

Kolegium Nauk Medycznych

Uniwersytet Rzeszowski



Poród przedwczesny - a ekspresja receptorów kanabinoidowych w łożyskach

lek. Stepan Feduniw

Rozprawa na stopień naukowy

doktora nauk medycznych w zakresie medycyny

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Grzegorz Raba

Rzeszów 2020

Podziękowania

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania
mojemu Promotorowi Panu Profesorowi Grzegorzowi Rabie
bez którego niniejsza rozprawa nie mogłaby powstać,
za pomoc merytoryczną, motywację i wsparcie w rozwoju naukowym.*

*Chciałbym również podziękować rodzinie oraz przyjaciołom
za wsparcie, motywację i niegasnącą wiarę we mnie.*

1 SPIS TREŚCI

2	Słowa kluczowe	5
3	Key words	5
4	Wykaz skrótów	6
5	Wstęp	11
5.1	Definicje.....	11
5.2	Epidemiologia porodu przedwczesnego	13
5.3	Czynniki ryzyka porodu przedwczesnego	15
5.4	Patogeneza porodu przedwczesnego.....	20
5.4.1	Rola procesu zapalnego w patogenezie porodu przedwczesnego	22
5.5	Konsekwencje porodu przedwczesnego	25
	• Zaburzenia funkcjonowania układu oddechowego.....	25
	• Zaburzenia w obrębie układu sercowo-naczyniowego	29
	• Hipotermia	30
	• Zaburzenia gospodarki węglowodanowej.....	31
	• Martwicze zapalenie jelit (NEC)	31
	• Zakażenie układu krwionośnego (sepsa)	32
	• Retinopatia wcześniaków (ROP)	32
	• Krwawienia dokomorowe (IVH)	33
	• Leukomalacja okołokomorowa (PVL)	34
	• Mózgowe porażenie dziecięce (CP).....	34
	• Śmierć okołoporodową noworodków	35
5.6	Rola systemu endokannabinoidowego w organizmie ludzkim.....	37
6	Cel pracy i uzasadnienie podjęcia tematu.....	40
7	Materiał.....	40

8	Metodyka	42
8.1	Izolacja RNA	45
8.2	Odwrotna transkrypcja (RT)	46
8.3	Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (Real - Time PCR)	46
9	Wyniki	49
9.1	Charakterystyka badanej populacji.	49
9.2	Ekspresja genów	62
9.3	Analiza korelacji	66
10	Dyskusja	74
11	Wnioski.....	81
12	Piśmiennictwo	82
13	Spis Tabel i Rycin.....	106
14	Streszczenie	108
15	Abstract.....	111

2 SŁOWA KLUCZOWE:

Receptor kanabinoidowy; system endokanabinoidowy; poród przedwczesny;
CB1; CB1a; CB2.

3 KEY WORDS:

Cannabinoid receptor; endocannabinoid system; preterm delivery;
CB1; CB1a; CB2.

4 WYKAZ SKRÓTÓW (W KOLEJNOŚCI ALFABETYCZNEJ):

2-AG - 2-arachnoidylo glicerol

ACTB - (ang. beta-actin) β -aktyna

ACTH - (ang. adrenocorticotrophic hormone) hormon adrenokortykotropowy

AEA - anandamid / arachidynylo etanoamid

AspAT - (ang. aspartate transaminase) aminotransferaza asparaginianowa

BDP - (ang. bronchopulmonary dysplasia) dysplazja oskrzelowo-płucna

BMI - indeks masy ciała [kg/m^2]

CB1 - selektywny receptor kanabinoidowy 1

CB1a - selektywny receptor kanabinoidowy 1 α (alfa)

CB2 - selektywny receptor kanabinoidowy 2

CCL3 i CCL4 / MIP-1 - (ang.. macrophage inflammatory protein) białko zapalne makrofagów

CCL5 / RANTES - (ang. C-C motif chemokine ligand 5 / regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted)

CC - poród drogą cięcia cesarskiego

cDNA - komplementarny DNA

CFU - (ang. colony-forming unit) jednostek tworzących kolonie

CLD - (ang. chronic lung disease of infancy) przewlekłą chorobą płuc noworodków

CNR1 - gen dla selektywnego receptora kanabinoidowego 1

CNR1a - gen dla selektywnego receptora kanabinoidowego 1 α (alfa)

CNR2 - gen dla selektywnego receptora kanabinoidowego 2

CP - (ang. cerebral palsy) mózgowe porażenie dziecięce

CRH - (ang. corticotropin-releasing hormone) kortykoliberyna

CRHBP - (ang. corticotropin-releasing factor-binding protein) białko wiążące CRH

CRP - (ang. C-reactive protein) białko C-reaktywne

Cp - poziom ekspresji

DBP - (ang. diastolic blood pressure) rozkurczowe ciśnienie tętnicze [mmHg]

DHEA - (ang. dehydroepiandrosterone) dehydroepiandrosteron

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy

E1 - estron

E2 - estradiol

E3 - estriol

ECS - (ang. endocannabinoid system) system endokanabinoidowy

ELBW - (ang. extremely low birth weight) noworodki o skrajnie niskiej masie urodzeniowej (<1000g)

ER-α - receptor estrogenowy alfa

FHR - (ang. fetal heart rate) częstość pracy serca płodu [uderzeń/min]

FKBP51 - białko wiążące FK506

GAPDH - (ang. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

GDM - (ang. gestational diabetes melitus) cukrzyca ciążowa

GPCR - (ang. G protein-coupled receptor) receptory sprzężone z białkami G

Hct - hematokryt [%]

Hgb - hemoglobina [mg/dl]

HPA - (ang. hypothalamic–pituitary–adrenal axis) Oś podwzgórze-przysadka-nadnercza

HR - (ang. heart rate) częstość pracy serca [uderzeń/min]

IL-1 - interleukina 1

IL-4 - interleukina 4

IL-6 - interleukina 6

IL-8 - interleukina 8

FGR - (fetal growth restriction) ograniczenie wzrostu płodu

IVF - (ang. in vitro fertilisation) zapłodnienie zewnątrzustrojowe

IVH - (ang. intraventricular hemorrhage) krwawienia dokomorowe

kg/m² - kilogram na metr kwadrat

KOH - zasada potasowa

LBW - (ang. low birth weight) noworodki o niskiej masie urodzeniowej (<2500 g)

LDH - (ang. lactate dehydrogenase) dehydrogenaza mleczanowa

LPS - lipopolisacharyd

MAP - (ang. mean arterial pressure) średnie ciśnienie tętnicze [mmHg]

MIAC - (ang. microbial invasion of the amniotic cavity) bakteryjną infekcję płynu owodniowego

mmHg - milimetry słupa rtęci

MRI - (ang. magnetic resonance imaging) obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego

mRNA - informacyjny RNA / matrycowy RNA

µg - mikro gram

µl - mikro liter

µM - mikro mol na 1 dm³ (decymetr sześcienny)

NEC - (ang. necrotizing enterocolitis) martwicze zapalenie jelit

°C - stopnie Celsjusza

OGTT - (ang. oral glucose tolerance test) test doustnego obciążenia glukozą

OOZN - ostre odmiedniczkowe zapalenie nerek

OR - (ang. odds ratio) iloraz szans

Oś HPA - (ang. hypothalamic-pituitary-adrenal axis) oś
podwzgórze-przysadka-nadnercza

OUN - ośrodkowy układ nerwowy

p - poziom istotności statystycznej

PDA - (ang. patent ductus arteriosus) przetrwały przewód tętniczy

PE - preeklampsja / stan przedrzucawkowy

PH - (ang. pregnancy hypertension) nadciśnienie tętnicze w ciąży

PPROM - (ang. preterm premature rupture of membrane) przedwczesne odpłynięcie płynu owodniowego

PSN - poród siłami i drogami natury

PTSD - (ang. posttraumatic stress disorder) zespół stresu pourazowego

PVL - (ang. periventricular leukomalacia) leukomalacja okołokomorowa

qRT-PCR - reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją

RDS - (ang. respiratory distress syndrome) zespół zaburzeń oddychania noworodka

Real-Time PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

REF - wartość referencyjna

RNA - kwas rybonukleinowy

ROP - (ang. retinopathy of prematurity) retinopatia wcześniaków

RT - odwrotna transkrypcja

SBP - (ang. systolic blood pressure) skurczowe ciśnienie tętnicze [mmHg]

SD - (ang. standard deviation) odchylenie standardowe

Skala pH - (ang. power of hydrogen) ilościowa skala kwasowości i zasadowości roztworów

THC - tetrahydrokanabinol

TLR4 - (ang. toll-like receptor 4)

TNF α - (ang. tumor necrosing factor alfa) czynnik martwicy nowotworów

UDG - glikozydaza DNA uracylu

USG - ultrasonografia

VLBW - (ang. very low birth weight) noworodki o bardzo niskiej masie urodzeniowej (<1500g)

WBC - (ang. white blood cells) liczba białych krwinek we krwi

WHO - (ang. world health organization) światowa organizacja zdrowia

zespół HELLP - zespół chorobowy składający się na niedokrwistość hemolityczną, podwyższenie enzymów wątrobowych i małopłytkowość

ZUM - zakażenie układu moczowego

5 WSTĘP

Problematyka porodu przedwczesnego dotyczy na szczęście mniejszości porodów na całym świecie. Niemniej jednak wystąpienie omawianej patologii wiąże się ze znacznymi komplikacjami ze strony nowonarodzonego dziecka i jest główną przyczyną przedłużonej hospitalizacji noworodków, ich pobytu na oddziale intensywnej terapii noworodkowej, a także przede wszystkim śmiertelności nowonarodzonych dzieci. Urodzenie się dziecka przed odpowiednim przygotowaniem nowopowstającego organizmu do środowiska pozamacicznego, różniące się znacznie od tego, do którego dotychczas płód był przystosowany jest dla tego człowieka dużym stresem i znacznym obciążeniem wszystkich nie w pełni rozwiniętych układów. Pomimo medycznego aspektu, jakim jest wystąpienie licznych powikłań wcześniactwa, ważny wpływ na funkcjonowanie noworodka ma także aspekt psychospołeczny. Powszechnie wiadome jest, iż narodziny dziecka i okres połogu jest wyjątkowym wydarzeniem w życiu każdego rodzica i dziecka, umożliwiające wzajemne poznanie się i nawiązanie więzi, czemu towarzyszą liczne mechanizmy neurohormonalne. Zaburzenie tego procesu w wyniku chociażby konieczności rozdzielenia rodzica z dzieckiem, jak i wyjątkowy stres o zdrowie noworodka może mieć implikacje na całe życie zarówno rodzica jak i dziecka.

5.1 DEFINICJE

Noworodek jest nazywany wcześniakiem z powodu porodu mającego miejsce przed ukończeniem 37 tygodnia ciąży o masie mniejszej niż 2500 g¹⁻⁴. Definicja ta nie jest doskonała i ulegała zmianom na przestrzeni lat. Kryterium wieku ciążowego nie jest najlepszym sposobem odpowiedniego ocenienia noworodka przedwcześnie urodzonego ze względu na trudności ustalenia czasu trwania ciąży wynikającego z szeregu czynników. Do takich czynników zaliczamy trudności w określeniu daty poczęcia, złego dostępu do badań ultrasonograficznych w części regionów świata, a także trudnościami wynikającymi z uwarunkowań kulturowych i społecznych⁴. Z drugiej strony kryterium wagowe nie jest także idealnym narzędziem diagnostycznym ze względu na zmienność osobniczą masy ciała uwarunkowaną wieloczynnikowo i ze względu na możliwość wystąpienia zarówno hipertrofii, makrosomii,

jak i ograniczenia wzrostu płodu. Z kolei poród przed ukończeniem 22. tygodnia ciąży, bądź wydobywanie płodu o masie nie przekraczającej 500 g nazywany jest według WHO poronieniem^{1,4}, aczkolwiek wiele doniesień z krajów anglojęzycznych stawia granicę pomiędzy poronieniem a obumarciem wewnątrzmacicznym płodu na 24. tygodniu ciąży⁵⁻⁷. Kontrowersje te wynikają prawdopodobnie z niskiej przeżywalności noworodków urodzonych z tak wczesnych ciąż. Pomimo coraz większego dostępu do sprzętu umożliwiającego wspomaganie oddechu, a także zapewniającego lepszą opiekę poporodową, odsetek powikłań, w tym śmiertelności noworodków nie uległ znaczącym zmianom od dłuższego czasu. Wcześniactwo można podzielić ze względu na ciężkość powikłań z nim związanym, wynikających z długości trwania ciąży na:

- późne wcześniactwo (doszło do urodzenia dziecka po ukończeniu 34 tygodnia ciąży, ale przed ukończeniem 36. tygodnia i 6. dnia ciąży),
- umiarkowane wcześniactwo (poród odbył się pomiędzy 32. tygodniem ciąży, a 33. tygodniem i 6 dniem ciąży),
- skrajne wcześniactwo (poród przed 32. tygodniem ciąży)
- bardzo skrajne wcześniactwo (poród przed 28. tygodniem ciąży)

Chorobowość i przede wszystkim umieralność w obrębie późnych i umiarkowanych wcześniaków w krajach rozwiniętych z odpowiednim dostępem do świadczeń medycznych wynosi mniej niż 1%, co zostało omówione w dalszej części pracy.

Dzieci urodzone przedwcześnie można także podzielić ze względu na wartość urodzeniowej masy ciała na noworodki:

- o niskiej masie urodzeniowej (LBW), gdy masa ciała noworodka była mniejsza niż 2500 g;
- o bardzo niskiej masie urodzeniowej (VLBW), gdy masa ciała noworodka była mniejsza niż 1500 g;
- o skrajnie niskiej masie urodzeniowej (ELBW), gdy masa ciała noworodka była mniejsza niż 1000 g.

Z klinicznego punktu widzenia ważnym aspektem w codziennej praktyce lekarskiej jest podział pacjentek na takie u których rozpoznajemy zagrażający poród przedwczesny, poród przedwczesny w toku i dokonany poród przedwczesny.

Poród przedwczesny zagrażający stanowi początkowe stadium porodu i rozpoznaje się u pacjentek prezentujących następujące objawy^{4,8}:

- obecność czynności skurczowej mięśnia macicy z częstością około 4-7 skurczów na godzinę,
- stan szyjki poniżej 10 punktów w skali Bishopa (skali oceniającej przygotowanie szyjki macicy do przejścia przez nią główki dziecka), czyli rozwarcie szyjki poniżej 3 cm i skrócenie szyjki poniżej 60%, mierzone w USG.

Z kolei poród przedwczesny w toku rozpoznaje się u pacjentek przy takich objawach, jak^{4,8}:

- obecność regularnej czynności skurczowej mięśnia macicy z częstością ponad 8 skurczów na godzinę lub gdy przerwa pomiędzy skurczami wynosi krócej niż 10 minut
- stan szyjki powyżej 10 w skali Bishopa, czyli rozwarcie szyjki powyżej 3 cm i skrócenie o ponad 80%.

Poród przedwczesny dokonany zostaje zdiagnozowany, po wydobyciu noworodka z jamy macicy.

5.2 EPIDEMIOLOGIA PORODU PRZEDWCZESNEGO

Poród przedwczesny występuje stosunkowo rzadko w populacji pacjentek rodzących. Średnia częstość występowania omawianej patologii różni się nieznacznie w obrębie poszczególnych populacji i przyjmuje wartość pomiędzy 5%, a 35% wśród wszystkich pacjentek rodzących². Zdecydowany wpływ na częstość występowania tej patologii wydaje się mieć stopień rozwinięcia danego państwa, a co za tym idzie stopień zaawansowania medycznej opieki. Kraje rozwijające się zdecydowanie częściej mają do czynienia z omawianym problemem w odróżnieniu od krajów rozwiniętych. Dodatkowo w krajach rozwijających się dostęp

do nowoczesnych metod wspomagania oddechu noworodków i innych procedur, w tym do inkubatorów, jest znacznie ograniczony, co przekłada się na cięższy przebieg powikłań okołoporodowych i większą śmiertelność dzieci⁴. Co ciekawe częstość porodu przedwczesnego w Europie jest niższa w porównaniu do USA i wynosi około 5-9% w Europie, 12-14% w Stanach Zjednoczonych i około 18% w Afryce i Azji¹. Uwzględniając przybliżoną liczbę porodów na świecie w ciągu roku i średni odsetek wcześniactwa wynosi około 11%, co się przekłada na około 15 milionów (zakres od 12 do 18 milionów) dzieci przedwcześnie urodzonych rocznie. Około 85% z nich rodzi się pomiędzy 32., a 36. tygodniem ciąży, a 15% przychodzi na świat przed ukończeniem 32. tygodnia ciąży i wymaga intensywnej opieki medycznej^{3,9,10}. Według danych Głównego Urzędu Statystycznego w Polsce, w roku 2017 odsetek porodów przedwczesnych wynosił 8%¹¹.

Zróznicowane występowanie porodu przedwczesnego może wynikać ze sposobu odżywiania, stosowania używek, warunków pracy, aktywności fizycznej, przy czym wpływ czynników socjalnych i ekonomicznych wydaje się być najbardziej znaczący w obrębie państw rozwiniętych⁴.

Obserwowany wzrost częstości występowania porodu przedwczesnego w obrębie państw wysokorozwiniętych ma związek z coraz później podejmowaną decyzją o założeniu rodziny, a co za tym idzie kobiety w momencie poczęcia są starsze^{1,11}. Wraz z naturalnym procesem starzenia rośnie częstość występowania ciąż mnogich i większe ryzyko trudności podczas zapłodnienia. W związku z tym liczba zapłodnień pozaustrojowych (IVF) stale wzrasta i wynosi 1,3% wszystkich ciąż w Stanach Zjednoczonych¹², natomiast największa ilość ciąż powstałych przy pomocy technik wspomaganego rozrodu pochodzi z Grecji, gdzie około 6% wszystkich ciąż powstaje w wyniku IVF¹³. Nie jest także niespodzianką informacja, że w wyniku prawie wszystkich stosowanych technik wspomaganego rozrodu odsetek ciąż mnogich w porównaniu do ciąż pochodzących od matek zapłodnionych w warunkach naturalnych jest zdecydowanie większy i wynosi od 15% do 30% ciąż pochodzących z IVF w porównaniu do 1-2% ciąż mnogich w populacji ogólnej^{14,15}.

Zaobserwowany w ostatnich latach duży rozwój intensywnej terapii neonatologicznej, która jest sporym obciążeniem finansowym, wynikającym z konieczności inwestowania w nowoczesną specjalistyczną aparaturę oraz leki przekłada się na przeżywalność coraz większej ilości dzieci, pochodzących z coraz mniej

zaawansowanych ciąży. Nadal jednak są obserwowane lepsze wyniki opieki noworodkowej w krajach Europy Zachodniej i USA, gdzie widoczny jest bardziej progresywny rozwój opieki okołoporodowej nad noworodkami urodzonymi przedwcześnie w postaci większej przeżywalności dzieci przedwcześnie urodzonych⁴. Pomimo lepszego dofinansowania opieki zdrowotnej wpływ na lepsze wyniki opieki okołoporodowej noworodków może mieć odmienne diagnozowanie poronienia i porodu przedwczesnego wśród państw Zachodniej Europy i Polski⁵⁻⁷.

5.3 CZYNNIKI RYZYKA PORODU PRZEDWCZESNEGO

Od początku istnienia położnictwa zastanawiano się nad istnieniem czynników powodujących szczególne narażenie pacjentek na wystąpienie porodu przedwczesnego. Pomimo wielu faktów i opisów mechanizmów powstania porodu przedwczesnego, nie opisano w literaturze jednoznacznej przyczyny omawianej patologii. Coraz więcej przesłanek dotyczy czynników genetycznych w mechanizmie porodu przedwczesnego¹⁶. Określenie czynników ryzyka porodu przedwczesnego umożliwia wyodrębnienie pacjentek najbardziej narażonych na przedwcześnie urodzenie dziecka. Wzmoczony nadzór specjalistyczny nad pacjentkami z grupy dużego ryzyka daje możliwość wdrożenia odpowiedniej interwencji, umożliwiającej jak najdłuższe dojrzewanie wewnątrzmaciczne płodu i poród w najbardziej odpowiednim momencie w ośrodku największej referencyjności z dostępem do zaawansowanego sprzętu, umożliwiającego odpowiednie leczenie licznych powikłań wcześniactwa. Czynniki ryzyka porodu przedwczesnego można podzielić na:

- **Czynniki związane z wywiadem położniczym i ciążą:**

- **Obciążony wywiad położniczy.**

Według licznych doniesień w literaturze jednorazowy poród przedwczesny w wywiadzie znacznie zwiększa występowanie porodu przedwczesnego w każdej kolejnej ciąży¹⁷⁻²¹. W dużym, wieloośrodkowym badaniu przeprowadzonym na populacji pacjentek z Nowej Zelandii, Szwecji i Słowenii udowodnione zostało od 4.5 do 7.5 razy większe ryzyko porodu przedwczesnego w populacji pacjentek obciążonych historią porodu przedwczesnego²². Przebyte poronienie szczególnie w zaawansowanej ciąży, bądź ciąża obumarła w wywiadzie

(która może być traktowana jako przedwczesne urodzenie niezdolnego do życia płodu), występowały zdecydowanie częściej wśród pacjentek rodzących przedwcześnie w kolejnej ciąży²³.

– **Krótki czas pomiędzy ciążami.**

Pomimo braku informacji w wywiadzie porodów przedwczesnych okres mniej niż 6 miesięcy pomiędzy ciążami zdecydowanie zwiększa ryzyko porodu przedwczesnego w kolejnej ciąży²⁴.

– **Choroby przewlekłe.**

Obecność takich schorzeń jak przewlekłe nadciśnienie tętnicze, nadciśnienie tętnicze w ciąży, choroby autoimmunologiczne, w tym przede wszystkim niedoczynność tarczycy, niewydolność nerek, cukrzyca rozpoznana w ciąży, cukrzyca ciężarnych i niezależnie występująca od omawianych chorób niedokrwistość predysponują do wystąpienia porodu przedwczesnego¹⁶. Prawdopodobnym patomechanizmem omawianego zjawiska jest uszkodzenie naczyń krwionośnych lub nieodpowiednie zaopatrzenie płodu w substancje odżywcze, tlen, nasilający się w miarę trwania ciąży. Pogorszenie dobrostanu płodu wywołuje poród przedwczesny, a prawdopodobny patomechanizm tego zjawiska został opisany w dalszej części pracy.

– **Krwawienie w trakcie ciąży.**

Coraz więcej doniesień w literaturze wskazuje, że obecność krwawienia na początkowych etapach ciąży wpływa na zwiększone ryzyko porodu przedwczesnego^{25,26}. Na patomechanizm tego zjawiska wydaje się również w dużym stopniu mieć wpływ działanie cytokin i gorsze funkcjonowanie łożyska.

– **Łożysko przodujące.**

Niewątpliwie jest ono czynnikiem ryzyka porodu przedwczesnego, głównie ze względu na często występujące krwawienia w trakcie trwania ciąży i konieczności z tego względu wcześniejszego zakończenia ciąży²⁷. W wyniku badania poporodowego łożysk, stwierdzone zostały zmiany patologiczne związane ze złym funkcjonowaniem łożyska²⁸. Odkrycie to może mieć związek

z nieprawidłowym funkcjonowaniem łożyska w takich ciążach i związany z tym niewystarczające dostarczanie substancji odżywczych dla płodu i jego niedotlenienie, stanowiących istotną rolę w patomechanizmie porodu przedwczesnego.

– **Infekcje.**

Udowodnionym jest fakt występowania stanu zapalnego występującego wewnątrzmacicznie²⁹, szczególnie spowodowanego zakażeniem mikroorganizmami, na zwiększone ryzyko wystąpienia porodu przedwczesnego. Dodatkowo nieprawidłowa flora bakteryjna, bądź toczący się proces zapalny w okolicach narządu rodowego (w obrębie układu moczowego, bądź pod postacią bakteryjnej waginozy pochwy^{30,31}) predysponuje do wystąpienia porodu przedwczesnego. Również uogólniony stan zapalny, związany z produkcją odpowiednich cytokin prozapalnych predysponuje do porodu przedwczesnego¹⁷.

