteina o małej gęstości (ang. *low-density lipoprotein*)  
MDA - dialdehyd malonowy (ang. *malondialdehyde*)  
MDR3 - białko transportowe z nadrodziny ABC, kodowane przez gen ABCB4 (ang. *multidrug resistance protein 3*)  
 $O_2^-$  - anionorodnik ponadtlenkowy  
OSI - wskaźnik stresu oksydacyjnego (ang. *oxidative stability index*)  
PE - stan przedrzucawkowy (ang. *preeclampsia*)  
RFT - reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)  
SATB2 - specjalne białko wiążące bogate w AT (ang. *Special AT-rich sequence-binding protein 2*)  
SOD - dysmutaza ponadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*)  
TAS - całkowity potencjał antyoksydacyjny (ang. *total antioxidant status*)  
TBA - kwasy żółciowe całkowite (ang. *total bile acids*)  
TMB - tetrametylobenzydyna  
TNF- $\alpha$  - czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor  $\alpha$* )

TOS - całkowity stan utleniaczy (ang. *total oxidant status*)

VEGF - czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*)

## 1. Wstęp

W czasie ciąży w ustroju ciężarnej dochodzi do szeregu zmian funkcjonalnych jak i anatomicznych, których zasadniczym celem jest zapewnienie prawidłowego rozwoju płodu. Zmiany te rozpoczynają się bezpośrednio po zapłodnieniu i dotyczą wszystkich narządów w organizmie ciężarnej; po zakończeniu ciąży zmiany adaptacyjne prawie w całości cofają się. Znajomość fizjologicznej adaptacji ustroju ciężarnej jest bardzo istotna w aspekcie rozpoznawania i ewentualnej terapii powikłań w przebiegu ciąży.

### 1.1. Zmiany funkcji wątroby w ciąży

Wątroba jest jednym z tych narządów, w których fizjologiczne zmiany pozwalają na niepowikłany przebieg ciąży. W wyniku wzrastającej macicy wątroba ulega przemieszczeniu ku górze co powoduje utrudnione jej badanie. Pomimo tego, że rzut serca, tętno matki oraz objętość osocza zwiększają się, przepływ krwi przez wątrobę nie zmienia się w ciąży. W ciąży mogą pojawiać się teleangiektazje i rumień dłoni, co w innych sytuacjach mogłoby być objawem patologii wątroby, a w ciąży związane jest z podwyższonym poziomem estrogenów. Perystaltyka pęcherzyka żółciowego i dróg żółciowych ulega zmniejszeniu, co wpływa na ryzyko powstawania kamieni żółciowych.

Istotne zmiany zachodzą w zakresie metabolizmu wątroby, które w znacznej części są wynikiem zmienionej aktywności estrogenów i progesteronu w ciąży, który jest główną przyczyną wzmożonej syntezy białek. Obniża się natomiast o 20-40% stężenie albumin. Stężenie aminotransferaz w osoczu jak i  $\gamma$ -glutamylotransferazy i 5'nukleotydazy w surowicy krwi nie ulegają w ciąży istotnym zmianom. Zwiększa się aktywność fosfatazy alkalicznej, szczególnie w III trymestrze ciąży, z uwagi na przenikanie tego enzymu z łożyska oraz wzmożonego jej obrotu w kościach. Wzrostowi ulegają również stężenia fibrynogenu, transferryny, globuliny wiążącej tyroksynę oraz glikokortykosteroidów, podczas gdy stężenie wolnej i całkowitej bilirubiny obniża się<sup>1,2</sup>.

### 1.2. Zaburzenia funkcji wątroby w ciąży

Schorzenia wątroby w ciąży są grupą chorób stosunkowo mało przebadaną i między innymi dlatego stanowią szczególne wyzwanie dla położników i hepatologów, przede wszystkim w aspekcie wczesnego rozpoznania i możliwych komplikacji dla matki i płodu. Dotyczą one około 3% ciąż, niemniej mogą mieć bardzo istotny wpływ na stan zdrowia kobiety i płodu. Zaburzenia funkcji wątroby w ciąży można podzielić na dwie

kategorię: choroby wątroby związane i niezwiązane z ciążą, które mogą się pojawiać w różnych okresach życia człowieka.

#### 1.2.1. Choroby wątroby związane z ciążą

W diagnostyce chorób związanych z ciążą decydujące znaczenie ma okres ich wystąpienia, objawy kliniczne oraz wyniki testów ciążowych. Powikłania tych schorzeń mogą być bardzo poważne łącznie ze zgonem ciężarnej (0-25%). Rokowanie zależy w znacznej mierze od przyczyny choroby, stopnia zaburzeń metabolicznych i wydzielniczych wątroby oraz okresu ciąży w którym nastąpiło rozpoznanie<sup>3</sup>.

##### Niepowściągliwe wymioty ciężarnych (HG – *hyperemesis gravidarum*)

Choroba ta jest rozpoznawana w pierwszym trymestrze ciąży; zwykle rozpoczyna się przed 9. tygodniem ciąży, a jej objawy ustępują przed ukończeniem 20. tygodnia ciąży. HG dotyczy od 0,3-2% ciąż i nierzadko stanowi wskazanie do hospitalizacji<sup>4</sup>. Wśród czynników ryzyka wystąpienia niepowściągliwych wymiotów ciężarnych wymienia się ciążę wielopłodową, podwyższone BMI, cukrzycę, schorzenia psychiatryczne oraz niepowściągliwe wymioty w wywiadzie położniczym. Schorzenie charakteryzuje się uporczywymi nudnościami i wymiotami mogącymi prowadzić do odwodnienia, zaburzeń elektrolitowych i utraty masy ciała nawet o ponad 5%. W zasadzie nie jest to choroba wątroby jednak u około 50% ciężarnych obserwuje się podwyższone wartości transaminaz, zwykle nie przekraczających wartości 200 U/L; może wystąpić również podwyższenie wartości amylazy i lipazy. W postępowaniu terapeutycznym istotną rolę odgrywa dożylne podawanie płynów, stosowanie środków przeciwwymiotnych, suplementacja witaminami i ewentualne odżywianie parenteralne<sup>3,5</sup>.

##### Ostre stłuszczenie wątroby w ciąży (AFLP - *acute fatty liver of pregnancy*)

Schorzenie to rozpoznawane jest zwykle w trzecim trymestrze ciąży lub po porodzie. Jest ono rzadkie, bowiem występuje z częstością 1/7-16000 ciąż niemniej stanowi około 16-43% poważnych konsekwencji związanych z chorobami wątroby w ciąży<sup>6</sup>. Wczesna diagnoza jest bardzo istotna z uwagi na szybki przebieg choroby i śmiertelność matek szacowaną na 18% oraz umieralność okołoporodową płodów czy też noworodków na poziomie ok. 23%. Patogeneza AFLP, choć nie do końca poznana, jest związana z zaburzonym metabolizmem kwasów tłuszczowych w komórkach wątroby, częściowo na podłożu genetycznym. Szybkie rozpoznanie może być trudne z uwagi na objawy

występujące również w częstszych dysfunkcjach wątroby, jak stan przedrzucawkowy czy HELLP, dlatego istotne jest wykluczenie tych patologii<sup>7</sup>. Postępowanie polega na natychmiastowym ukończeniu ciąży i leczeniu wspomagającym. W skrajnych przypadkach konieczny bywa przeszczep wątroby<sup>8</sup>.

#### Stan przedrzucawkowy z dysfunkcją wątroby (PE – *preeclampsia with liver dysfunction*)

Stan przedrzucawkowy stanowi poważne powikłanie ciąży, które dotyka nawet 3-8% wszystkich ciąż. PE jest zespołem objawów chorobowych, które pojawiają się po 20. tygodniu ciąży, charakteryzującym się obecnością nadciśnienia tętniczego ( $\geq 140/90$  mmHg), któremu towarzyszy proteinuria ( $>300$  mg/dobę) lub jedno z następujących stanów: trombocytopenia, dysfunkcja nerek, dysfunkcja wątroby, obrzęk płuc, objawy ze strony narządu wzroku lub OUN<sup>9</sup>. Stan przedrzucawkowy może powodować również poważne powikłania dla płodu, takie jak wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu, oddzielenie łożyska, poród przedwczesny i powiązane z nim patologie, w tym martwicze zapalenie jelit, porażenie mózgowe, retinopatia wcześniacza, zespół zaburzeń oddychania u noworodka, a nawet zgon okołoporodowy<sup>10</sup>.

#### Zespół HELLP (HELLP - *hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count*)

Dotyczy około 0,1- 1% ciąż. Rozpoznawany jest zwykle w II lub III trymestrze ciąży, a w 30% przypadków po porodzie. Często współistnieje ze stanem przedrzucawkowym i rzucawką. Podstawowe objawy zawarte są w nazwie, tj. hemoliza (*hemolysis*), podwyższony poziom enzymów wątrobowych (*hemolysis, elevated liver enzymes*) oraz obniżony poziom płytek krwi (*low platelet count*)<sup>6</sup>. Dodatkowo mogą pojawić się nudności, wymioty, ból głowy czy złe samopoczucie. Żółtaczka występuje u ok. 5%. Z uwagi na często niejednoznaczne objawy i różny przebieg rozpoznanie bywa trudne<sup>2</sup>. Zespół HELLP wiąże się z matczyną śmiertelnością na poziomie 5%, podczas gdy śmiertelność płodu może sięgać nawet 30%. Postępowanie zależy od wieku ciążowego i stanu chorej, natomiast wczesny poród pozostaje podstawą pomyślnego wyniku leczenia<sup>4</sup>.

Cholestaza ciężarnych, która jest podmiotem zainteresowania niniejszej pracy została opisana poniżej.

### 1.2.2. Choroby wątroby niezwiązane z ciążą

Druga grupa patologii wątroby jest niezwiązana z ciążą, dotyczy zaostrzenia chorób wątroby rozpoznanych przed ciążą, a także chorób wykrytych w ciąży przypadkowo.

#### Zapalenie wątroby o różnej etiologii

Zapalenie wątroby w ciąży może mieć różną etiologię. Może być wynikiem zakażenia wirusami: HAV (*hepatitis A virus*), HBV (*hepatitis B virus*), HCV (*hepatitis C virus*), HDV (*hepatitis D virus*), HEV (*hepatitis E virus*), HSV (*herpes simplex*), CMV (*cytomegalovirus*) lub Epsteina-Barra<sup>4</sup>.

#### Zespół Budd-Chiari

Zespół Budd-Chiari występuje rzadko a istotą choroby jest zaburzenie odpływu krwi żyłnej z wątroby i obejmuje wszystkie naczynia, od najmniejszych żył wątrobowych, aż do połączenia żyły głównej dolnej z przedsionkiem serca.

Przebieg kliniczny może być bezobjawowy, może też doprowadzić do piorunującej niewydolności wątroby wymagającej transplantacji<sup>11</sup>. Czynnikiem ryzyka rozwoju zespołu Budd-Chiari są zaburzenia w zakresie układu krzepnięcia o charakterze nadkrzepliwości (np. trombofilia, niedobór białka S). Kobiety, u których zespół ten rozpoznano przed ciążą, powinny zostać odpowiednio przygotowane do koncepcji (farmakoterapia, chirurgia). W czasie ciąży, oprócz bardzo rzadkich dramatycznych zdarzeń, najczęstszymi powikłaniami są poronienie i zagrażający poród przedwczesny.

#### Choroba Wilsona

Choroba Wilsona jest rzadką, genetycznie uwarunkowaną chorobą (autosomalna recesywna mutacja *ATTP7B*), w której dochodzi do gromadzenia miedzi w narządach wewnętrznych, przede wszystkim w wątrobie i w mózgu. Prowadzi to do jej różnych postaci, od bezobjawowych poprzez różne formy niewydolności wątroby, a także objawy neurologiczne czy psychiatryczne. W grupie kobiet u których rozpoznano chorobę Wilsona częściej obserwuje się niepłodność. W czasie ciąży częstość powikłań, z których najczęstszym jest poronienie, w znacznym stopniu zależy od kontynuowania terapii z okresu poprzedzającego ciążę lub rozpoczętej w czasie ciąży. Pomimo kontrowersji dotyczących terapii choroby Wilsona w czasie ciąży, obserwacje kliniczne wskazują na korzyści wynikające z niej, które przewyższają ewentualne efekty uboczne<sup>12,13</sup>.

### Marskość wątroby i nadciśnienie wątrobowe

Marskość wątroby i nadciśnienie wątrobowe występują rzadko wśród kobiet w wieku rozrodczym. Niemniej u kobiet w ciąży z marskością wątroby istnieje duże ryzyko pogorszenia funkcji wątroby, mogące doprowadzić do wodobrzusza, krwawienia z żyłaków przełyku czy encefalopatii jak również zgonu pacjentki<sup>5</sup>.

#### 1.2.3. Ciąża u kobiet po przeszczepie wątroby

Pierwszy opis ciąży u kobiety po przeszczepie wątroby został przedstawiony w 1978 roku przez Walcotta i wsp.<sup>14</sup>. Zasadniczym problemem w grupie ciężarnych po przeszczepie wątroby jest ochrona przed odrzuceniem przeszczepu oraz wczesne rozpoznanie i ewentualne leczenie u matki i płodu powikłań w postaci stanu przedrzucawkowego, cukrzycy ciążowej, zagrażającego porodu przedwczesnego oraz bakteryjnej posocznicy<sup>3</sup>.

#### 1.3. Wewnątrzwątrobowa cholestaza ciężarnych (ICP - *intrahepatic cholestasis of pregnancy*)

Cholestaza ciążowa została opisana po raz pierwszy przez Ahlfelda w 1883 roku, jako żółtaczką i świąd, pojawiające się w ostatnim trymestrze ciąży i przemijające po porodzie<sup>15</sup>. Jest najczęstszym schorzeniem wątroby w ciąży.

Choroba ta stanowi poważne wyzwanie kliniczne dla położników, gdyż nie jest groźna dla matki natomiast wiąże się z poważnymi konsekwencjami dla płodu. W przebiegu cholestazy może dojść do zachłyśnięcia smółką (ok. 27% przypadków), do porodu przedwczesnego (ryzyko szacowane na 19-60%), bradykardii płodu (14%), stresu płodowego (21-44%) czy w końcu do nagłej, nieprzewidywalnej śmierci wewnątrzmaciczej płodu (0,4-4,1% przypadków)<sup>16</sup>.

Przyczyny tego schorzenia nie są do końca poznane, dlatego budzi tak wiele zainteresowania i pytań.

##### 1.3.1. Epidemiologia

Zachorowalność oceniana jest w zależności od obszaru występowania i pochodzenia etnicznego. Obserwuje się też zwiększoną rozpoznawalność w miesiącach zimowych. Wcześniejsze badania przeprowadzane w krajach Ameryki Południowej, podawały występowanie ICP u ok. 14% w Chile i Boliwii (przed rokiem 1975), natomiast obecnie w tych krajach znacząco spadło do ok. 4%. W części Europy, w Azji, Północnej Ameryce

czy Australii zachorowalność szacuje się poniżej 1%. Jest ona natomiast wyższa w krajach skandynawskich i nadbałtyckich, powyżej 2 %<sup>15,17</sup>.

### 1.3.2. Etiologia

Czynniki ryzyka wystąpienia cholestazy ciążowej nie są do końca poznane; ryzyko wystąpienia cholestazy w kolejnej ciąży ocenia się na 40-60% jednak intensywność choroby ma charakter losowy, tj. niezależny od przebiegu wcześniejszego powikłania<sup>18</sup>.

Opisywane są czynniki genetyczne, środowiskowe i hormonalne<sup>16</sup>. Częściej rozpoznaje się ICP w ciążach bliźniaczych, co może mieć związek z podwyższonym poziomem estrogenów<sup>17,19</sup>. W innych publikacjach zwraca się uwagę na zwiększone występowanie cholestazy u pacjentek w ciąży w wyniku technik wspomaganego rozrodu<sup>20</sup>. Zachorowalność na cholestazę ciążową wzrasta wraz z wiekiem ciężarnej (>35 roku życia), wielorództwem, występowaniem cholestazy we wcześniejszych ciążach, wcześniejszym stosowaniem doustnej antykoncepcji hormonalnej<sup>21</sup>, a także u kobiet zainfekowanych wirusem HCV<sup>22</sup>.

Niektórzy badacze sugerują, że znacząca może być rola tzw. nieszczelnego jelita (*leaky gut*), gdzie dochodzi do wzrostu przepuszczalności jelit dla bakteryjnych endotoksyn<sup>23</sup>.

#### *Czynniki genetyczne*

Wiele elementów takich jak częstsze rodzinne występowanie, zróżnicowanie geograficzne i etniczne, podwyższone ryzyko zachorowania w kolejnej ciąży oraz stwierdzone mutacje genu kodującego białka transportujące kwasy żółciowe w wątrobie wskazuje na znaczny wpływ zaburzeń genetycznych w etiologii cholestazy<sup>17</sup>. Gen towarzyszący ICP zlokalizowany został w regionie p23 drugiego chromosomu. Mutacje w fosfolipidach, transporterach wątrobowych (MDR3/ABCB4), transporterach aminofosfolipidowych (ATP8B1/FIC1) oraz w pompie wydalającej sole kwasów żółciowych (BSEP/ABCB11) zostały wykryte u ciężarnych z ICP. Kombinacja mutacji MDR3 z BSEP może być związana z ciężką postacią cholestazy<sup>21</sup>.

#### *Czynniki hormonalne*

Wiele jest dowodów potwierdzających rolę hormonów płciowych w patogenezie ICP. Istotną rolę przypisuje się estrogenom, których stężenie w trzecim trymestrze ciąży, kiedy to zazwyczaj rozpoznaje się to schorzenie, jest najwyższe. Ryzyko cholestazy jest

większe w ciąży wielopłodowej, w której stężenie estrogenów jest istotnie wyższe niż w ciąży pojedynczej, a także u kobiet zażywających w przeszłości doustne hormonalne tabletki antykoncepcyjne. Za mechanizm działania estrogenów uznaje się zaburzenia sulfatacji oraz nieprawidłowy transport kwasów tłuszczowych. Choroba przemija po porodzie, gdy poziom hormonów ulega zmniejszeniu<sup>15,24</sup>. Wpływ progesteronu i jego metabolitów jest niejasny. Jedną z hipotez zakłada genetyczny defekt sekrecji związków siarczanów i metabolitów progesteronu do kwasów żółciowych<sup>21,25</sup>.

#### *Czynniki środowiskowe*

Zmienność sezonową występowania cholestazy potwierdza zwiększenie rozpoznawalności choroby zimą<sup>18</sup>. Czynnikiem dietetycznym związanym ze zmniejszonym poziomem selenu w diecie, został opisany na przykładzie obserwacji niedoboru tego pierwiastka populacji kobiet w Chile<sup>26</sup>. Wykazano też mniejszą aktywność peroksydazy glutationowej u ciężarnych z ICP, która jest ważnym enzymem antyoksydacyjnym, zawierającym właśnie selen<sup>27</sup>.

#### *Stres oksydacyjny*

Niektóre doniesienia opisują podwyższone wartości wybranych markerów stresu oksydacyjnego u pacjentek z cholestazą ciążową, ale też rolę mechanizmów immunologicznych w tej chorobie<sup>28</sup>. Zagadnienie to, stanowiące jeden z elementów prowadzonych przeze mnie badań, będzie omówione szczegółowo w kolejnym rozdziale.

#### 1.3.3. Rozpoznanie

Cholestazę ciążową rozpoznaje się w drugim lub trzecim trymestrze ciąży, a w bardzo rzadkich przypadkach, nawet w pierwszym trymestrze<sup>29</sup>. Typowe objawy cholestazy ciążowej to świąd, który występuje u 80% kobiet po 30 tygodniu ciąży. Dotyczy głównie dłoni oraz stóp, nasila się wieczorem i w nocy, co nierzadko prowadzi do zmęczenia i zaburzeń snu ciężarnej. Jest to często pierwszy objaw, który zgłasza pacjentka, a czasami jedyny. Żółtaczka obserwowana jest u ok.14-25% pacjentek. Znacznie rzadziej obserwuje się ciemne zabarwienie moczu czy stolce tłuszczowe.

Rozpoznanie stawiane jest na podstawie nieprawidłowej wartości kwasów żółciowych (TBA >10  $\mu\text{mol/l}$ ) i podwyższonych wartości transaminaz wątrobowych (ALAT, ASPAT). Wartość GGT jest podwyższona jedynie u 1/3 chorych, poziom bilirubiny może być również powyżej normy ale zwykle nie przekracza 6 mg/dl.

Fosfataza alkaliczna wzrasta nawet 4-krotnie, ale jej poziom rośnie fizjologicznie w ciąży dlatego w aspekcie diagnostyki ICP rola tego enzymu jest mniej istotna.