– **FGR i wady wrodzone płodu.**

Ograniczenie wzrostania płodu (FGR) ma patogenezę wieloczynnikową, do których należą wady genetyczne i anatomiczne płodu, niewydolność łożyska i choroby matki. Wymienione czynniki niezależne od obności FGR, predysponują do wyzwolenia stresu u noworodka i pobudzenia osi HPA, co prowadzi do porodu przedwczesnego¹⁶.

– **Ciąża wielopłodowa i wielowodzie.**

Czynniki te wpływają na nieprawidłowe rozciągnięcie się macicy, co przyczynia się do wystąpienia porodu przedwczesnego. Częstość występowania porodów przedwczesnych jest proporcjonalna do ilości płodów w obrębie macicy, jak i ilości płynu owodniowego nagromadzonego w ciążarnej macicy¹⁶. Oprócz tego w tracie ciąż wielopłodowych na wystąpienie porodu przedwczesnego może mieć wpływ większe stężenie hormonów (relaksyny i estrogenów) we krwi ciążarnej³².

– **Wady wrodzone macicy i niewydolność cieśniowo-szyjkowa.**

Te czynniki również mają wpływ na nieprawidłowe napięcie mięśnia macicy, predysponującego do wystąpienia porodu przedwczesnego¹⁶.

- **Czynniki socjalne:**

- **Wiek ciężarnej.**

Matki będące zarówno w bardzo młodym wieku (< 20 r.ż.), jak i te w bardziej zaawansowanym (> 35 lat), należą do grupy ryzyka porodu przedwczesnego^{33–35}. Młody wiek ciężarnej jest związany często z częstszym stosowaniem używek w trakcie ciąży i niskim statusem socjo-ekonomicznym, które są niezależnymi od wieku czynnikami ryzyka porodu przedwczesnego. Zaawansowany wiek ciężarnej jest związany często z współwystępowaniem chorób przewlekłych, w tym nadwagi i otyłości mających znaczny wpływ na gorsze funkcjonowanie naczyń krwionośnych w obrębie łożyska i związane z tym częstsze występowanie porodu przedwczesnego^{33–35}.

- **Niski status socjo-ekonomiczny.**

Pacjentki mające mniejsze dochody, niewystarczające na codzienne godne funkcjonowanie, częściej cierpią na niedożywienie i są zmuszone ciężko pracować, często pod presją stresu i wykonując nieraz ciężką pracę fizyczną³⁶. Dodatkowym czynnikiem mającym wpływ na ryzyko porodu przedwczesnego wśród omawianej grupy osób jest stres i zamartwianie się o dobro nienarodzonego potomstwa. Osoby, których status socjalny i ekonomiczny jest określany jako niski często też są niewykształcone, co nie daje im możliwości zmiany istniejącej sytuacji. Ponadto brak wsparcia i obecność przemocy wobec kobiet ciężarnych w danej grupie są dużo częstsze w porównaniu do populacji ogólnej³⁷. Wszystkie wymienione czynniki sprawiają, iż ciężarne są zmuszone do funkcjonowania w sytuacjach o dużo większym natężeniu stresu w porównaniu do populacji ogólnej, predysponującego do wystąpienia porodu przedwczesnego.

- **Stosowanie używek.**

Zarówno spożywanie alkoholu, palenie tytoniu, jak i przyjmowanie innych nielegalnych środków odurzających (narkotyków czy dopalaczy) wiąże się z częstszym wystąpieniem porodu

przedwczesnego. Prawdopodobnie substancje te powodują zaburzenia przepływu krwi przez krążenie płodowe, wyzwalając tym samym stres u płodu, prowadzącą do kaskady reakcji organizmu, skutkiem których jest poród przedwczesny. Ponadto wymienione typy substancji mogą mieć uszkadzający wpływ na płód, powodując powstanie w nim zmian strukturalnych lub/i biochemicznych. Kobiety spożywające wymienione używki w trakcie ciąży rodziły przedwcześnie w 25-65% przypadków³⁸.

- **Czynniki środowiskowe:**

- **Czynniki chemiczne.**

Substancje chemiczne obecne w środowisku mają wpływ na rozwijający się wewnątrzmacicznie płód. W doniesieniach z literatury istnieją wystarczające dowody by określić, iż przebywanie w środowisku skażonym związkami siarki, fluoru i licznymi metalami ciężkimi predysponuje do wcześniejszego ukończenia ciąży^{39,40}.

- **Czynniki fizyczne**, wśród których należy wymienić przede wszystkim narażenie na promieniowanie jonizujące, promieniowanie termiczne, promieniowanie radioaktywne, obecność oddziaływań elektromagnetycznych, hałas i wibracje. Wymienione czynniki wpływają znacząco na zwiększenie częstości występowania porodu przedwczesnego^{41,42}. Brak wysiłku fizycznego w ciąży, ale także ciężka fizyczna praca wiążą się ze zwiększonym ryzykiem porodu przedwczesnego^{43,44}.

Lista substancji i czynników fizycznych obecnych w otaczającym środowisku mogących mieć wpływ na wystąpienie porodu przedwczesnego wydaje się być znacznie dłuższa, lecz z powodów etycznych testowanie potencjalnie szkodliwych czynników w trakcie trwania ciąży jest niemożliwe do wykonania. Istotnym aspektem dotyczącym substancji wpływających na wystąpienie porodu przedwczesnego wydaje się mieć wpływ coraz to większe zanieczyszczenie powietrza występujące na uprzemysłowionych terenach⁴⁵.

- **Czynniki psychogenne:**

Zaburzenia nastroju ciężarnej.

W licznych doniesieniach naukowych wystąpienie depresji, lęku, bądź zespołu stresu pourazowego (PTSD) wiązało się z komplikacjami u dojrzewającego płodu, wśród których największe znaczenie przypisuje się zwiększonej częstości występowania porodu przedwczesnego^{46–50}. Wśród najważniejszych czynników wpływających na wystąpienie zaburzeń nastroju w trakcie ciąży jest obecność depresji, bądź innych schorzeń psychicznych przed ciążą, brak wsparcia partnera, bądź rodziny, a także trudności finansowe⁵¹. Dodatkowo wystąpienie obciążonego wywiadu położniczego w postaci chorób w trakcie ciąży, zagrożenia porodem przedwczesnym w poprzedniej ciąży, bądź poród przedwczesny w wywiadzie, wiąże się z lękiem przed ponownym urodzeniem płodu przed terminem i związanymi z tym komplikacjami^{52–54}. Ponadto czynniki ryzyka depresji niezależne od ciąży predysponują do wystąpienia depresji w trakcie ciąży^{52–54}. W związku z istotnie częstszym występowaniem depresji w trakcie ciąży w porównaniu do populacji nieciężarnych kobiet i wpływie zaburzeń nastroju na rozwijający się płód Minister Zdrowia wprowadził w swoim rozporządzeniu konieczność przesiewowej oceny wszystkich ciężarnych na obecność depresji w trakcie ciąży⁵⁵.

5.4 PATOGENEZA PORODU PRZEDWCZESNEGO

Wystąpienie porodu przedwczesnego jest skomplikowanych procesem mającym znaczny wpływ na chorobowość noworodków. Patogeneza urodzenia się dziecka przed 37. tygodniem ciąży jest wieloczynnikowym procesem, wśród których należy wymienić wpływ:

- Przedwczesnej aktywacji matczynej lub płodowej osi podwzgórze-przysadka-nadnercza (HPA) związanej ze sytuacją stresową dla organizmu;
- Przedwczesnego oddzielenia się łożyska prawidłowo usadowionego lub krwotoku doczesowego;
- Patologicznego rozciągnięcia mięśnia macicy i konsekwentnie do tego przedwczesnego pęknięcia pęcherza płodowego;

- Rozwinięcia się reakcji zapalnej w obrębie połączenia maczyno-łożyskowego i/lub zmiany mikrobiomu w obrębie narządów płciowych.

Wpływ procesów zachodzących w obrębie połączenia maczyno-łożyskowego wydaje się pełnić decydującą rolę w patogenezie porodu przedwczesnego ze względu na pełnioną przez łożysko funkcję narządu wydzielania wewnętrznego^{17,56}. Znaczący wpływ na procesy zachodzące w łożysku wykazuje oś podwzgórze-przysadka-nadnercza zarówno w trakcie fizjologicznego, jak i przedwczesnego porodu. Czynniki pobudzającymi przedwczesną aktywację osi HPA są występujące w obrębie łożyska ogniska niedokrwienne, będące manifestacją stresu płodu, który ma większy wpływ na występowanie porodu przedwczesnego niż psychosocjalny stres ciężarnej^{57,58}. Istotnym ogniwem będącym połączeniem pomiędzy osią HPA i łożyskiem jest kortykoliberyna (CRH)⁵⁹. Jest to hormon wydzielany głównie przez podwzgórze i oddziałujący na przysadkę mózgową. CRH jest wydzielane nie tylko przez podwzgórze, ale w trakcie ciąży jego produkcja zachodzi również w łożysku, trofoblastcie, pęcherzu płodowym i komórkach doczesnowych⁶⁰. CRH wydzielane przez łożysko oddziałuje głównie nie na przysadkę mózgową, lecz bezpośrednio na myometrium^{61,62}. Prawdopodobnie duże stężenie CRH jest przyczyną porodu przedwczesnego i stężenie tego hormonu we krwi ciężarnej może służyć jako marker porodu przedwczesnego^{59,63}. W fizjologicznej ciąży dojrzewanie płodowej osi HPA rozpoczyna się już od połowy ciąży, powodując stopniowy fizjologiczny wzrost wydzielania kortyzolu u płodu i zwiększenie uwalniania CRH z łożyska⁵⁹. Znaczący wpływ na ten proces i stężenie CRH ma białko wiążące CRH (CRHBP), którego obniżenie następuje w krótkim okresie poprzedzającym poród, powodując nagłe zwiększenie wolnego CRH²⁸.

Nadmierny stres emocjonalny ciężarnej również może wywołać pobudzenie osi podwzgórze-przysadka-nadnercza, poprzez uwolnienie hormonów nadnerczowych i podwzgórzowych prowadzących do porodu przedwczesnego. Idealnym przykładem omawianego mechanizmu jest wystąpienie objawów depresji śródciążowej powodującej wzrost ryzyka wystąpienia porodu przedwczesnego niemalże dwukrotnie⁶⁴⁻⁶⁶. Podobny wpływ na występowanie porodu przedwczesnego wykazano u pacjentek z rozpoznaniem lękiem w ciąży i zespołem stresu pourazowego⁴⁶⁻⁵⁰. Udowodniono także, że stres i związany z nim wysoki poziom CRH stymuluje produkcję prostaglandyn przez komórki owodni, kosmówki i doczesnej, które z kolei wywołują czynność skurczową macicy²⁸.

Z drugiej strony wydzielane w macicy prostaglandyny stymulują komórki łożyska, trofoblastu, pęcherza płodowego i doczesnowe do produkcji CRH, wynikiem czego jest powstanie dodatniego sprzężenia zwrotnego prowadzącego do porodu przedwczesnego. W literaturze można także znaleźć dowody bezpośredniego wpływu CRH na czynność skurczową macicy⁶⁷.

Wzrost poziomu prostaglandyn ostatecznie prowadzi do porodu poprzez wpływ na działanie proteaz w obrębie narządów płciowych i zwiększoną kurczliwość mięśniówki macicy⁶⁸. Z powodu tego, iż prostaglandyny mogą doprowadzić do porodu na każdym etapie ciąży wydają się być kluczowym elementem wystąpienia porodu przedwczesnego.

Ponadto glikokortykosteroidy oddziałują przez białko wiążące FK506 (FKBP51), które powoduje pobudzenie receptorów progesteronowych i glikokortykosteroidowych⁶⁹. Efektem pobudzenia osi HPA jest także zwiększone uwalnianie adrenokortykotropiny (ACTH) przysadkowej, która prowadzi do stymulacji komponenty estrogenowej i prostaglandynowej w obrębie łożyska i w konsekwencji aktywacji czynności skurczowej mięśniówki macicy i wystąpienie porodu przedwczesnego⁷⁰. ACTH płodowe oddziałuje na nadnercza płodu, pobudzając je do wydzielania dehydroepiandrosteronu (DHEA), aktywnej formy testosteronu, który w wątrobie płodu zostaje przekształcony do 16-hydroksy-DHEA-S. CRH łożyskowe także może oddziaływać na nadnercza płodu, pobudzając je do wydzielania DHEA⁷¹. Hormon ten w łożysku zostaje przekształcony do estronu (E1), estradiolu (E2) i estriolu (E3), które oddziałując na receptor estrogenowy alfa (ER-α) powodują aktywację mięśniówki macicy poprzez zwiększenie tworzenia połączeń szczelinowych (ang. gap junctions), receptorów dla oksytocyny, wydzielania prostaglandyn i wydzielanie białek odpowiedzialnych za kurczliwość mięśnia macicy (kinaza lekkiego łańcucha miozyny, kalmodulina)^{72–75}.

5.4.1 Rola procesu zapalnego w patogenezie porodu przedwczesnego

Ważnym aspektem mechanizmu zarówno fizjologicznego jak i przedwczesnego porodu jest oddziaływanie prostaglandyn i cytokin w obrębie ciężarnej macicy. W literaturze obecne są doniesienia, iż spontaniczna czynność porodowa w ciążach donoszonych współwystępuje ze zmianami histologicznymi, wskazującymi na obecność stanu zapalnego w materiale łożyskowym, a także stwierdzona została obecność cytokin prozapalnych w płynie owodniowym po dokonanych porodzie^{76,77}. Występowanie reakcji

zapalnej w obrębie połączenia maczyno- płodowego jest istotną składową mechanizmów porodowych. Nie jest to jednoznaczne z obecnością zakażenia. Aktywowana reakcja zapalna prowadzi do uwolnienia szeregu cytokin prozapalnych i prostaglandyn, prowadząc do powstania czynności skurczowej mięśnia macicy bez udziału antygenów bakteryjnych lub wirusowych. W porodach przedwczesnych wpływ czynnika infekcyjnego na powstanie reakcji zapalnej występuje zdecydowanie częściej, niż podczas porodów po 37. tygodniu ciąży. W badaniach przeprowadzonych przez Laudańskiego i wsp. wykazano, iż decydujący wpływ na wystąpienie porodu przedwczesnego wykazują zakażenia przebiegające bez znaczącej manifestacji objawów klinicznych^{78,79}.

W badaniu przeprowadzonym przez Rabę i wsp. zaobserwowano szczególnie znaczenie czynników prozapalnych w patogenezie porodu przedwczesnego w ciążach trwających do 30. tygodnia²⁸. Obecność stanu zapalnego była stwierdzana zarówno w obrazie patomorfologicznym jak i cytologicznym płynu owodniowego. Aż 80% pacjentek, rodzących przed 30 tygodniem ciąży prezentowało bakteryjną infekcję płynu owodniowego (MIAC) lub błon płodowych, w porównaniu do porodów o czasie, gdzie obecność MIAC była stwierdzana w mniej niż 30%⁸⁰.

Patomechanizm porodu przedwczesnego spowodowanego toczącą się infekcją w obrębie jamy macicy polega na oddziaływaniu produkowanych przez drobnoustroje toksyn, enzymów proteolitycznych i kolagenolitycznych na receptory obecne w łożysku i mięśniówce macicy. Większość bakterii oddziałuje na receptory obecne wewnątrzmacicznie poprzez produkcję Egzotoksyny A2. Fosfolipaza A2 aktywuje szereg prostaglandyn, powodując tym samym powstanie czynności skurczowej mięśniówki macicy⁸¹. Jednak największe znaczenie w patogenezie porodu przedwczesnego ma uwalniany przez bakterie lipopolisacharyd (LPS), wykorzystywany do badań jako izolowany czynnik zapoczątkowujący poród na każdym etapie ciąży⁸². LPS indukuje poród poprzez pobudzenie receptora TLR4 (ang: Toll-like receptor 4), powoduje to pobudzenie szeregu komórek odpornościowych we krwi ciężarnej i łożysku, odpowiedzialnych za powstanie reakcji zapalnej na granicy maczyno- płodowej⁸³.

W mechanizmie rozwoju reakcji zapalnej, będącej przyczyną porodu przedwczesnego znaczącą funkcję pełnią cytokiny prozapalne. Cytokiny są białkami oddziałującymi na wzrost, proliferację i pobudzenie komórek biorących udział w odpowiedzi immunologicznej, modulując wybiórczo odpowiedź komórkową

i humoralną, wpływając na funkcję pozostałych komórek ustrojowych i wzajemnie oddziałując między sobą i komórkami docelowymi^{84,85}. Różne cytokiny mogą działać antagonistycznie, addycyjnie lub synergistycznie na te same procesy biologiczne. Większość cytokin nie ma wpływu tylko i wyłącznie na konkretny typ komórek, lecz oddziałuje wielokierunkowo. Cytokiny wydzielane przez limfocyty określa się mianem limfokin, a uwalniane przez makrofagi nazywane są monokinami. Ogólnie cytokiny zostały zakwalifikowane do następujących grup: interferony, interleukiny, czynniki martwicy nowotworów, czynniki wzrostu oraz czynniki chemotaktyczne (chemokiny)⁸⁶.

W wyniku rozwijającego się stanu zapalnego wewnątrzmacicznego, cytokiny wpływają na wszystkie fazy odpowiedzi immunologicznej. Różne cytokiny działają na proliferację, różnicowanie i aktywację limfocytów, monocytów, makrofagów i granulocytów. Cytokiny wpływają na komórki docelowe przez oddziaływanie na specyficzne receptory. Podczas zakażenia wewnątrzmacicznego dochodzi do uwalniania przez komórki układu odpornościowego licznych cytokin takich jak: Czynniki martwicy nowotworów (TNF α), Interleukina-1 (IL-1), Interleukina-6 (IL-6), które stymulują syntezę prostaglandyn oraz uwalnianie metaloproteinaz. Powyższe zmiany skutkują rozwojem czynności skurczowej mięśniówki macicy, rozwojem zapalenia błon płodowych i pęknięcia pęcherza płodowego, przebudowę kolagenu szyjki macicy i przygotowanie jej do porodu²⁸.

Wystąpienie krwawienia na którymkolwiek etapie ciąży predysponuje do rozwinięcia zakażenia w obrębie jamy macicy. Przyczyną tego zjawiska może być wstępujące dostanie się mikroorganizmów do jamy macicy⁸⁷. Rozwijające się zakażenie może spowodować powstanie czynności skurczowej macicy i przyspieszenie oddzielania się łożyska. Zmniejszenie zaopatrywania płodu w utlenowaną i bogatą w substancje odżywcze krew powoduje pogorszenie dobrostanu płodu i pobudzenie osi podwzgórze-przysadka-nadnercza u płodu i uwolnienie łożyskowego CRH, który dodatkowo pobudza produkcję prostaglandyn i wywołanie czynności skurczowej⁸⁰.

Przedwczesne odpłynięcie płynu owodniowego przed 37. tygodniem ciąży (PPROM) powstaje w wyniku zapalenia wewnątrzmacicznego, jak i w przebiegu innych mechanizmów. PPRM powstaje w wyniku zakażenia pęcherza płodowego, a także do zakażenia może dojść w wyniku pęknięcia pęcherza płodowego

i wprowadzenia infekcji wstępująco do jamy macicy. Istotne znaczenie w tym patomechanizmie porodu przedwczesnego pełni obecność bakteriozy pochwy, bądź jej bezobjawowa kolonizacja przez bakterie: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* i *Chlamydia trachomatis*^{21,88}.

Infekcja wewnątrzmaciczna może często rozwijać się wewnątrzmacicznie przez dłuższy czas bez manifestacji objawów klinicznych do czasu rozwinięcia czynności skurczowej mięśniówki macicy lub PPRM. Wczesna identyfikacja toczącego się procesu zapalnego wydaje się być znacząca, stwarzając szansę na odpowiednią opiekę i możliwość zastosowania leczenia, zapobiegającego wystąpieniu porodu przedwczesnego. Rozwój technik badawczych w dziedzinie biologii molekularnej umożliwia coraz dokładniejsze poznanie genów i białek, będących punktami uchwytu licznych mechanizmów zachodzących wewnątrzmacicznie. Poznanie tych patomechanizmów umożliwia ich praktyczne wykorzystanie w praktyce klinicznej⁸⁹.

5.5 KONSEKWENCJE PORODU PRZEDWCZESNEGO

Pomimo rzadkiego występowania porodu przedwczesnego w populacji ma on istotny wpływ na chorobowość i umieralność noworodków. Ponad 95% patologii stanowiących chorobowość pacjentów neonatologicznych wynika właśnie z występowania przedwczesnego ukończenia ciąży⁴.

Noworodek jest nazywany wcześniakiem z powodu porodu mającego miejsce przed ukończeniem 37 tygodnia ciąży¹⁻⁴. Wcześniactwo dzieli się ze względu na ciężkość powikłań z nim związanych, wynikających z długości trwania ciąży.

Przedwczesne urodzenie wiąże się z nieodpowiednio krótkim czasem rozwoju płodu w obrębie jamy macicy. Po wydostaniu się na świat, nowonarodzone dziecko musi dostosować się do nowych warunków środowiska, co jest niezwykle trudne przy niedostatecznym funkcjonowaniu prawie wszystkich narządów i układów⁹⁰. Nieodpowiednie przystosowywanie noworodka prowadzi do szeregu nieprawidłowości. Do najczęstszych zaburzeń przystosowania nowonarodzonego dziecka należą następujące powikłania porodu przedwczesnego:

- **Zaburzenia funkcjonowania układu oddechowego** występują pod postacią:

- **Zespół zaburzeń oddychania noworodka (RDS)** inaczej zwana chorobą błon szklistych jest najczęstszym powikłaniem okołoporodowym występującym u dzieci przedwcześnie urodzonych. Według niektórych źródeł dotyczy nawet 93% noworodków z bardzo niską masą urodzeniową^{90,91}.

Płuca płodu nie pełnią swojej funkcji i wypełnione są płynem, aż do momentu porodu. Około 20. tygodnia ciąży zaczyna być wytwarzany środek powierzchniowo czynny zwany surfaktantem, w celu przygotowania tkanki płucnej do pełnienia jej funkcji poporodowo⁹². Surfactant zmniejsza napięcie powierzchniowe pęcherzyków płucnych, ułatwiając w ten sposób ich rozbudowę i zmniejsza prawdopodobieństwo powstania niedodmy pęcherzykowej. Patomechanizm zespołu zaburzeń oddychania noworodka wynika z niedostatecznego rozwoju układu oddechowego spowodowaną głównie brakiem surfaktantu w obrębie pęcherzyków płucnych. Rzadkie zespoły genetyczne mogą przyczyniać się do ubytku surfaktantu w obrębie pęcherzyków płucnych, lecz najczęstszą przyczyną niewystarczającego działania tej substancji jest urodzenie się przedwcześnie dziecka. U noworodków urodzonych przedwcześnie dochodzi zarówno do niewystarczającej produkcji surfaktantu, jak i nieprawidłowej budowy produkowanej substancji⁹¹. Pomimo niewystarczającego działania surfaktantu u noworodków urodzonych przedwcześnie istnieją przesłanki co do obecności reakcji zapalnej i nagromadzenia się neutrofili w obrębie miąższu płuc i następującego w wyniku tego uszkodzenia płuc⁹³. Oprócz tego, jak wspomniano powyżej, niedobór surfaktantu powoduje niedodmę pęcherzyków płucnych i może prowadzić do uszkodzenia nabłonka oddechowego i śródbłonka naczyń włosowatych, czego skutkiem jest powstanie odpowiedzi zapalnej zależnej od działania cytokin^{94–97}. Zapalenie i uszkodzenie płuc mogą z kolei prowadzić do gromadzenia się bogato-białkowego płynu, który może dezaktywować wydzielający się do pęcherzyków płucnych surfaktant,

a tym samym pogłębiać niedobór środka powierzchniowo czynnego⁹⁸. W wyniku powstałego stanu zapalnego, uszkodzenia pęcherzyków płucnych i zaburzenia w obrębie redystrybucji czynników osmotycznie czynnych dochodzi do obrzęku miąższu płuc. Głównym negatywnym skutkiem omawianych zmian w obrębie tkanki płucnej jest zmniejszona podatność i mała objętość płuc (funkcjonalna pojemność resztkowa). Zmiany te są głównie spowodowane niedodmą, chociaż zarówno obrzęk płuc, jak i zapalenie mogą przyczyniać się do występowania omawianego stanu. Wynikiem nieprawidłowości w obrębie płuc jest zaburzenie wymiany gazowej zachodzącej w płucach i ogólnoustrojowa hipoksemia, mogąca prowadzić do zgonu noworodka. RDS jest więc główną przyczyną chorobowości i umieralności okołoporodowej noworodków urodzonych przedwcześnie⁹¹.