Objawy ustępują samoistnie już po 48 godzinach od porodu. Ważnym aspektem w rozpoznaniu cholestazy ciążowej jest również wykluczenie innych przyczyn świądu (takich jak np. alergia) oraz zaburzeń funkcji wątroby (opisanych powyżej). W badaniu ultrasonograficznym jamy brzusznej nie stwierdza się odchyleń.

Do rozpoznania ICP nie jest konieczne wykonanie biopsji wątroby. Powinno się ją zalecić jedynie w przypadku żółtaczki bez świądu, w sytuacji, gdy objawy występują przed 20 tygodniem ciąży oraz gdy nieprawidłowe wyniki laboratoryjnych parametrów funkcji wątroby utrzymują się 8 tygodni po porodzie<sup>21,30</sup>.

#### 1.3.4. Postępowanie

Leczenie polega przede wszystkim na zmniejszeniu objawów klinicznych (świąd skóry) oraz biochemicznych cholestazy, a także na monitorowaniu dobrostanu płodu.

Przebieg choroby dla matki jest łagodny, choć nasilający się świąd może powodować zmęczenie, zaburzenia wchłaniania tłuszczów czy też niedobory żywieniowe, w tym niedobór witaminy K, co w konsekwencji może zwiększać ryzyko krwotoków położniczych. Dlatego zaleca się odpoczynek, dietę lekkostrawną oraz suplementację witaminy K. Świąd zwykle mija w ciągu 48 godzin po porodzie, a normalizacja parametrów funkcji wątroby w ciągu kilku dni po porodzie.

Rokowanie dla płodu nie koreluje z nasileniem objawów klinicznych u matki, natomiast ryzyko obumarcia wewnątrzmacicznego wzrasta przy wartościach TBA >40  $\mu\text{mol/l}$  oraz pod koniec trwania ciąży, a szczególnie po 37 tygodniu ciąży.

Zaleca się nadzór położniczy poprzez wykonywanie zapisów KTG, badań USG-doppler oraz liczenie ruchów płodu. Pomiar parametrów funkcji wątroby (TBA, ALT, AST) należy powtarzać raz w tygodniu. W przypadku niepowikłanej, łagodnej ICP, indukcję porodu zaleca się ok 37-38 tygodnia ciąży<sup>21</sup>.

W przypadku ciężkiej cholestazy (TBA >40  $\mu\text{mol/l}$ ) z towarzyszącą żółtaczką, należy ukończyć ciążę po osiągnięciu dojrzałości płuc<sup>16</sup>.

#### *Leczenie farmakologiczne*

Lekiem pierwszego rzutu jest kwas ursodeoksycholowy (UDCA), stosowany w dawce 10-15 mg/kg masy ciała. W większości przypadków efekty działania widoczne są po 1-2 tygodniach farmakoterapii. UDCA jest zwykle dobrze tolerowany przez pacjentki<sup>18</sup>.

Uważa się, że poprawia funkcjonowanie wątrobowych białek transportowych, a także ma ochronny wpływ na funkcjonowanie łożyska. W przypadku złej tolerancji UDCA, co zdarza się rzadko, stosuje się cholestyraminę, S-adenozyl L-metioninę czy hydroksyzynę<sup>16</sup>. Przed wprowadzeniem UDCA stosowano m.in. leki antyhistaminowe, benzodiazepiny, cholestyraminę, deksametazon czy fenobarbital. Nie znalazły one jednak szerszego zastosowania z uwagi na ograniczoną skuteczność działania<sup>17</sup>.

#### 1.4. Stres oksydacyjny

Od połowy lat 80. XX wieku pojawia się w literaturze naukowej termin stresu oksydacyjnego, natomiast procesy związane z tym stanem były przedmiotem zainteresowania naukowców już dużo wcześniej<sup>31</sup>. Obecnie, sam termin „*oxidative stress*” (stres oksydacyjny), wpisany w wyszukiwarkę Pubmed sugeruje ponad 490000 pozycji związanych z tym zagadnieniem.

Stres oksydacyjny występuje w organizmie, gdy zaburzona zostaje równowaga między procesami pro- i antyoksydacyjnymi. Przewaga procesów prooksydacyjnych może być wywołana nadmierną produkcją reaktywnych form tlenu i azotu (RONS, *reactive oxygen and nitrogen species*), a także niewystarczającą ilością przeciwutleniaczy<sup>32</sup>. Gdy taki stan występuje krótko, stymulowane są mechanizmy obronne organizmu i równowaga zostaje przywrócona. W przypadku długotrwałego stresu oksydacyjnego dochodzi do uszkodzenia komórki, przede wszystkim w wyniku utleniania lipidów, węglowodanów, białek i kwasów nukleinowych<sup>33</sup>.

##### 1.4.1. Reaktywne formy tlenu i azotu

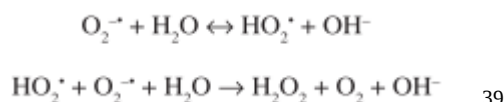
Wolne rodniki tlenowe, inaczej nazywane reaktywnymi formami tlenu (RFT), tlenowymi związkami reaktywnymi czy aktywnymi postaciami tlenu są cząsteczkami, które są zdolne do niezależnego funkcjonowania. Posiadają przynajmniej jeden niesparowany elektron i co najmniej jeden atom tlenu. Mają krótki czas życia, ale także dużą łatwość wchodzenia w reakcje chemiczne na poziomie komórki. Nie jest to korzystne dla ustroju w kontekście przemian metabolicznych z uwagi na wysoką reaktywność RFT<sup>34,35</sup>.

Procesy metaboliczne organizmu, które zachodzą naturalnie, np. oddychanie tlenowe czy procesy zapalne stanowią źródło wielu wolnych rodników tlenowych<sup>36</sup>.

Podstawowym źródłem RFT jest mitochondrialny łańcuch oddechowy, oksydazy NADPH, śródnabłonkowa syntaza NO, oksydaza ksantynowa, lipooksygenaza, mieloperoksydaza czy cyklooksygenaza<sup>37,38</sup>. Istotnym procesem, w którym powstają

RFT jest łańcuch mikrosomalny cytochromu P-450, który bierze udział w utlenianiu pestycydów, leków i ksenobiotyków<sup>39,40</sup>.

RFT wytwarzane są kaskadowo. Początkowo, najczęściej w trakcie omawianych powyżej reakcji, do tlenu dołączany jest elektron i wówczas powstaje anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^-$ ), który zawiera jeden niesparowany elektron i jest niezwykle reaktywny, dlatego stanowi formę wyjściową dla innych rodzajów RFT<sup>40</sup>. W trakcie dalszej przemiany  $O_2^-$  powstaje nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ):



$O_2^-$  nie przenika przez błony komórkowe z uwagi na charakter ładunku elektrycznego. W trakcie transportu przez błonowy przekształca się w rodnik wodoronadtlenkowy ( $HO_2^-$ ), by po przeniknięciu przez błonę, ulec dysocjacji ponownie do  $O_2^-$ .

Nadtlenek wodoru wytwarzany jest też w reakcjach z udziałem enzymów oksydazy moczanowej oraz oksydazy ksantynowej. W tzw. reakcji Fentona  $H_2O_2$  ulega rozpadowi, w obecności wolnych jonów  $Fe^{2+}$ , do rodnika hydroksylowego ( $OH^{\cdot}$ ) oraz anionu wodorotlenowego. Katalaza i peroksydaza rozkładają nadmiar  $H_2O_2$ . Nadtlenek wodoru może wchodzić w reakcje w miejscach odległych od miejsc wytworzenia z uwagi na łatwość przechodzenia przez błony komórkowe.

Powstały w wyniku reakcji Fentona  $OH^{\cdot}$  jest bardzo reaktywny i może utleniać większość związków w organizmie. W reakcji Habera-Weissa z  $O_2^-$  i  $H_2O_2$  może powstać  $OH^{\cdot}$ <sup>40</sup>.

Tabela 1. Reaktywne formy tlenu i ich prekursory<sup>34</sup>

| Wolne rodniki                     | Prekursory wolnych rodników |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| rodnik hydroksylowy $OH^{\cdot}$  | nadtlenoazotyn $ONOO^-$     |
| anionorodnikponadtlenkowy $O_2^-$ | kwask podchlorawy $HOCl$    |
| rodnik wodoronadtlenkowy $HO_2^-$ | nadtlenek wodoru $H_2O_2$   |
| rodnik alkoksylowy $RO^{\cdot}$   | tlen singletowy $O_2$       |
| rodnik nadrtlenkowy $ROO^{\cdot}$ | ozon $O_3$                  |

Czynniki egzogenne, czyli zewnętrzne, które mogą powodować powstawanie RFT to m.in. palenie tytoniu, nieprawidłowa dieta, spożywanie alkoholu, promieniowanie jonizujące, promieniowanie nadfioletowe, ultradźwięki, zanieczyszczenia środowiska, a także nadmierny wysiłek fizyczny<sup>35,39</sup>.

Wolne rodniki tlenowe biorą udział w wielu procesach fizjologicznych np. w wydzielaniu hormonów, skurczach mięśni czy w procesie eliminacji leków z organizmu. Wspomagają regulowanie napięcia naczyniowego, a także działanie układu immunologicznego<sup>34</sup>.

W procesie tzw. wybuchu tlenowego, który wiąże się z wysokim zużyciem tlenu, komórki fagocytarne używają RFT do usuwania patogenów<sup>41</sup>.

Wolne rodniki tlenowe warunkują prawidłowe działanie reakcji zapalnych w wyniku zwiększenia przepuszczalności ścian naczyń włosowatych. Pobudzają różnicowanie się i apoptozę komórkową oraz mają istotne znaczenie w procesach starzenia. Ponadto, stymulują dokomórkowy transport glukozy. Istotną funkcję RFT stanowi regulacja procesów wysyłania sygnałów między- i śródkomórkowych<sup>42</sup>.

#### 1.4.2. System obrony antyoksydacyjnej

Opisywane są 3 etapy systemu obrony antyoksydacyjnej. Pierwszy to enzymy antyoksydacyjne, które nie dopuszczają do powstawania wolnych rodników. Drugi polega na przerywaniu łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych, a który stanowią tzw. zmiatacze wolnych rodników. W trzecim etapie usuwane są skutki reakcji utleniania oraz odtwarzane prawidłowe struktury uszkodzonych cząsteczek<sup>34</sup>.

Wolne rodniki są usuwane w wyniku działania systemu nieenzymatycznego, tworzonego poprzez substancje ochronne, wspomniane wcześniej zmiatacze wolnych rodników oraz systemu enzymatycznego, które stanowią wyspecjalizowane enzymy. Zmiatacze wolnych rodników oddają im swoje elektrony, przechodząc w postać utlenioną, ale mało reaktywną. W ten sposób niemożliwe jest utlenianie innych składników. Zaliczamy do nich związki egzogenne oraz endogenne. Związki egzogenne to m.in. witamina C (kwas askorbinowy), witamina E (A-tokoferol), witamina i prowitamina A (beta-karoten), koenzym Q10, flawonoidy (związki roślinne), antocyjaniny, neopteryna, melatonina, kreatynina, bilirubina oraz hormony płciowe (estradiol, estron). Związkiem endogennym jest zredukowany glutation (GSH), który stanowi wewnątrzkomórkowy mechanizm obrony antyoksydacyjnej.

Enzymy biorące udział w eliminacji, ale i w zapobieganiu powstawania wolnych rodników to<sup>34</sup>:

- *Dysmutaza ponadtlenkowa* (SOD), metaloenzym, który bierze udział w obronie przeciwko toksycznemu działaniu nadtlenków. Katalizuje reakcje rozkładu ponadtlenkowego anionorodnika do nadtlenku wodoru i tlenu<sup>43</sup>. SOD występuje w organizmie w postaci wewnątrzkomórkowej: cytoplazmatycznej, która zawiera miedź i cynk oraz mitochondrialnej zawierającej mangan, a także w postaci zewnątrzkomórkowej, która również zawiera miedź i cynk, ale ma inną budowę<sup>44,45</sup>. Z SOD współdziała katalaza (CAT).

- *Katalaza* (CAT) występuje w cytoplazmie i peroksysomach; współdziała z SOD. Zbudowana jest z 4 podjednostek, w każdej znajduje się grupa hemowa oraz cząsteczka NADPH. Znane są dwie różne aktywności enzymu. W dużych stężeniach  $H_2O_2$  przeprowadza reakcję dysproporcjonowania nadtlenku wodoru. Produktem końcowym jest woda i tlen<sup>46</sup>. Gdy ilości tego rodnika są mniejsze, usuwa go i jednocześnie utlenia związek organiczny<sup>47</sup>.

- *Peroksydaza glutationowa* (GSH-Px) to selenoenzym. Redukuje nadtlenek wodoru do wody oraz nadtlenki organiczne poprzez zredukowany glutation<sup>48,49</sup>. W wyniku przemiany zredukowanego glutationu pod wpływem GSH-Px powstaje disulfid glutationu (GSSG), czyli postać utleniona glutationu. Ten związek jest szkodliwy dla komórki, dlatego aby nie dopuścić do gromadzenia się go, GSH-Px współdziała z reduktazą glutationu (GSHR). Enzym ten odtwarza zredukowaną formę glutationu w wyniku utleniania NADPH<sup>50</sup>.

Właściwości antyoksydacyjne wykazują także pewne białka endogenne, które zapobiegają peroksydacji lipidów oraz wytwarzaniu RFT. Ceruloplazmina, albumina, transferryna czy ferrytyna pełnią taką rolę w osoczu krwi<sup>51</sup>.

Zdolności antyoksydacyjne posiada również kwas moczowy. Wychwytuje on rodnik hydroksylowy oraz wiąże jony metali<sup>52</sup>.

#### 1.4.3. Skutki stresu oksydacyjnego

Skutkiem stresu oksydacyjnego, przy niewystarczającym działaniu mechanizmów naprawczych jest utlenianie białek, co prowadzi do zmiany ich funkcji i struktury, utlenianie błon komórkowych czy uszkodzenie DNA, czego konsekwencją mogą być mutacje prowadzące np. do karcinogenezy. W warunkach zaburzonej hemostazy dochodzi do uszkodzenia mitochondriów, hamowana jest glikoliza a zużycie ATP, które

jest niezbędne do eliminacji GSSG, wzrasta<sup>34</sup>. Zmniejsza się stężenie GSH, rośnie stężenie GSSG. Innym następstwem wzmożonych procesów utleniania jest zwiększenie peroksydacji lipidów i spadek GSH. Prowadzi to do wzrostu aktywności cyklooksygenazy i lipoopksygenazy, enzymów biorących udział w kaskadzie przemiany kwasu arachidonowego, a także napływu jonów wapniowych do komórek, co powoduje uszkodzenie błony komórkowej i receptorów komórkowych. Następstwem zaburzonej hemostazy jest też uszkodzenie mitochondrialnego i jądrowego DNA. Mitochondrialne DNA (mt DNA) jest narażone na destrukcyjne działanie wolnych rodników w większym stopniu niż DNA jądrowe<sup>34</sup>.

Skutkiem stresu oksydacyjnego jest również peroksydacja lipidów. Nienasycone kwasy tłuszczowe oraz inne lipidy ulegają utlenieniu z powstaniem ich nadtlenków<sup>53</sup>. Związki te upośledzają funkcjonowanie komórek poprzez zaburzanie struktury oraz pękanie błon komórkowych, a także zmianę funkcji receptorowych. MDA (dialdehyd malonowy) jest głównym produktem procesu peroksydacji lipidów, związkiem bardzo szkodliwym dla ustroju. MDA zmienia antygenowe właściwości peptydów, hamuje działanie niektórych enzymów, powstrzymuje transkrypcję i replikację DNA oraz wywołuje pęknięcia nici DNA. MDA jest często opisywanym w literaturze markerem peroksydacji lipidów<sup>39</sup>.

Wykazano istotny wpływ stresu oksydacyjnego w patogenezie wielu chorób, np. cukrzycy, chorób OUN (choroba Alzheimera, choroba Parkinsona, stwardnienie rozsiane, stwardnienie zanikowe boczne), układu krążenia, chorób oczu, zapalenia wątroby czy trzustki, a także w reumatoidalnym zapaleniu stawów<sup>39,51,54,55</sup>.

#### 1.4.4. Markery stresu oksydacyjnego

Produkty utleniania powstałe w wyniku stresu oksydacyjnego mogą być wykorzystane jako markery do oceny nasilenia procesu.

Białka ulegają utlenieniu bezpośrednio w wyniku działania RFT, ale także pośrednio, na skutek reakcji ze związkami, które powstają poprzez działanie stresu oksydacyjnego, jak np.: HOCl, wodorotlenki, Fe, Cu, wolne rodniki, utlenione aminokwasy i lipidy. Markery białkowe, takie jak np. pochodne karbonylowe, 3-nitrotyrozyna czy tzw. zaawansowane produkty utleniania białek, są najtrwalsze<sup>31</sup>.

W wyniku peroksydacji lipidów powstaje wspomniany MDA, dość często wykorzystywany jako marker stresu oksydacyjnego.

Do oceny stresu oksydacyjnego wykorzystuje się też enzymy biorące udział w reakcjach usuwania wolnych rodników, jak np. SOD czy GSH-Px<sup>34</sup>.

TAS czyli całkowity status antyoksydacyjny określa ilościowo wpływ stresu oksydacyjnego na ludzki organizm oraz stopień ochrony przed jego działaniem. TAS jest parametrem pochodzącym z oceny osocza, który wyraża się głównie liczbą grup tiolowych białek osocza oraz stężeniem kwasu moczowego<sup>56</sup>.

Tabela 2. Przykładowe markery stresu oksydacyjnego<sup>57</sup>

| <b>Markery stresu oksydacyjnego</b>                                                             | <b>Reakcja</b>                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 8-oksy-2-deoxyguanozyna<br>zredukowane cukry (np. ryboza,<br>askorbinian)<br>reaktywne aldehydy | utlenianie kwasów nukleinowych |
| 3-nitrotyrozyna                                                                                 | utlenianie węglowodanów        |
| utlenianie grup tiolowych<br>produkty końcowe zaawansowanej<br>glikacji                         | utlenianie białek              |
| MDA<br>akroleina<br>4-hydroksynonenal<br>F2-izoprostany<br>utlenione LDL                        | peroksydacja lipidów           |

#### 1.4.5. Stres oksydacyjny a ciąża

Uważa się, że prawidłowo przebiegająca ciąża jest stanem stresu oksydacyjnego ze względu na podwyższony poziom utlenionych LDL oraz spadek całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w porównaniu do kobiet nieciążarnych<sup>58</sup>. Dodatkowo, aktywacja obwodowych limfocytów, granulocytów i monocytów w trzecim trymestrze, z których wszystkie wytwarzają RFT, świadczy o ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej<sup>59</sup>.

Opisywany jest wpływ stresu oksydacyjnego na wiele patologii związanych z ciążą, takich jak nadciśnienie tętnicze, stan przedrzucawkowy, zaburzenia wzrastania płodu, przedwczesne pęknięcie błon płodowych czy zwiększone ryzyko poronienia<sup>60,61</sup>.

Obecność stresu oksydacyjnego obserwuje się również w łożysku, w którym pojawiają się charakterystyczne dla niego białka. Wśród nich najważniejsze są:

➤ białko p16

Białko p16 odgrywa ważną rolę w regulacji cyklu komórkowego. Inaktywuje CDK działając jako białko supresorowe w większości komórek. CDKN2A, gen kodujący p16 jest usuwany albo ulega mutacji w wielu nowotworach, takich jak rak przełyku, rak trzustki, nowotwory głowy i szyi. Jednakże w przypadku raka szyjki macicy supresorowa rola białka p16 jest zniesiona i w przypadku tego nowotworu białko p16 wykazuje działanie onkogenne<sup>62</sup>.

➤ cyklooksygenaza-2 (COX-2)

Cyklooksygenaza jest enzymem, który katalizuje konwersję kwasu arachidonowego do prostacyklin, tromboksanu i prostaglandyn. Zidentyfikowano dwie izoformy syntazy prostaglandyn: konstytutywna COX-1 oraz indukowana COX-2. COX-2 jest wytwarzany w określonych warunkach takich jak zapalenie, gorączka, ból. Bierze też udział w procesie nowotworzenia<sup>63</sup>. W raku piersi, żołądka, przełyku, jelita grubego, trzustki, płuca, endometrium, głowy i szyi, pęcherza moczowego oraz prostaty opisano nadekspresję COX -2<sup>64</sup>.

➤ cyklina D1

Cykliny są białkami regulującymi cykl komórkowy poprzez aktywację kinaz cyklinozależnych (CDK), a poziom cyklin jest zmienny w zależności od fazy cyklu<sup>65</sup>.

Cyklina D1 w połączeniu z CDK 4 i CDK6 działa jak sensor mitogeny i integruje pozakomórkowe sygnały mitogenne oraz progresję cyklu komórkowego. w przypadku nadekspresji cykliny D1 staje się ona onkogenem<sup>66</sup>.