- **Dysplazja oskrzelowo-płucna (BDP)**, inaczej nazywana **przewlekłą chorobą płuc noworodków (CLD)** jest powikłaniem związanym głównie z koniecznością przewlekłej tlenoterapii powyżej 28 dnia życia, przy obecności charakterystycznego obrazu w radiogramie płuc⁹⁹. Powikłanie to dotyczy nie tylko wcześniaków, ale występuje także wśród dzieci urodzonych o czasie, głównie z współistniejącą przepukliną przeponową, bądź niedorozwojem płuc o innej etiologii. Patogeneza jest wieloczynnikowa i składa się na nią niedorozwój układu oddechowego i uszkodzenie komórek układu oddechowego przez czynniki działające podczas życia wewnątrzmacicznego (wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrastania, czy palenie w trakcie ciąży przez ciężarną) lub okołoporodowo (poprzez wentylację mechaniczną, toksyczne działanie tlenu, infekcje układu oddechowego i sepsę wywołaną głównie przez bakterie z rodziny *Ureaplasma*). Dysplazja oskrzelowo-płucna występuje wśród noworodków przedwcześnie urodzonych z powodu niedostatecznego rozwinięcia struktur wspierających drogi oddechowe, niedobór surfaktantu, zmniejszoną podatność

otaczających tkanek, niedostatecznie rozwinięte mechanizmy przeciwutleniające i nieodpowiedni klirens płynów¹⁰⁰. Niedojrzałość układu oddechowego zwiększa ryzyko uszkodzeń układu oddechowego. Mechanizm powstania BDP można podzielić na następujące aspekty:

- Zmniejszone tworzenie przegród pomiędzy pęcherzykami płucnymi i hipoplazja pęcherzyków płucnych prowadzą do zmniejszenia liczby i zwiększenia wielkości pęcherzyków płucnych. Proces ten prowadzi do zmniejszenia powierzchni wymiany gazowej.
- Powstawanie nieprawidłowych naczyń włosowatych pęcherzyków płucnych i pogrubienie warstwy mięśniowej tętniczek płucnych powoduje wzrost oporu płucnego. Nieprawidłowa neowaskularyzacja prowadzi do rozwoju nadciśnienia płucnego i prowadzi konsekwentnie do zwiększonej umieralności dzieci dotkniętych BDP¹⁰¹.
- Zwiększenie elastyczności tkanek i pogrubienie śródmiąższu płuc zakłócają tworzenie przegród pomiędzy pęcherzykami płucnymi i rozwój naczyń włosowatych, prowadząc do nieprawidłowego rozwoju tkanki płucnej¹⁰².

Choroba dotyczy około 15-30% noworodków mechanicznie wentylowanych przez okres ponad trzech tygodni¹⁰³. Występowanie choroby jest odwrotnie proporcjonalne do wieku ciążowego i masy urodzeniowej noworodka i dotyczy aż 40% dzieci urodzonych przed 29 tygodniem ciąży i pozostaje niezmiennie od ponad 20 lat¹⁰⁴!

- **Bezdech wcześniaków** dotyczy około jednej czwartej wcześniaków. Występowanie omawianej patologii dotyczy przede wszystkim dzieci z ekstremalnie niską masą urodzeniową¹⁰⁵. Patologia ta jest spowodowana niedojrzałym układem nerwowym i związaną z tym nieodpowiednią kontrolą czynności układu oddechowego. Klinicznie istotne bezdechy noworodków trwają ponad 20 sekund lub gdy epizodom bezdechu towarzyszą objawy hipoksemii z dodatkową bradykardią¹⁰⁵.

- **Rozlane krwawienie pęcherzykowe** często występuje wśród dzieci urodzonych przedwcześnie i wiąże się ze zwiększonym odsetkiem umieralności okołoporodowej noworodków. Patologia ta dotyczy od 0,5% do 9% przedwcześnie urodzonych pacjentów¹⁰⁶.

- **Zaburzenia w obrębie układu sercowo-naczyniowego:**

- **Przetrwały przewód tętniczy (PDA)** jest drugim co do częstości powikłaniem wśród pacjentów urodzonych przedwcześnie i może dotyczyć prawie połowy z nich⁹⁰. Przewód tętniczy w życiu płodowym z powodu dużego oporu panującego w naczyniach krążenia płucnego, umożliwia przepływ krwi z tętnicy płucnej do aorty. Po porodzie dochodzi do spadku oporu w naczyniach płucnych, natomiast ciśnienie krwi w krążeniu dużym jest znacznie większe od ciśnienia panującego w tętnicy płucnej. W wyniku tego połączenia dochodzi do przepływu lewo-prawego i obciążenia krążenia płucnego przez zbyt wysokie ciśnienie tętnicze krwi i hipoperfuzję narządów zaopatrywanych przez systemowy obieg krwi. Konsekwencjami takiej nieprawidłowej redystrybucji krwi w obrębie naczyń wychodzących z serca są odma płucna, rozlane krwawienie pęcherzykowe, dysplazja oskrzelowo-płucna, krwawienie dokomorowe i martwicze zapalenie jelit. Powikłania te są zależne od wielkości przecieku, oraz odpowiedzi płuc i serca na zaistniałe obciążenie¹⁰⁷. Objawami okołoporodowymi znacznego przepływu krwi przez przewód tętniczy u noworodka może być bezdech, niewydolność oddechowa lub/i niewydolność krążenia. Odma płucna powstaje w wyniku nadmiernego ciśnienia panującego w obrębie miąższu płucnego i nadmiernej hiperfiltracji płynu znajdującego się w obrębie miąższu płucnego. Powyżej wymieniony mechanizm zachodzących zmian w miąższu płucnym powodujący jego uszkodzenie może przyczynić się do uszkodzenia naczyń krwionośnych i być konsekwencją rozlanego krwawienia pęcherzykowego. Długotrwałe obciążenie

krążenia płucnego poporodowo, prowadzi do trwałej przebudowy ściany naczyń, powodując zmniejszenie elastyczności i rozwoju zarówno nadciśnienia płucnego, jak i dysplazji pęcherzykowo-płucnej. Stale podwyższone ciśnienie w sieci naczyń krwionośnych krążenia płucnego powoduje nadmierne obciążenie prawej komory pompującej krew do obiegu płucnego i jej przerost. Konsekwencją przerostu prawej komory jest zmniejszenie efektywności jej kurczliwości, prowadzącej do niewydolności mięśnia sercowego^{90,107}. Przyczyną późnego (po 24. godzinach życia) krwawienia dokomorowego jest uszkodzenie naczyń w krążeniu mózgowym spowodowanych niedokrwieniem i reperfuzją tych naczyń¹⁰⁸. Nekrotyczne zapalenie jelit również wynika z niedostatecznej perfuzji naczyń krążenia systemowego, co skutkuje niedokrwieniem jelit.

- **Hipotensja** występuje z powodu zmniejszonego wyrzutu krwi na obwód, spowodowanego przetrwałym przewodem tętniczym, co powoduje niskie ciśnienie krwi na obwodzie. Dodatkowym czynnikiem mającym wpływ na hipotensję poporodową wykazany u płodów po chirurgicznej korekcie przewodu tętniczego jest mniejsze stężenie kortykosteroidów u noworodków urodzonych przedwcześnie. Przyczyną niskiego ciśnienia krwi tętniczej po porodzie przedwczesnym wydaje się być niedostateczne rozwinięcie gruczołów wydzielania wewnętrznego^{109–111}. Dodatkowo w etiopatogenezie hipotensji wcześniaków wydaje się mieć wpływ zmniejszone napięcie naczyń krwionośnych, wynikające z ich niedostatecznego rozwoju^{112,113}.

- **Hipotermia** wśród noworodków przedwcześnie urodzonych wynika z niekorzystnego stosunku powierzchni ciała do jego objętości i niedojrzałych mechanizmów ochrony przed utratą ciepła z organizmu. U dzieci przedwcześnie urodzonych występowanie hipotermii wiąże się ze zwiększoną umieralnością noworodków. Wśród dzieci, które przeżyły epizod hipotermii zdecydowanie częściej występowały krwawienia

dokomorowe, niewydolność oddechowa i rozlane krwawienie dopęcherzykowe^{114–118}.

- **Zaburzenia gospodarki węglowodanowej** również częściej występują wśród noworodków urodzonych przedwcześnie. Przyczyną tego jest niedojrzałość trzustki jako nadrzędnego gruczołu układu wydzielania wewnętrznego, odpowiadającego za regulację poziomu glukozy we krwi. Bezpośrednią przyczyną hipoglikemii jest hiperinsulinizm. Hiperglikemia występuje natomiast z powodu gorszej odpowiedzi receptorów obwodowych na wzrastające stężenie insuliny, a także niekompletne zahamowanie produkcji glukozy¹¹⁹.
- **Martwicze zapalenie jelit (NEC)** jest częstym zaburzeniem dzieci przedwcześnie urodzonych. Aż do 90% przypadków NEC dotyczy wcześniaków. 2 do 10% noworodków przedwcześnie urodzonych i około 7% wśród pacjentów o urodzeniowej masie ciała poniżej 1500 g cierpi na martwicze zapalenie jelit^{120,121}. Pomimo doniesień już z 1965 roku dotyczących NEC, dotychczas nieznany jest dokładny patomechanizm powstawania omawianego powikłania. Liczne obserwacje wskazują na wieloczynnikowy charakter tego zjawiska^{121,122}. Wśród zaobserwowanych patomechanizmów powstania martwiczego zapalenia jelit należy wymienić: niedojrzałość jelit, nieodpowiednią kolonizację mikroflory bakteryjnej jelit, hipoperfuzję i następujące w jej wyniku niedotlenienie tkanki jelit. Podczas martwiczego zapalenia jelit dochodzi w początkowej fazie do współwystępowania zapalenia jelit i niedokrwienia ściany jelita. Zakres uszkodzenia może występować wyłącznie w obrębie błony śluzowej, ale też może rozprzestrzeniać się na całą grubość ściany jelita i prowadzić do perforacji przewodu pokarmowego. Najczęściej proces chorobowy dotyczy końcowej części jelita krętego i okrężnicy, aczkolwiek martwicze zapalenie jelit może wystąpić na każdym odcinku przewodu pokarmowego¹²². Występowanie NEC znacząco zwiększa umieralność okołoporodową dzieci, a wśród

ozdrowieńców po przebytych martwiczym zapaleniu jelit występuje także zwiększone ryzyko zaburzeń rozwoju układu nerwowego.

- **Zakażenie układu krwionośnego (sepsa)** o późnym początku często występuje wśród noworodków urodzonych przedwcześnie, a szczyt zachorowania przypada na trzeci dzień życia. W jednym z przeprowadzonych dotychczas badań Stoll i wsp. wykazali na 6215 noworodkach, że aż do 21% dzieci przedwcześnie urodzonych wykazywało objawy bakteriemii¹²³. Występowanie sepsy u noworodków wiąże się z gorszym rokowaniem w postaci występowania konieczności przedłużonej intubacji, dysplazji oskrzelowo-płucnej, przedłużonej obecności cewników wewnątrznaczyniowych, PDA, NEC i zwiększenie związanej z występowaniem powyższych powikłań śmiertelności okołoporodowej^{124,125}.
- **Retinopatia wcześniaków (ROP)** dotyczy około 20% dzieci urodzonych przed 37. tygodniem ciąży¹²⁶. Jest zaburzeniem rozwoju proliferacji naczyń i rozwija się w niedojrzałej siatkówce. Fizjologicznie proces rozwoju naczyń krwionośnych w siatkówce płodu rozpoczyna się około 15 - 18 tygodnia ciąży¹²⁷. W trakcie tego procesu dochodzi do proliferacji naczyń z okolicy plamki ślepej, czyli miejsca ujścia nerwu wzrokowego i neowaskularyzacji do obwodowych części siatkówki. Zakończenie tego procesu występuje około 36. - 40. tygodnia ciąży, i jest uzależnione od wielu czynników osobniczych¹²⁷. Patologiczny rozwój naczyń krwionośnych siatkówki zachodzi w dwóch etapach. Początkowo dochodzi do uszkodzenia naczyń poprzez hipoperfuzję spowodowaną hipotensją, niedotlenieniem i wtórną reperfuzję. Nieprawidłowo powstałe naczynia wykazują większą przepuszczalność w porównaniu do prawidłowych naczyń. Skutkiem tego procesu są krwawienia do siatkówki i jej obrzęk. Zwłóknienia powstałe w nieprawidłowych naczyniach, powodują zmniejszenie ich średnicy lub nawet skurcz omawianych naczyń. Patologiczne naczynia siatkówki w ciężkich przypadkach mogą powodować jej deformację i nawet odwarstwienie

siatkówki. Na szczęście ciężkie przypadki retinopatii wcześniaków zdarzają się bardzo rzadko (w mniej niż 5% wcześniaków¹²⁶) i ROP zazwyczaj przebiega łagodnie, ustępując całkowicie bez leczenia i znaczących ubytków siatkówki¹²⁷.

- **Krwawienia dokomorowe (IVH)** jest to wynaczynienie się krwi do systemu komorowego występujące u noworodków w silnie unaczynionym, lecz niedojrzałym i bardzo kruchym miejscu zwanym macierzystą strefą rozrodczą (ang. Germinal Matrix, GM)^{124,128}. Struktura ta znajduje się pod wyściółką komór¹²⁹. Powikłanie to dotyczy nawet do 15% wcześniaków o bardzo niskiej masie urodzeniowej, w literaturze występują doniesienia o krwawieniu dokomorowym u dzieci donoszonych, lecz zjawisko to występuje wyjątkowo rzadko^{128,130}. Większość przypadków występowania krwawienia dokomorowego występuje w krótkim okresie okołoporodowym, zazwyczaj około 3 - 4 dnia życia dziecka¹²⁴. Ciężkość nasilenia krwawienia dokomorowego jest mierzona przy pomocy USG w 4-stopniowej klasyfikacji według Papile'a¹³¹:

- Stopień I: krwawienie ogranicza się do strefy macierzystej, lokalizuje się podwyściółkowo,
- Stopień II: krwawienie przebija się do światła komór, ale nie powoduje ich poszerzenia,
- Stopień III: krwawienie wiąże się z powstaniem skrzeplin poszerzających światło komór,
- Stopień IV: krwawienie dotyczy zarówno komór bocznych, jak i miąższu mózgu.

Stopień nasilenia krwawienia dokomorowego u wcześniaków jest odwrotnie proporcjonalny do urodzeniowej masy ciała, która jest bezpośrednio związana z długością trwania ciąży¹²⁴. Następstwem krwawienia dokomorowego może być bezpośrednie, strukturalne, permanentne uszkodzenie mózgowia, bądź bezpośrednie uszkodzenie mózgowia spowodowane jego obrzękiem. Wyżej opisany stan pacjenta

może doprowadzić do mózgowego porażenia dziecięcego, bądź zgonu okołoporodowego noworodka.

- **Leukomalacja okołokomorowa (PVL)** jest zaburzeniem intensywności sygnału lub echogeniczności istoty białej okołokomorowej, zarówno w postaci torbielowatej, jak i nietorbielowatej przy badaniu USG lub MRI¹³². Przyczyną powstania wymienionych nieprawidłowości w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (OUN) jest duża wrażliwość istoty białej okołokomorowej na uszkodzenia związane z zaburzeniami perfuzji. W istocie szarej okołokomorowej dochodzi do zmian niedokrwiennych, będących prawdopodobną przyczyną symptomatologii omawianego powikłania porodu przedwczesnego. Ponadto w wyniku niedojrzałości ośrodkowego układu nerwowego niemożliwa jest pełna kontrola samoregulacji przepływu krwi przez poszczególne struktury OUN¹³³. Leukomalacja okołokomorowa występuje u 7% dzieci urodzonych przedwcześnie i koreluje odwrotnie z zaawansowaniem wieku ciążowego. PVL dotyczy około 30% noworodków urodzonych przed 32. tygodniem ciąży i aż 40% pacjentów urodzonych przed 28. tygodniem ciąży¹³⁴. Leukomalacji okołokomorowej mogą towarzyszyć różne ubytki neuronalne w 60 - 100%, występujące pod postacią mózgowego porażenia dziecięcego¹³³.
- **Mózgowe porażenie dziecięce (CP)** jest to grupa zaburzeń funkcjonowania ośrodkowego układu nerwowego. Na spektrum zaburzeń mózgowego porażenia dziecięcego składa się upośledzony rozwój czynności motorycznych, gorsza percepcja bodźców pod postacią zaburzeń narządu wzroku i słuchu, utrudnionym formowaniem myśli, co przekłada się na trudności w nauce. Ubytki neurologiczne raz zaobserwowane u noworodka lub rozpoznane na późniejszym etapie rozwoju nie postępują w trakcie rozwoju dziecka, utrzymując się na stałym poziomie. Omawiane zaburzenie jest najczęstszym powodem niepełnosprawności ruchowej u dzieci⁵⁶. Mózgowe porażenie dziecięce występuje z częstością od 1,5 do 3 przypadków na 1000 urodzeń^{135–138} i pojawia się aż czterdzieści razy częściej u wcześniaków w porównaniu

do dzieci urodzonych o czasie⁵⁶ i wynosi około 5 - 15% wśród dzieci o bardzo małej masie urodzeniowej (<1500g)¹³⁸. Mózgowe porażenie dziecięce często współwystępuje z innymi powikłaniami porodu przedwczesnego, takimi jak: Leukomalacja okołokomorowa, RDS, IVH, NEC czy BDP. Logicznym wydaje się związek przyczynowo skutkowy uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego i występowanie ubytku w jego funkcjonowaniu, natomiast patogeneza mózgowego porażenia dziecięcego wydaje się mieć skomplikowany i wieloczynnikowy charakter. Z tego powodu unika się wiązania osobno któregośkolwiek z wymienionych powikłań porodu przedwczesnego z występowaniem mózgowego porażenia dziecięcego.

- **Śmierć okołoporodową noworodków** rozpoznajemy w przypadku zgonu noworodka do 28. dnia od porodu. Przy czym wczesna śmierć noworodkowa występuje pomiędzy porodem a 7. dniem od porodu, a późna śmierć noworodkowa jest rozpoznawana, jeżeli do zgonu doszło po tygodniu od urodzenia, ale przed 28. dniem od porodu^{3,4}. Występowanie okołoporodowej śmierci noworodków może być konsekwencją wszystkich omawianych dotychczas powikłań porodu przedwczesnego, natomiast największym predyktorem wystąpienia tego powikłania jest długość trwania ciąży i masa urodzeniowa noworodka. Szacuje się, iż ryzyko okołoporodowej śmierci noworodków w zależności od wieku ciążowego wynosi^{9,139}:

- 0,18% w 40 tygodniu ciąży;
- 0,24% pomiędzy 37. i 39. tygodniem ciąży;
- 0,7% pomiędzy 34. i 36. tygodniem ciąży;
- 1,6% pomiędzy 32. i 33. tygodniem ciąży;
- 3,5% pomiędzy 28. i 31. tygodniem ciąży;
- 37,5% w ciążach trwających krócej niż 28 tygodni.

Szacunkowa okołoporodowa śmierć noworodków w zależności od urodzeniowej masy ciała przedstawia się następująco:

- 0,2% przy masie urodzeniowej ponad 2500g;
- 1% przy masie urodzeniowej pomiędzy 2000, a 2499g;

- 0,7% przy masie urodzeniowej pomiędzy 1500, a 1999g;
- 4% przy masie urodzeniowej pomiędzy 1250, a 1499g;
- 6,2% przy masie urodzeniowej pomiędzy 1000, a 1249g;
- 12,5% przy masie urodzeniowej pomiędzy 750, a 999 g;
- 39,4% przy masie urodzeniowej pomiędzy 500, a 749 g;
- 85,3% przy masie urodzeniowej mniejszej niż 500 g.

Śmierć okołoporodowa dzieci występuje znacząco częściej wśród noworodków przedwcześnie urodzonych i stanowi około nawet 1/3 wcześniaków w USA¹²⁴.

Noworodek urodzony przedwcześnie ponosi niekorzystne konsekwencje wynikające z niedostatecznej dojrzałości wielu narządów i układów. Pomimo tego negatywnego wpływu przedwczesnego porodu na chorobowość i śmiertelność noworodków, poród przedwczesny ma także swoje negatywne skutki na dobrostan matki nowonarodzonego dziecka w okresie okołoporodowym, a także może mieć implikacje na dalsze życie pacjentki. W wyniku nagłych zmian stężeń hormonów i układu kortykosteroidowego w organizmie kobiety okołoporodowo po fizjologicznej ciąży i fizjologicznym porodzie rozpoznawane są często zaburzenia nastroju określane w literaturze anglojęzycznej „baby blues”^{140–144}. Konieczność rozłąki matki z noworodkiem powoduje dodatkowo pogłębienie złego samopoczucia, natomiast konieczność hospitalizacji nowonarodzonego dziecka na oddziale intensywnej terapii z powodu powikłań wcześniactwa z pewnością może też wywoływać ekstremalny stres u pacjentki. Nakładające się na ten obraz kliniczny zagrożenie utraty długo wyczekiwanego potomka może spowodować pogłębienie złego stanu psychicznego matki. Baby blues, nazywany fizjologicznym zaburzeniem okołoporodowym trwa nie dłużej niż 14 dni po porodzie^{140–144}. Wymienione czynniki mają niewątpliwie negatywny wpływ na pogorszenie stanu psychicznego matki i przedłużenie się okresu zaburzeń nastroju, co skutkuje koniecznością rozpoznania u matki depresji poporodowej^{140–144}. Dodatkowym czynnikiem mającym bardzo duży wpływ na występowanie i nasilenie depresji poporodowej jest obecność depresji w trakcie ciąży, której częstość w trakcie ciąży wynosi około 10 - 25%^{51,145,146}. Pacjentki z zagrażającym porodem przedwczesnym bardzo często odczuwają lęk przed wystąpieniem porodu przedwczesnego, a stan taki predysponuje do wystąpienia depresji w ciąży i w związku z tym depresji poporodowej. Co ciekawe, jednym z najczęstszych powikłań lęku

i depresji w trakcie ciąży jest urodzenie płodu przedwcześnie^{52,147}, co tworzy swojego rodzaju zamknięty, samonapędzający się krąg współzależności występowania lęku i depresji w ciąży i porodu przedwczesnego. Bardzo istotnym czynnikiem protekcyjnym w tym okresie jest wsparcie partnera, bądź osoby bliskiej pacjentki, a także odpowiednie podejście klinicysty, który powinien być czujny i nie zwlekać z wdrożeniem odpowiedniego leczenia^{51,52,147}.

5.6 ROLA SYSTEMU ENDOKANABINOIDOWEGO W ORGANIZMIE LUDZKIM

W latach 40-tych XX-tego wieku Wollner i wsp. wyizolowała z roślin nowe biologicznie czynne związki organiczne^{148,149}. Interesujące jest, że aktywny składnik marihuany THC (trans Δ^9 -tetrahydrokannabinol) został odkryty dopiero w 1964 roku przez Gaoni and Mechoulam¹⁵⁰. Początkowo sądzono, iż działanie odkrytych związków polega na uszkodzaniu błony komórkowej ze względu na hydrofobowy charakter. Mechanizm ten został zdementowany odkryciem i sklonowaniem pierwszego receptora kanabinoidowego w 1990 roku^{151,152}. Drugi receptor kanabinoidowy CB2 został odkryty wkrótce po CB1 w 1993 roku¹⁵³. Odkrycie endogennych ligandów receptorów CB 1 i 2 nastąpiło w latach 1992 i 1995^{154,155}. Rozwój badań immunologicznych w ostatnim dziesięcioleciu umożliwił dokładniejszą ocenę ekspresji wielu genów i mechanizmów biochemicznych obecnych w organizmie ludzkim, w tym składających się na układ endokanabinoidowy (ECS).