➤ SATB2

SAT B2 to specjalne białko wiążące bogate w AT -2. Białko SATB2 należy do rodziny czynników transkrypcyjnych. Wpływa na ekspresję genów jako kofaktor transkrypcyjny oraz poprzez regulację architektury chromatyny<sup>67,68</sup>. SAT B2 ma wysoki poziom ekspresji w mózgu, rdzeniu kręgowym i odgrywa istotną rolę w rozwoju ośrodkowego układu nerwowego. SATB2 ma też znaczenie w różnicowaniu osteoblastów. Opisano

zespół genetyczny związany z SATB2 obejmujący niepełnosprawność intelektualną, wady twarzoczaszki, w tym rozszczep podniebienia, wady zębów oraz osteopenię<sup>69</sup>.

#### ➤ FOXP3

Białko FOXP3 pełni istotną rolę jako czynnik transkrypcyjny, biorący udział w powstawaniu limfocytów T regulatorowych (Treg), szczególnie komórek Treg CD 4 (+) i CD 25 (+)<sup>70</sup>, które są najlepiej poznane spośród populacji limfocytów T i posiadają właściwości supresyjne<sup>71</sup>. Brak białka FOX P3 z powodu mutacji w genie FOXP3 skutkuje występowaniem ciężkich, wielonarządowych zaburzeń autoimmunologicznych, zwanych zespołem IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*)<sup>72</sup>.

Stres oksydacyjny jest zjawiskiem niezwykle interesującym choć jednocześnie wymagającym jeszcze wielu analiz, tak jak nie do końca poznana jest etiopatogeneza oraz jak nieprzewidywalny bywa przebieg cholestazy ciążowej. Dlatego te rozważania stanowiły inspirację do podjęcia badań, w których chciałabym określić rolę stresu oksydacyjnego w rozwoju tego schorzenia. Uzasadnieniem takiej decyzji jest bardzo mała ilość badań klinicznych dotyczących tego zagadnienia.

## **2. Cel pracy**

Ocena roli stresu oksydacyjnego w ciąży powikłanej cholestazą ciążową jest zasadniczym celem pracy. Realizacja jego była przeprowadzona w oparciu o uzyskanie odpowiedzi na poniższe cele szczegółowe:

- analiza parametrów charakteryzujących stres oksydacyjny w surowicy krwi,
- określenie aktywności stresu oksydacyjnego w łożysku na podstawie oceny charakterystycznych dla tego stanu białek.

### 3. Materiał

Do badania włączono 127 kobiet ciężarnych hospitalizowanych w Ginekologiczno-Położniczym Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, między styczniem 2019 a marcem 2020 roku. Ze wszystkimi pacjentkami zebrano szczegółowy wywiad oraz pobrano krew obwodową, natomiast od części pacjentek dodatkowo pobrano także fragment łożyska po porodzie. Grupa pacjentek, u której badano łożysko liczyła 58 kobiet.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (uchwała nr 79/19).

Każda pacjentka włączona do badania otrzymała wyczerpującą informację na jego temat oraz podpisała świadomą zgodę na udział w badaniu.

Badania zostały sfinansowane ze środków statutowych Kliniki Perinatologii i Ginekologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Próbki łożysk zostały poddane ocenie histopatologicznej, którą wykonano w ramach współpracy z Wielkopolskim Centrum Onkologii (WCO) Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu im. Karola Marcinkowskiego przy ul. Garbary 15 w Poznaniu.

#### 3.1. Grupy

##### 3.1.1. Grupa badana

Do grupy badanej włączono ciężarne, po ukończonym 28. tygodniu ciąży, u których rozpoznano cholestazę ciążową na podstawie wyników badań laboratoryjnych, t.j.: podwyższonych wartości całkowitych kwasów żółciowych (TBA) powyżej 10  $\mu\text{mol/l}$ , podwyższonych poziomów transaminaz (ALAT, ASPAT) oraz świądu skóry<sup>73</sup>.

Zastosowano następujące kryteria wykluczające: przedwczesne pęknięcie błon płodowych, wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu (IUGR), inne niż ICP przyczyny świądu skóry oraz inne niż ICP choroby wątroby.

Na potrzeby badania markerów stresu oksydacyjnego z krwi grupę badaną podzielono na dwie podgrupy ze względu na czas trwania ciąży:

- pacjentki z rozpoznaną cholestazą ciążową przed ukończonym 37. tygodniem ciąży (n=48);
- pacjentki z rozpoznaną cholestazą ciążową po ukończonym 37. tygodnia ciąży, czyli w ciąży donoszonej (n=31).

Od części pacjentek z grupy badanej pobrano również fragment łożyska (n=34).

### 3.1.2. Grupa kontrolna

Grupę kontrolną stanowiły zdrowe ciężarne, w podobnym wieku, rodności i wieku ciążowym (n=48). W grupie tej zastosowano kryteria wykluczające: choroby metaboliczne, choroby autoimmunologiczne, choroby nowotworowe, choroby zapalne, inne niż ICP choroby wątroby oraz inne niż ICP przyczyny świądu.

Od części pacjentek z grupy kontrolnej pobrano również fragment łożyska (n=24).

#### 4. Metody badawcze

##### 4.1. Ocena parametrów klinicznych

U wszystkich pacjentek zakwalifikowanych do badania, zarówno z grupy badanej jak i kontrolnej, zebrano wywiad położniczy, rodzinny, szczególnie w kierunku cholestazy. Określono wiek, masę ciała, wzrost oraz BMI ciężarnych. W grupie badanej przeanalizowano parametry badań biochemicznych krwi (TBA, transaminazy) oraz informację na temat występowania świądu skóry.

##### 4.2. Oznaczenie poziomu markerów stresu oksydacyjnego w surowicy krwi

Pobierano 15 ml krwi żyłnej z żyły odłokciowej pacjentki do dwóch jednakowych probówek neutralnych (tzw. na skrzep), a następnie dostarczano je w ciągu 30 minut do laboratorium.

Krew odwirowano przez 10 minut przy 4000 obrotach/min, a surowicę przenoszono do probówek typu Eppendorfa o poj. 1,5 ml i zamrażano w temperaturze  $-80^{\circ}\text{C}$ . Próbkę przechowywano do momentu jednoczasowego oznaczenia stężenia wybranych markerów stresu oksydacyjnego.

U wszystkich pacjentek z grupy badanej i kontrolnej oznaczano następujące markery stresu oksydacyjnego: SOD, GSH-Px, GSR, GSH, MDA, VEGF oraz TAS.

Procedurę oznaczania przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta w Centralnym Laboratorium GPSK w Poznaniu.

##### 4.2.1. Oznaczenie SOD, GSH-Px, GSR, GSH, MDA, VEGF metodą ELISA

Metodę opisano na przykładzie oznaczenia MDA.

Zestaw oparty jest o wariację kanapkowej (*sandwich*) metody immunoenzymatycznej w fazie stałej ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Modyfikacja ta polega na użyciu dwóch rodzajów przeciwciał monoklonalnych klasy IgG znakujących badaną substancję.

Dno naczynka reakcyjnego w tym zestawie opłaszczane jest monoklonalnym przeciwciałem skierowanym przeciwko ludzkiemu MDA. Następnie do tego naczynka dodana zostaje substancja badana, w tym przypadku ludzka surowica, jak również streptawidyna znakowana enzymem (peroksydazą chrzanową HRP) oraz kolejne przeciwciało monoklonalne skierowane przeciwko ludzkiemu MDA i skoniugowane z biotyną. Podczas 60 minutowej inkubacji w  $37^{\circ}\text{C}$  utworzony zostaje następujący kompleks:

faza stała - przeciwciało przeciw MDA - badany ludzki MDA z surowicy - przeciwciało drugorzędowe znakujące skoniugowane z biotyną - streptawidyna skoniugowana z peroksydazą chrzanową (HRP). Następnie podczas płukania naczynek reakcyjnych w buforze fosforanowym zostaje usunięty nadmiar niezwiązanych przeciwciał i pozostaje tylko kompleks przeciwciał z antygenem związanym z fazą stałą. W kolejnym etapie dodany zostaje substrat dla enzymu, którym jest TMB (3,3',5,5'-tetrametylobenzydyna). W normalnych warunkach TMB jest substancją światłoczułą i bezbarwną, natomiast HRP jest enzymem katalizującym proces utleniania TMB. Podczas kolejnej 10 minutowej inkubacji zachodzi proces utlenienia TMB, wynikiem czego jest zmiana barwy z bezbarwnej na niebieską. Kolejnym etapem jest zatrzymanie reakcji enzymatycznej poprzez zakwaszenie środowiska reakcji silnym kwasem. Utleniony TMB w środowisku kwaśnym zmienia barwę z niebieskiej na żółtą. Na koniec odczytujemy absorbancję korzystając z filtra o długości fali 450nm. W przypadku wszystkich immunoenzymatycznych metod kanapkowych (*sandwich ELISA*) wartość absorbancji jest wprost proporcjonalna do stężenia analitu.

Wszystkie odczynniki z firmy Sun Red Biocompany wykorzystują ten sam schemat reakcji ELISA. Zmieniają się tylko przeciwciała monoklonalne wychwytyjące związane z fazą stałą oraz przeciwciała znakujące związane z streptawidyną, na takie które są skierowane przeciwko badanemu analitowi.

W ten sam sposób zatem badano pozostałe markery: SOD, GSH-Px, GSR, GSH oraz VEGF.

#### 4.2.2. Oznaczenie TAS

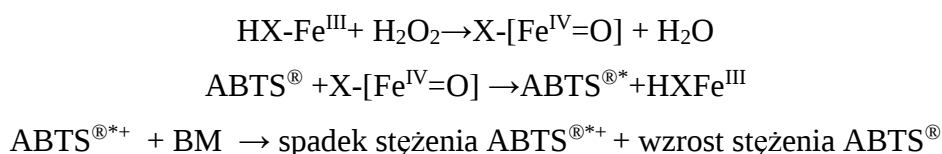
Całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAS) oznaczano z użyciem zestawu Randox Total Antioxidant Status na aparacie COBAS firmy Roche.

Reakcja przebiega w trzech etapach, przy czym pierwszy etap ma za zadanie wyprodukowanie silnego medium utleniającego jakim jest ferrylmyoglobina  $X-[Fe^{IV}=O]$ . Jest to osiągane poprzez inkubację metmyoglobiny  $[HX-Fe^{III}]$  z nadtlaniem wodoru  $[H_2O_2]$ . W ten sposób dochodzi do utlenienia żelaza zawartego w metmyoglobinie z III poziomu na IV i powstania ferrylmyoglobiny  $X-[Fe^{IV}=O]$ .

W drugim etapie do ferrylmyoglobiny ( $X-[Fe^{IV}=O]$ ) zostaje dodany ABTS<sup>®</sup> 2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]). Mieszanina jest inkubowana z peroksydazą. W tym czasie ABTS<sup>®</sup> zostaje utleniony do formy reaktywnej ABTS<sup>®\*</sup> a ferrylmyoglobina ( $X-[Fe^{IV}=O]$ ) zredukowana do metmyoglobiny ( $HX-Fe^{III}$ ). Kation

ABTS<sup>®\*+</sup> posiada barwę zielono-niebieską, której maksimum absorbancji jest obserwowane przy długości fali 600nm.

Dodanie surowicy badanej, w której zawarte są antyoksydanty, do trzeciego etapu reakcji powoduje zmniejszenie wytwarzania zielono-niebieskiego zabarwienia pochodzącego od reaktywnej formy ABTS<sup>®\*</sup>. Zmniejszenie wytwarzania barwnika jest odwrotnie proporcjonalne do poziomu antyoksydantów w badanym materiale i wprost proporcjonalne do spadku absorbancji przy długości fali 600nm. Reakcja zachodzi wg schematu:



#### 4.3. Badanie łożyska

U części pacjentek z grupy badanej (n=34) oraz kontrolnej (n=24) pobrano fragment łożyska obejmujący jego całą grubość, o wym. 2x2 cm, ze środkowej części płyty, w połowie odległości między brzegiem łożyska a przyczepem pępowiny. Fragmenty łożyska pobierano bezpośrednio po porodzie i utrwalano w roztworze 10% formaliny. Przechowywano w temperaturze pokojowej do momentu jednoczesnej oceny histopatologicznej.

##### 4.3.1. Przygotowanie preparatów do barwienia immunohistochemicznego

Reprezentatywne fragmenty płyty łożyska, zabezpieczone w 10% formalinie o pH 7,2-7,4 przekazano do Zakładu Patomorfologii w WCO przy ul. Garbary 15 w Poznaniu. Następnie materiał został w sposób rutynowy poddany obróbce, której efektem było otrzymanie bloczków parafinowych zawierających wycinki z łożysk. Z tego zostały sporządzone preparaty H+E (barwione hematoksyliną i eozyną), które poddano ocenie w celu weryfikacji poprawności otrzymania właściwych przekrojów, wycinków i dobrego utrwalenia materiału. Następnie sporządzono preparaty do barwień immunohistochemicznych, które zostały wykorzystane w sposób zautomatyzowany według rutynowych metod. Dla uzyskania kontroli poprawności wykonania badań immunohistochemicznych użyto reakcji kontrolnych badań immunohistochemicznych do poszczególnych białek, które potem zweryfikowano pod względem poprawności oraz jakości oceny. Następnie wszystkie preparaty, które zostaną później poddane ocenie wybarwiono immunohistochemicznie.

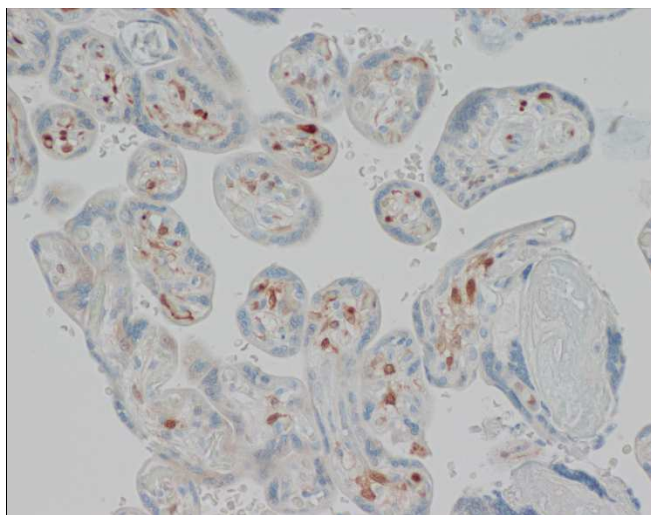
#### 4.3.2. Technika immunohistochemiczna

Badania immunohistochemiczne wykonano zgodnie ze standardowymi procedurami w Zakładzie Patologii Nowotworów WCO. Zestaw pierwotnych przeciwciał przedstawiono w tabeli 3.

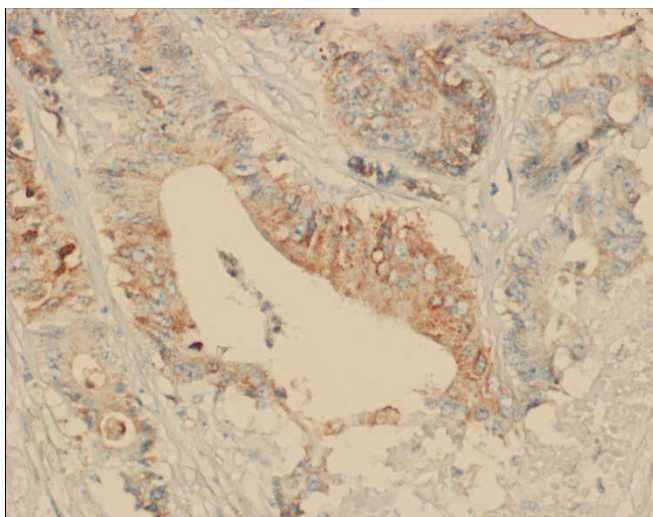
Tabela 3. Przeciwciała zastosowane w badaniach immunohistochemicznych

| Marker     | Przeciwciało                               | Metoda           |
|------------|--------------------------------------------|------------------|
| FOXP3      | Mo Monoclonal, Clone236A/E7, Abcam         | manualna         |
| Cyklina D1 | Rb Moclonal, CloneSP-4R, RTU, Ventana      | aparat Ventana   |
| COX2       | Rb Monoclonal, CloneSP21, RTU, Cell Marque | aparat Ventana   |
| p16 INK4a  | Mo Monoclonal, CloneE6H4, RTU, Ventana     | aparat Ventana   |
| SATB2      | Rb Monoclonal, CloneEP281, 1/100 DAKO      | autostainer DAKO |

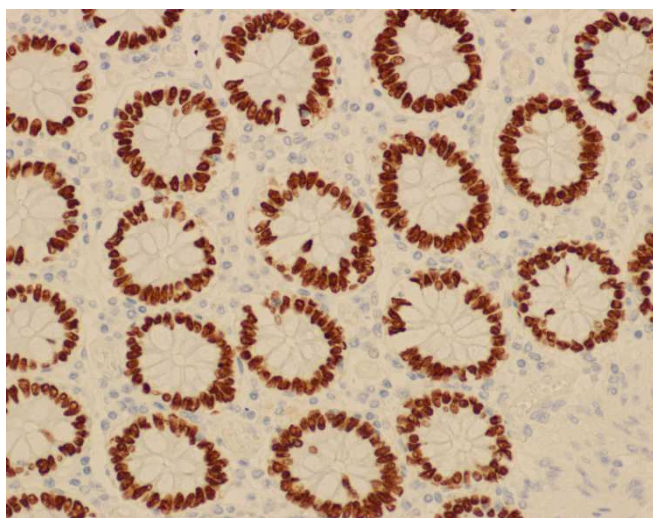
W celu wizualizacji lokalizacji badanego markera (białka) wykorzystano reakcję barwną (kolor brązowy), której obecność (lub brak) w poszczególnych preparatach oceniono z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego. Przykłady wybarwionych preparatów dla poszczególnych markerów przedstawiona na rycinach 1-5.



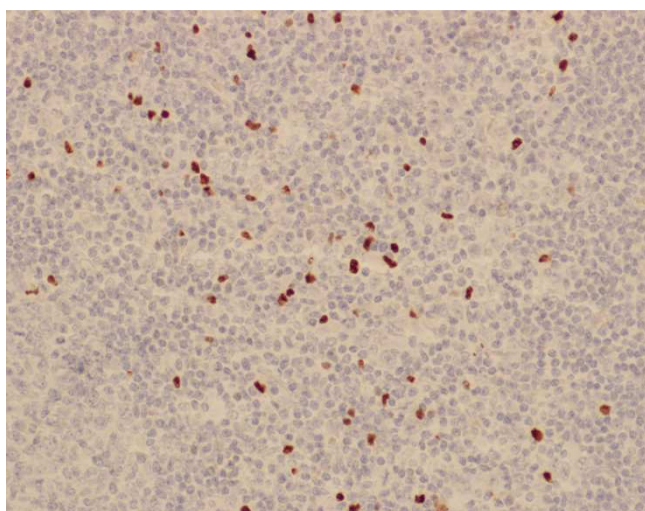
Rycina 1. Ekspresja białka cytoplazmatycznego p16



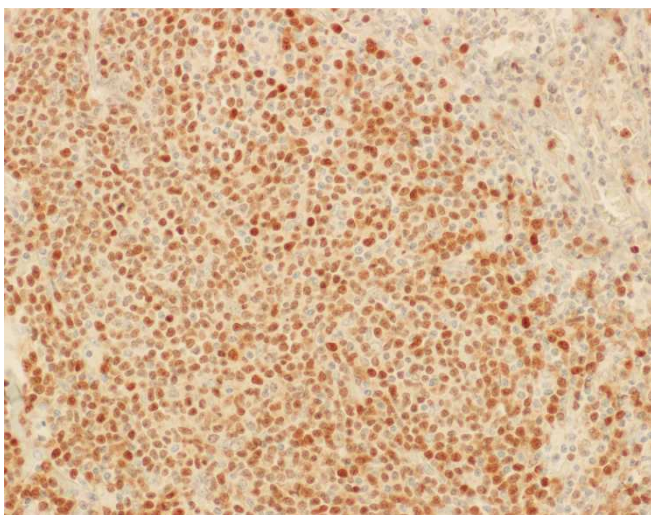
Rycina 2. Ekspresja białka cytoplazmatycznego COX-2



Rycina 3. Ekspresja białka jądrowego SATB2



Rycina 4. Ekspresja białka jądrowego – cyklina D1



Rycina 5. Ekspresja białka jądrowego FOXP3

#### 4.3.3. Ocena ekspresji białek

Dwóch niezależnych obserwatorów, którzy byli zaślepieni co do miejsca pochodzenia tkanek, oceniali intensywność reakcji, a także rozległość reakcji wykorzystując półilościową, 12-stopniową skalę Remmele – Stegner, opisywaną również jako skala IRS (ang. *immunoreactive score*)<sup>74</sup>.

Tabela 4. Skala IRS wg Remmele i Stegner<sup>74</sup>

| <b>A - obszar komórek immunopozytywnych</b>    | <b>B - intensywność reakcji</b>         |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 0 pkt - brak komórek z pozytywną reakcją       | 0 pkt - brak reakcji barwnej            |
| 1 pkt - do 10% komórek z pozytywną reakcją     | 1 pkt - słabo nasilona reakcja barwna   |
| 2 pkt – 11% do 50% komórek z pozytywną reakcją | 2 pkt - średnio nasilona reakcja barwna |
| 3 pkt - 51 do 80% komórek z pozytywną reakcją  | 3 pkt - intensywna reakcja barwna       |
| 4 pkt - >80% komórek z pozytywną reakcją       |                                         |

Wynik w opisywanej skali otrzymuje się obliczając iloczyn A x B, gdzie otrzymana wartość w zależności od przedziału oznacza:

- 0: brak reakcji immunohistochemicznej;
- 1-2: słaba reakcja immunohistochemiczna;
- 3-4: umiarkowanie silna reakcja immunohistochemiczna;
- 6-12: silna reakcja immunohistochemiczna.

Dla oceny ekspresji białka p16 przyjęto opisywaną skalę Remmele - Stegner odrębnie dla trofoblastu oraz odrębnie dla komórek śródbłónki w kosmkach. Ocenę preparatu dokonywano pod powiększeniem obiektywu 10x, w ogniskach uznanych za „hot spot”. Metoda wyboru miejsca intensywności reakcji immunohistochemicznej „hot spot” czyli miejsca, które na preparacie w ocenie pod małym powiększeniem wykazuje najwyższą ekspresję.

Dla oceny ekspresji białka COX-2 wykorzystano również skalę IRS, ale jedynie dla trofoblastu, ponieważ nie wykazano reakcji w naczyniach dla białka COX-2.

Dla oceny ekspresji cykliny D1 przyjęto zmodyfikowaną skalę Remmele-Stegner gdzie:

- reakcję jądrową traktowano wyłącznie zero-jedynkowo:
  - 0 – brak reakcji;
  - 1 – reakcja obecna, niezależnie od intensywności;
- odsetek komórek zajętych przyjęto z pierwotnie zastosowanej skali Remmele-Stegner, tzn. w zakresie 0-4 w zależności od odsetka komórek z pozytywną reakcją.

#### 4.4. Analiza statystyczna

Do analizy danych użyto programu IBM SPSS Statistics 26. Jako poziom istotności przyjęto wartość 0,05. W celu zbadania, czy dane mają rozkład normalny, wybrano test Shapiro-Wilka. Do zbadania korelacji pomiędzy danymi wybrano współczynnik korelacji Spearmana w sytuacji braku normalności rozkładu zmiennych. Wybrane markery porównano dla dwóch grup – w przypadku gdy dane miały rozkład normalny wybrano test parametryczny t-studenta dla zmiennych niezależnych, a gdy brak było rozkładu normalnego – test nieparametryczny U Manna-Whitneya dla zmiennych niezależnych. W przypadku, gdy porównywanych było więcej grup wybrano odpowiednio test parametryczny ANOVA oraz nieparametryczny Kruskala Wallisa dla zmiennych niezależnych (brak wybranego testu *post-hoc* ze względu na brak istotnych różnic w tych badaniach). Wskaźniki struktury (wielkości procentowe) porównano między sobą z użyciem z-testu.

## 5. Wyniki

### 5.1. Charakterystyka analizowanych grup

Grupa badana i kontrolna nie różniły się w sposób statystycznie istotny pod względem wieku, masy ciała, BMI, liczby pierwiastek i wieloródek. Na potrzeby badania markerów stresu oksydacyjnego z surowicy krwi grupę badaną i kontrolną podzielono dodatkowo na dwie podgrupy ze względu na tydzień ciąży pobrania krwi: do 37 t.c. oraz 37+ t.c.

Od części pacjentek, dodatkowo pobrano także fragment łożyska po porodzie (58 kobiet).

Analiza statystyczna otrzymanych wyników w zakresie oceny parametrów stresu oksydacyjnego surowicy krwi dotyczyła sprawdzenia czy zachodzi istotna różnica pomiędzy wartościami dla następujących, porównywanych ze sobą grup:

- grupa badana i grupa kontrolna;
- grupa badana do 37 t.c. i grupa kontrolna do 37 t.c.;
- grupa badana 37+ t.c. i grupa kontrolna 37+ t.c.;
- grupa badana do 37 t.c. i grupa badana 37+ t.c.

Natomiast w zakresie oceny aktywności określonych białek stresu oksydacyjnego w łożysku analiza statystyczna otrzymanych wyników dotyczyła sprawdzenia czy zachodzi istotna różnica pomiędzy wartościami dla grupy badanej i kontrolnej.

Charakterystykę badanych grup podsumowano w tabeli 5.

Tabela 5. Charakterystyka analizowanych grup w zależności od wieku, masy ciała, BMI, liczby pierwiastek i wieloródek

| Rodzaj grupy         | N          | Wiek [lata]  | Masa ciała [kg] | BMI          | Pierwiastka |              | Wieloródka |              |
|----------------------|------------|--------------|-----------------|--------------|-------------|--------------|------------|--------------|
|                      |            |              |                 |              | N           | %            | N          | %            |
| <b>badana</b>        | <b>79</b>  | <b>32,42</b> | <b>76,94</b>    | <b>27,91</b> | <b>36</b>   | <b>45,6%</b> | <b>43</b>  | <b>54,4%</b> |
| badana do 37 t.c.    | 48         | 32,96        | 78,71           | 28,50        | 21          | 43,8%        | 27         | 56,3%        |
| badana 37+ t.c.      | 31         | 31,58        | 74,19           | 26,96        | 15          | 48,4%        | 16         | 51,6%        |
| <b>kontrolna</b>     | <b>48</b>  | <b>31,29</b> | <b>76,28</b>    | <b>27,51</b> | <b>18</b>   | <b>37,5%</b> | <b>30</b>  | <b>62,5%</b> |
| kontrolna do 37 t.c. | 15         | 31,13        | 77,23           | 28,24        | 8           | 53,3%        | 7          | 46,7%        |
| kontrolna 37+ t.c.   | 33         | 31,36        | 75,91           | 27,22        | 10          | 30,3%        | 23         | 69,7%        |
| <b>razem</b>         | <b>127</b> | <b>31,99</b> | <b>76,70</b>    | <b>27,76</b> | <b>54</b>   | <b>42,5%</b> | <b>73</b>  | <b>57,5%</b> |

## 5.2. Ocena parametrów stresu oksydacyjnego w surowicy krwi

### 5.2.1. Stężenie TAS (mmol/l) w surowicy krwi

Wyniki stężenia TAS (mmol/l) dla badanych grup podsumowano w tabeli 6.

Tabela 6. Wyniki stężenia TAS (mmol/l)

| Rodzaj grupy          | N  | Średnia | 95% CI |      | Mediana | Odch. std. | Min  | Max  |
|-----------------------|----|---------|--------|------|---------|------------|------|------|
| badana                | 79 | 1,74    | 1,64   | 1,84 | 1,82    | 0,424      | 0,01 | 2,42 |
| kontrolna             | 48 | 1,91    | 1,83   | 1,99 | 1,93    | 0,274      | 1,02 | 2,63 |
| badana do 37 t.c.     | 48 | 1,69    | 1,57   | 1,81 | 1,78    | 0,426      | 0,01 | 2,11 |
| kontrolna do 37. t.c. | 15 | 1,88    | 1,73   | 2,02 | 1,91    | 0,264      | 1,19 | 2,18 |
| badana 37+ t.c.       | 31 | 1,82    | 1,67   | 1,97 | 1,88    | 0,417      | 0,18 | 2,42 |
| kontrolna 37+. t.c.   | 33 | 1,92    | 1,82   | 2,02 | 1,94    | 0,281      | 1,02 | 2,63 |
| badana do 37 t.c.     | 48 | 1,69    | 1,57   | 1,81 | 1,78    | 0,426      | 0,01 | 2,11 |
| badana 37+ t.c.       | 31 | 1,82    | 1,67   | 1,97 | 1,88    | 0,417      | 0,18 | 2,42 |

W wyniku analizy statystycznej stwierdzono:

- w grupie badanej wartości były istotnie niższe niż w grupie kontrolnej ( $p < 0,05$ );
- w grupie badanej do 37 t.c. wartości były istotnie niższe niż w grupie kontrolnej do 37 t.c. ( $p < 0,05$ );
- brak istotnych różnic między grupą badaną 37+ t.c. a grupą kontrolną 37+ t.c.;
- brak istotnych różnic między grupą badaną do 37 t.c. a grupą badaną 37+ t.c.

### 5.2.2. Stężenie SOD (ng/ml) w surowicy krwi

Wyniki stężenia SOD (ng/ml) dla badanych grup podsumowano w tabeli 7.

Tabela 7. Wyniki stężenia SOD (ng/ml)

| Rodzaj grupy          | N  | Średnia | 95% CI |       | Mediana | Odch. std. | Min  | Max    |
|-----------------------|----|---------|--------|-------|---------|------------|------|--------|
| badana                | 79 | 55,76   | 41,49  | 70,03 | 24,77   | 63,698     | 1,06 | 231,55 |
| kontrolna             | 48 | 51,01   | 31,39  | 70,63 | 16,18   | 67,566     | 2,32 | 235,50 |
| badana do 37 t.c.     | 48 | 44,73   | 27,61  | 61,85 | 13,66   | 58,953     | 1,84 | 231,55 |
| kontrolna do 37. t.c. | 15 | 48,12   | 14,40  | 81,84 | 18,51   | 60,892     | 2,32 | 189,24 |
| badana 37+ t.c.       | 31 | 72,84   | 47,94  | 97,74 | 52,87   | 67,886     | 1,06 | 227,24 |
| kontrolna 37+. t.c.   | 33 | 52,32   | 27,06  | 77,59 | 15,02   | 71,255     | 2,70 | 235,50 |
| badana do 37 t.c.     | 48 | 44,73   | 27,61  | 61,85 | 13,66   | 58,953     | 1,84 | 231,55 |
| badana 37+ t.c.       | 31 | 72,84   | 47,94  | 97,74 | 52,87   | 67,886     | 1,06 | 227,24 |

W wyniku analizy statystycznej stwierdzono:

- brak istotnych różnic między grupą badaną a grupą kontrolną;
- brak istotnych różnic między grupą badaną do 37 t.c. a grupą kontrolną do 37 t.c.;
- brak istotnych różnic między grupą badaną 37+ t.c. a grupą kontrolną 37+ t.c.;
- brak istotnych różnic między grupą badaną do 37 t.c. a grupą badaną 37+ t.c.

#### 5.2.3. Stężenie GSH-Px (ng/ml) w surowicy krwi

Wyniki stężenia GSH-Px (ng/ml) dla badanych grup podsumowano w tabeli 8.

Tabela 8. Wyniki stężenia GSH-Px (ng/ml)

| Rodzaj grupy          | N  | Średnia | 95% CI |        | Mediana | Odch. std. | Min  | Max    |
|-----------------------|----|---------|--------|--------|---------|------------|------|--------|
| badana                | 79 | 78,84   | 58,04  | 99,64  | 37,07   | 92,862     | 1,64 | 387,62 |
| kontrolna             | 48 | 72,01   | 43,34  | 100,68 | 22,84   | 98,737     | 1,42 | 342,49 |
| badana do 37 t.c.     | 48 | 62,89   | 37,50  | 88,28  | 17,35   | 87,444     | 1,64 | 387,62 |
| kontrolna do 37. t.c. | 15 | 71,25   | 19,09  | 123,41 | 22,84   | 94,193     | 1,42 | 283,68 |
| badana 37+ t.c.       | 31 | 103,53  | 67,96  | 139,10 | 61,73   | 96,973     | 3,79 | 349,11 |
| kontrolna 37+. t.c.   | 33 | 72,35   | 36,13  | 108,58 | 22,84   | 102,161    | 1,78 | 342,49 |
| badana do 37 t.c.     | 48 | 62,89   | 37,50  | 88,28  | 17,35   | 87,444     | 1,64 | 387,62 |
| badana 37+ t.c.       | 31 | 103,53  | 67,96  | 139,10 | 61,73   | 96,973     | 3,79 | 349,11 |

W wyniku analizy statystycznej stwierdzono:

- brak istotnych różnic między grupą badaną a grupą kontrolną;
- brak istotnych różnic między grupą badaną do 37 t.c. a grupą kontrolną do 37 t.c.;
- w grupie badanej 37+ t.c. wyniki były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej 37+ t.c. ( $p < 0,05$ );
- w grupie badanej 37+ t.c. wyniki były istotnie wyższe niż w grupie badanej do 37 t.c. ( $p < 0,05$ ).

#### 5.2.4. Stężenie GSR (ng/ml) w surowicy krwi

Wyniki stężenia GSR (ng/ml) dla badanych grup podsumowano w tabeli 9.

Tabela 9. Wyniki stężenia GSR (ng/ml)

| Rodzaj grupy          | N  | Średnia | 95% CI |       | Mediana | Odch. std. | Min  | Max    |
|-----------------------|----|---------|--------|-------|---------|------------|------|--------|
| badana                | 79 | 47,24   | 33,84  | 60,63 | 13,93   | 59,804     | 0,37 | 243,02 |
| kontrolna             | 48 | 37,46   | 21,82  | 53,09 | 8,75    | 53,861     | 0,08 | 175,18 |
| badana do 37 t.c.     | 48 | 40,06   | 22,31  | 57,81 | 10,62   | 61,138     | 0,37 | 243,02 |
| kontrolna do 37. t.c. | 15 | 42,38   | 11,08  | 73,68 | 8,91    | 56,527     | 0,27 | 165,67 |
| badana 37+ t.c.       | 31 | 58,36   | 37,50  | 79,21 | 40,98   | 56,858     | 0,41 | 223,46 |
| kontrolna 37+. t.c.   | 33 | 35,22   | 16,30  | 54,13 | 8,59    | 53,351     | 0,08 | 175,18 |
| badana do 37 t.c.     | 48 | 40,06   | 22,31  | 57,81 | 10,62   | 61,138     | 0,37 | 243,02 |
| badana 37+ t.c.       | 31 | 58,36   | 37,50  | 79,21 | 40,98   | 56,858     | 0,41 | 223,46 |

W wyniku analizy statystycznej stwierdzono:

- brak istotnych różnic między grupą badaną a grupą kontrolną;
- brak istotnych różnic między grupą badaną do 37 t.c. a grupą kontrolną do 37 t.c.;
- w grupie badanej 37+ t.c. wyniki były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej 37+ t.c. ( $p < 0,05$ );
- brak istotnych różnic między grupą badaną do 37+ t.c. a grupą badaną 37+ t.c.

#### 5.2.5. Stężenie GSH (Uml/l) w surowicy krwi

Wyniki stężenia GSH (Uml/l) dla badanych grup podsumowano w tabeli 10.

Tabela 10. Wyniki stężenia GSH (Uml/l)

| Rodzaj grupy          | N  | Średnia | 95% CI |       | Mediana | Odch. std. | Min  | Max   |
|-----------------------|----|---------|--------|-------|---------|------------|------|-------|
| badana                | 79 | 13,58   | 9,97   | 17,20 | 5,37    | 16,141     | 0,20 | 64,91 |
| kontrolna             | 48 | 11,69   | 6,91   | 16,46 | 2,52    | 16,451     | 0,39 | 53,42 |
| badana do 37 t.c.     | 48 | 10,78   | 6,50   | 15,07 | 3,10    | 14,762     | 0,20 | 58,17 |
| kontrolna do 37. t.c. | 15 | 11,95   | 3,05   | 20,84 | 3,75    | 16,067     | 0,39 | 45,38 |
| badana 37+ t.c.       | 31 | 17,92   | 11,52  | 24,31 | 10,47   | 17,437     | 0,56 | 64,91 |
| kontrolna 37+. t.c.   | 33 | 11,57   | 5,59   | 17,55 | 2,49    | 16,867     | 0,44 | 53,42 |
| badana do 37 t.c.     | 48 | 10,78   | 6,50   | 15,07 | 3,10    | 14,762     | 0,20 | 58,17 |
| badana 37+ t.c.       | 31 | 17,92   | 11,52  | 24,31 | 10,47   | 17,437     | 0,56 | 64,91 |

W wyniku analizy statystycznej stwierdzono:

- brak istotnych różnic między grupą badaną a grupą kontrolną;
- brak istotnych różnic między grupą badaną do 37 t.c. a grupą kontrolną do 37 t.c.;
- w grupie badanej 37+ t.c. wyniki były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej 37+ t.c. ( $p < 0,05$ );

- w grupie badanej 37+ t.c. wyniki były istotnie wyższe niż w grupie badanej do 37 t.c. ( $p < 0,05$ ).

#### 5.2.6. Stężenie MDA (nmol/ml) w surowicy krwi

Wyniki stężenia MDA (nmol/ml) dla badanych grup podsumowano w tabeli 11.

Tabela 11. Wyniki stężenia MDA (nmol/ml)

| Rodzaj grupy          | N  | Średnia | 95% CI |       | Mediana | Odch. std. | Min  | Max    |
|-----------------------|----|---------|--------|-------|---------|------------|------|--------|
| badana                | 79 | 29,00   | 21,31  | 36,70 | 9,84    | 34,333     | 0,52 | 121,70 |
| kontrolna             | 48 | 29,38   | 17,01  | 41,75 | 6,25    | 42,597     | 0,14 | 149,66 |
| badana do 37 t.c.     | 48 | 23,45   | 14,03  | 32,88 | 8,57    | 32,453     | 0,52 | 110,46 |
| kontrolna do 37. t.c. | 15 | 29,65   | 8,57   | 50,73 | 13,05   | 38,063     | 0,23 | 117,73 |
| badana 37+ t.c.       | 31 | 37,60   | 24,43  | 50,77 | 28,12   | 35,905     | 0,57 | 121,70 |
| kontrolna 37+. t.c.   | 33 | 29,26   | 13,28  | 45,24 | 4,31    | 45,068     | 0,14 | 149,66 |
| badana do 37 t.c.     | 48 | 23,45   | 14,03  | 32,88 | 8,57    | 32,453     | 0,52 | 110,46 |
| badana 37+ t.c.       | 31 | 37,60   | 24,43  | 50,77 | 28,12   | 35,905     | 0,57 | 121,70 |

W wyniku analizy statystycznej stwierdzono:

- brak istotnych różnic między grupą badaną a grupą kontrolną;
- brak istotnych różnic między grupą badaną do 37 t.c. a grupą kontrolną do 37 t.c.;
- brak istotnych różnic między grupą badanej 37+ t.c. a grupą kontrolną 37+ t.c.;
- w grupie badanej 37+ t.c. wyniki były istotnie wyższe niż w grupie badanej do 37 t.c. ( $p < 0,05$ ).

#### 5.2.7. Stężenie VEGF (ng/l) w surowicy krwi

Wyniki stężenia VEGF (ng/l) dla badanych grup podsumowano w tabeli 12.

Tabela 12. Wyniki stężenia VEGF (ng/l)

| Rodzaj grupy          | N  | Średnia | 95% CI  |         | Mediana | Odch. std. | Min    | Max      |
|-----------------------|----|---------|---------|---------|---------|------------|--------|----------|
| badana                | 79 | 2221,18 | 1640,05 | 2802,32 | 872,04  | 2594,496   | 62,51  | 9526,73  |
| kontrolna             | 48 | 2168,87 | 1273,72 | 3064,01 | 382,00  | 3082,770   | 82,26  | 11014,70 |
| badana do 37 t.c.     | 48 | 1782,79 | 1094,21 | 2471,38 | 607,18  | 2371,421   | 62,51  | 9367,04  |
| kontrolna do 37. t.c. | 15 | 1899,99 | 568,97  | 3231,00 | 555,52  | 2403,503   | 82,26  | 6844,22  |
| badana 37+ t.c.       | 31 | 2899,97 | 1868,50 | 3931,44 | 1760,81 | 2812,063   | 122,60 | 9526,70  |
| kontrolna 37+. t.c.   | 33 | 2291,09 | 1094,84 | 3487,33 | 358,44  | 3373,658   | 98,90  | 11014,70 |
| badana do 37 t.c.     | 48 | 1782,79 | 1094,21 | 2471,38 | 607,18  | 2371,421   | 62,51  | 9367,04  |
| badana 37+ t.c.       | 31 | 2899,97 | 1868,50 | 3931,44 | 1760,81 | 2812,063   | 122,57 | 9526,73  |

W wyniku analizy statystycznej stwierdzono:

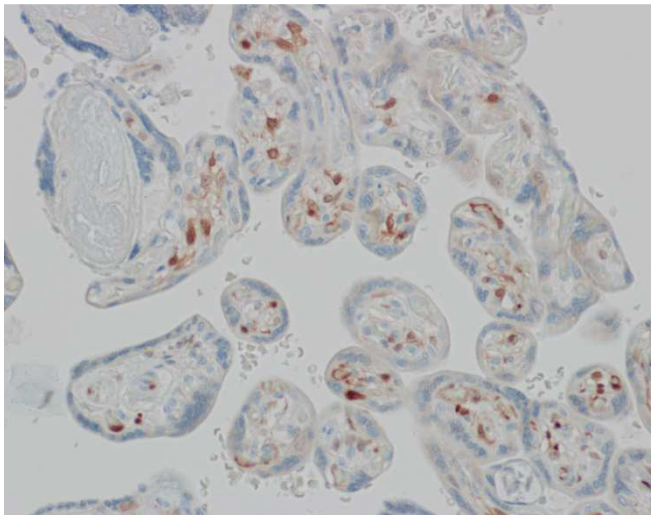
- w grupie badanej wyniki były istotnie wyższe ( $p < 0,01$ );
- brak istotnych różnic między grupą badaną do 37 t.c. a grupą kontrolną do 37 t.c.;
- brak istotnych różnic między grupą badanej 37+ t.c. a grupą kontrolną 37+ t.c.;
- brak istotnych różnic między grupą badaną 37+ t.c. a grupą badaną do 37 t.c.