ECS jest jednym z wielu sposobów regulacji homeostazy organizmu. Ekspresji receptorów CB1 i CB2 doszukano się w prawie każdej komórce ciała ludzkiego. Mechanizm działania ECS składa się na system endogennych ligandów, receptorów transbłonowych, działających za pośrednictwem białka G i enzymów, które powstają po pobudzeniu receptora przez odpowiednie ligandy. Do endogennych ligandów receptorów kanabinoidowych zalicza się AEA (anandamid / arachidynoylo etanoamid) i 2-AG (2-arachidynoylo glicerol)¹⁵⁶. Są to eikosanoidy wytwarzane przez komórki ciała ludzkiego z kwasu arachidonowego.

Receptory kanabinoidowe należą do klasy A rodziny receptorów działających za pośrednictwem białka G (GPCR). Pobudzenie wymienionego kompleksu zachodzi za pośrednictwem β -arestyn. Receptor CB1, kodowany przez gen *CNR1* ulega ekspresji

w niemalże każdej komórce ludzkiego ciała, natomiast największą ekspresję wykazano w ośrodkowym układzie nerwowym¹⁵⁷.

Receptor CB2 składa się z 44% tych samych aminokwasów co receptor CB1. Sekwencja aminokwasowa receptora CB2 jest z kolei mniej konserwatywna u gatunków ludzi i gryzoni w porównaniu do sekwencji aminokwasowej receptora CB1^{158–160}. Receptor kannabinoidowy CB2 ulega głównie ekspresji w obrębie komórek układu odpornościowego, a selektywna modulacja pobudzenia receptora CB2 wywiera efekt przeciwbólowy bez komponenty psychoaktywnej obecnej podczas pobudzenia CB1. Zjawisko to ma potencjał terapeutyczny w chorobach zapalnych, zwłóknieniowych i neurodegeneracyjnych^{160,161}.

Egzogenne kanabinoidy wyizolowane z różnych rodzajów konopii indyjskiej były stosowane w poszczególnych kulturach, od wieków wykorzystując ich efekt terapeutyczny. Rozwój nowoczesnych metod biochemicznych umożliwił ekstrakcję bardziej selektywnych syntetycznych związków mających wpływ na receptory kanabinoidowe¹⁶². Selektywni agoniści receptorów CB1 wykazują potencjał przeciwbólowy i przeciwzapalny w terapii stwardnienia rozsianego, chorób neurodegeneracyjnych i innych zaburzeń przebiegających z rozwinięciem nadmiernego stanu zapalnego. Przez pewien czas zarejestrowany był przez European Medical Agency agonista receptora CB1 rimonabant (SR141716) w leczeniu otyłości, lecz został wycofany ze względu na obecność działań niepożądanych na ośrodkowy układ nerwowy pod postacią zwiększania niepokoju, depresji i wywoływanie myśli samobójczych¹⁵⁷.

Receptory kanabinoidowe zostały wykryte w obrębie mięśni szkieletowych porzecznie prążkowanych¹⁶³ i w mięśniówce gładkiej¹⁶⁴. Pobudzenie receptorów CB w omawianych strukturach prowadziło do relaksacji wyżej wymienionych tkanek, a mniejsza ekspresja receptorów kanabinoidowych i z tym związane mniejsze oddziaływanie endogennych kanabinoidów prowadziło do nadmiernej kurczliwości mięśni. Podobne działanie ECS zaobserwowano w obrębie mięśniówki macicy nieciężarnej, jak i ciężarnej u gryzoni i u ludzi w tkance objętej endometriozą^{165–168}.

Pobudzenie receptorów kanabinoidowych CB1 i CB2 bierze także udział w następujących procesach: plastyczności neuronów, powstawania bólu, lęku, zapalenia i neuro-zapalenia, modulacji układu immunologicznego, regulacji metabolizmu, czy wzrostu kości¹⁵⁶.

Liczne badania oceniające odsetek ciężarnych stosujących substancje zawierające THC i jego pochodne stale rośnie na przestrzeni lat. Jarlenski i wsp. zaobserwowali wzrost stosowania marihuany i jej pochodnych wśród kobiet z populacji amerykańskiej z ok. 5% w 2005 do prawie 20% w 2015¹⁶⁹. Young-Wolff i wsp. w swoim badaniu oceniali wzrost stosowania THC zarówno przed ciążą jak i w ciąży. Od 2009 do 2017 stosowanie THC przed ciążą wzrosło z niecałych 7% do prawie 13%, a w trakcie ciąży z 2% do prawie 4%, wykazując dwukrotny wzrost stosowania THC wśród kobiet¹⁷⁰. Jeszcze w innym badaniu przeprowadzanym przez Volkova i wsp. pomiędzy 2002 i 2017 rokiem, użycie kanabinoidów wzrosło z 3% do 7.0% wśród ciężarnych, z czego aż 12% badanych ciężarnych stosowała kanabinoidy w pierwszym trymestrze ciąży¹⁷¹.

W badaniu obserwacyjnym, przeprowadzonym na populacji kanadyjskich pacjentek ciężarnych przyjmujących rekreacyjnie kanabinoidy egzogenne w trakcie trwania ciąży, Corsi i wsp. wykazali zwiększenie występowania porodu przedwczesnego związanego ze stosowaniem egzogennych kanabinoidów¹⁷². Z kolei w doniesieniach od van Gelder i wsp. i Fergusson i wsp. stosowanie kanabinoidów w trakcie ciąży nie wiązało się z małą masą urodzeniową bądź porodem przedwczesnym^{173,174}.

Heterogenne wyniki przeprowadzonych prac nad wpływem egzogennych kanabinoidów na długość trwania ciąży i występowanie powikłań związanych ze stosowaniem pochodnych THC pozwalają wysnuć wnioski o nieznaczącym wpływie stosowania egzogennych ligandów receptorów kanabinoidowych. Brakuje natomiast systematycznych przeglądów literatury i metaanaliz w literaturze, porównujących wartość poszczególnych badań oceniających wpływ kanabinoidów egzogennych na przebieg ciąży, w wyniku czego wnioski płynące z pojedynczych badań wydają się być niemiernodajne. Nieistotność uzyskanych wyników może wynikać zarówno z plejotropowego działania zażywanych substancji, jak i z powstających wątpliwości co do metodologii przeprowadzanych badań. Mianowicie w żadnym z cytowanych artykułów oceniających występowanie powikłań ciąży związanych ze stosowaniem substancji mających wpływ na pobudzenie receptorów kanabinoidowych badacze nie mieli wpływu na sprawdzenie składu używanych środków raportowanych przez badane kobiety, a także oceny ilości i regularności przyjmowania marihuany i jej pochodnych. Ciekawym i niezbadanym aspektem wydaje się być wpływ stosowania egzogennych kanabinoidów na działanie endogennego systemu kanabinoidów,

gdyż pobudzenie zewnątrzpochodnymi związkami receptorów może wpływać na szlaki regulujące działanie tego systemu. Niewątpliwie dalsze badania w tym zakresie są niezbędne do zrozumienia tych mechanizmów.

6 CEL PRACY I UZASADNIENIE PODJĘCIA TEMATU

Celem pracy było zbadanie zależności pomiędzy ekspresją receptorów kanabinoidowych w obrębie łożyska po porodzie, a problemem porodu przedwczesnego.

Cele szczegółowe przeprowadzonego badania to:

- Zbadanie ekspresji receptorów CB1, CB1a i CB2 w łożyskach u kobiet po porodach.
- Zbadanie zależności pomiędzy ekspresją receptorów CB1, CB1a i CB2 w łożyskach, a długością trwania ciąży / wiekiem ciążowym w momencie porodu i wystąpieniem porodu przedwczesnego.
- Zbadanie zależności ekspresji receptora CB1, CB1a i CB2 w łożyskach, a występowaniem wybranych powikłań w przebiegu ciąży.

7 MATERIAŁ

Badanie przeprowadzono na materiale wieloośrodkowym 150 kobiet rodzących w terminie od marca 2004 do grudnia 2012 roku, w Oddziale Położnictwa Wojewódzkiego Szpitala w Przemyślu, Klinice Perinatologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, oraz Klinice Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. U 115 kobiet wystąpił poród przedwczesny i stanowiły Grupę Badaną, u 35 kobiet poród odbył się w fizjologicznym terminie i określono je mianem Grupy Kontrolnej.

Kryteria włączenia do grupy badanej były następujące:

- Samoistne, spontaniczne zakończenie ciąży i urodzenie dziecka pomiędzy 22. tygodniem 0 dni, a 36. tygodniem 6 dni ciąży.
- Poród odbyty drogami natury lub cięciem cesarskim z nagłych wskazań śródporodowych.

- Kryteria wyłączenia z grupy badanej:
- Cięża mnoga,
- Obecność powikłań ciąży, takich jak:
 - niedokrwistość w ciąży wymagająca leczenia preparatami żelaza,
 - cholestaza ciężarnych,
 - zespół HELLP,
 - ostre stłuszczenie wątroby ciężarnych,
 - chorób przewlekłych nerek,
 - niedoborów odporności,
 - chorób autoimmunologicznych,
 - łożysk przodujących,
 - FGR i SGA,
 - małowodzie,
 - wielowodzie.
- Porody z ciąż uzyskanych w wyniku in vitro
 - Wykrycie u płodów następujących nieprawidłowości:
 - wady anatomiczne lub dysmorfie płodu,
 - aberracje chromosomowe i zespoły genetyczne rozpoznane perinatalnie,
 - zgon wewnątrzmaciczny płodu.

Kryteria włączenia do grupy kontrolnej były następujące:

- Samoistne, spontaniczne zakończenie ciąży i urodzenie dziecka pomiędzy 37. tygodniem 0 dni, a 40. tygodniem 6 dni ciąży.
- Poród odbyty drogami natury lub cięciem cesarskim z nagłych wskazań śródporodowych.

Kryteria wyłączenia z grupy kontrolnej:

- Cięża mnoga,
- Obecność powikłań ciąży, takich jak:
 - niedokrwistość w ciąży wymagająca leczenia preparatami żelaza,
 - cholestaza ciężarnych,
 - zespół HELLP,

- ostre stłuszczenie wątroby ciężarnych,
 - chorób przewlekłych nerek,
 - niedoborów odporności,
 - chorób autoimmunologicznych,
 - łożysk przoduujących,
 - FGR i SGA,
 - małowodzie,
 - wielowodzie.
- Porody z ciąż uzyskanych w wyniku in vitro
 - wykrycie u płodów następujących nieprawidłowości:
 - wady anatomiczne lub dysmorfie płodu,
 - aberracje chromosomowe i zespoły genetyczne rozpoznane perinatalnie,
 - zgon wewnątrzmaciczny płodu.

Wszystkie pacjentki zostały wyczerpująco poinformowane o celu i przebiegu badania oraz wyraziły zgodę na udział w badaniu. Przed przeprowadzeniem badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Rzeszowskiego (Nr. 90/B/2016 oraz Nr. 5/10/2020).

8 METODYKA

W grupie badanej oraz grupie kontrolnej oceniono: wiek matek w chwili porodu, stan socjo-ekonomiczny pacjentek, temperatura ciała przy przyjęciu, tętno matki, ciśnienie tętnicze ciężarnej, wzrost matki, masę ciała sprzed ciąży i w chwili hospitalizacji, na podstawie których wyliczono odpowiednie BMI.

Oceniane parametry noworodkowe: FHR przy przyjęciu do szpitala, płeć urodzonego dziecka oraz masę urodzeniową noworodka. Na potrzeby oceny przeszłości położniczej pacjentek uzyskano informację na temat: liczby ciąż i poronień, liczby porodów o czasie zakończonych zarówno CC jak i PSN, liczby porodów przedwczesnych zakończonych zarówno CC jak i PSN, długości trwania ciąży do momentu porodu. Wśród badanej populacji oceniono wybrane choroby przewlekłe występujące przed ciążą i takie, które po raz pierwszy rozpoznano w ciąży. Wywiad w kierunku stosowania używek takich jak alkohol, nikotyna czy inne nielegalne środki

odurzające został przeprowadzony w odniesieniu do czasu sprzed ciąży, jak i w trakcie ciąży.

Ciąża obumarła w wywiadzie inaczej zwana wewnątrzmacicznym obumarciem płodu była definiowana jako zgon wewnątrzmaciczny płodu, który nastąpił przed opuszczeniem przez płód dróg rodnych kobiety po ukończeniu 22. tygodnia ciąży^{1,4}, aczkolwiek wiele doniesień z krajów anglojęzycznych stawia granicę pomiędzy poronieniem a obumarciem wewnątrzmacicznym płodu na 24. tygodnie ciąży⁵⁻⁷. Kontrowersje te wynikają z niskiej przeżywalności noworodków urodzonych z tak wczesnych ciąż.

Zakażenie układu moczowego było rozpoznawane wśród badanych pacjentek na podstawie zgłaszanych objawów klinicznych (dysuria, podwyższona temperatura ciała, objawy ostrego odmiedniczkowego zapalenia nerek (OOZN)) i wyników badań laboratoryjnych (posiew moczu, badanie ogólne moczu, badanie wykładników stanu zapalnego, takich jak leukocytoza i stężenie białka C-reaktywnego). Rozpoznanie stawiane było na podstawie wykrycia w posiewie moczu znamiennej bakteriurii^{175,176}:

- $\geq 10^3$ CFU*/ml u kobiety z objawami zapalenia pęcherza moczowego w próbce moczu ze środkowego strumienia
- $\geq 10^4$ CFU*/ml u kobiety z objawami OOZN w próbce moczu ze środkowego strumienia
- $\geq 10^5$ CFU*/ml w przypadku powikłanego ZUM w próbce moczu ze środkowego strumienia
- $\geq 10^2$ CFU*/ml w próbce moczu pobranej poprzez jednorazowe wprowadzenie cewnika do pęcherza moczowego
- $\geq 10^5$ CFU*/ml w próbce moczu ze środkowego strumienia u bezobjawowej pacjentki

*CFU - jednostek tworzących kolonie.

Bakteryjną waginozę pochwy rozpoznawano u pacjentek na podstawie kryteriów Amsela przy występowaniu 3 z 4 następujących objawów¹⁷⁷⁻¹⁷⁹:

- rzadka, biaława, jednorodna wydzielina z pochwy;
- komórki typu clue cells w obrazie mikroskopowym;
- pH wydzieliny pochwowej $>4,5$;

- wydzielający się rybi zapach po dodaniu 10% roztworu KOH do próbki zawierającej wydzielinę z pochwy.

Krwawienie w trakcie ciąży było rozpoznawane jako utrata jakiegokolwiek ilości krwi zgłaszanej przez pacjentkę na którymkolwiek z etapów ciąży.

Nadciśnienie tętnicze w ciąży (PH) było rozpoznawane zgodnie ze stanowiskiem Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego, Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego oraz Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników u pacjentek, które w 2 z 3 pomiarów ciśnienia tętniczego (przy odrzuceniu pierwszego pomiaru) wykazało wartości $\geq 140/90$ mmHg i było stwierdzane po raz pierwszy po 20 tygodniu ciąży bez towarzyszącego białkomoczu. Dodatkowe wystąpienie białkomoczu ($\geq 0,3$ g białka w 24 godzinnej zbiorce moczu lub wskaźnik białko/kreatynina $\geq 0,3$) powodowało rozpoznanie stanu przedrzucawkowego (PE)¹⁸⁰.

Na zespół HELLP składały się następujące objawy: niedokrwistość hemolityczna ($\text{LDH} \geq 600$ IU/l i/lub bilirubina we krwi $> 1,2$ mg%), podwyższenie enzymów wątrobowych ($\text{AspAT} \geq 70$ IU/l) i małopłytkowość ($< 100\ 000/\text{ml}$). Przy czym występowanie nadciśnienia tętniczego nie było warunkiem koniecznym do rozpoznania zespołu HELLP¹⁸⁰.

Cukrzycę ciężarnych (GDM) rozpoznawano zgodnie z wytycznymi Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników, Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego i Zaleceniami WHO^{181–184} u pacjentek spełniających ≥ 1 z następujących kryteriów:

- zmierzona glikemia na czczo wynosiła w przedziale od 5,1 do 6,9 mmol/l (92 - 125 mg/dl);
- zmierzona glikemia w pierwszej godzinie po doustnym obciążeniu 75 g glukozy (test OGTT) wynosiła ≥ 10 mmol/l (180 mg/dl);
- zmierzona glikemia w drugiej godzinie po doustnym obciążeniu 75 g glukozy (test OGTT) wynosiła od 8,5 do 11,0 mmol/l (153 - 199 mg/dl).

Zgodnie z powyższymi zaleceniami^{181–184} cukrzyca przedciążowa (PGDM) i cukrzyca rozpoznana w ciąży była stwierdzana, gdy spełnione były ≥ 1 z następujących kryteriów:

- dwukrotnie zmierzona glikemia na czczo $\geq 7,0$ mmol/l (126 mg/dl);

- glikemia przygodna wynosiła $\geq 11,1$ mmol/l (200 mg/dl) i pacjentce towarzyszyły objawy hiperglikemii;
- pomiar glikemii w drugiej godzinie po doustnym obciążeniu 75 g glukozy (test OGTT) wynosił $\geq 11,1$ mmol/l (200 mg/dl).

W celu określenia ekspresji receptorów kanabinoidowych CB1, CB1a, oraz CB2 w łożyskach, bezpośrednio po zakończeniu III okresu porodu i wydaleniu płodu, z łożysk pobierano 4 wycinki; po jednym z każdego kwadrantu, z miejsc makroskopowo niezmienionych. Wycinki umieszczano w RNA - Later na okres 24 godzin, po czym po osuszeniu mrożono materiał w temperaturze -80°C .

Otrzymane wyniki porównano do ekspresji genów referencyjnych GAPDH (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego) i ACT (β -aktyna). Wszystkie pomiary ekspresji genów powtórzono wielokrotnie (łącznie wykonano 452 powtórzeń pomiarów receptora CB1, CB1a i CB2) i z uzyskanych wartości zostały wyliczone średnie ekspresje poszczególnych receptorów wraz z odchyleniami standardowymi (SD) i zakresem zmiennych (wartość minimalna - maksymalna).

Oznaczenie ekspresji receptorów kanabinoidowych zostało wykonane dzięki uprzejmości zespołu specjalistów Laboratorium Badań Transplantacyjnych w Medycynie Przyrodniczo-Medycznego Centrum Badań Innowacyjnych Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Rzeszowskiego pod kierownictwem profesora dr hab. n. med. Jacka Tabarkiewicza.

W tym celu użyto następujących technik: izolacji RNA, w dalszej kolejności odwrotnej transkrypcji (RT) i reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR).

8.1 IZOLACJA RNA

Całkowita ilość RNA została wyizolowana z tkanki łożyskowej przy pomocy Gene MATRIX Universal RNA Purification Kit (EurX, Gdansk, Poland) wspomagana przy pomocy TRI-reagenta (fenol zrównoważony i stabilizowany : chloroform : alkohol izoamylowy 25:24:1) (AppliChem GmbH, Darmstadt, Germany) i β -mercaptoethanolu (Acros Organics, New Jersey, USA). Cały proces izolacji RNA był przeprowadzony zgodnie z protokołem stworzonym przez producenta. 3 mg każdej z próbek zostało zhomogenizowane przy użyciu gentleMACS M Tubes (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch

Gladbach, Germany) i gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). Całkowita zawartość RNA zmierzono przy pomocy spektrofotometru Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA). Tak przygotowany materiał został zabezpieczony do oznaczeń w temperaturze -80°C.

8.2 ODWROTNA TRANSKRYPCJA (RT)

Następnym krokiem po dokonaniu izolacji RNA było wyizolowanie gDNA i odwrotną transkrypcję odpowiednich genów przy pomocy QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). 1 µg RNA był transkrybowany do 20 µg cDNA. Wszystkie reakcje były przeprowadzone na lodzie. Inkubacja w trakcie przeprowadzania odwrotnej transkrypcji została przeprowadzona przy pomocy Labcycler 48 (SensoQuest GmbH, Göttingen, Germany). Uzyskany cDNA został zabezpieczony do oznaczeń w temperaturze -80°C.

8.3 REAKCJA ŁAŃCUCHOWA POLIMERAZY W CZASIE RZECZYWISTYM (REAL - TIME PCR)

Procedura reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR) została przeprowadzona przy pomocy termocyklera Roche LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics Ltd, Basel, Switzerland) i dodatkowo przy pomocy Power-Up SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, California, USA). Celem badania było zlokalizowanie następujących genów *CNR1*, *CNR1a* i *CNR2*, które odpowiedzialne są za ekspresję odpowiednich receptorów CB1, CB1a i CB2. W celu weryfikacji zrobionych pomiarów użyto genów referencyjnych (*REF*). Geny te charakteryzują się niezmienną ekspresją na różnych etapach rozwoju, w różnych warunkach przeprowadzanego eksperymentu, dlatego są dobrym źródłem do porównania ekspresji innych genów, na przykład genów receptorów kanabinoidowych, badanych w przeprowadzonym badaniu. Dodatkowo geny te wykorzystywane są do normalizacji poziomów mRNA między próbkami w ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją (qRT-PCR). Żeby gen był użyty jako REF niezbędna jest jego walidacja, która służy do potwierdzenia stałości ekspresji w komórkach. Do takich genów, które przeszły proces walidacji zaliczamy gen dla *GAPDH* (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego) i *ACTB* (β-aktyna), które zostały użyte w przeprowadzonym badaniu jako wartości referencyjne. Dla każdej

pojedynczej reakcji użyto 1 µl cDNA. Odpowiednie do badanych genów primery zostały użyte w stężeniu 10 µM. Rodzaje użytych primerów zostały umieszczone w Tabeli 1.

Tabela 1. Sekwencje primerów (5' - 3').

Gen docelowy	Sekwencje primerów (5' - 3')
<i>ACTB</i>	F: 5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3' R: 5'-GTAACAACGCATCTCATATTTGGAA-3'
<i>GAPDH</i>	F: 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3' R: 5'-TGATGGCATGGACTGTGGTCAT-3'
<i>CNR1</i>	F: 5'-TCATTAAGACGGTGTTTGCATTCT-3' R: 5'-CGTGTCGCAGGTCCTTACTC-3'
<i>CNR1a</i>	F: 5'-TGCAGAGCTCTCCGTAGTCA-3' R: 5'-TGGTCCTCGGGACAGAAG-3'
<i>CNR2</i>	F: 5'-TCATCTACACCTATGGGCATGTTCT-3' R: 5'-CCTCATTCGGGCCATTCC-3'

Przebieg procesu Real-Time PCR został poprzedzony standardowymi przygotowaniem. Program służący do przeprowadzenia reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym polega na aktywacji UDG (glikozydaza DNA uracylu) na początku w 50 °C przez 2 minuty. Następnie doprowadzano do rozpoczęcia procesu denaturacji w temperaturze 95 °C przez 2 min. Kolejnym etapem były 45 cykli denaturacji w temperaturze 95 °C przez 15 sekund plus hartowanie w temperaturze 60 °C przez 1 minutę. Ostatnim etapem wykorzystana została analiza krzywej topnienia w celu weryfikacji specyficzności reakcji PCR. Względny poziom ekspresji receptorów został porównany do genów referencyjnych przy użyciu algorytmu $2^{-\Delta Ct}$ i $1/\Delta Cp$, gdzie ΔCp została określona jako różnica pomiędzy średnią wartością ekspresji (Cp) badanego receptora (CB1, CB1a lub CB2), a średnią ekspresją genu referencyjnego (REF).

Do obliczenia danych statystycznych użyto pakietu statystycznego StatSoft, Inc. (2020). STATISTIKA (data analysis software system), wersja 13.3, oraz arkusza kalkulacyjnego Microsoft Excel.

Zmienne, układające się na skali ilościowej (interwałowej) zostały przedstawione za pomocą średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego, a także zakresu wartości minimalnej i maksymalnej. Z kolei zmienne układające się na skali jakościowej (nominalnej) zostały scharakteryzowane przy użyciu liczności i wartości procentowej wyliczonej z ilości pacjentek przydzielonych do odpowiedniej z grup: badanej i kontrolnej.

W celu oceny, obecności rozkładu normalnego w obrębie zmiennych przedstawianych na skali interwałowej użyto testu Shapiro-Wilka. Z kolei w dalszej kolejności w celu potwierdzenia hipotezy różnych wariacji grupy badanej i kontrolnej posłużono się testem Levena.

Obecność istotniej korelacji pomiędzy dwoma grupami przedstawionymi na skali ilościowej w populacji o rozkładzie normalnym i o różnych wariacjach w obrębie grup została policzona przy pomocy testu Cochran-Cox'a. Natomiast zależność pomiędzy dwoma grupami przedstawionymi na skali ilościowej w populacji o takich samych wariacjach w obrębie obydwu grup policzono, używając testu t-studenta. W przypadku zmiennych w obrębie dwóch grup przedstawionych na skali porządkowej i zmiennych przedstawionych na skali ilościowej rozkładzie różnym od normalnego istotność statystyczną obliczono przy pomocy testu nieparametrycznego U Mann-Whitney'a (brak spełnienia warunków zastosowania testu t-studenta bądź Cochran-Cox'a). Istotność statystyczną w obrębie zmiennych przedstawionych na skali jakościowej obliczono przy pomocy testu chi-kwadrat. W celu stwierdzenia powiązania siły oraz kierunku między zmiennymi zastosowano analizę korelacji przy pomocy współczynników Pearsona lub/i Spearman'a. W celu obliczenia korelacji pomiędzy poszczególnymi czynnikami wykonano analizę regresji logistycznej i policzono OR (iloraz szans). We wszystkich obliczeniach istotne statystycznie wyniki uznano przy korelacji $p \leq 0.05$.

9 WYNIKI

9.1 CHARAKTERYSTYKA BADANEJ POPULACJI.

Tabela 2. Charakterystyka badanych grup.

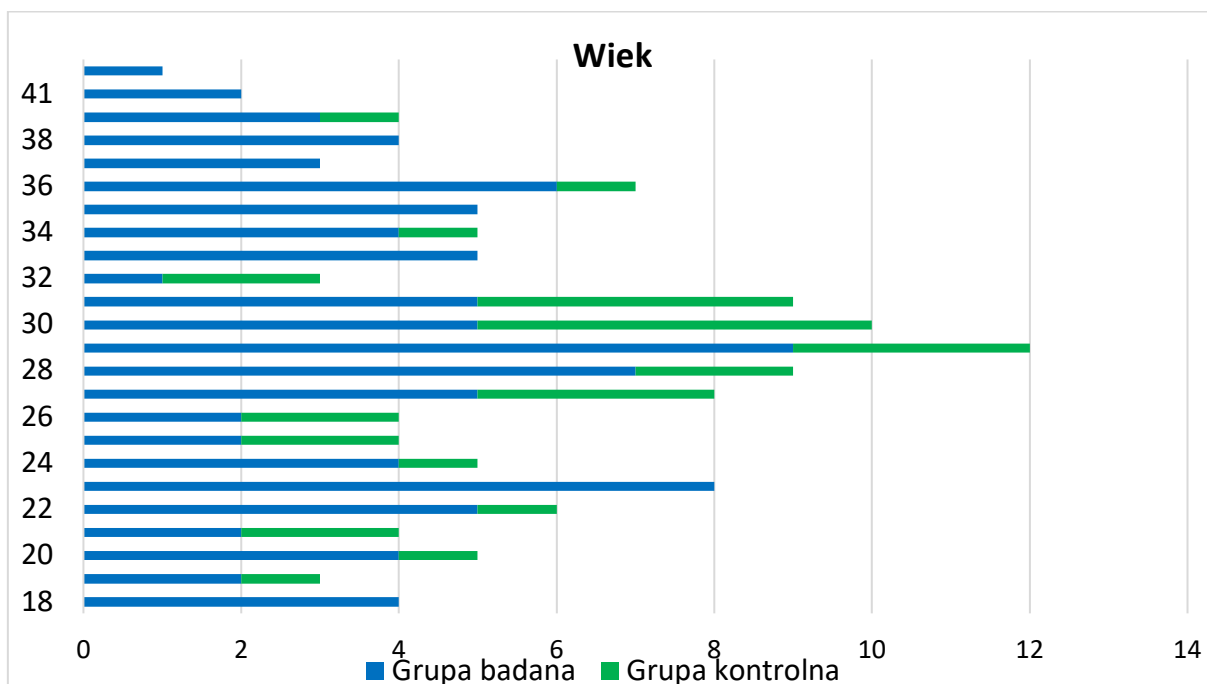
Badany czynnik	Badane parametry	Grupa badana (n=115)	Grupa kontrolna (n=35)	p
Wiek pacjentek [lata]	średnia	28,8	28,3	0,42
	SD	6,2	4,7	
	min-max	18 - 42	19 - 39	
Która ciąża	średnia	2,1	1,8	0,52
	SD	1,5	0,9	
	min-max	1 - 9	1 - 5	
Wiek ciąży [tygodnie]	średnia	31,1	39,2	<0,001
	SD	3,8	1,5	
	min-max	21 - 36,6	37 - 41,7	
Masa ciała noworodka [g]	średnia	1725	3337	<0,001
	SD	780	498	
	min-max	400 - 3940	2150 - 4540	
Wzrost pacjentki [cm]	średnia	164,2	166,6	0,056
	SD	5,4	5,5	
	min-max	150 - 176	154 - 176	
Masa ciała pacjentki w chwili przyjęcia [kg]	średnia	68,6	74,2	0,015
	SD	10,7	12,0	
	min-max	45 - 103	47 - 95	

Badany czynnik	Badane parametry	Grupa badana (n=115)	Grupa kontrolna (n=35)	p
Masa ciała pacjentki przed ciążą [kg]	średnia	60,5	60,7	0,87
	SD	9,9	9,9	
	min-max	39 - 84	46 - 81	
BMI w chwili przyjęcia [kg/m ²]	średnia	25,6	26,7	0,2
	SD	4,4	4,3	
	min-max	18 - 40,7	18,8 - 35,9	
BMI przed ciążą [kg/m ²]	średnia	21,8	21,9	0,97
	SD	3,9	3,4	
	min-max	15,6 - 35,6	16,1 - 26,8	
Temperatura ciała w chwili przyjęcia	średnia	36,7	36,5	0,023
	SD	0,4	0,4	
	min-max	35,4 - 37,8	35,4 - 37,4	
Hgb w chwili przyjęcia	średnia	11,5	12,2	0,011
	SD	1,07	1,04	
	min-max	8 - 14,7	10,5 - 14,4	
Hct w chwili przyjęcia	średnia	34,4	36,2	0,017
	SD	5,7	3,6	
	min-max	25 - 78,1	29,8 - 43,6	
Średnie FHR w chwili przyjęcia	średnia	144,5	142,1	0,58
	SD	8,6	6	
	min-max	110 - 171	130 - 156	
	średnia	15,8	2,5	0,0078

Badany czynnik	Badane parametry	Grupa badana (n=115)	Grupa kontrolna (n=35)	p
CRP w chwili przyjęcia	SD	29,1	2,5	
	min-max	0,1 - 218,5	0,5 - 7,7	
MAP w chwili przyjęcia	średnia	89,4	90,6	0,47
	SD	8,25	7,85	
	min-max	73,3 - 112,0	78,0 - 110,3	
HR w chwili przyjęcia	średnia	80,9	79,8	0,5
	SD	8,6	9,8	
	min-max	60 - 106	60 - 109	
pH pochwy w chwili przyjęcia	średnia	6,17	4,5	0,0028
	SD	1,08	0,35	
	min-max	4 - 8,6	4 - 5	
WBC w chwili przyjęcia	średnia	547,9	439,2	0,0029
	SD	3175	2100	
	min-max	0,77 - 26000	7,3 - 10300	

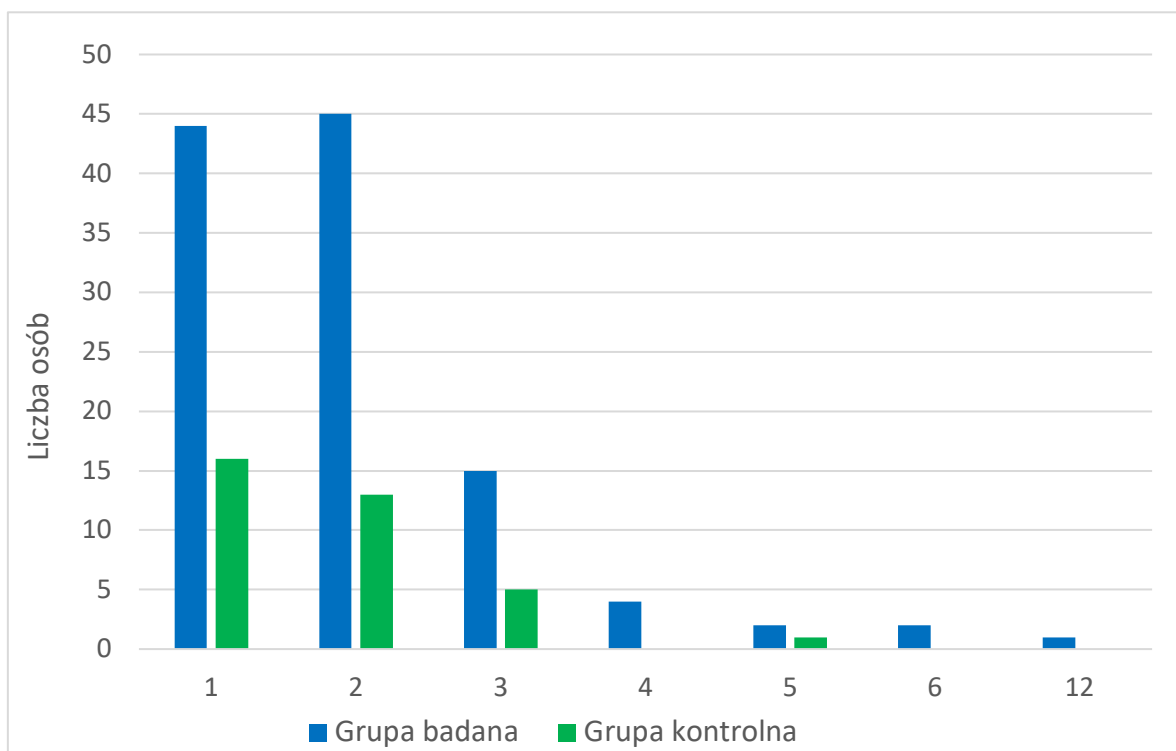
p - (prawdopodobieństwo) porównanie grupy badanej z grupą kontrolną.

SD - odchylenie standardowe



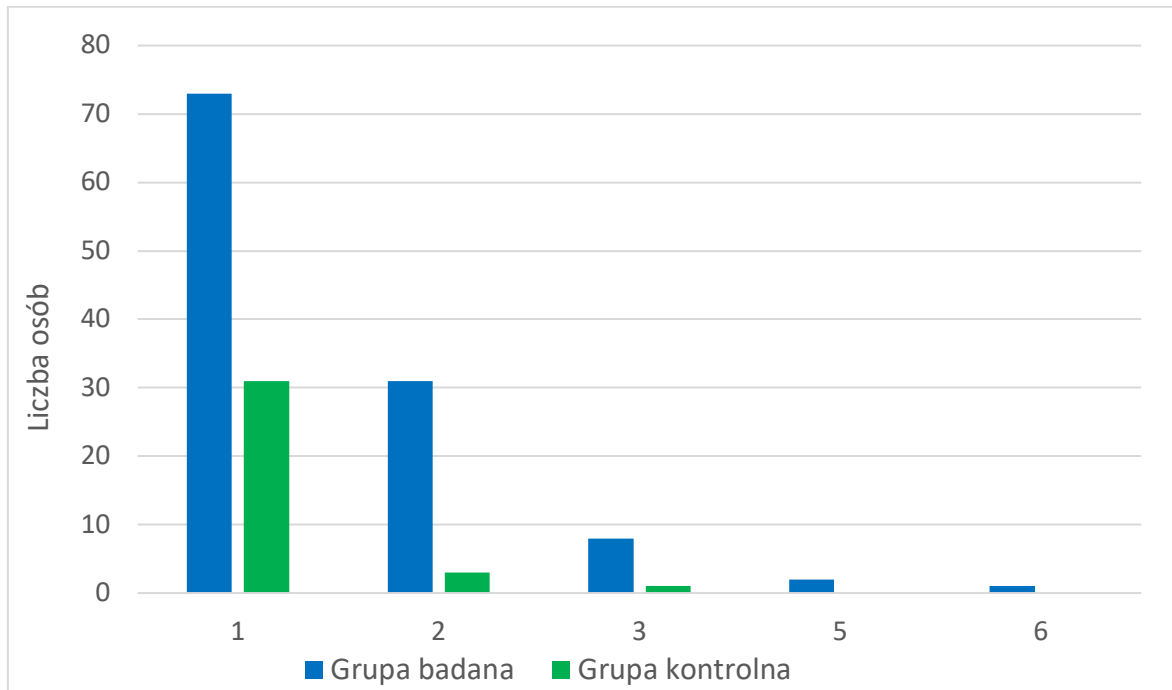
Rycina 1. Rozkład wieku wśród badanej grupy pacjentek.

Średni wiek ciężarnych w chwili porodu nie różnił się statystycznie pomiędzy grupą badaną, a kontrolną i wynosił odpowiednio $29 \pm 6,3$ lat v.s. $28,2 \pm 4,5$ lat ($p=0,48$; OR = 1,025 (95%CI: 0,96 - 1,1). Kobiety w wieku powyżej 34. roku życia stanowiły 14,8% pacjentek zakwalifikowanych do grupy badanej, w porównaniu do 8,6% pacjentek z grupy kontrolnej.



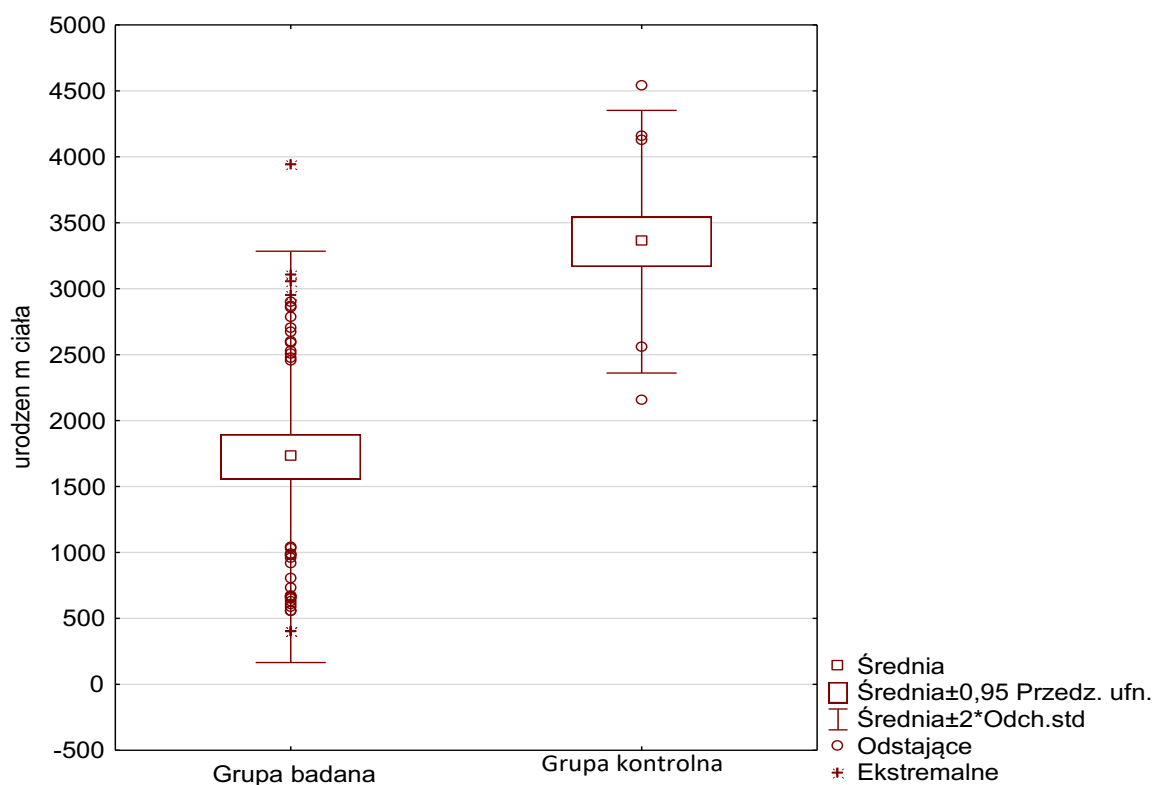
Rycina 2. Struktura badanej populacji w zależności od liczby przebytych ciąż.

Średnia ilość ciąż w wywiadzie w grupie badanej i kontrolnej nie różniły się statystycznie.



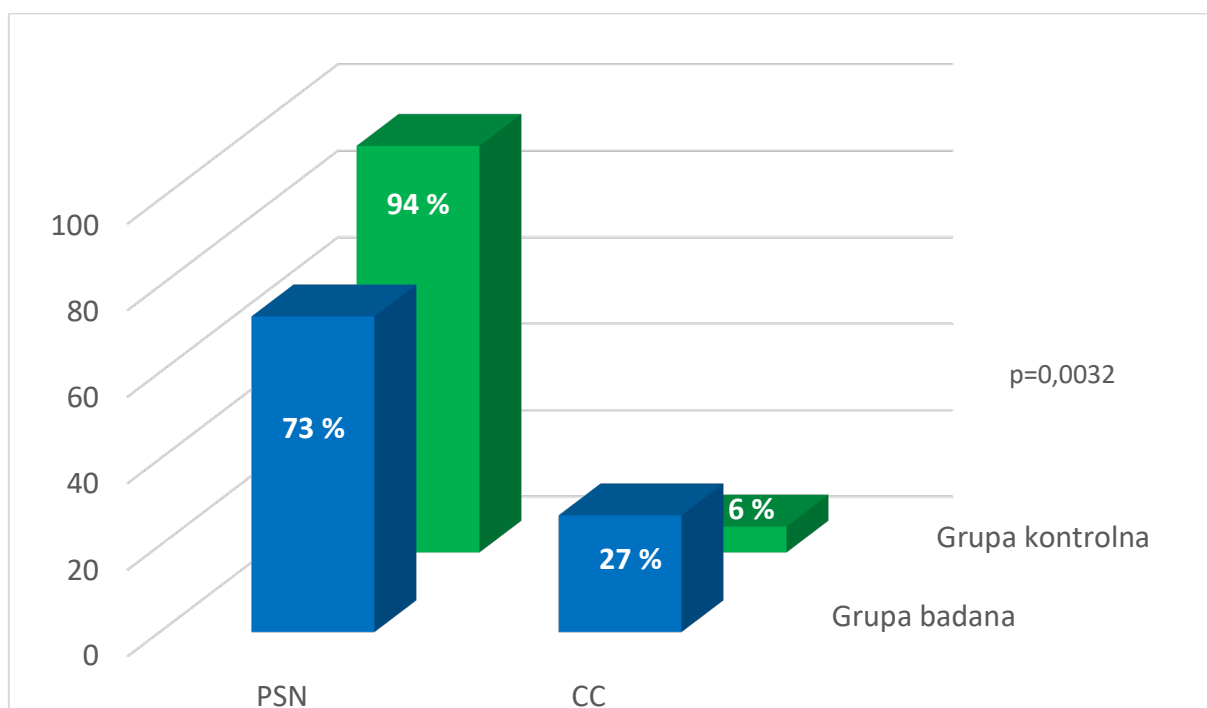
Rycina 3. Struktura badanej populacji w zależności od liczby przebytych porodów.

Średnia liczba odbytych porodów w grupie badanej i kontrolnej wynosiły odpowiednio: $1,5 \pm 0,88$ v.s. $1,1 \pm 0,43$ ($p=0,024$).



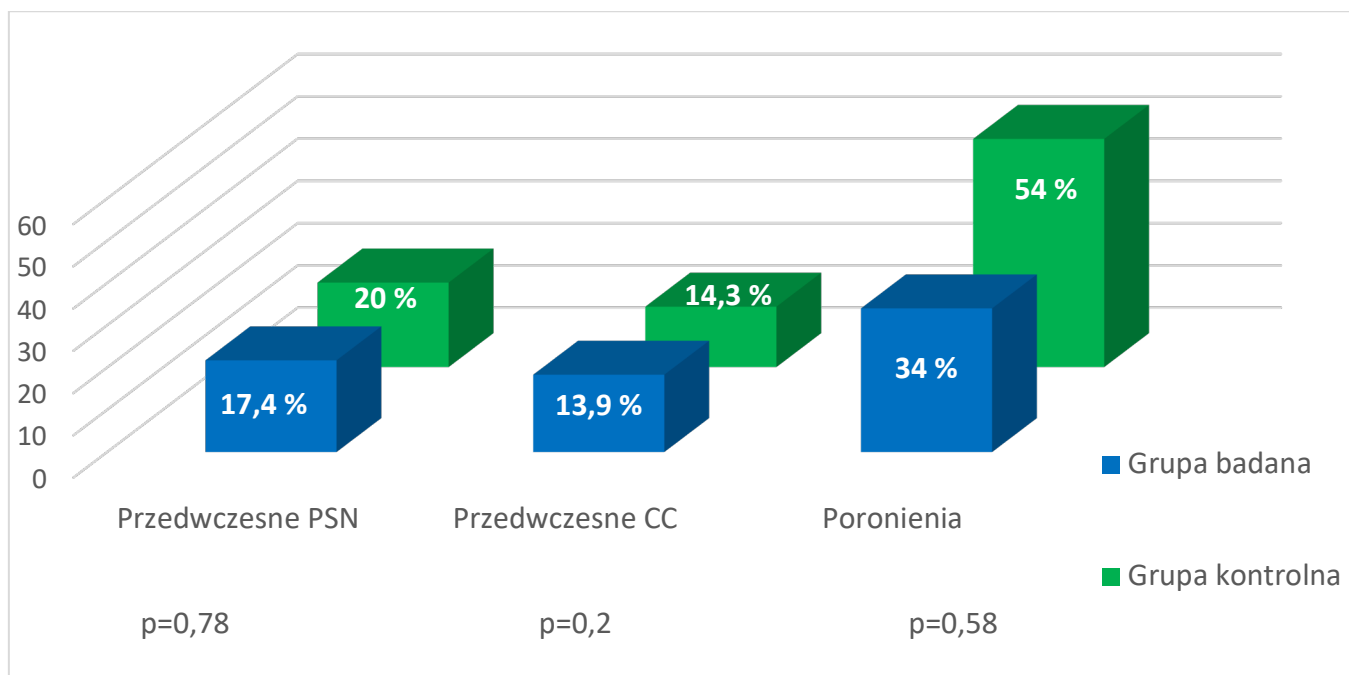
Rycina 4. Masa ciała noworodków.

Średnie masy ciała noworodków w grupie badanej i kontrolnej wynosiły odpowiednio: 1725 g. v.s. 3337 g ($p < 0.00001$).