### 5.3. Wyniki ekspresji wybranych białek w łożysku

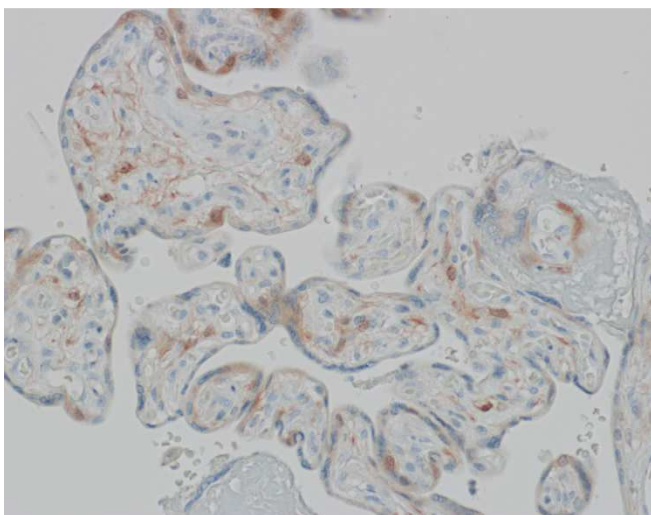
Ekspresję białek p16, COX-2, cyklina D1, SAT B2, FOX p3 oceniano w trofoblaście oraz w śródbłonku naczyń włosowatych łożyska.

#### 5.3.1. Wyniki ekspresji białka p16 w łożysku

Na rycinach 6-7 przedstawiono ekspresję białka p16 w łożysku pochodzącym od ciężarnych z cholestazą i zdrowych.



Rycina 6. Ekspresja białka p16 w łożysku – cholestaza



Rycina 7. Ekspresja białka p16 w łożysku - grupa kontrolna

#### 5.3.1.1. Wyniki ekspresji białka p16 w trofoblaście

Wyniki ekspresji białka p16 w trofoblaście podsumowano w tabeli 13.

Tabela 13. Ekspresja białka p16 w trofoblaście w grupie badanej i kontrolnej

| Ekspresja białka p16 w trofoblaście             |   | Grupa badana | Grupa kontrolna |
|-------------------------------------------------|---|--------------|-----------------|
| brak reakcji immunohistochemicznej              | N | 17           | 16              |
|                                                 | % | 50,0%        | 66,7%           |
| słaba reakcja immunohistochemiczna              | N | 14           | 8               |
|                                                 | % | 41,2%        | 33,3%           |
| umiarkowanie silna reakcja immunohistochemiczna | N | 3            | 0               |
|                                                 | % | 8,8%         | 0,0%            |
| silna reakcja immunohistochemiczna              | N | 0            | 0               |
|                                                 | % | 0,0%         | 0,0%            |
| razem                                           | N | 34           | 24              |
|                                                 | % | 100,0%       | 100,0%          |

W wyniku analizy statystycznej wykazano, że brak jest istotnych różnic między grupą badaną a kontrolną.

#### 5.3.1.2. Wyniki oznaczenia białka p16 w naczyniach kosmków

Wyniki oznaczenia białka p16 w naczyniach kosmków podsumowano w tabeli 14.

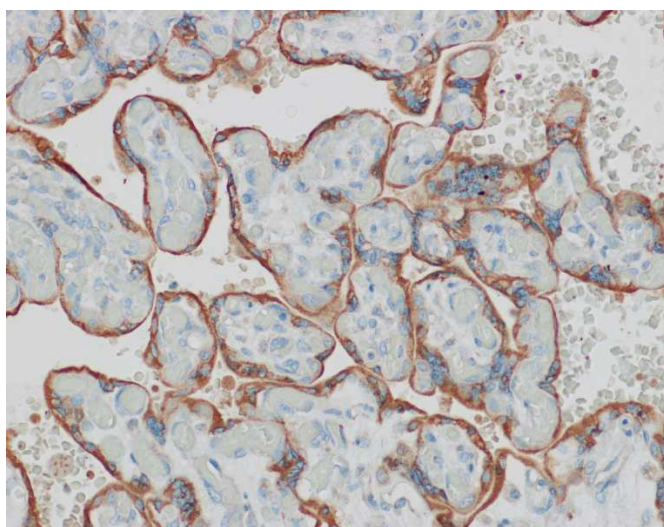
Tabela 14. Wyniki oznaczenia białka p16 w naczyniach kosmków w grupie badanej i kontrolnej

| Ekspresja białka p16 w naczyniach kosmków       |   | Grupa badana | Grupa kontrolna |
|-------------------------------------------------|---|--------------|-----------------|
| brak reakcji immunohistochemicznej              | N | 1            | 1               |
|                                                 | % | 2,9%         | 4,2%            |
| słaba reakcja immunohistochemiczna              | N | 9            | 11              |
|                                                 | % | 26,5%        | 45,8%           |
| umiarkowanie silna reakcja immunohistochemiczna | N | 8            | 5               |
|                                                 | % | 23,5%        | 20,8%           |
| silna reakcja immunohistochemiczna              | N | 16           | 7               |
|                                                 | % | 47,1%        | 29,2%           |
| razem                                           | N | 34           | 24              |
|                                                 | % | 100,0%       | 100,0%          |

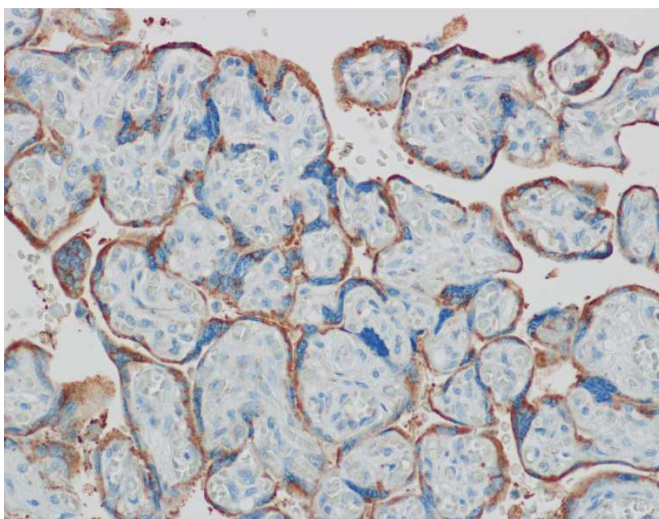
W wyniku analizy statystycznej wykazano, że brak jest istotnych różnic między grupą badaną a kontrolną.

#### 5.3.2. Wyniki ekspresji białka COX-2 w łożysku

Na rycinach 8-9 przedstawiono przykładowe wyniki ekspresji białka COX-2 w łożysku ciężarnych z cholestazą i zdrowych.



Rycina 8. Ekspresja białka COX-2 w łożysku – cholestaza



Rycina 9. Ekspresja białka COX-2 w łożysku - grupa kontrolna

#### 5.3.2.1. Wyniki ekspresji białka COX-2 w trofoblaście

Wyniki ekspresji białka COX-2 w trofoblaście podsumowano w tabeli 15.

Tabela 15. Wyniki ekspresji białka COX-2 w trofoblaście w grupie badanej i kontrolnej

| Ekspresja białka COX-2 w trofoblaście           |   | Grupa badana | Grupa kontrolna |
|-------------------------------------------------|---|--------------|-----------------|
| brak reakcji immunohistochemicznej              | N | 0            | 0               |
|                                                 | % | 0,0%         | 0,0%            |
| słaba reakcja immunohistochemiczna              | N | 0            | 0               |
|                                                 | % | 0,0%         | 0,0%            |
| umiarkowanie silna reakcja immunohistochemiczna | N | 0            | 3               |
|                                                 | % | 0,0%         | 12,5%           |
| silna reakcja immunohistochemiczna              | N | 34           | 21              |
|                                                 | % | 100,0%       | 87,5%           |
| razem                                           | N | 34           | 24              |
|                                                 | % | 100,0%       | 100,0%          |

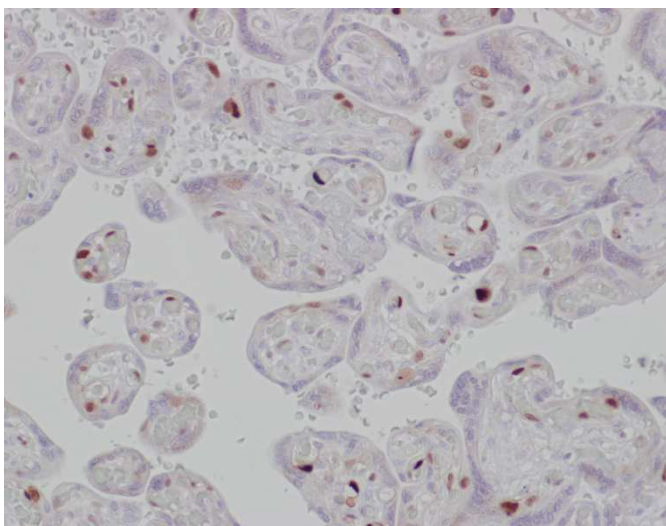
W wyniku analizy statystycznej wykazano, że zachodzi istotna różnica między grupą badaną a kontrolną. W grupie badanej istotnie więcej oznaczeń niż w grupie kontrolnej miało silną reakcję immunohistochemiczną, podczas gdy istotnie mniej miało umiarkowanie silną reakcję immunohistochemiczną ( $p=0,034$ ).

#### 5.3.2.2. Wyniki ekspresji białka COX-2 w naczyniach kosmków

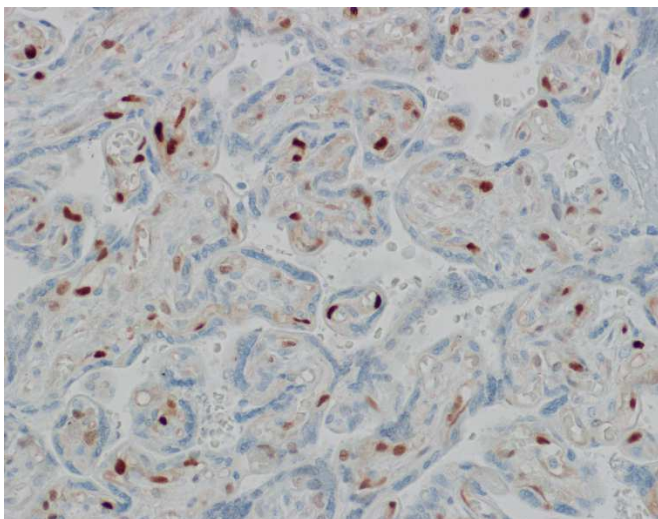
Nie wykazano reakcji w naczyniach dla białka COX-2.

#### 5.3.3. Wyniki ekspresji białka cyklina D1 w łożysku

Na rycinach 10-11 przedstawiono przykładowe wyniki ekspresji białka cyklina D1 w łożysku ciężarnych z cholestazą i zdrowych.



Rycina 10. Ekspresja białka cyklina D1 w łożysku – cholestaza



Rycina 11. Ekspresja białka cyklina D1 w łożysku - grupa kontrolna

#### 5.3.3.1. Wyniki ekspresji białka cyklina D1 w trofoblaście

Nie wykazano reakcji w trofoblaście dla białka cyklina D1.

#### 5.3.3.2. Wyniki oznaczenia białka cyklina D1 w naczyniach kosmków

Wyniki oznaczenia białka cyklina D1 w naczyniach kosmków podsumowano w tabeli 16.

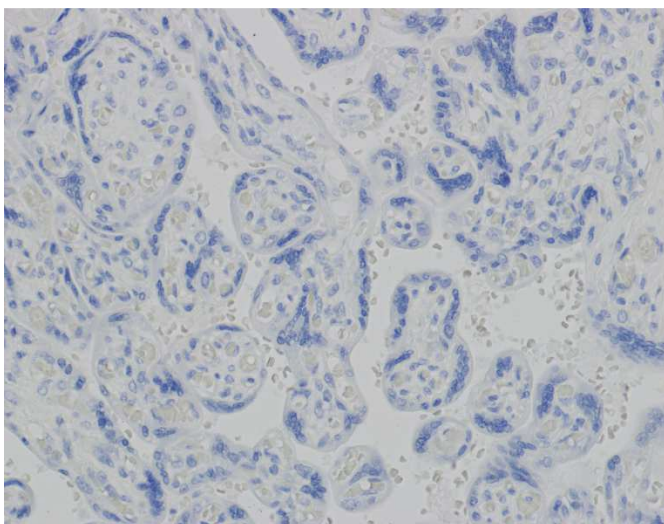
Tabela 16. Wyniki oznaczenia białka cyklina D1 w naczyniach kosmków w grupie badanej i kontrolnej

| <b>Ekspresja białka cyklina D1 w naczyniach kosmków</b> |   | <b>Grupa badana</b> | <b>Grupa kontrolna</b> |
|---------------------------------------------------------|---|---------------------|------------------------|
| brak reakcji immunohistochemicznej                      | N | 0                   | 0                      |
|                                                         | % | 0,0%                | 0,0%                   |
| słaba reakcja immunohistochemiczna                      | N | 16                  | 20                     |
|                                                         | % | 47,1%               | 83,3%                  |
| umiarkowanie silna reakcja immunohistochemiczna         | N | 18                  | 4                      |
|                                                         | % | 52,9%               | 16,7%                  |
| silna reakcja immunohistochemiczna                      | N | 0                   | 0                      |
|                                                         | % | 0,0%                | 0,0%                   |
| razem                                                   | N | 34                  | 24                     |
|                                                         | % | 100,0%              | 100,0%                 |

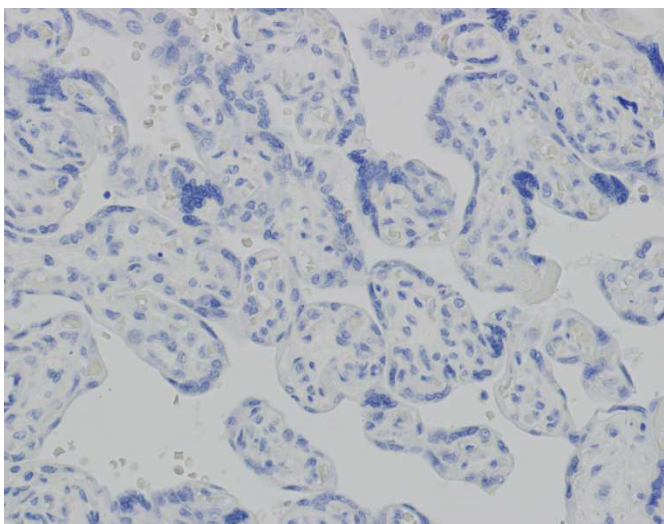
W wyniku analizy statystycznej wykazano, że zachodzi istotna różnica między grupą badaną a kontrolną. W grupie badanej istotnie więcej osób niż w grupie kontrolnej miało umiarkowanie silną reakcję immunohistochemiczną, a istotnie mniej słabą reakcję immunohistochemiczną.

#### 5.3.4. Wyniki ekspresji białka SATB2 w łożysku

Na rycinach 12-13 przedstawiono przykładowe wyniki ekspresji białka SATB2 w łożysku ciążarnych z cholestazą i zdrowych.



Rycina 12. Ekspresja białka SATB2 w łożysku – cholestaza



Rycina 13. Ekspresja białka SATB2 w łożysku - grupa kontrolna

#### 5.3.4.1. Wyniki ekspresji białka SATB2 w trofoblaście

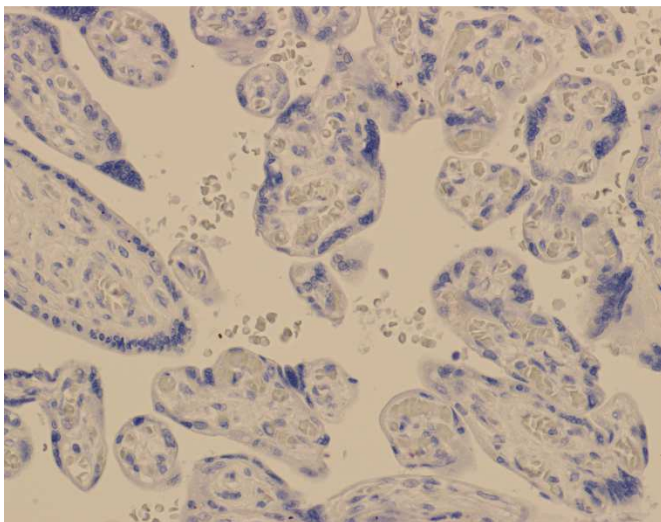
Nie wykazano reakcji w trofoblaście dla białka SATB2.

#### 5.3.4.2. Wyniki ekspresji białka SATB2 w naczyniach kosmków

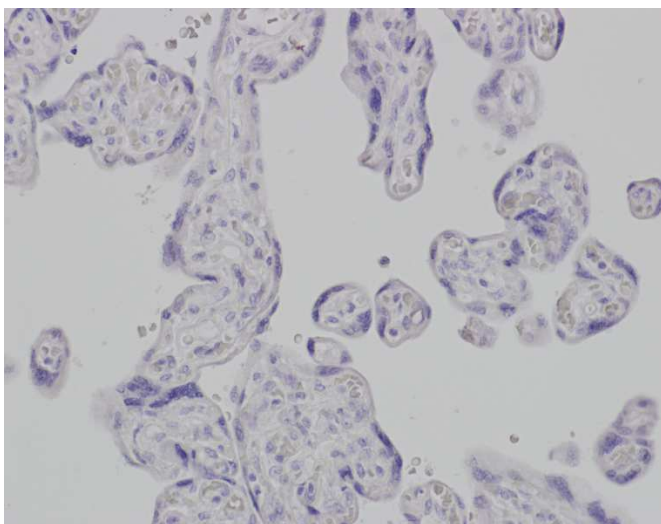
Nie wykazano reakcji w naczyniach dla białka SATB2.

#### 5.3.5. Wyniki ekspresji białka FOXP3 w łożysku

Na rycinach 14-15 przedstawiono przykładowe wyniki ekspresji białka FOXP3 w łożysku ciężarnych z cholestazą i zdrowych.



Rycina 14. Ekspresja białka FOXP3 w łożysku - cholestaza



Rycina 15. Ekspresja białka FOXP3 w łożysku - grupa kontrolna

#### 5.3.5.1. Wyniki ekspresji białka FOXP3 w trofoblaście.

Nie wykazano reakcji w trofoblaście dla białka FOXP3.

#### 5.3.5.2. Wyniki ekspresji białka FOXP3 w naczyniach kosmków

Nie wykazano reakcji w naczyniach dla białka FOXP3.

## 6. Dyskusja

O ile rozpoznanie cholestazy ciążowej i postępowanie przedporodowe nie sprawiają klinicystom większych trudności, o tyle sam, często nieprzewidywalny przebieg tej choroby, mogący prowadzić do istotnych powikłań u płodu, powoduje duży niepokój pacjentek i wzmacnia czujność w opiece nad chorymi. Naukowcy na całym świecie badają przyczyny występowania tej patologii oraz poszukują optymalnych markerów przydatnych w jej predykcji, ale też w monitorowaniu przebiegu choroby a w szczególności w ocenie efektów terapii. Obecnie, najlepszym takim badaniem jest ocena TBA we krwi. W szwedzkim, kohortowym badaniu, zaobserwowano, że jedynie wartości  $TBA \geq 40 \mu\text{mol/l}$  prowadziły do porodu przedwczesnego, obecności smółki w płynie owodniowym czy śmierci wewnątrzmacicznej płodu<sup>75</sup>. Podobne wyniki uzyskano w prospektywnym brytyjskim badaniu z 2014 roku, gdzie ryzyko przedwczesnego porodu, przyjęcia na oddział noworodkowy po porodzie z ciąży powikłanej ICP czy urodzenia martwego noworodka znacznie wzrastało gdy poziom TBA przekraczał  $40 \mu\text{mol/l}$ <sup>76</sup>. Niektóre, nieliczne prace natomiast, opisywały zwiększone ryzyko powikłań matczynych w przebiegu ICP, w tym upośledzenie tolerancji glukozy, dyslipidemie, stan przedrzucawkowy<sup>77-79</sup> a także cukrzycę ciążową<sup>80</sup>.