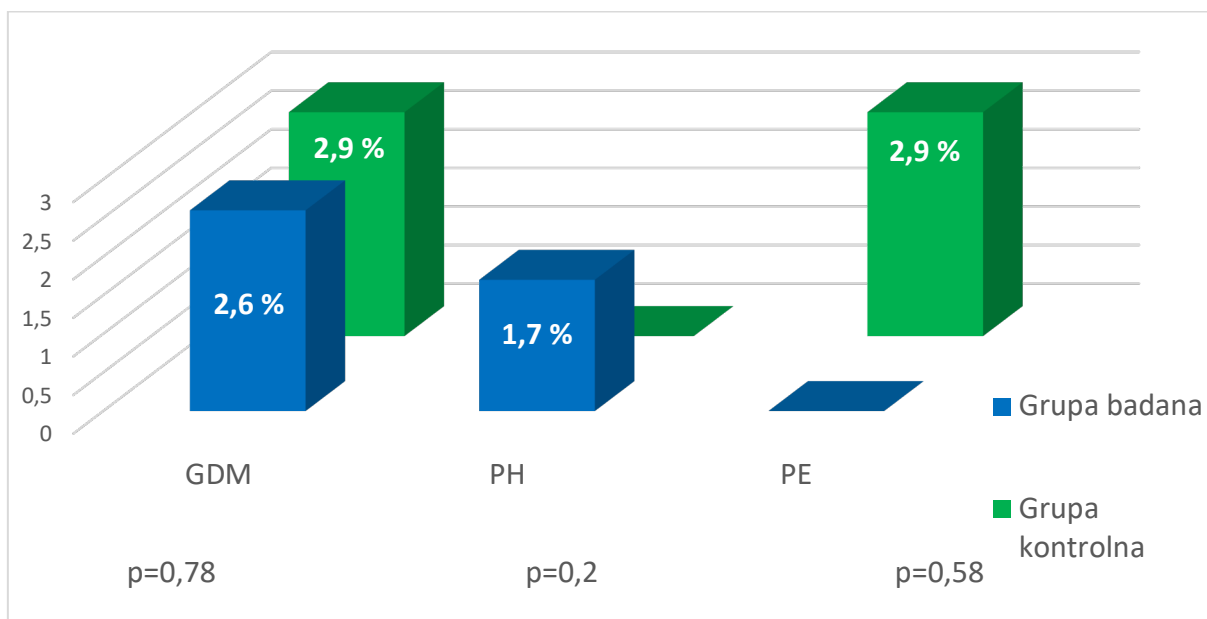
Rycina 5. Sposób ukończenia ciąży.

Ciąże w grupie badanej istotnie częściej kończyły się cięciem cesarskim 27% w porównaniu do grupy kontrolnej 6% OR = 5,79 (95%CI: 2,3 - 14,8) (p=0,0032).



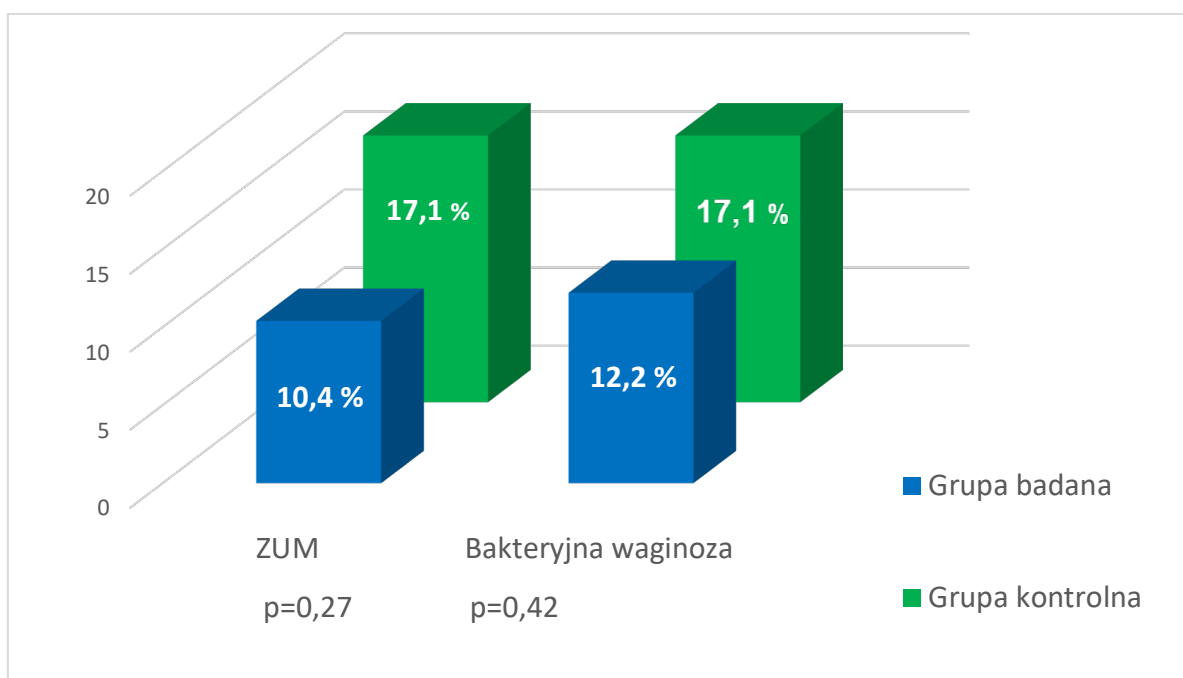
Rycina 6. Wywiód położniczy.

Obciążony wywiód położniczy porodów zakończonych zarówno drogami i siłami natury, jak i drogą cięcia cesarskiego zgłosiło 40% pacjentek z grupy badanej i 34,3% w grupie kontrolnej (p=0,78). Wystąpienie jednego porodu przedwczesnego zakończonego CC występowało w 16,2% pacjentek z grupy badanej v.s. 8,6% pacjentek z grupy kontrolnej i było statystycznie związane z wystąpieniem porodu przedwczesnego OR = 9,3 (95%CI: 1,2 - 72,9) (p=0,033).



Rycina 7. Choroby ciążarnych.

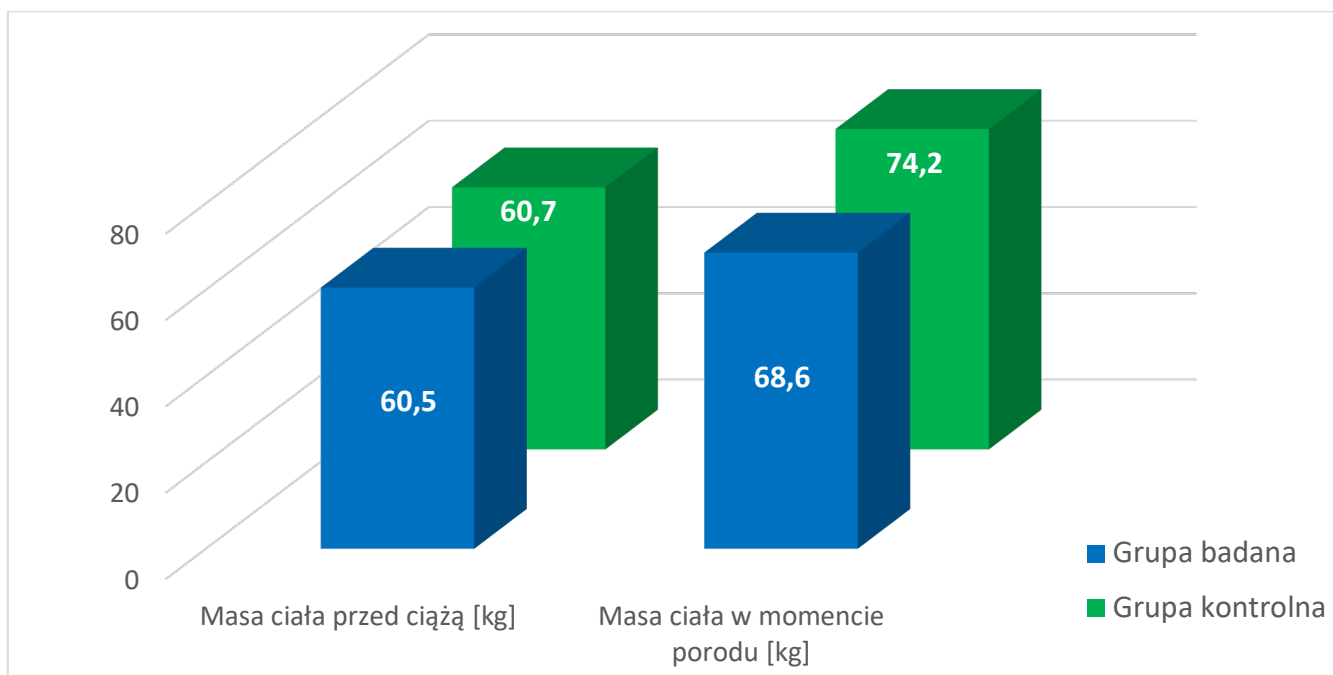
Wystąpienie chorób w trakcie ciąży takich jak cukrzyca ciążarnych, nadciśnienie tętnicze w ciąży, czy stan przedrzucawkowy nie były statystycznie powiązane z występowaniem porodu przedwczesnego.



Rycina 8. Infekcje układu moczowo-płciowego.

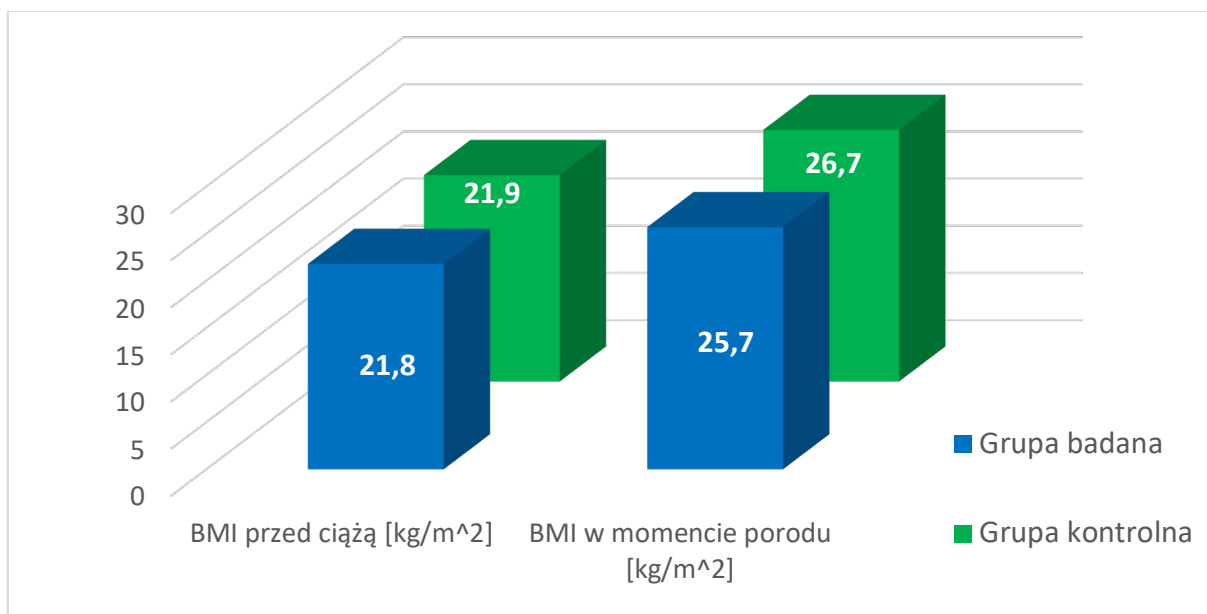
Infekcje układu moczowego wystąpiły u 10,5% grupy badanej v.s. 17,1% w grupie kontrolnej (p=0,27). Natomiast na bakteryjną waginozę cierpiało

12,2% v.s. 17,1% pacjentek ($p=0,42$). Powyższe nieprawidłowości nie były istotnie związane z porodem przedwczesnym.



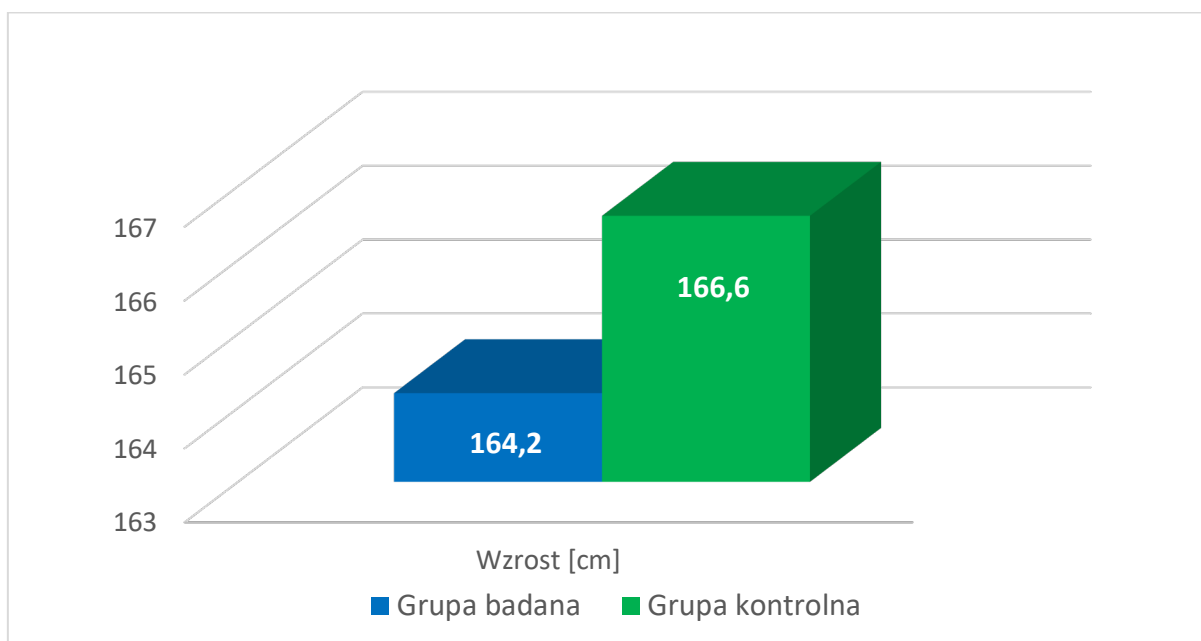
Rycina 9. Masa ciała badanej populacji.

Kryterium rozkładu normalnego zostało spełnione dla masy ciała ciężarnej sprzed ciąży. Natomiast nie wykazano istotniej różnicy w obrębie tych wartości w odróżnieniu do masy w chwili porodu, która była zdecydowanie mniejsza u pacjentek rodzących przedwcześnie ($p=0,046$), OR = 0,96 (95%CI 0,93 - 0,99).



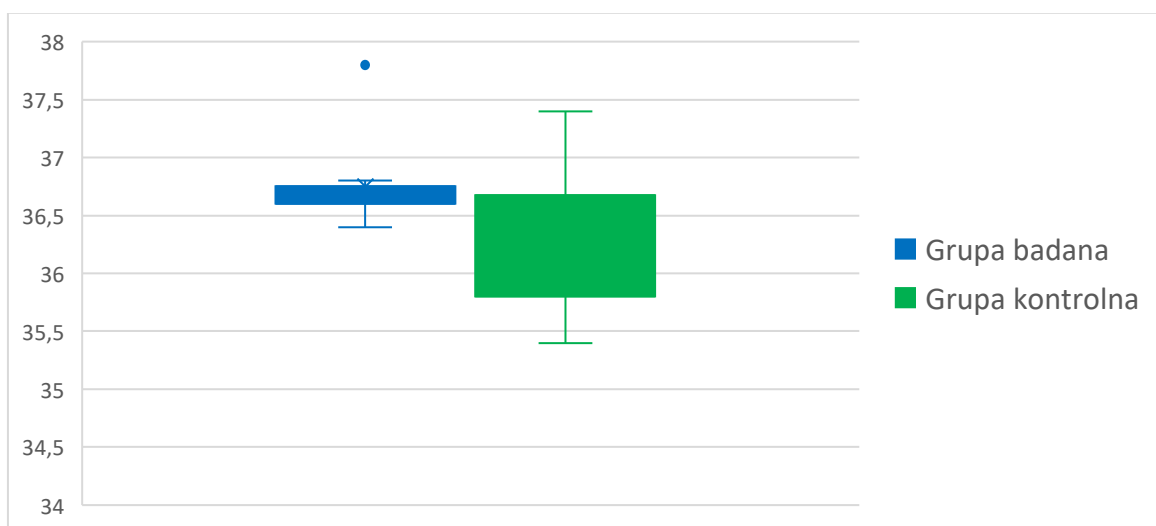
Rycina 10. BMI badanej populacji.

Porównanie BMI sprzed ciąży i przed porodem nie wykazały istotnych różnic pomiędzy grupami i wynosiły odpowiednio 21,8 v.s. 21,9 przed ciążą ($p=0,97$) i 25,7 v.s. 26,7 ($p=0,2$) przed porodem.



Rycina 11. Wzrost pacjentek.

Pacjentki z grupy badanej były nieco niższe i mierzyły średnio 164,2 cm w porównaniu do grupy kontrolnej, których wzrost wynosił średnio 166,6 cm. Różnice wzrostu były granicznie istotne ($p=0,056$).

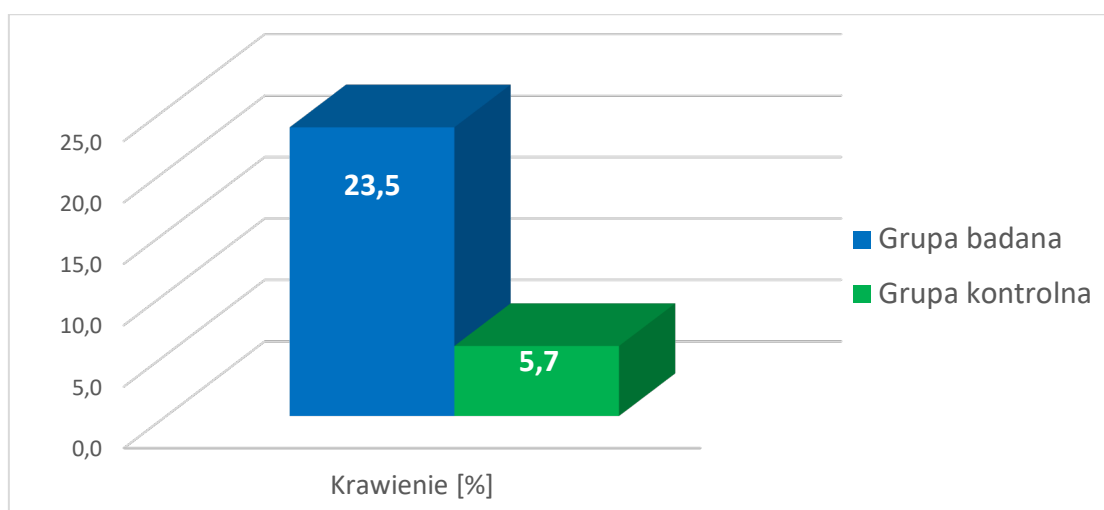


Rycina 12. Temperatura ciała rodzących przy przyjęciu do szpitala [°C].

Pacjentkom w grupie badanej częściej towarzyszyły wykładniki stanu zapalnego, mierzone w przeprowadzonym badaniu przy pomocy pomiarów temperatury ciała, białka C-reaktywnego (CRP) i poziomu leukocytów we krwi (WBC).

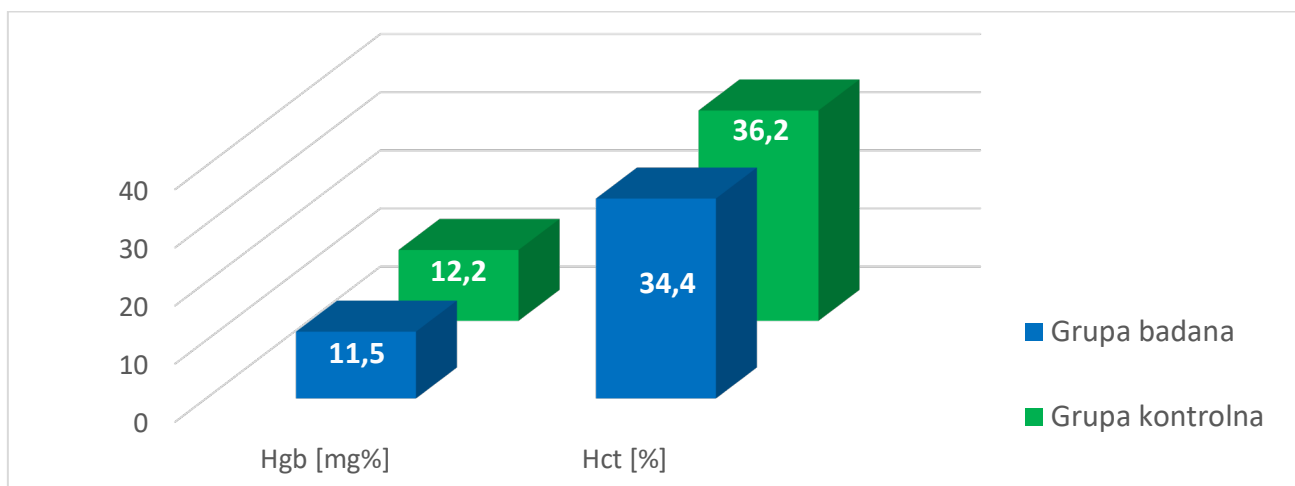
Wyższa temperatura ciała statystycznie częściej występowała w grupie badanej i wynosiła średnio 36,7 °C w porównaniu do średniej temperatury ciała w grupy kontrolnej, gdzie średnie wartości temperatury ciała wynosiły 36,4 °C ($p=0,023$), natomiast zależność ta nie była istotna przy ocenie regresji logistycznej.

Zarówno CRP jak i WBC miały wyższe wartości u pacjentek w grupie badanej. W grupie badanej CRP wynosiło średnio 15,8 v.s. 2,5 w grupie kontrolnej ($p=0,0078$), co zostało także wykazane w wyniku regresji logistycznej $OR = 1,43$ (95%CI: 1,0 - 2,05). Podobnie średnie wartości WBC wynosiły w grupie badanej 547,9 v.s. 439,2 w grupie kontrolnej ($p=0,0029$), lecz wyniku wykonanej regresji logistycznej nie wykazano istotnej zależności $OR = 1$ (95%CI: 0,999 - 1,0).



Rycina 13. Krwawienie w ciąży.

U pacjentek w grupie badanej częściej w chwili przyjęcia do szpitala rozpoznano krwawienie z dróg rodnych i obserwowano je u 23,5% pacjentek z grupy badanej i 5,7% pacjentek w grupie kontrolnej $OR=5,06$ (95%CI: 1,14 - 22,49) ($p=0,01$).

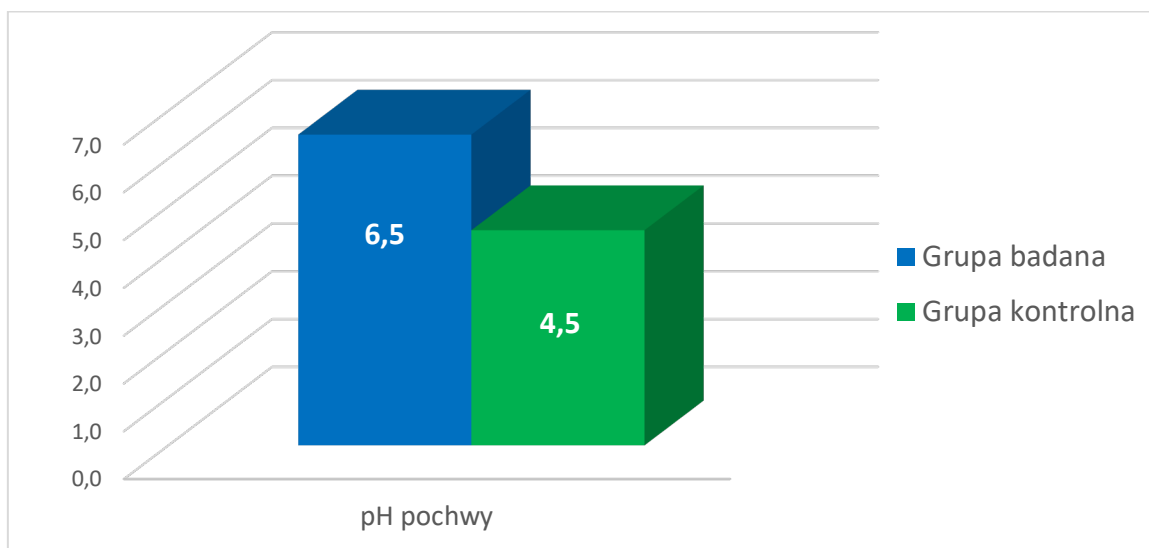


Rycina 14. Hemoglobina i Hematokryt badanej populacji.

Stężenie Hemoglobiny (Hgb) i hematokryt (Hct) prezentowały istotnie niższe wartości w grupie badanej. Średnie Hgb wynosiło w grupie badanej 11,5 mg/dl, a w grupie kontrolnej 12,2 mg/dl ($p=0,01$), natomiast wyniku wykonanej regresji logistycznej nie wykazano statystycznej zależności pomiędzy Hgb i porodem przedwczesnym OR = 1,01 (95%CI: 0,97 - 1,06). Średnie wartości Hct w grupie badanej wynosiło 34,4 v.s. 36,2 w grupie kontrolnej ($p=0,017$), lecz również w wyniku regresji logistycznej nie było statystycznie związane z wystąpieniem porodu przedwczesnego OR = 1,0 (95%CI: 0,998 - 1,0).

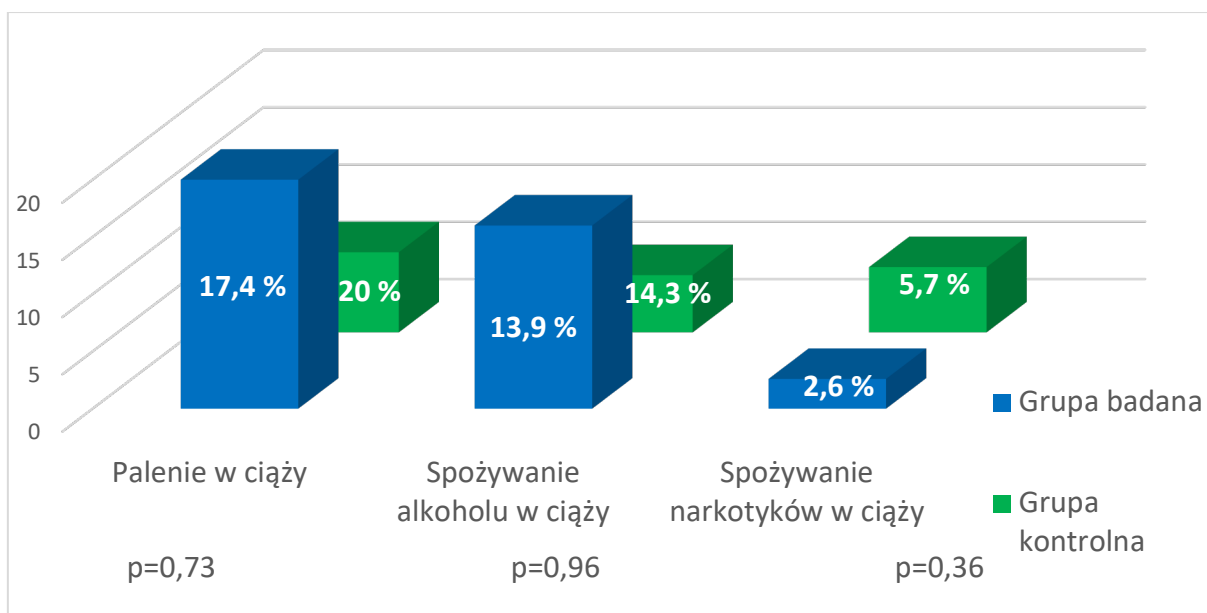
Podstawowe parametry życiowe nie różniły się istotnie w obrębie populacji pacjentek. Średnie skurczowe ciśnienie tętnicze wynosiło w grupie badanej 89,4 mmHg i 90,6 w grupie kontrolnej ($p=0,52$).

Średnia czynność akcji serca (HR) przy przyjęciu w grupie badanej wynosiła 80,9 uderzeń/minutę v.s. 79,8 uderzeń/minutę w grupie kontrolnej ($p=0,5$).



Rycina 15. pH pochwy pacjentek przy przyjęciu.

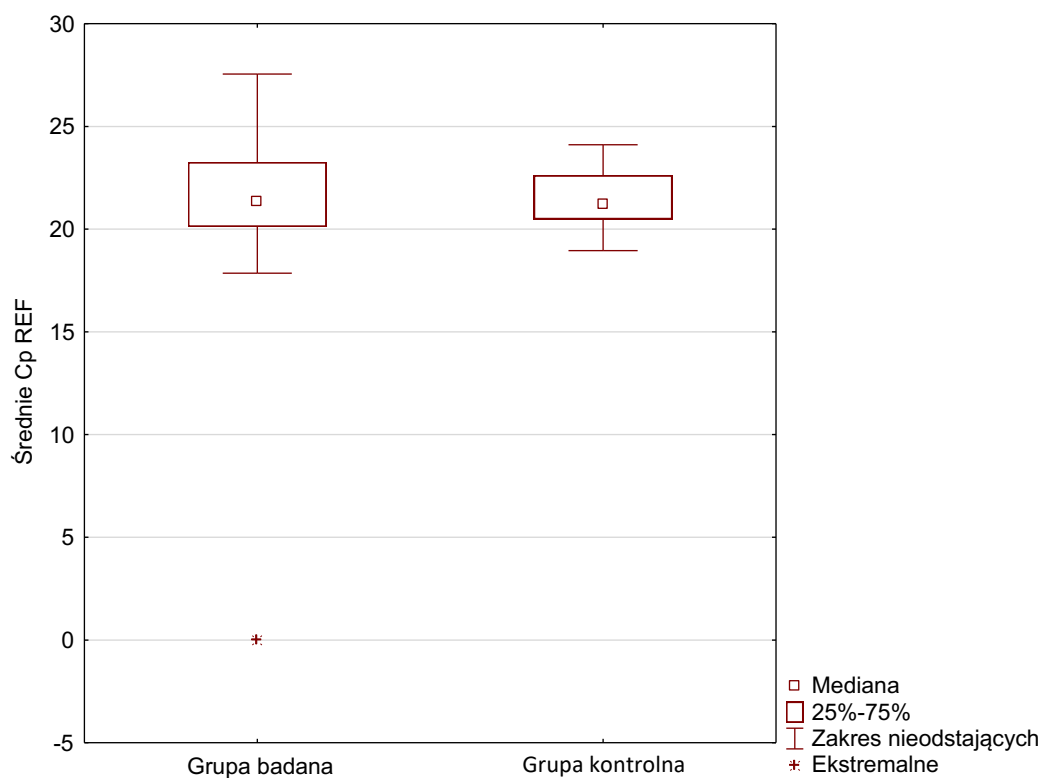
W grupie badanej pH pochwy było statystycznie wyższe i wynosiło średnio 6,17 w porównaniu do grupy kontrolnej, w której wynosiło średnio 4,5 ($p=0,0028$). Ta różnica wynika z faktu, iż w badanej grupie były pacjentki z odpływaniem płynu owodniowego, co istotnie zawyżyło średnie pH pochwy pacjentek.



Rycina 16. Stosowanie używek w trakcie ciąży.

Stosowanie używek takich jak alkohol, nikotyna czy inne środki odurzające było oceniane zarówno przed ciążą jak i w trakcie jej trwania. Analiza statystyczna nie wykazała istotnej różnicy w przyjmowaniu używek przez badane grupy pacjentek.

9.2 EKSPRESJA GENÓW

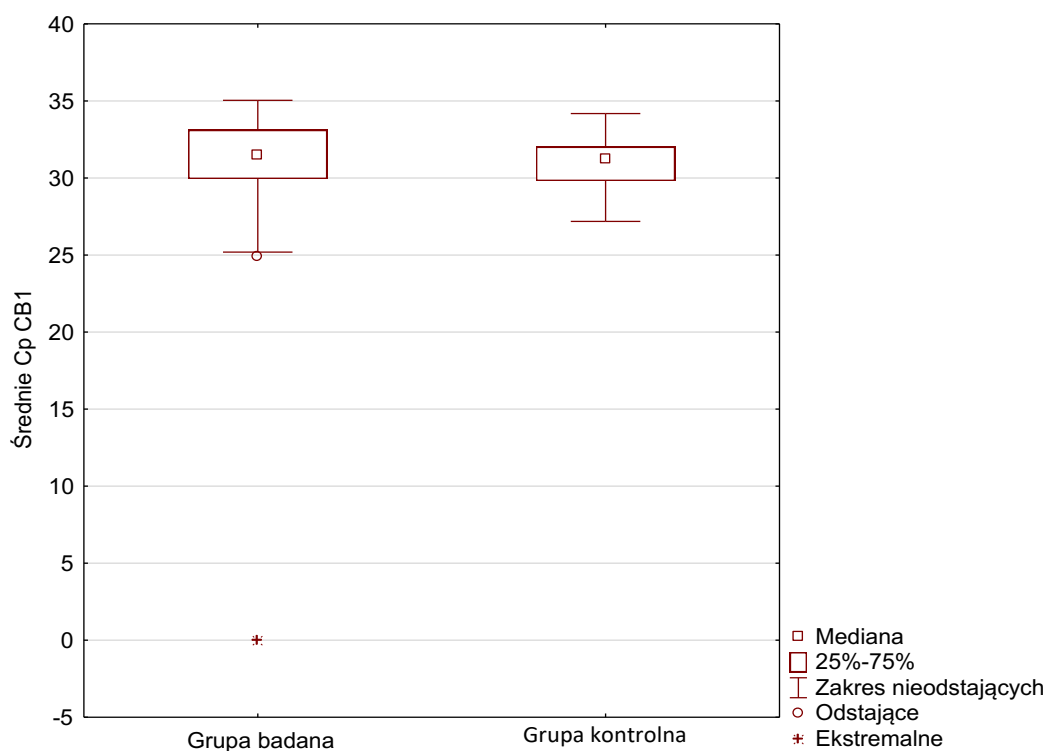


Rycina 17. Ekspresja genów referencyjnych.

Ekspresję badanych genów porównywano do genów referencyjnych, których ekspresja nie różniła się istotnie w obrębie grup.

Tabela 3. Ekspresja receptora CB1 w badanych łożyskach.

	Grupa badana (n=115)		Grupa kontrolna (n=35)		
	Średnia Cp $\pm$ SD	Zakres (min-max)	Średnia Cp $\pm$ SD	Zakres (min-max)	p-value
CB1	31.1 $\pm$ 3.6	0 - 35.0	31.1 $\pm$ 1.8	27.2 - 34.2	0.47
REF	21.5 $\pm$ 2.8	0 - 27.6	21.7 $\pm$ 1.4	18.9 - 24.1	0.43
1/ Δ Cp CB1	0.1 $\pm$ 0.1	-0.04 - 0.9	0.1 $\pm$ 0.03	0.07 - 0.2	0.49

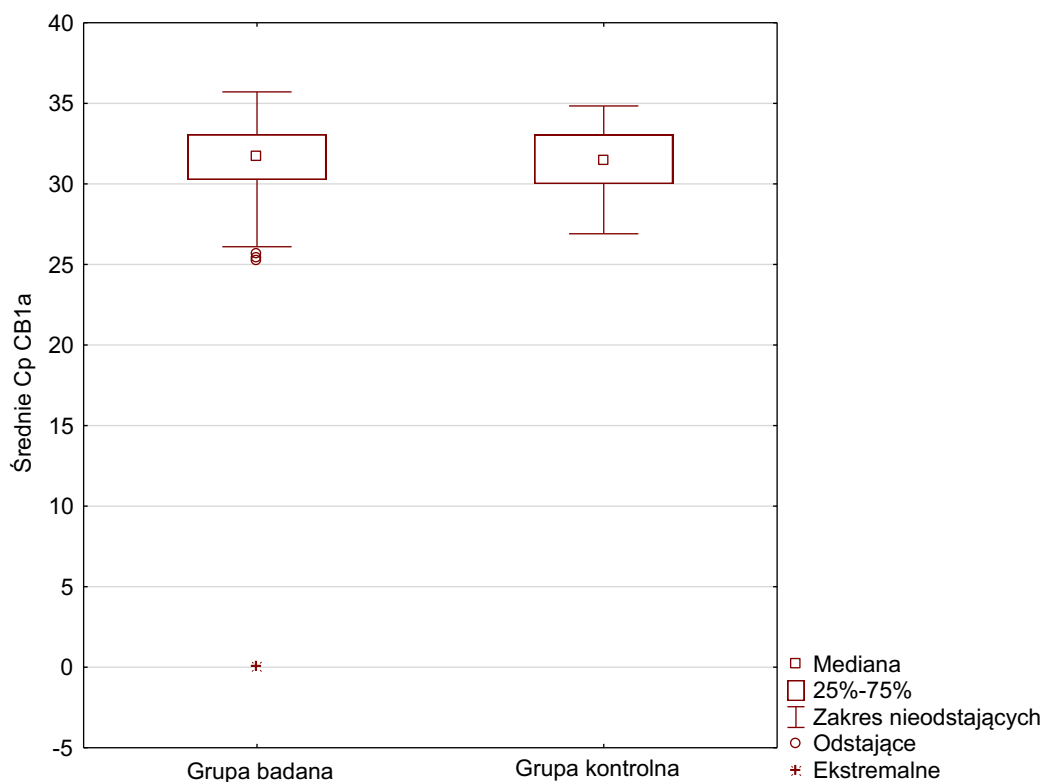


Rycina 18. Ekspresja receptora CB1.

Analiza ekspresji receptora CB1 w porównaniu do wartości referencyjnej w obrębie grupy badanej wynosiła średnio 31,3 i nie wykazała statystycznej różnicy w obrębie grup.

Tabela 4. Ekspresja receptora CB1a w badanych łóżyskach.

	Grupa badana (n=115)		Grupa kontrolna (n=35)		
	Średnia Cp ± SD	Zakres (min-max)	Średnia Cp ± SD	Zakres (min-max)	p-value
CB1a	31.2 ± 3.6	0 - 35.7	31.3 ± 2.0	26.9 - 34.8	0.70
REF	21.5 ± 2.8	0 - 27.6	21.7 ± 1.4	18.9 - 24.1	0.43
1/ΔCp CB1a	0.1 ± 0.1	-0.04 - 0.9	0.1 ± 0.03	0.07-0.2	0.66

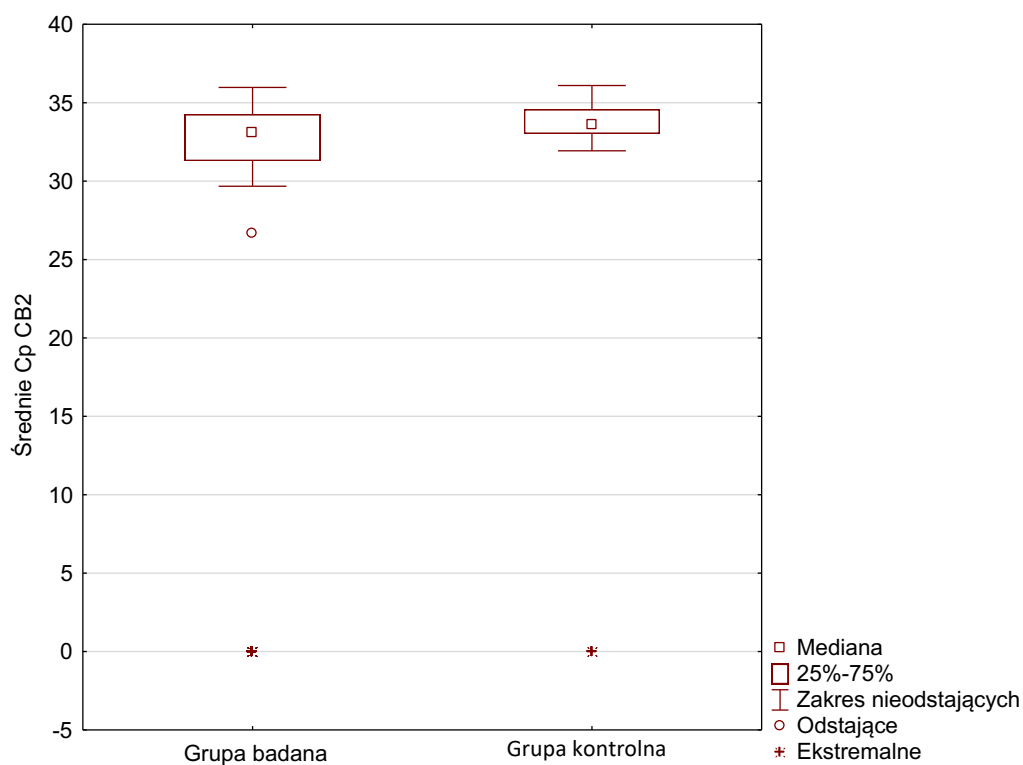


Rycina 19. Różnica ekspresji receptora CB1a.

Podobne wyniki uzyskano analizując ekspresję receptora CB1a, która wynosiła w obrębie grupy badanej średnio 31,2 i nie wykazała istotniej różnicy w obrębie grup.

Tabela 5. Ekspresja receptora CB2 w badanych łóżyskach.

	Grupa badana (n=115)		Grupa kontrolna (n=35)		
	Średnia Cp $\pm$ SD	Zakres (min-max)	Średnia Cp $\pm$ SD	Zakres (min-max)	p-value
CB2	26.8 $\pm$ 13.5	0 - 36.0	31.1 $\pm$ 9.6	0 - 36.1	0.038
REF	21.5 $\pm$ 2.8	0 - 27.6	21.7 $\pm$ 1.4	18.9 - 24.1	0.43
1/ Δ Cp CB2	0.06 $\pm$ 0.1	-0.05 - 0.5	0.07 $\pm$ 0.04	-0.04 - 0.1	0.57

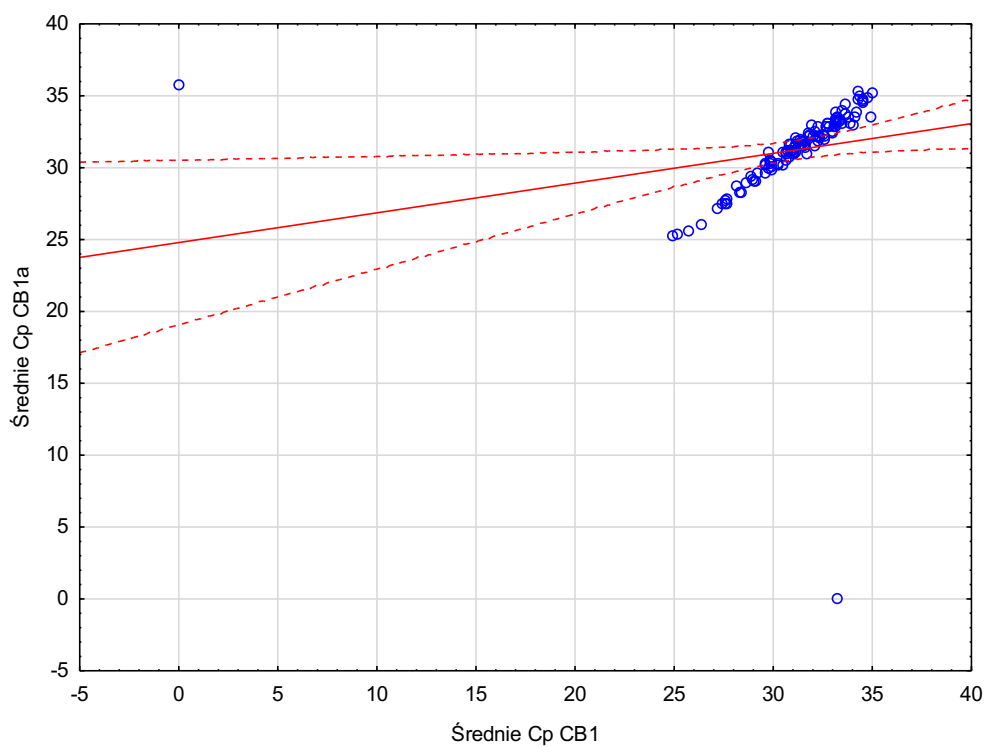


Rycina 20. Różnica ekspresji receptora CB2.

Istotnie różnice ekspresji wykazano dla receptora CB2, która wynosiła w grupie badanej 26,8 v.s. 31,1 w grupie kontrolnej ($p=0.038$). Ponadto w części łożysk nie wykazano ekspresji receptora CB2. Znamienne częściej nie zaobserwowano ekspresji receptora CB2 wśród pacjentek z grupy badanej odpowiednio 23 w grupie badanej v.s. 3 w grupie kontrolnej.

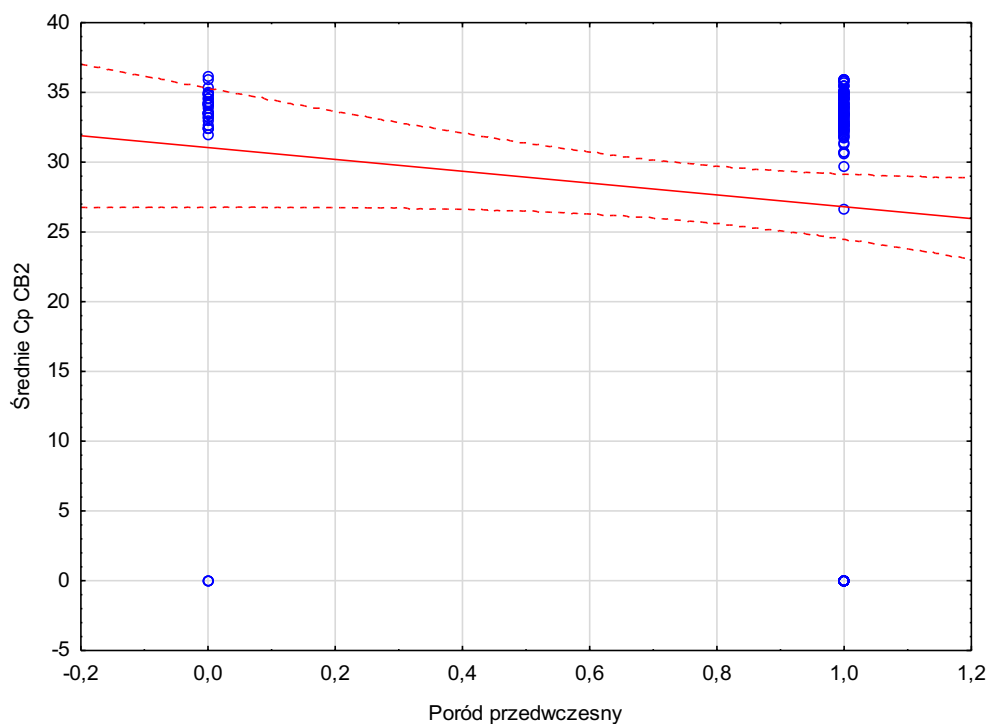
9.3 ANALIZA KORELACJI

Zbadaną ekspresję receptorów kanabinoidowych skorelowano z czynnikami charakteryzującymi badaną populację.



Rycina 21. Wzajemna korelacja ekspresji receptorów CB1 i CB1a

Średnie ekspresje receptorów CB1 i CB1a korelowały ze sobą ($p=0,038$). Tę zależność przedstawiono na Rycinie 21.

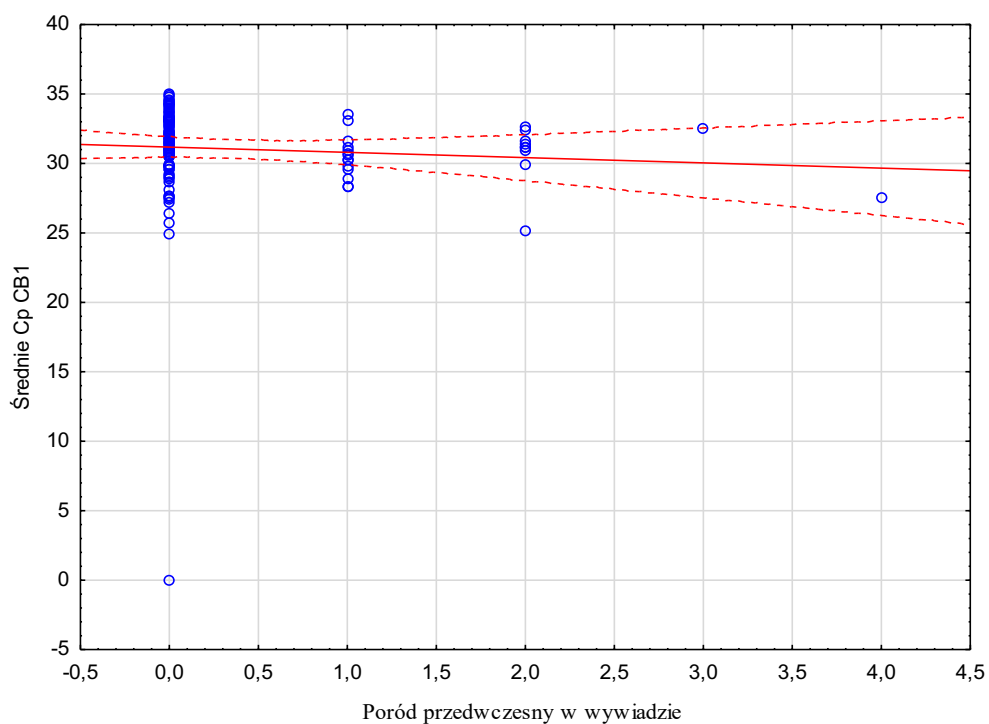


Rycina 22. Korelacja wystąpienia porodu przedwczesnego ze średnią ekspresją receptora CB2.