W postępowaniu, prócz monitorowania dobrostanu płodu i poziomu TBA, istotna jest farmakoterapia. Skutecznym i bezpiecznym preparatem jest kwas ursodeoksycholowy. W 2021 roku, Luo i wsp.<sup>81</sup> oceniali efekty leczenia UDCA u pacjentek z ICP. Z badań tych wynika, że u kobiet z ICP częściej rozpoznawano stan przedrzucawkowy, wykonywano cięcie cesarskie i dochodziło do porodu przedwczesnego w porównaniu z grupą kontrolną. Wykazano, że podanie UDCA zmniejszyło odsetek porodów przedwczesnych<sup>81</sup>. Protokół opracowany przez Wang i wsp.<sup>82</sup> w 2021 roku, dostarcza opartych na dowodach podstaw do klinicznego zastosowania kwasu ursodeoksycholowego w leczeniu cholestazy ciążowej<sup>82</sup>.

Najbardziej aktualny przegląd literatury z 2021 roku opracowany przez Xiao i wsp.<sup>83</sup> traktuje bardzo dokładnie o patogenezie ICP, gdzie prócz czynników genetycznych, hormonalnych, środowiskowych czy immunologicznych omawiana jest rola hipoksji w patogenezie ICP. Zdaniem naukowców, zgromadzone w ciągu ostatnich 10 lat dowody molekularne wskazują, że cholestaza ciążowa jest chorobą powikłaną ostrym niedotlenieniem łożyskowo-płodowym. W swej pracy przedstawiają wyniki wielu badaczy na temat niedotlenienia w ICP<sup>83</sup>. Ciekawe doniesienia na temat wazodylatacyjnych regulatorów krwi w łożysku, kortykotropiny (CRH) i urokortyny

(UCN) znajdują się w badaniach kilku zespołów, gdzie zaobserwowano obniżenie ekspresji UCN w ICP<sup>84-86</sup>. Xu i wsp.<sup>87</sup> wykazali, że transkrypcja i translacja CRH i UCN była zaburzona w ciąży powikłanej ICP o wczesnym początku<sup>87</sup>, natomiast badacze pod kierownictwem He stwierdzili, że u pacjentek w ciąży powikłanej cholestazą wystąpiła redukcja kosmków łożyska o 29% w porównaniu z pacjentkami zdrowymi<sup>88</sup>. W innych badaniach łożysk z ICP, zaobserwowano wzrost czynnika indukowanego hipoksją 1-alfa (HIF-1 $\alpha$ ), HIF-2  $\alpha$ , oraz białka regulowanego na potranskrypcyjnym etapie w rozwoju i odpowiedzi na uszkodzenie DNA-1. Wyżej wymienione czynniki pełnią ważną funkcję w odpowiedzi na niedotlenienie i stres oksydacyjny oraz regulują metabolizm glukozy<sup>89,90</sup>. Chińscy badacze podkreślają, że stres oksydacyjny i łożysko są ze sobą powiązane gdyż, wolne rodniki wpływają na rozwój łożyska, a nieprawidłowa placentacja prowadzi do stresu oksydacyjnego i jego negatywnych konsekwencji. W trofoblaście zachodzą reakcje autofagii i apoptozy, a brak równowagi między tymi zjawiskami jak nadmieniają dalej Wu i wsp.<sup>91</sup> może być związany z patologiami ciąży, takimi jak poronienia, stan przedrzucawkowy czy wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania płodu.

Stres oksydacyjny jest w ostatnich latach zagadnieniem coraz częściej badanym przez naukowców. Potwierdzono jego istotną rolę w procesach starzenia organizmu, wielu patologii ciąży, niemniej niewiele jest doniesień opisujących rolę stresu oksydacyjnego w etiologii cholestazy ciążowej.

#### 6.1. Ocena parametrów stresu oksydacyjnego w surowicy krwi

Produkcja wolnych rodników oraz peroksydacja lipidów wzrasta pod koniec fizjologicznej ciąży. Zmiany te są równoważone przez wzrost poziomu przeciwutleniaczy takich jak witamina E, witamina C, oraz kwas moczowy<sup>92</sup>. Gdy zostaje zaburzona równowaga i uszkodzenia oksydacyjne przekraczają zdolności antyoksydacyjne organizmu, mogą pojawić się powikłania ciąży, takie jak poronienie, ograniczenie wzrastania płodu, stan przedrzucawkowy czy poród przedwczesny<sup>93</sup>.

Niewątpliwie, ważnymi enzymami obrony antyoksydacyjnej, będącymi zmiataczami wolnych rodników ponadtlennokowych są dysmutaza ponadtlennokowa (SOD) oraz peroksydaza glutationowa (GSH-Px)<sup>94</sup>. We włoskim przeglądzie z 2021 roku, bardzo dokładnie przedstawiono biologię molekularną systemu glutationu (GSH). Opisano wiele funkcji GSH w organizmie, gdzie prócz roli zmiatacza wolnych rodników, bierze on udział w wielu innych ważnych procesach komórkowych, np.

w metabolizowaniu toksycznych substancji czy w sygnalizacji komórkowej. Zwrócono uwagę na rolę GSH w patogenezie wielu schorzeń wątroby: alkoholowej chorobie wątroby, niealkoholowej stłuszczeniowej chorobie wątroby, raka wątrobowokomórkowego, przewlekłego uszkodzenia cholestatycznego, wirusowego zapalenia wątroby typu B i C czy uszkodzenia niedokrwienne. W pracy tej omówiono również korzyści terapeutyczne wynikające z suplementacji GSH lub jego prekursorów<sup>95</sup>.

W moich badaniach oceniałam stężenia SOD i GPX w surowicy krwi. Dla SOD, w wyniku analizy statystycznej nie stwierdzono istotnych różnic między grupą badaną a grupą kontrolną w żadnym z czterech kryteriów podziału w zależności od czasu trwania ciąży. Polscy badacze pod kierownictwem Biesiady<sup>96</sup> również analizowali poziom SOD, GPX oraz MDA i CAT m.in. we krwi pacjentek z cholestazą ciążową. Wszystkie średnie poziomy badanych enzymów były podobne w grupie kobiet z cholestazą i w grupie kobiet zdrowych. Badacze Ci wnioskuje, że u pacjentek z cholestazą, poziom enzymów oksydacyjnych we krwi, nie może być wskaźnikiem zaburzenia równowagi oksydo-redukcyjnej z uwagi na brak istotnych dowodów wynikających z przeprowadzonych badań<sup>96</sup>. Hu Y-Y i wsp.<sup>97</sup> oceniali poziom SOD, GPX oraz 8-iso-PGF2 $\alpha$  - produktu peroksydacji lipidów, we krwi pacjentek z rozpoznaną cholestazą ciążową, w zależności od poziomu TBA. W badaniach tych także nie zaobserwowano istotnej różnicy w poziomach SOD między analizowanymi grupami, natomiast poziom 8-iso-PGF2 $\alpha$  oraz GPX były istotnie niższe u pacjentek z cholestazą niż w grupie kontrolnej<sup>97</sup>.

Wyniki moich analiz GSH-Px nie wykazały istotnych statystycznie różnic między grupą badaną a grupą kontrolną, również w zestawieniu grupy badanej do 37 t.c. z grupą kontrolną do 37 t.c. Co ciekawe, wyniki dla GSH-Px w grupie badanej powyżej 37 t.c. były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej powyżej 37 t.c.. Co więcej, analiza grupy badanej wykazała, że wyniki w grupie pacjentek z cholestazą powyżej 37 t.c. były istotnie wyższe niż w grupie pacjentek z cholestazą do 37 t.c. Może to świadczyć o rosnącym nasileniu stresu oksydacyjnego w ciąży powikłanej cholestazą wraz z czasem trwania ciąży.

Podobne wyniki do opisywanych powyżej otrzymałam dla reduktazy glutationowej (GSR). Reduktaza glutationu jest odpowiedzialna za utrzymanie podaży glutationu zredukowanego, a tym samym kontroluje reakcje redoks w komórkach<sup>98</sup>. Dla GSR w badaniach własnych nie wykazałam istotnych statystycznie różnic między grupą

badaną a grupą kontrolną oraz między grupą badaną do 37 t.c. a grupą kontrolną do 37 t.c. Stwierdziłam natomiast, że w grupie badanej powyżej 37 t.c. wyniki były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej powyżej 37 t.c. Należy podkreślić, że wyniki porównania grupy badanej w zależności od czasu trwania ciąży były na granicy istotności statystycznej, co być może uległoby zmianie w przypadku analiz na większej liczbie pacjentek.

W badanej populacji wyniki dla glutationu były takie jak dla GSH-Px, czyli nie wykazałam istotności statystycznej między grupą badaną i kontrolną, a także między grupą badaną do 37 t.c. a grupą kontrolną do 37 t.c. Natomiast wraz z czasem trwania ciąży, w grupie pacjentek z cholestazą ciążową powyżej 37 t.c. wyniki były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej powyżej 37 t.c. W analizie grupy badanej w zależności od czasu trwania ciąży, wyniki były istotnie wyższe powyżej 37 t.c. Obserwujemy zatem ponownie narastanie wykładników stresu oksydacyjnego wraz z czasem trwania ciąży, co ma związek ze wzrostem ryzyka powikłań dla płodu w przebiegu ICP. Z pewnością warto rozważyć dalsze badania markerów stresu oksydacyjnego mogących monitorować nasilenie stresu oksydacyjnego u pacjentek z cholestazą ciążową.

Zhou B.i wsp.<sup>99</sup> badali związek poziomu GSH, SOD, NO i MDA u pacjentek z ICP z wykładnikami zagrożenia płodu. Autorzy tych badań podkreślają, że podwyższone poziomy wykładników stresu oksydacyjnego mogą korelować ze zwiększonym ryzykiem niekorzystnych wyników neonatologicznych.<sup>99</sup> Jest to spójne z wynikami moich analiz, gdzie wartości GSH-Px, GSH i MDA nasilają się wraz z czasem trwania ciąży powikłanej ICP.

Wspomniany powyżej dialdehyd malonowy (MDA), produkt utleniania lipidów, który jest jednym z najczęściej badanych markerów stresu oksydacyjnego<sup>100</sup>, był również przedmiotem analiz w moich badaniach. W grupie badanej powyżej 37 t.c. wyniki były istotnie wyższe niż w grupie badanej do 37 t.c. Co ciekawe, analiza pomiędzy grupą badaną powyżej 37 t.c. a grupą kontrolną powyżej 37 t.c. była na granicy istotności statystycznej. Dlatego można wnioskować o pewnej tendencji i być może na większej próbie pacjentek uzyskano by istotność statystyczną. Można zatem założyć, że stres oksydacyjny w grupie badanej nasila się wraz z trwaniem ciąży.

W wyniku stresu oksydacyjnego komórki mięśniówki gładkiej naczyń migrują i proliferują, a także dochodzi do nasilenia stanu zapalnego, również w odpowiedzi na wytwarzanie m.in. czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF). Zaburzenie równowagi procesów utleniania i redukcji wpływa także na apoptozę i funkcję ściany

naczyń doprowadzając do dysfunkcji nabłonka<sup>101</sup>. Larson i wsp.<sup>102</sup> dokonali przeglądu literatury w aspekcie zmian w układzie odpornościowym u pacjentek z cholestazą ciążową. Autorzy opisują wiele mechanizmów immunologicznych, niemniej według ich obserwacji jedynie poziom VEGF, czynnika angiogenezy jest podwyższony w ICP, co jak twierdzą kwestionuje rolę tego procesu w ICP<sup>102</sup>.

Dla VEGF stwierdziłam, że w grupie badanej wyniki były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej. W pozostałych analizach nie uzyskałam istotności statystycznej różnic między badanymi grupami.

W pracy Zhang i wsp.<sup>103</sup> badano łożyska kobiet z ICP. Zaobserwowano ekspresję VEGF w warunkach hipoksji. Zespół z Chin wnioskuje, że krótkotrwała hipoksja stymuluje ekspresję VEGF w łożysku z ICP, co może stanowić mechanizm ochronny dla płodu<sup>103</sup>. Jednak Du i wsp.<sup>104</sup>, na podstawie wyników własnych badań pacjentek z cholestazą, sugerują, że odpowiedź immunologiczna, angiogeneza czy waskulogeneza pełnią istotną rolę w patogenezie ICP. Naukowcy opisują zaangażowanie podstawowych genów regulatorowych głównie w szlak sygnalizacyjny VEGF, odpowiedź immunologiczną oraz sygnalizację sprzężonego z białkiem G receptora<sup>104</sup>.

Badacze z Turcji również podkreślają rolę reakcji immunologicznej matki w patofizjologii cholestazy ciążowej. Zespół Ozlera, w prospektywnym badaniu na grupie 30 pacjentek z ICP, badał poziom cytokin zapalnych, takich jak interleukina 6 (IL 6), czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) i neopteryna oraz status stresu oksydacyjnego określając całkowity status antyoksydacyjny (TAS) oraz całkowity stres oksydacyjny (TOS) we krwi, za pomocą zautomatyzowanej metody Erel. Wskaźnik stresu oksydacyjnego (OSI) obliczono następnie jako stosunek TOS do TAS. Poziomy TAS, TOS i OSI były istotnie wyższe w grupie pacjentek z cholestazą<sup>28</sup>.

W moich badaniach wyniki TAS surowicy krwi w grupie badanej były istotnie niższe niż w grupie kontrolnej, a dodatkowo, w grupie badanej do 37 t.c. wyniki były również istotnie niższe niż w grupie kontrolnej do 37 t.c. W publikacji Oztasa i wsp. analizowano TAS, TOS, a także łożyskową metaloproteinazę ADAMTS-12 oraz stężenie aryloesterazy (ARES) w łożysku. pacjentek z ICP oraz ze stanem przedrzucawkowym. W oparciu o uzyskane wyniki, autorzy sugerują możliwą rolę zapalenia w patogenezie ICP<sup>105</sup>.

## 6.2. Ocena aktywności określonych białek stresu oksydacyjnego w łożysku

W ciąży łożysko syntetyzuje aktywne transportery kwasów żółciowych<sup>106,107</sup> co skłania do poszukiwania relacji między tym schorzeniem a prawidłową funkcją łożyska.

W swojej pracy, Heidari i wsp.<sup>108</sup> zwrócili uwagę na cytotoksyczne właściwości gromadzących się cząsteczek kwasów żółciowych w cholestazie, co prowadzi do upośledzenia czynności wątroby i innych narządów. Pomimo tego, że dokładne mechanizmy cytotoksyczności nie są w cholestazie do końca poznane, to jedną z głównych ról przypisuje się stresowi oksydacyjnemu i jego konsekwencjom. Na poziomie komórkowym głównym celem działania cząsteczek cytotoksycznych są mitochondria. Ich uszkodzenie może prowadzić do kryzysu energetycznego i uwolnienia mediatorów śmierci komórki<sup>108</sup>. Takie obserwacje opisali w swoich wstępnych badaniach Mella i wsp.<sup>109</sup>. Oceniali oni ekspresję 13 genów kodujących białka mitochondrialne, a także nasilenie stresu oksydacyjnego poprzez ocenę uszkodzenia DNA. Uzyskane wyniki sugerują, że mitochondria w łożysku reagują na nasilony stres oksydacyjny, modyfikując ekspresję genów, co jak wnioskują badacze, może odgrywać rolę w patofizjologii ICP<sup>109</sup>.

Wei-Bin Wu i wsp.<sup>110</sup> zainteresowali się peroksyredoksyną-3 (PRDX3), enzymem mitochondrialnym, który katalizuje utlenianie nadtlenu wodoru w komórce, czyli ma działanie antyoksydacyjne<sup>111</sup>. W swoich badaniach wykazali, że poziom PRDX3 był obniżony w łożyskach pacjentek z ICP, a także w komórkach kosmków i trofoblastu poddawanych działaniu kwasów żółciowych *in vitro*. W oparciu o wyniki uzyskane z przeprowadzonych badań, stwierdzili, że ekspozycja na kwas żółciowy obniżyła poziom PRDX3 w ludzkich trofoblastach, czyli enzym ten chronił komórki trofoblastu przed dysfunkcją mitochondrium i skutkami stresu oksydacyjnego. Na podstawie swych badań sugerują, że zmniejszenie PRDX3 przez nadmiar kwasów żółciowych w trofoblastach odgrywa kluczową rolę w patogenezie i progresji ICP. Ponadto wykazali, że zmniejszona ekspresja PRDX3, sprzyjała starzeniu komórek w wyniku aktywacji białka p38 oraz indukcji białek p16 i p21<sup>110</sup>.

W badaniach własnych oceniałam ekspresję białka p16 w łożysku. Zarówno w trofoblaście jak i w śródbłonku naczyń włosowatych kosmków, w grupie badanej i kontrolnej obserwowano reakcję barwną białka p16, natomiast nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji tego białka. Natomiast badanie kolejnego białka COX-2 w trofoblaście, wykazało, że w grupie badanej było istotnie więcej oznaczeń z silną reakcją immunohistochemiczną, podczas, gdy istotnie mniej preparatów miało

umiarkowanie silną reakcją immunohistochemiczną. Co ciekawe, w śródbłonku naczyń kosmków nie wykazano żadnej reakcji barwnej.

Wielu badaczy podkreśla, że mysz jest najlepiej zbadanym eksperymentalnym modelem genetycznym ssaków, w którym można badać także mechanizmy patologii położniczych i łożyskowych. Mysie łożysko jest narządem zbudowanym z trzech regionów: *strefy labiryntu*, głównego obszaru wymiany, składającego się z siatki matczynych przestrzeni pokrytych trofoblastem, *strefy węzłowej*, o nieznannej funkcji, zawierającej komórki spongiotrofoblastów i trofoblastyczne komórki glikogenu, oraz *doczesnej podstawowej (decidua basalis)*<sup>112</sup>. Burdon i wsp.<sup>113</sup> badali nasilenie stresu oksydacyjnego w łożyskach myszy, w różnym wieku ciążowym, i jego korelację z ekspresją enzymów cyklooksygenazy COX-1 i COX-2 oraz z apoptozą. Eksplanty łożyska poddawali działaniu hipoksji - reoksygenacji *in vitro*, w celu wygenerowania stresu oksydacyjnego. Zaobserwowali znaczny wzrost stężeń hydroksynonenalu (HNE), który jest produktem peroksydacji lipidów, a także COX-1 i COX-2 wraz z wiekiem ciążowym. Podwójne znakowanie wykazało kolokalizację HNE oraz COX-1 i COX-2 w obrębie trofoblastu stref labiryntowych i komórek glikogenu stref węzłowych mysich łożysk<sup>113</sup>.

Stres oksydacyjny zaburza wiele reakcji w organizmie, w tym cykli komórkowych, dlatego zbadano ekspresję cykliny D1. Znaczenie diagnostyczne cykliny D1 przypisuje się przede wszystkim w procesach onkologicznych. Uważana jest za protoonkogen a nadekspresja tego białka charakteryzuje komórki nowotworowe<sup>114</sup>. Nadekspresja cykliny D1 w różnych typach raka jest powszechnie spotykana, jednak nie do końca jasny jest dokładny mechanizm w jakim przyczynia się do powstawania nowotworów. Laphanuwat i wsp.<sup>115</sup> w swoich badaniach wykazali nową rolę cykliny D1, która opisuje, że ekspresja tego białka jest niezbędna, aby komórki rakowe mogły pozostać na etapie proliferacji, poprzez utrzymywanie stresu oksydacyjnego w komórkach nowotworowych na niskim, subletalnym poziomie i powstrzymuje starzenie się komórek raka indukowane stresem oksydacyjnym<sup>115</sup>.

W moich oznaczeniach nie wykazałam reakcji barwnej dla cykliny D1 w trofoblastie badanych łożysk, zarówno w grupie pacjentek z cholestazą jak i w grupie kontrolnej. Ekspresja cykliny D1 w naczyniach kosmków, oceniana w zmodyfikowanej skali Remmele-Stegner, wykazała, że zachodzi reakcja barwna i stwierdza się zależności istotne statystycznie między analizowanymi grupami pacjentek. W preparatach pacjentek z cholestazą istotnie więcej próbek wykazywało reakcję barwną na obszarze

obejmującym ponad 50% komórek, natomiast istotnie mniej próbek z tej grupy wykazywało reakcję barwną na obszarze mniejszym niż 50% komórek. Na tej podstawie postawiono wnioski, że ekspresja cykliny D1 w łożyskach z cięż powikłanych cholestazą jest wyższa, tym samym zaburzona jest równowaga oksydacyjna. Taki stan wpływa na prawidłową funkcję komórek i prowadzi do rozwoju patologii, w tym raka<sup>116</sup>.

Białko SATB2, można również uznać za onkogen. Roy i wsp.<sup>117</sup> dokonali przeglądu literatury, w którym omówili patofizjologiczne role tego transkrypcyjnego białka i ocenili, że może być stosowane jako biomarker diagnostyczny raka. SATB2 moduluje ekspresję genów regulujących samoodnawianie i pluripotencję. Jego nadekspresja indukuje transformację komórek nabłonka, które zyskują właściwości komórek progenitorowych. Ponadto, stwierdzili, że SATB2 aktywuje szlak beta-kateniny, silnie aktywowany w większości nowotworów<sup>117</sup>.

W badaniach własnych łożyska, w obu analizowanych grupach, zarówno w trofoblaście, jak i w naczyniach kosmków nie wykazano reakcji barwnej dla białka SATB2.

Brak reakcji immunohistochemicznej zaobserwowałam także w ocenie białka FOXP3 w analizowanych łożyskach. W grupie badanej i kontrolnej, zarówno w trofoblaście jak i w naczyniach kosmków, nie stwierdzono żadnej reakcji barwnej w przyjętej skali IRS. Jak opisuje Kim<sup>118</sup>, funkcją FOXP3, jako członka rodziny czynników transkrypcyjnych, wyrażanego w podzbiorze komórek T CD4+, jest tłumienie ekspresji wielu genów, w tym IL-2 i cytokin efektorowych komórek T<sup>118</sup>. Komórki regulatorowe T CD4+ FOXP3+ odgrywają główną rolę w homeostazie immunologicznej. Jak pisze wspomniany wcześniej zespół Larsona, wzrost kwasów żółciowych w cholestazie ciężowej powoduje zmianę w układzie odpornościowym z odpowiedzi Th2 na Th1<sup>102</sup>.

Poszukiwanie odpowiedniej, skutecznej terapii ICP jest niezmiennie ważnym aspektem, który stanowi pole badań dla wielu zespołów. Hargreaves i wsp.<sup>119</sup> dokonali przeglądu literatury, w którym przedstawili przykłady skutecznego zastosowania suplementacji koenzymu Q w wybranych patologiach serca, nerek, wątroby, a także ataksjach i miopatiach na tle genetycznym<sup>119</sup>. Ubichinon czy koenzym Q10 (CoQ10) odgrywa kluczową rolę w metabolizmie wszystkich komórek, gdyż odpowiada za przenoszenie elektronów w reakcjach łańcucha oddechowego. Niedobór tego związku chemicznego odgrywa rolę w patogenezie wielu schorzeń. Pierwotny niedobór CoQ10 wynika z defektów genetycznych, opisywany przede wszystkim w schorzeniach mięśni

i układu nerwowego, natomiast wtórny deficyt ubichinonu opisywany jest w chorobie sercowo-naczyniowej, przewlekłych schorzeniach nerek, cukrzycy typu II czy chorobach wątroby. Martinefski i wsp.<sup>120</sup> oceniali potencjalną rolę terapeutyczną CoQ10 w cholestazie wewnątrzkomórkowej, w porównaniu ze stosowaniem UDCA. Badania eksperymentalne przeprowadzane były na szczurach zdrowych oraz szczurach z wystymulowaną etynyloestradiolem cholestazą. Oceniano m.in. SOD, CAT, GSH, retinol, kwas askorbinowy, transaminazy, CoQ10, CoQ9 w osoczu krwi, wątrobie oraz/lub w mitochondriach hepatocytów. W farmakoterapii stosowano wyłącznie CoQ10 albo CoQ10 w połączeniu z UDCA. Suplementacja ubichinonu zapobiegała wzrostowi poziomu kwasów żółciowych oraz fosfatazy alkalicznej w surowicy, a także zapobiegała spadkowi przepływu żółci u szczurów z cholestazą. Dodatkowo, zaobserwowano poprawę parametrów stresu oksydacyjnego w wątrobie. Terapia UDCA również zmniejszała wykładniki cholestazy, ale była mniej skuteczna w porównaniu z CoQ10 w poprawie środowiska redoks wątroby. Natomiast najlepsze efekty wg naukowców dawała terapia skojarzona CoQ10 i UDCA. Autorzy sugerują, że taka propozycja leczenia ICP może stanowić korzystną, alternatywną terapię<sup>120</sup>.

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach potwierdziłam związek między stresem oksydacyjnym a wewnątrzwątrobową cholestazą ciężarnych. Ma to moim zdaniem istotne znaczenie, ponieważ pomimo korzystnych wyników leczenia tego schorzenia za pomocą kwasu ursodeoksycholowego, nadal nie potrafimy określić czynników ryzyka wystąpienia tego powikłania. Wydaje mi się, że dalsze badania dotyczące etiologii ICP są w pełni uzasadnione, ponieważ mogą przyczynić się do pełnego zrozumienia patofizjologii tego schorzenia i tym samym określić optymalny protokół terapeutyczny jak również, co jest bardzo istotne, uzyskać możliwość prowadzenia odpowiedniej profilaktyki.

## **7. Wnioski**

1. W ciąży powikłanej cholestazą obserwuje się zaburzenia w zakresie równowagi procesów pro- i antyredukcyjnych.
2. U ciężarnych z cholestazą ciążową wraz z rozwojem ciąży obserwuje się nasilenie wykładników stresu oksydacyjnego, które zaznaczają się istotnie po ukończeniu 37 tygodnia ciąży.
3. Aktywność białek charakterystycznych dla stresu oksydacyjnego jest widoczna w łożysku, co świadczy o istotnej roli tego narządu w regulacji procesów oksydacyjnych.

## 8. Streszczenie

Cholestaza ciążowa jest najczęstszym schorzeniem wątroby w ciąży. Zwykle rozwija się w trzecim trymestrze ciąży. Najczęstsze objawy to świąd skóry, szczególnie okolicy dłoni i stóp, a także podwyższone poziomy kwasów żółciowych oraz transaminaz w badaniach krwi matki. Charakterystyczne dla tej choroby jest ustępowanie objawów po porodzie. Przebieg cholestazy ciążowej jest stosunkowo łagodny dla matki, natomiast wiąże się ze zwiększonym ryzykiem komplikacji dla płodu, w tym porodu przedwczesnego, zachłyśnięcia smółką czy nagłej śmierci wewnątrzmacicznej płodu. Zachorowalność jest zależna od obszaru występowania i pochodzenia etnicznego. Na wystąpienie choroby mają wpływ czynniki hormonalne (rola estrogenów czy progesteronu), genetyczne (mutacje białek MDR3, BSEP) czy środowiskowe (niedobór seleny, nadmiar kwasu erudykowego, pestycydy), a także immunologiczne, jednakże etiopatogeneza cholestazy ciążowej jest nadal nie do końca poznana. Leczenie opiera się na złagodzeniu objawów klinicznych, normalizacji poziomu TBA i transaminaz oraz przede wszystkim na monitorowaniu dobrostanu płodu i zapobieganiu niekorzystnym powikłaniom położniczym. Lekiem pierwszego rzutu w cholestazie ciążowej jest kwas ursodeoksycholowy.

Stres oksydacyjny jest zaburzeniem homeostazy procesów utleniania i redukcji, na skutek czego dochodzi do utleniania białek, węglowodanów, lipidów czy materiału DNA. Opisany jest wpływ stresu oksydacyjnego na wiele patologii związanych z ciążą, natomiast niewiele jest doniesień na temat roli stresu oksydacyjnego w cholestazie ciążowej.

Ocena roli stresu oksydacyjnego w ciąży powikłanej cholestazą ciążową jest zasadniczym celem pracy. Realizacja jego była przeprowadzona w oparciu o uzyskanie odpowiedzi na poniższe cele szczegółowe:

- analiza parametrów charakteryzujących stres oksydacyjny w surowicy krwi;
- określenie aktywności stresu oksydacyjnego w łożysku na podstawie oceny charakterystycznych dla tego stanu białek.

Do badania włączono 127 kobiet ciężarnych hospitalizowanych w Ginekologiczno-Położniczym Szpitalu Klinicznym Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, między styczniem 2019 a marcem 2020 roku.

Materiał do badania stanowiła krew żylna oraz łożysko. Z surowicy krwi oznaczono stężenia SOD, GSH-Px, GSR, GSH, MDA, VEGF z wykorzystaniem komercyjnego zestawu ELISA firmy Sun Red Biocompany oraz TAS przy pomocy

zestawu Randox Total Antioxidant Status na aparacie COBAS firmy Roche. Preparaty uzyskane z łożysk wybarwiano przeciwciałami monoklonalnymi w kierunku obecności białka p16, COX-2, cykliny D1, SATB2 oraz FOXP3.

Do analizy danych użyto programu IBM SPSS Statistics 26. Jako poziom istotności przyjęto wartość 0,05.

Na potrzeby badania markerów stresu oksydacyjnego z krwi grupę badaną podzielono na dwie podgrupy ze względu na czas trwania ciąży: do 37 t.c. oraz powyżej 37 t.c. Analiza statystyczna otrzymanych wyników dotyczyła sprawdzenia czy zachodzi istotna różnica między wartościami dla następujących, porównywanych ze sobą grup:

- grupa badana i grupa kontrolna;
- grupa badana do 37 t.c. i grupa kontrolna do 37 t.c.;
- grupa badana 37+ t.c. i grupa kontrolna 37+ t.c.;
- grupa badana do 37 t.c. i grupa badana 37+ t.c.

Dla SOD, w wyniku analizy statystycznej nie stwierdzono istotnych różnic między grupą badaną a grupą kontrolną w żadnym z czterech kryteriów podziału w zależności od czasu trwania ciąży.

Wyniki analiz GSH-Px nie wykazały istotnych statystycznie różnic między grupą badaną a grupą kontrolną, również w zestawieniu grupy badanej do 37 t.c. z grupą kontrolną do 37 t.c. Wyniki dla GSH-Px w grupie badanej powyżej 37 t.c. były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej powyżej 37 t.c., co więcej, analiza grupy badanej wykazała, że wyniki w grupie pacjentek z cholestazą powyżej 37 t.c. były istotnie wyższe niż w grupie pacjentek z cholestazą do 37 t.c.

Dla GSR nie wykazano istotności statystycznych między grupą badaną a grupą kontrolną oraz między grupą badaną do 37 t.c. a grupą kontrolną do 37 t.c. Stwierdzono natomiast, że w grupie badanej powyżej 37 t.c. wyniki były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej powyżej 37 t.c.

Dla GSH nie wykazano istotności statystycznej w grupie badanej i kontrolnej, a także między grupą badaną do 37 t.c. a grupą kontrolną do 37 t.c. Natomiast wraz z czasem trwania ciąży, w grupie pacjentek z cholestazą ciążową powyżej 37 t.c. wyniki były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej powyżej 37 t.c. W analizie grupy badanej w zależności od czasu trwania ciąży, wyniki były istotnie wyższe powyżej 37 t.c.

Analiza wyników MDA wykazała, że w grupie badanej powyżej 37 t.c. wartości były istotnie wyższe niż w grupie badanej do 37 t.c. Analiza pomiędzy grupą badaną powyżej 37 t.c. a grupą kontrolną powyżej 37 t.c. była na granicy istotności statystycznej.

Dla VEGF stwierdzono, że w grupie badanej wyniki były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej. W pozostałych analizach nie uzyskano istotności statystycznej.

Wyniki TAS w grupie badanej były istotnie niższe niż w grupie kontrolnej i dodatkowo, w grupie badanej do 37 t.c. wyniki były również istotnie niższe niż w grupie kontrolnej do 37 t.c.

Próbki łożysk wybarwiono immunohistochemicznie i oceniano ekspresję wybranych białek korzystając z półilościowej skali IRS.

Zarówno w trofoblaście jak i w śródbłonku naczyń włosowatych kosmków, w grupie badanej i kontrolnej obserwowano reakcję barwną dla białka p16, natomiast nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji tego białka.

Dla białka COX-2 w trofoblaście wykazano, że w grupie badanej było istotnie więcej oznaczeń z silną reakcją immunohistochemiczną, podczas, gdy istotnie mniej preparatów miało umiarkowanie silną reakcję immunohistochemiczną. W śródbłonku naczyń kosmków nie wykazano żadnej reakcji barwnej.

W oznaczeniach nie wykazano reakcji barwnej dla cykliny D1 w trofoblaście badanych łożysk, zarówno w grupie pacjentek z cholestazą jak i w grupie kontrolnej. Ekspresja cykliny D1 w naczyniach kosmków, oceniana w zmodyfikowanej skali Remmele-Stegner, wykazała, że zachodzi reakcja barwna i stwierdza się zależności istotne statystycznie między analizowanymi grupami pacjentek. W preparatach pacjentek z cholestazą istotnie więcej próbek wykazywało reakcję barwną na obszarze obejmującym ponad 50% komórek, natomiast istotnie mniej próbek z tej grupy wykazywało reakcję barwną na obszarze mniejszym niż 50% komórek.

Nie wykazano reakcji w trofoblaście i w śródbłonku naczyń kosmków dla białka SATB2 oraz dla białka FOX p3.

Wnioski:

1. W ciąży powikłanej cholestazą obserwuje się zaburzenia w zakresie równowagi procesów pro- i antyredukcyjnych.
2. Wraz z rozwojem ciąży obserwuje się nasilenie wykładników stresu oksydacyjnego, które zaznaczają się istotnie po ukończeniu 37. tygodnia ciąży.
3. Aktywność białek charakterystycznych dla stresu oksydacyjnego jest widoczna w łożysku, co świadczy o istotnej roli tego narządu w regulacji procesów oksydacyjnych.

## 9. Summary

Intrahepatic cholestasis of pregnancy is the most common liver disorder of pregnancy. It usually develops in the third trimester of pregnancy. The most common symptoms are pruritus, especially around the palms and soles and elevated levels of bile acids and transaminases in maternal blood. Characteristic of this disease is the disappearance of symptoms after delivery. While the course of gestational cholestasis is relatively benign for the mother, it is associated with an increased risk of fetal complications including preterm delivery, meconium aspiration, and sudden intrauterine fetal death. The incidence depends on the area of occurrence and ethnicity. Hormonal (the role of estrogens and progesterone), genetic (mutations of MDR3 and BSEP proteins), environmental (selenium deficiency, excess of erudic acid, pesticides) and immunological factors influence the occurrence of the disease. Treatment is based on the alleviation of clinical symptoms, normalization of TBA and transaminase levels, and most importantly on the monitoring of fetal well-being and prevention of adverse obstetric complications. The first-line drug for gestational cholestasis is ursodeoxycholic acid.

Oxidative stress is a disturbance of oxidation and reduction processes, resulting in oxidation of proteins, carbohydrates, lipids or DNA material. The effect of oxidative stress on many pregnancy-related pathologies has been described, but there are few reports on the role of oxidative stress in gestational cholestasis.

Assessing the role of oxidative stress in pregnancy complicated by gestational cholestasis is the primary aim of this study. Its realization was carried out on the basis of obtaining answers to the following specific objectives:

- analysis of parameters characterizing oxidative stress in blood serum;
- to determine the activity of oxidative stress in the placenta based on the evaluation of proteins characteristic for this condition.

The study included 127 pregnant women hospitalized at the Gynecological-Obstetrical Clinical Hospital of the Karol Marcinkowski Medical University in Poznan, between January 2019 and March 2020.

The study material consisted of venous blood and placenta. Serum levels of SOD, GSH-Px, GSR, GSH, MDA, VEGF were determined using a commercial ELISA kit from Sun Red Biocompany and total antioxidant status (TAS) was determined using the Randox Total Antioxidant Status kit on a COBAS instrument from Roche. The preparations obtained from the placentas were stained with monoclonal antibodies for the presence of p16, COX-2, cyclin D1, SATB2 and FOXP3 proteins.

IBM SPSS Statistics 26 program was used for data analysis. A value of 0.05 was used as the significance level.

For the study of oxidative stress markers from blood, the study group was divided into two subgroups based on the duration of pregnancy: below 37 week of gestation (wk) and above 37 wk. Statistical analysis of the obtained results concerned checking whether there was a significant difference between the values for the following groups compared with each other:

- study group and control group;
- test group below 37 wk and control group below 37 wk;
- study group 37+ wk and control group 37+ wk;
- study group below 37 wk and study group 37+ wk.

For SOD, statistical analysis showed no significant differences between the study group and the control group in any of the four division criteria according to the duration of pregnancy.

The results of GSH-Px analyses showed no statistically significant differences between the study group and the control group, also in the comparison of the study group below 37 wk with the control group below 37 wk. The results for GSH-Px in the study group above 37 wk were significantly higher than in the control group above 37 wk. Moreover, analysis of the study group showed that the results in the group of patients with cholestasis above 37 wk were significantly higher than in the group of patients with cholestasis below 37 wk.

For GSR, no statistical significance was found between the study group and the control group or between the study group below 37 wk and the control group below 37 wk. However, it was found that in the study group above 37 wk the results were significantly higher than in the control group above 37 wk.

For GSH, there was no statistical significance in the study and control groups, as well as between the study group below 37 wk and the control group below 37 wk. However, with the duration of pregnancy, the results were significantly higher in the group of patients with gestational cholestasis above 37 wk than in the control group above 37 wk. In the analysis of the study group according to the duration of pregnancy, the scores were significantly higher above 37 wk.

The analysis of MDA results showed that in the study group above 37 wk the values were significantly higher than the study group below 37 wk. The analysis between

the study group above 37 wk and the control group above 37 wk was at the limit of statistical significance.

For VEGF, the results were found to be significantly higher in the study group than in the control group. No statistical significance was obtained in the other analyses.

TAS scores in the study group were significantly lower than in the control group, and in addition, the scores in the study group below 37 wk were also significantly lower than in the control group below 37 wk.

Placental samples were stained immunohistochemically and the expression of selected proteins was evaluated using the semi-quantitative IRS scale.

In both trophoblast and endothelium of villi capillaries, a color reaction for p16 protein was observed in the test and control groups, whereas no statistically significant differences in the expression of this protein were shown.

For COX-2 protein in trophoblast, it was shown that there were significantly more assays with strong immunohistochemical reaction in the test group, while significantly fewer preparations had moderately strong immunohistochemical reaction. no color reaction was shown in the vascular endothelium of villi.

The assays showed no color reaction for cyclin D1 in the trophoblast of the placentas examined, either in the cholestasis group or in the control group. The expression of cyclin D1 in the chorionic vasculature, evaluated with the modified Remmele-Stegner scale, showed that there was a color reaction and statistically significant correlation between the analyzed groups of patients. In the preparations of patients with cholestasis significantly more samples showed color reaction in the area covering more than 50% of cells, while significantly less samples from this group showed color reaction in the area less than 50% of cells.

No reaction was shown in the trophoblast and in the vascular endothelium of the villi for SATB2 protein and for FOXP3 protein.

Conclusions:

1. In pregnancy complicated by cholestasis an imbalance of pro- and anti-reductive processes is observed.
2. As the pregnancy progresses, oxidative stress markers increase and become significantly more pronounced after the 37th week of gestation.
3. Activity of proteins characteristic for oxidative stress is visible in the placenta, which proves the important role of this organ in regulation of oxidative processes.

## 10. Piśmiennictwo

1. Kamimura K, Abe H, Kawai H, et al. Advances in understanding and treating liver diseases during pregnancy: A review. *World J Gastroenterol*. 2015;21(17):5183.
2. Shekhar S, Diddi G. Liver disease in pregnancy. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2015;54(5):475-482.
3. Mikolasevic I, Filipec-Kanizaj T, Jakopcic I, et al. Liver disease during pregnancy: A challenging clinical issue. *Med Sci Monit*. 2018;24.
4. García-Romero CS, Guzman C, Cervantes A. Liver disease in pregnancy: Medical aspects and their implications for mother and child. *Ann Hepatol*. 2019. doi:10.1016/j.aohp.2019.04.009
5. Westbrook RH, Dusheiko G, Williamson C. Pregnancy and liver disease. *J Hepatol*. 2016:933-945.
6. Cichoz-Lach H. Pathogenesis of liver diseases associated with pregnancy. *Ginekol Pol*. 2010;81(8):613-617.
7. Ko H, Yoshida E. Acute fatty liver of pregnancy. *Can J Gastroenterol*. 2006;20(1):25-30. doi:10.1002/9781119129400.ch30
8. Brady CW. Liver Disease in Pregnancy: What's New. *Hepatol Commun*. 2020;4(2):145-156. doi:10.1002/hep4.1470
9. Armaly Z, Jadaon JE, Jabbour A, Abassi ZA. Preeclampsia: Novel mechanisms and potential therapeutic approaches. *Front Physiol*. 2018;9(JUL):1-15. doi:10.3389/fphys.2018.00973
10. Backes CH, Markham K, Moorehead P, Cordero L, Nankervis CA, Giannone PJ. Maternal Preeclampsia and Neonatal Outcomes. *J Pregnancy*. 2011;2011:1-7. doi:10.1155/2011/214365
11. Milkiewicz P. Zespół Budd-Chiari - aspekty kliniczne i leczenie. *Gastroenterol Klin Postępy i Stand*. 2010;2(4):142-147.
12. Rodriguez-Castro KI, Hevia-Urrutia FJ, Sturniolo GC. Wilson's disease: A review of what we have learned. *World J Hepatol*. 2015;7(29):2859-2870. doi:10.4254/wjh.v7.i29.2859
13. Rabiee A, Hamilton JPA. Pregnancy in Wilson disease. *Hepatology*. 2018;67(4):1201-1203. doi:10.1002/hep.29619
14. Walcott WO, Derick DE, Jolley JJ, et al. Successful pregnancy in a liver transplant patient. *Am J Obstet Gynecol*. 1978;132(3):340-341.

doi:10.1016/0002-9378(78)90906-7

15. Pařízek A, Dušková M, Vítek L, et al. The role of steroid hormones in the development of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Physiol Res*. 2015;64:S203-S209.
16. Milkiewicz P. Cholestaza ciążowa - wybrane aspekty. *Gastroenterol Klin Postępy i Stand*. 2010;2(1):10-13.
17. Püsl T, Beuers U. Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *Orphanet J Rare Dis*. 2007;2(26). doi:10.1186/1750-1172-2-26
18. Diken Z, Usta IM, Nassar AH. A clinical approach to intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Am J Perinatol*. 2014;31(1):1-8. doi:10.1055/s-0033-1333673
19. Gonzalez MC, Reyes H, Arrese M, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy in twin pregnancies. *J Hepatol*. 1989;9(1):84-90. doi:10.1016/0168-8278(89)90079-2
20. Bolukbas FF, Bolukbas C, Balaban HY, et al. Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy: Spontaneous vs in vitro Fertilization. *Euroasian J Hepato-Gastroenterology*. 2017;7(2):126-129. doi:10.5005/jp-journals-10018-1232
21. Ozkan S, Ceylan Y, Ozkan OV, Yildirim S. Review of a challenging clinical issue: Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *World J Gastroenterol*. 2015;21(23):7134-7141. doi:10.3748/wjg.v21.i23.7134
22. Locatelli A, Roncaglia N, Arreghini A, et al. Hepatitis C virus infection is associated with a higher incidence of cholestasis of pregnancy. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 1999;106(5):498-500. doi:10.1111/j.1471-0528.1999.tb08305.x
23. Reyes H, Zapata R, Hern I, Sandoval L, Silva JJ. Is a Leaky Gut Involved in the Pathogenesis of Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy? *Hepatology*. 2006;43:715-722. doi:10.1002/hep.21099
24. Glantz A. Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy: Amelioration of Pruritus by UDCA Is Associated with Decreased Progesterone Disulphates in Urine. *Hepatology*. 2008;47:544-551. doi:10.1002/hep.21987
25. Reyes H. Bile acids and progesterone metabolites in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Ann Med*. 2000;32:94-106. doi:10.3109/07853890009011758
26. Reyes H, Báez ME, González MC, et al. Selenium, zinc and copper plasma levels in intrahepatic cholestasis of pregnancy, in normal pregnancies and in healthy individuals, in Chile. *J Hepatol*. 2000;32(4):542-549. doi:10.1016/s0168-8278(00)80214-7

27. Kauppila, A; Korpela H. Low serum selenium concentration and glutathione peroxidase activity in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987;294:150-152. doi:10.1136/bmj.294.6565.150
28. Ozler A, Ucmak D, Evsen MS, et al. Immune mechanisms and the role of oxidative stress in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Cent Eur J Immunol*. 2014;39(2):198-202. doi:10.5114/ceji.2014.43723
29. Stulic M, Culafic D, Boricic I, et al. Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy: A Case Study of the Rare Onset in the First Trimester. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(8). doi:10.3390/medicina55080454
30. Menżyk T, Bator M, Derra A, Kierach R, Kukla M. The role of metabolic disorders in the pathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Clin Exp Hepatol*. 2018;4(4):217-223. doi:10.5114/ceh.2018.80122
31. Rutkowska, M; Iskra M. Historia badań nad wpływem stresu oksydacyjnego na modyfikację białek. *Now Lek*. 2007;76(1):70-72.
32. Ognik K, Cholewińska E. Biomarkery wykorzystywane w ocenie oksydacyjnych uszkodzeń białek. *Kosmos*. 2018;67(2):347-359.
33. Karolkiewicz J. Wpływ stresu oksydacyjnego na strukturę i funkcję komórek oraz konsekwencje wynikające z uszkodzeń wolnorodnikowych — związek z procesami starzenia. *Gerontol Pol*. 2011;19(2):59-67.
34. Czajka A. Wolne rodniki tlenowe a mechanizmy obronne organizmu. *Now Lek*. 2006;75(6):582-586.
35. Jopkiewicz S. Stres oksydacyjny Część I . Stres oksydacyjny jako czynnik rozwoju chorób cywilizacyjnych. *Med Środowiskowa*. 2018;21(2):48-52. doi:10.19243/2018207
36. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
37. Chen C-H, Chern C-L, Lin C-C, et al. Involvement of reactive oxygen species, but not mitochondrial permeability transition in the apoptotic induction of human SK-Hep-1 hepatoma cells by shikonin. *Planta Med*. 2003;69(12):1119-1124. doi:10.1055/s-2003-45193
38. Bryk D, Olejarz W, Zapolska-Downar D. The role of oxidative stress and NADPH oxidase in the pathogenesis of atherosclerosis. *Postepy Hig Med Dosw*. 2017;71:57-68. doi:10.5604/17322693.1229823

39. Matyska-Piekarska E, Łuszczewski A, Łacki J, Wawer I. Rola stresu oksydacyjnego w etiopatogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów. *Postepy Hig Med Dosw.* 2006;60:617-623.
40. Świdarska-Kołacz, G; Kumański, K; Parka B. Alkohol a stres oksydacyjny. *Kosmos.* 2012;61:93-103.
41. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood.* 1998;92(9):3007-3017.
42. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95. doi:10.1152/physrev.00018.2001
43. Ray G, Husain SA. Oxidants, antioxidants and carcinogenesis. *Indian J Exp Biol.* 2002;40(11):1213-1232.
44. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:97-112. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000525
45. Noor R, Mittal S, Iqbal J. Superoxide dismutase--applications and relevance to human diseases. *Med Sci Monit.* 2002;8(9):RA210-5.
46. Ścibior D, Czczot H. Katalaza-budowa, właściwości, funkcje. Catalase: structure, properties, functions. *Postep Hig Med Dosw.* 2006;60:170-180.
47. Zabłocka A, Janusz M. Dwa oblicza wolnych rodników tlenowych The two faces of reactive oxygen species. *Postepy Hig Med Dosw.* 2008;62:118-124.
48. Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta.* 2003;333(1):19-39. doi:10.1016/s0009-8981(03)00200-6
49. Wu G, Fang Y-Z, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J Nutr.* 2004;134(3):489-492. doi:10.1093/jn/134.3.489
50. Rychlik B, Pułaski Ł, Sokal A, Soszyński M, Bartosz G. Transport of organic anions by multidrug resistance-associated protein in the erythrocyte. *Acta Biochim Pol.* 2000;47(3):763-772.
51. Augustyniak, A; Skrzydlewska E. Zdolności antyoksydacyjne w starzejącym się organizmie. *Postep Hig Med Dosw.* 2004;58:194-201.
52. Meucci E, Littarru C, Deli G, Luciani G, Tazza L, Littarru GP. Antioxidant status and dialysis: plasma and saliva antioxidant activity in patients with fluctuating urate levels. *Free Radic Res.* 1998;29(5):367-376. doi:10.1080/10715769800300411

53. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 2004;55:373-399.  
doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
54. Karpińska A, Gromadzka G. Oxidative stress and natural antioxidant mechanisms: the role in neurodegeneration. From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Postepy Hig Med Dosw.* 2013;67:43-53.  
doi:10.5604/17322693.1029530
55. Gutowicz M. The influence of reactive oxygen species on the central nervous system. *Postepy Hig Med Dosw.* 2011;65:104-113.  
doi:10.5604/17322693.933486
56. Jędrzejczak-Pospiech K, Błaszczuk J. The effect of lutein on the total antioxidant status in human blood. *Klin Oczna.* 2017;2017(4):220-223.  
doi:10.5114/ko.2017.76212
57. Czerska M, Mikołajewska K, Zieliński M, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Today's oxidative stress markers. *Med Pr.* 2015;66(3):393-405.
58. 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
59. Redman CWG, Sargent IL. Pre-eclampsia, the Placenta and the Maternal Systemic Inflammatory Response—A Review. *Placenta.* 2003;24:S21-S27.  
doi:10.1053/plac.2002.0930
60. Chełchowska M, Mazur J. Stężenia wisfatyny oraz markerów stresu tlenowego w surowicy krwi kobiet ciężarnych palących tytoń. *Przegl Lek.* 2016;73:761-765.
61. 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
62. Li M, Yang J, Liu K, et al. p16 promotes proliferation in cervical carcinoma cells through CDK6-HuR-IL1A axis. *J Cancer.* 2020;11:1457-1467.  
doi:10.7150/jca.35479
63. Solanki R, Agrawal N, Ansari M, Jain S. COX-2 Expression in Breast Carcinoma with Correlation to Clinicopathological Parameters. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018;19(7):1971-1975. doi:10.22034/APJCP.2018.19.7.1971
64. Sitarz R, Kolasińska-Bzoma M, Skórzewska M, Polkowski WP, Maciejewski R. Cyklooksygenaza-2 i jej rola w kancerogenezie. *Zesz Nauk Tow Doktorantów UJ Nauk Ścisłe.* 2012;5(5):19-39.

65. Stenzel A, Zuryń A, Grzanka AA, Grzanka A. Cykliny jako markery chorób nowotworowych. *Nowotwory*. 2012;62(2):115-122.
66. Tchakarska G, Sola B. The double dealing of cyclin D1. *Cell Cycle*. 2020;19(2):163-178. doi:10.1080/15384101.2019.1706903
67. Dobрева G, Chahrour M, Dautzenberg M, et al. SATB2 is a multifunctional determinant of craniofacial patterning and osteoblast differentiation. *Cell*. 2006;125(5):971-986. doi:10.1016/j.cell.2006.05.012
68. Britanova O, Akopov S, Lukyanov S, Gruss P, Tarabykin V. Novel transcription factor Satb2 interacts with matrix attachment region DNA elements in a tissue-specific manner and demonstrates cell-type-dependent expression in the developing mouse CNS. *Eur J Neurosci*. 2005;21(3):658-668. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.03897.x
69. Berg K, Schaeffer D. SATB2 as an Immunohistochemical Marker for Colorectal Adenocarcinoma. *Arch Patho Lab Medl*. 2017;141:1428-1433. doi:10.5858/arpa.2016-0243-RS
70. Zhang L, Zhao Y. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells: multiple pathways on the road. *J Cell Physiol*. 2007;211(3):590-597. doi:10.1002/jcp.21001
71. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol*. 2008;38:1654-1663. doi:10.1002/eji.200838105
72. Mailer RK. IPEX as a Consequence of Alternatively Spliced FOXP3. *Front Pediatr*. 2020;8:594375. doi:10.3389/fped.2020.594375
73. Leszczyńska-Gorzelak, B; Oleszczuk J. Rekomendacje Zespołu Ekspertów Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczące postępowania w wewnątrzwątrobowej cholestazie ciężarnych. *Ginekol Pol*. 2012;9:713-717.
74. Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe*. 1987;8(3):138-140. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3303008>.
75. Glantz A, Marschall H-U, Mattsson L-A. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates. *Hepatology*. 2004;40(2):467-474. doi:10.1002/hep.20336
76. Geenes V, Chappell LC, Seed PT, Steer PJ, Knight M, Williamson C. Association of severe intrahepatic cholestasis of pregnancy with adverse

- pregnancy outcomes: a prospective population-based case-control study. *Hepatology*. 2014;59(4):1482-1491. doi:10.1002/hep.26617
77. Martineau M, Raker C, Powrie R, Williamson C. Intrahepatic cholestasis of pregnancy is associated with an increased risk of gestational diabetes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2014;176:80-85. doi:10.1016/j.ejogrb.2013.12.037
  78. Martineau MG, Raker C, Dixon PH, et al. The Metabolic Profile of Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy Is Associated With Impaired Glucose Tolerance, Dyslipidemia, and Increased Fetal Growth. *Diabetes Care*. 2015;38(2):243-248. doi:10.2337/dc14-2143
  79. Wikström Shemer E, Marschall HU, Ludvigsson JF, Stephansson O. Intrahepatic cholestasis of pregnancy and associated adverse pregnancy and fetal outcomes: a 12-year population-based cohort study. *BJOG*. 2013;120(6):717-723. doi:10.1111/1471-0528.12174
  80. Majewska A, Godek B, Bomba-Opon D, Wielgos M. Association between intrahepatic cholestasis in pregnancy and gestational diabetes mellitus. A retrospective analysis. *Ginekol Pol*. 2019;90(8):458-463. doi:10.5603/GP.2019.0079
  81. Luo M, Tang M, Jiang F, et al. Intrahepatic cholestasis of pregnancy and associated adverse maternal and fetal outcomes: A retrospective case-control study. *Gastroenterol Res Pract*. 2021;2021. doi:10.1155/2021/6641023
  82. Wang Y, Peng X, Zhang Y, Yang Q, Xiao Y, Chen Y. Ursodeoxycholic acid improves pregnancy outcome in patients with intrahepatic cholestasis during pregnancy. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(4):e23627. doi:10.1097/MD.00000000000023627
  83. Xiao J, Li Z, Song Y, et al. Molecular Pathogenesis of Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. Abergel A, ed. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2021;2021:1-10. doi:10.1155/2021/6679322
  84. Zhou F, Gao B, Deng C, Huang G, Xu T, Wang X. Dynamic expression of corticotropin-releasing hormone and urocortin in estrogen induced-cholestasis pregnant rat. *Reprod Toxicol*. 2016;65:179-186. doi:10.1016/j.reprotox.2016.07.019
  85. Zhang L, Sun Q, Wang X, Zhou F, Gao B. Decreased maternal plasma urocortin level in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2015;46(2):263-266. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25924442>.

86. Zhou F, Zhang L, Sun Q, Wang XD. Expression of urocortin and corticotrophin-releasing hormone receptor-2 in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Placenta*. 2014;35(11):962-968. doi:10.1016/j.placenta.2014.07.019
87. Xu T, Zhou Z, Liu N, et al. Disrupted compensatory response mediated by Wolfram syndrome 1 protein and corticotrophin-releasing hormone family peptides in early-onset intrahepatic cholestasis pregnancy. *Placenta*. 2019;83:63-71. doi:10.1016/j.placenta.2019.06.378
88. He M, Liu Z, Wang X. Decreased volume of placental lobular villi vessels in patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2011;42(6):797-801. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22332545>.
89. Hu Y, Wang X, Liu S. Expression of HIF-1alpha mRNA and HIF-2alpha mRNA in placentas of pregnant women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2007;38(4):641-643. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17718430>.
90. Wei W, Hu YY. Expression of hypoxia-regulated genes and glycometabolic genes in placenta from patients with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Placenta*. 2014;35(9):732-736. doi:10.1016/j.placenta.2014.06.372
91. Wu F, Tian F-J, Lin Y. Oxidative Stress in Placenta: Health and Diseases. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1-15. doi:10.1155/2015/293271
92. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;57(5):609-613. doi:10.1046/j.1365-2265.2002.01638.x
93. Sugino N, Takiguchi S, Umekawa T, Heazell A, Caniggia I. Oxidative stress and pregnancy outcome: a workshop report. *Placenta*. 2007;28 Suppl A:S48-50. doi:10.1016/j.placenta.2007.01.013
94. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9-19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613
95. Vairetti M, Di Pasqua LG, Cagna M, Richelmi P, Ferrigno A, Berardo C. Changes in glutathione content in liver diseases: An update. *Antioxidants*. 2021;10(3):1-39. doi:10.3390/antiox10030364
96. Biesiada L, Pietrzak Z, Brocka U, Oszukowski P, Krasomski G. Markers of oxidative stress in pregnancies complicated by pregnancy induced hypertension and intrahepatic cholestasis. *Ginek Pol*. 2007;78(12):956-960.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18411919>.

97. Hu YY, Liu JC, Xing AY. Oxidative stress markers in intrahepatic cholestasis of pregnancy: A prospective controlled study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(17):3181-3186.
98. Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med*. 2016;95:27-42. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028
99. Zhou B, Wang CH, Ding RB, Chen JG, Che YH, Deng YX. The relationship between the internal oxidation reduction system and fetal distress on pregnant patients with intrahepatic cholestasis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(20):3817-3821.
100. Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxidants Redox Signal*. 2015;23(14):1144-1170. doi:10.1089/ars.2015.6317
101. Urbański K, Nowak M, Guzik TJ. Wpływ stresu oksydacyjnego na funkcjonowanie naczyń krwionośnych. *Postepy Biochem*. 2013;59(4):424-431.
102. Larson SP, Kovilam O, Agrawal DK. Immunological basis in the pathogenesis of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Expert Rev Clin Immunol*. 2016;12(1):39-48. doi:10.1586/1744666X.2016.1101344
103. Zhang R, Pan X-H, Xiao L. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) under hypoxia in placenta with intrahepatic cholestasis of pregnancy and its clinically pathological significance. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11475-11479. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26617878>.
104. Du Q, Pan Y, Zhang Y, et al. Placental gene-expression profiles of intrahepatic cholestasis of pregnancy reveal involvement of multiple molecular pathways in blood vessel formation and inflammation. *BMC Med Genomics*. 2014;7:42. doi:10.1186/1755-8794-7-42
105. Oztas E, Ozler S, Ersoy AO, et al. Placental ADAMTS-12 Levels in the Pathogenesis of Preeclampsia and Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy. *Reprod Sci*. 2016;23(4):475-481. doi:10.1177/1933719115604730
106. St-Pierre MV, Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Meier PJ. Transport of bile acids in hepatic and non-hepatic tissues. *J Exp Biol*. 2001;204(10):1673-1686. doi:10.1242/jeb.204.10.1673
107. Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function,

- and regulation. *Physiol Rev.* 2003;83(2):633-671.  
doi:10.1152/physrev.00027.2002
108. Heidari R, Niknahad H. The Role and Study of Mitochondrial Impairment and Oxidative Stress in Cholestasis. *Methods Mol Biol.* 2019;1981:117-132.  
doi:10.1007/978-1-4939-9420-5\_8
  109. Mella MT, Kohari K, Jones R, et al. Mitochondrial gene expression profiles are associated with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Placenta.* 2016;45:16-23.  
doi:10.1016/j.placenta.2016.07.002
  110. Wu W Bin, Menon R, Xu YY, et al. Downregulation of peroxiredoxin-3 by hydrophobic bile acid induces mitochondrial dysfunction and cellular senescence in human trophoblasts. *Sci Rep.* 2016;6(December):1-14. doi:10.1038/srep38946
  111. Czekalska A. Peroksydaza i ich złożona rola w procesie nowotworzenia. *Postępy Biol Komórki.* 2016;43(2):321-331.
  112. Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta.* 2002;23(1):3-19. doi:10.1053/plac.2001.0738
  113. Burdon C, Mann C, Cindrova-Davies T, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Oxidative Stress and the Induction of Cyclooxygenase Enzymes and Apoptosis in the Murine Placenta. *Placenta.* 2007;28(7):724-733.  
doi:10.1016/j.placenta.2006.12.001
  114. Brudnik U, Wojas-Pelc A, Alekseenko A. Clinical usefulness of cyclin D1 investigation in neoplastic tumors - Review of the literature. *Postep Dermatologii i Alergol.* 2007;24(1):48-51.
  115. Laphanuwat P, Likasitwatanakul P, Sittithumcharee G, et al. Cyclin D1 depletion interferes with oxidative balance and promotes cancer cell senescence. *J Cell Sci.* 2018;131(12):jcs214726. doi:10.1242/jcs.214726
  116. Vurusaner B, Poli G, Basaga H. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(1):7-18.  
doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.035
  117. Roy SK, Shrivastava A, Srivastav S, Shankar S, Srivastava RK. SATB2 is a novel biomarker and therapeutic target for cancer. *J Cell Mol Med.* 2020;24(August):11064-11069. doi:10.1111/jcmm.15755
  118. Kim CH. FOXP3 and its role in the immune system. *Adv Exp Med Biol.* 2009;665:17-29. doi:10.1007/978-1-4419-1599-3\_2

119. Hargreaves I, Heaton RA, Mantle D. Disorders of human coenzyme q10 metabolism: An overview. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18):1-13.  
doi:10.3390/ijms21186695
120. Martinefski MR, Rodriguez MR, Buontempo F, Lucangioli SE, Bianciotti LG, Tripodi VP. Coenzyme Q 10 supplementation: A potential therapeutic option for the treatment of intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Eur J Pharmacol.* 2020;882:173270. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173270