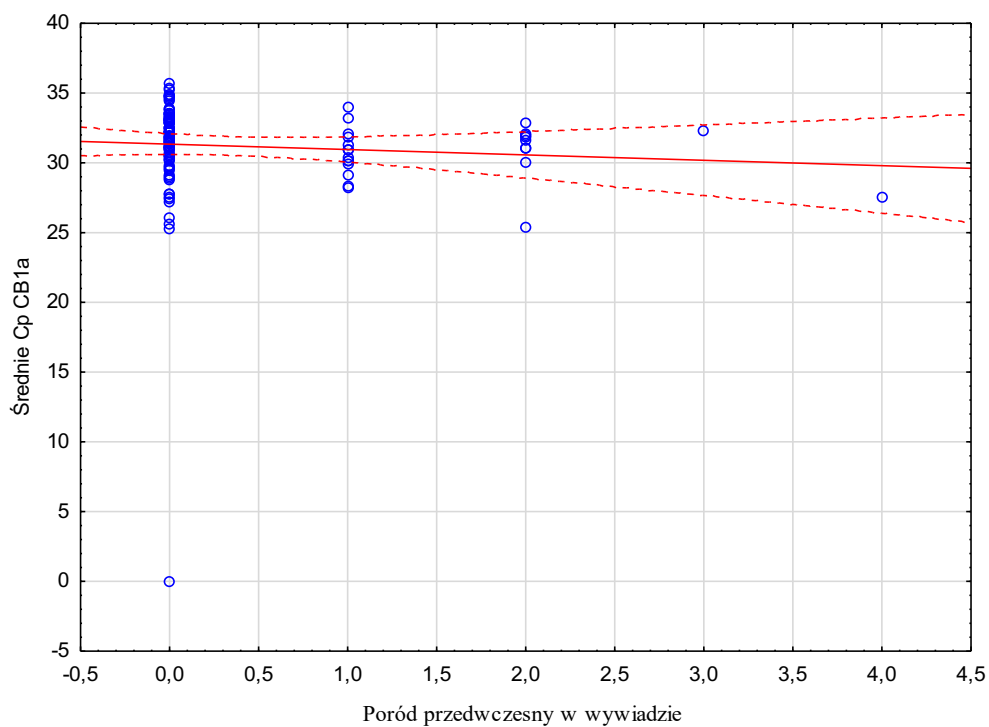
Średnia ekspresja receptora CB2 była nie tylko niższa w grupie badanej, ale w wyniku analizy korelacji wykazano, iż im niższa była ekspresja receptora CB2 tym częściej występował poród przedwczesny w badanej populacji ($p=0,038$).

Tabela 6. Korelacja ekspresji receptorów z wystąpieniem w przeszłości porodu przedwczesnego u kobiet w badanej grupie.

	Średnia ekspresja receptora	Współczynnik R Spearman	Poziom p
poród przedwczesny w wywiadzie	CB1	-0,202	0,03
poród przedwczesny w wywiadzie	CB1a	-0,202	0,03



Rycina 23. Korelacja porodu przedwczesnego w wywiadzie ze średnią ekspresją receptora CB1.



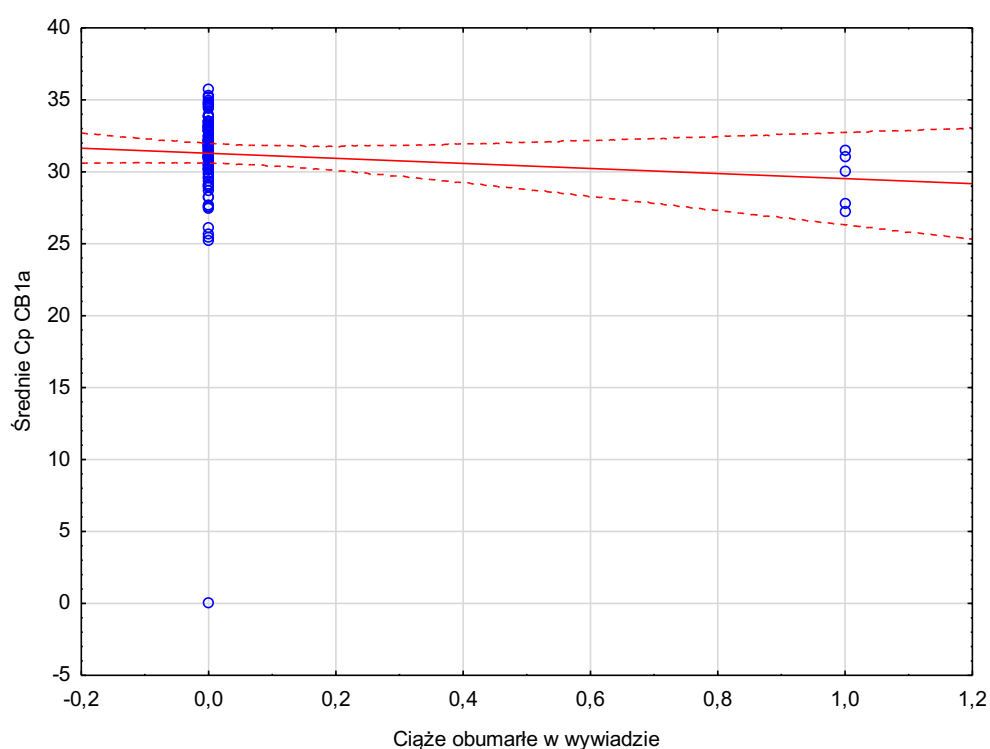
Rycina 24. Korelacja porodu przedwczesnego w wywiadzie ze średnią ekspresją receptora CB1a.

Zarówno średnia ekspresja receptora CB1 ($p=0,03$), jak i średnia ekspresja receptora CB1a ($p=0,03$) korelowały z wystąpieniem w przeszłości porodu

przedwczesnego wśród kobiet z grupy badanej. Im częściej występował poród przedwczesny w wywiadzie pacjentek z grupy badanej, tym niższa była ekspresja receptorów CB1 i CB1a.

Tabela 7. Korelacja ekspresji receptorów z występowaniem w wywiadzie ciąż obumarłych u kobiet w badanej grupie.

	Średnia ekspresja receptora	Współczynnik R Spearman	Poziom p
ciężce obumarłe w wywiadzie	1/ Δ CB1	0,245	0,0082
ciężce obumarłe w wywiadzie	CB1a	-0,199	0,033
ciężce obumarłe w wywiadzie	1/ Δ CB1a	0,262	0,0047
ciężce obumarłe w wywiadzie	1/ Δ CB2	0,206	0,028

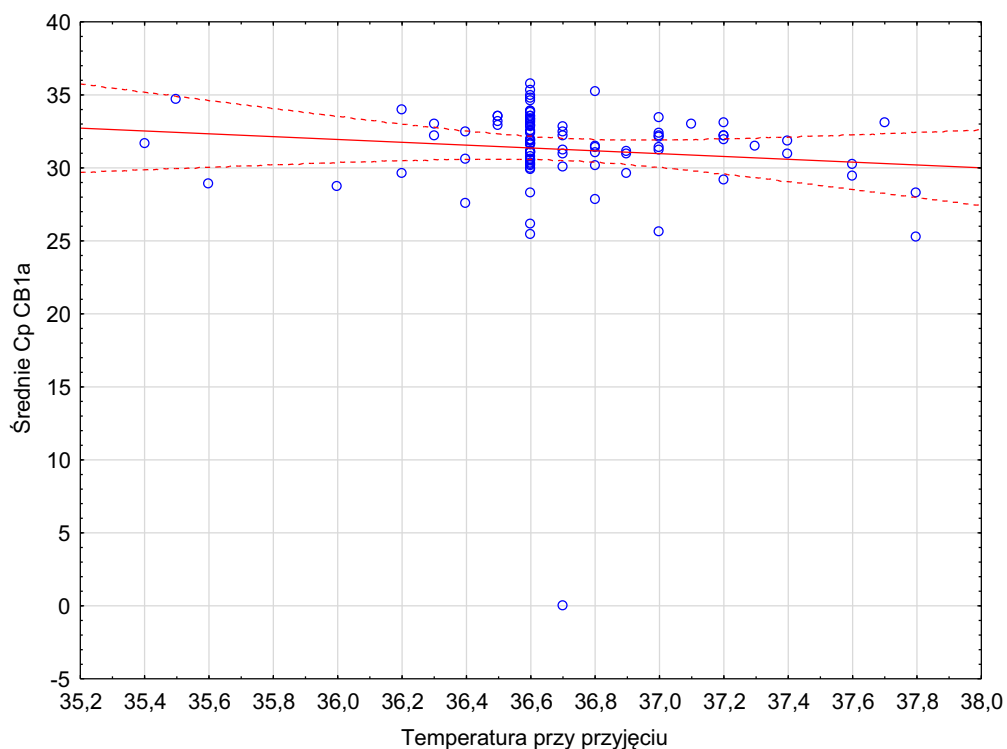


Rycina 25. Korelacja pomiędzy ekspresją receptora CB1a i występowaniem ciąż obumarłych w wywiadzie.

Zarówno średnia ekspresja, jak i względna ekspresja receptorów CB1, CB1a i CB2 korelowały z ciążami obumarłymi w wywiadzie. Im częściej występowały ciążce obumarłe w wywiadzie, tym niższa była ekspresja receptora CB1 ($p=0,049$) i CB1a ($p=0,047$).

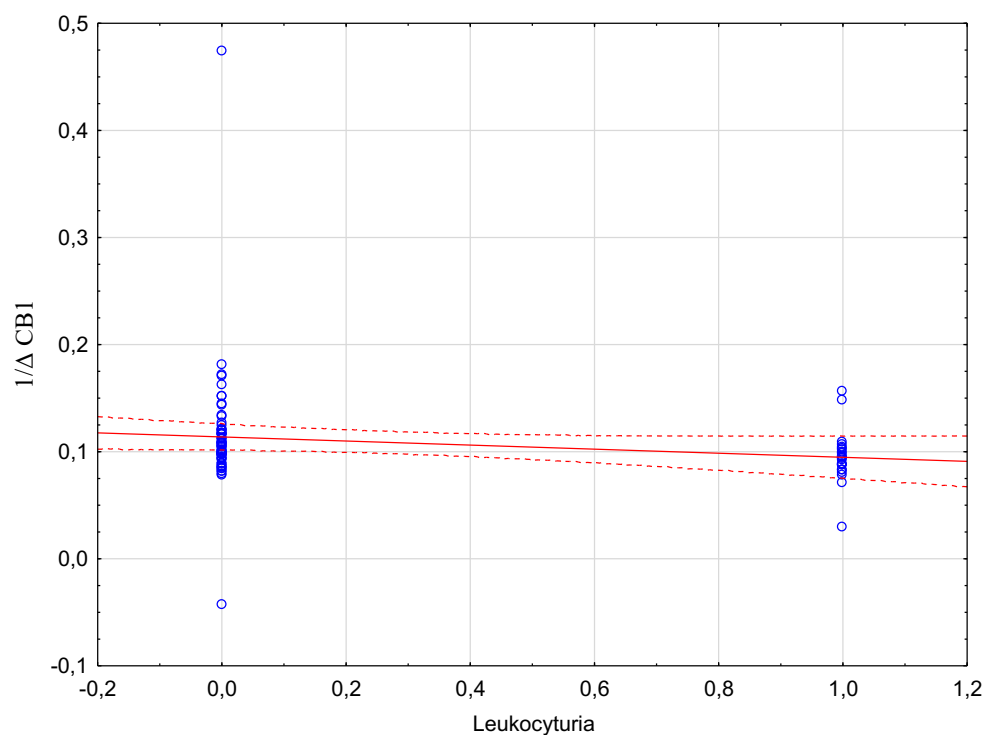
Tabela 8. Korelacja ekspresji receptorów z podwyższoną temperaturą ciała rodzących w grupie badanej.

	Średnia ekspresja receptora	Współczynnik R Spearman	Poziom p
Temperatura ciała przy przyjęciu	CB1a	-0,202	0,046

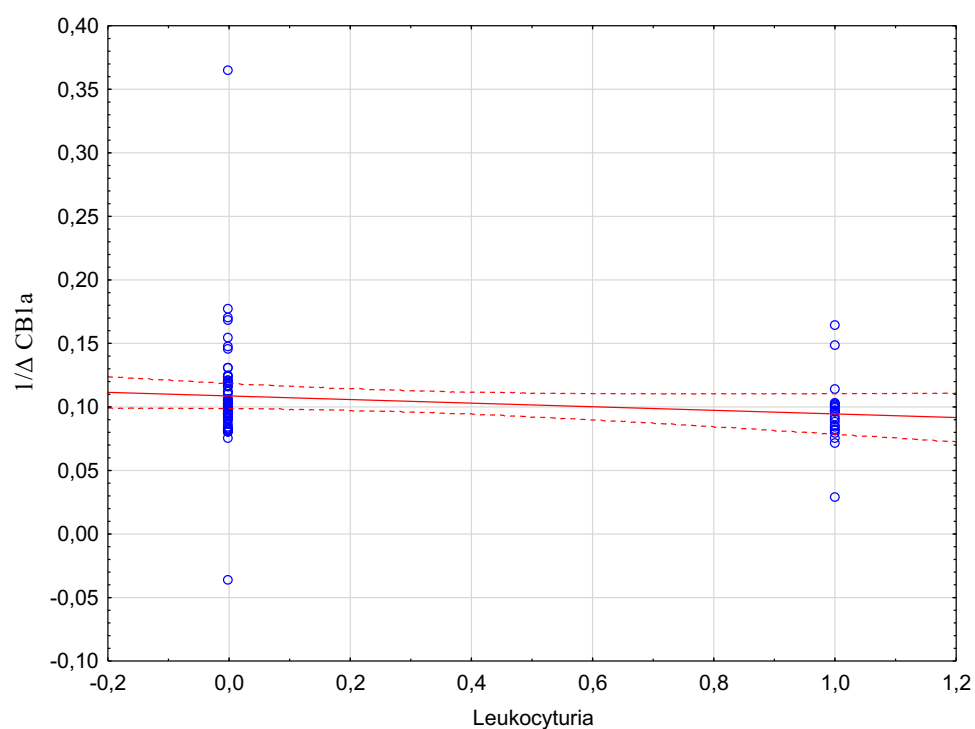


Rycina 26. Korelacja średniej ekspresji receptora CB1a i temperatury ciała podczas przyjęcia.

Temperatura ciał rodzących podczas przyjęcia na oddział położniczy korelowała ze średnią ekspresją receptora CB1a wśród kobiet z grupy badanej. Im wyższa była temperatura ciała przy przyjęciu, tym niższa była ekspresja receptora CB1a ($p=0,045$).



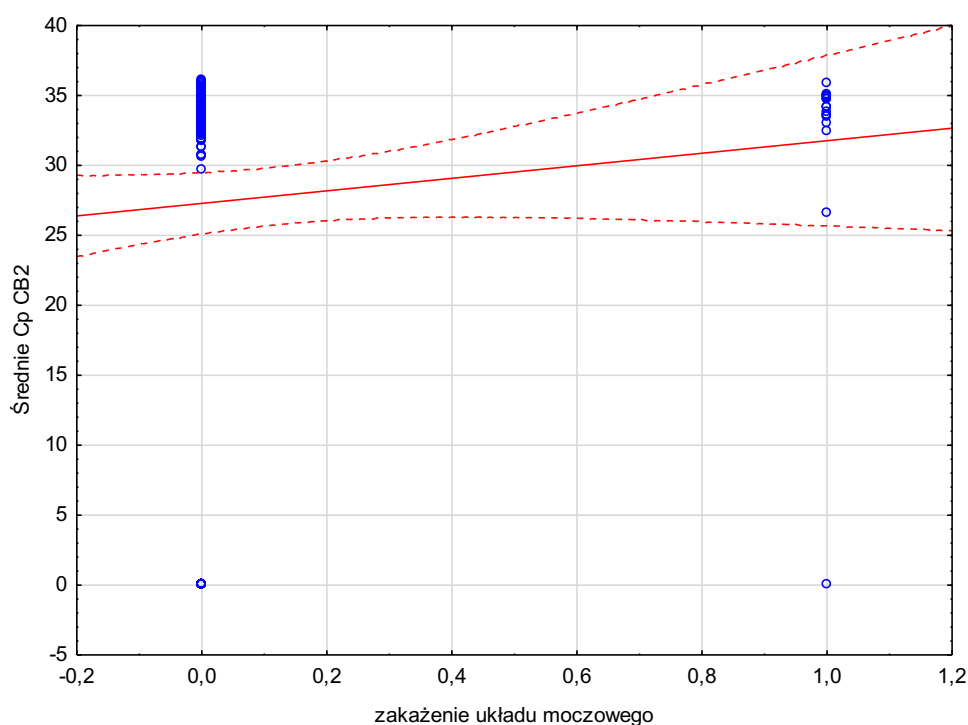
Rycina 27. Korelacja względnej ekspresji CB1 i leukocyturii pacjentek w grupie badanej i kontrolnej.



Rycina 28. Korelacja względnej ekspresji CB1a i leukocyturii pacjentek w grupie badanej i kontrolnej.

Analiza korelacji wykazała pozytywną korelację względnej ekspresji receptora CB1 i CB1a u pacjentek z grupy badanej i kontrolnej w pobranych próbkach łożysk

i leukocyturii przy przyjęciu (odpowiednio $p=0,028$ i $p=0,019$). Wcześniej opisywana średnia ekspresja receptorów jest wyłącznie pomiarem ekspresji wybranego receptora w badanym materiale, natomiast względna ekspresja jest porównaniem ekspresji receptora do ekspresji genu referencyjnego (ocena względnej ekspresji względem ekspresji receptora referencyjnego REF dokonano przy pomocy wzorów $1/Cp\ CB1 - Cp\ REF$, lub $1/Cp\ CB1a - Cp\ REF$, lub $1/Cp\ CB2 - Cp\ REF$).



Rycina 29. Korelacje średniej ekspresji receptora CB2 z wystąpieniem zakażenia układu moczowego.

Średnia ekspresja receptora CB2 korelowała z wystąpieniem objawów zakażenia układu moczowego (ZUM) przy przyjęciu na oddział położniczy wśród wszystkich kobiet zakwalifikowanych do badania ($p=0,04$). Im częściej rozpoznawane było ZUM, tym wyższa była ekspresja receptorów CB2.

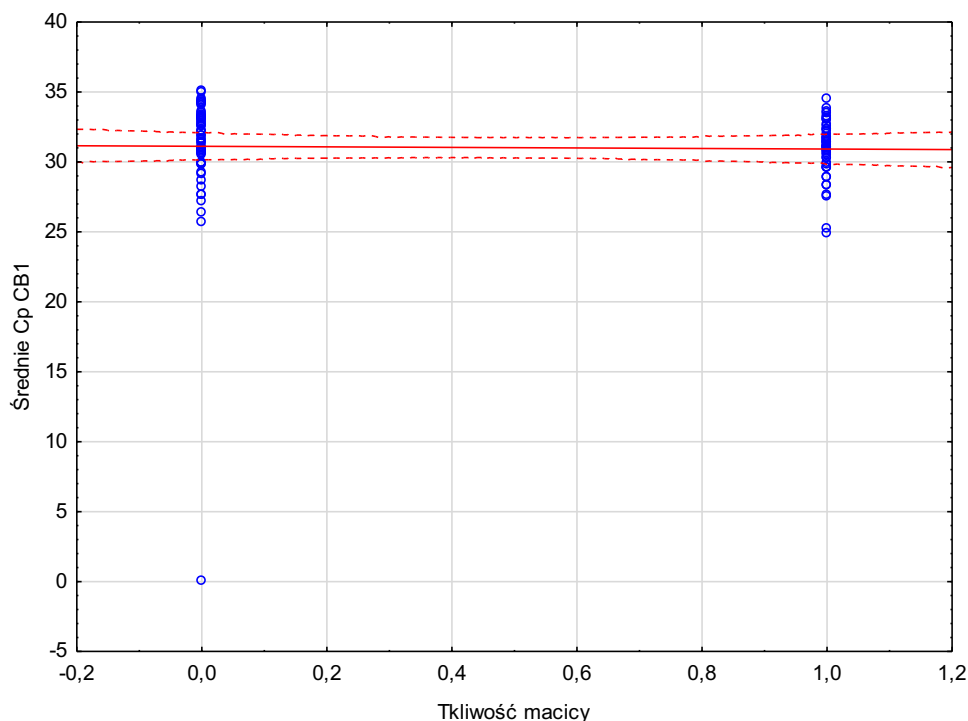
Tabela 9. Korelacja względnej ekspresji receptorów CB2 z krwawieniem w ciąży u kobiet w badanej grupie.

	Średnia ekspresja receptora	Współczynnik R Spearman	Poziom p
krwawienia w ciąży	1/ Δ CB2	0,236	0,012

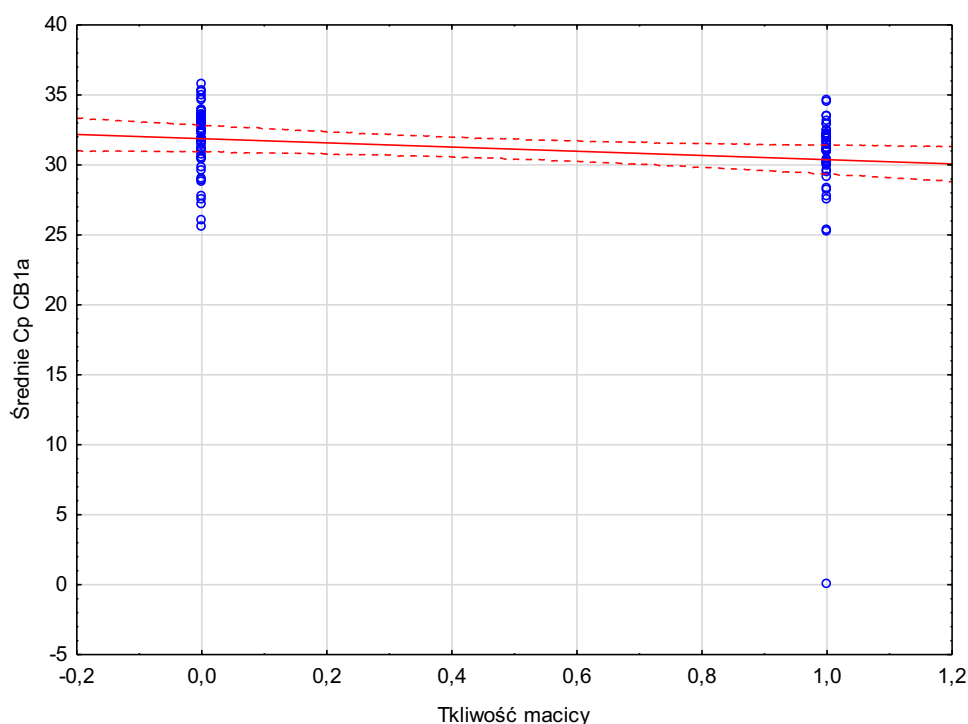
Względna ekspresja receptora CB2 korelowała z wystąpieniem krwawienia w trakcie ciąży, na którymkolwiek z etapów ciąży.

Tabela 10. Korelacja ekspresji receptorów z tkliwością macicy u kobiet w badanej grupie.

	Średnia ekspresja receptora	Współczynnik R Spearman	Poziom p
tkliwość macicy	CB1	-0,202	0,039
tkliwość macicy	CB1a	-0,261	0,0067



Rycina 30. Korelacja tkliwości macicy i średniej ekspresji receptora CB1.



Rycina 31. Korelacja tkliwości macicy i średniej ekspresji receptora CB1a.

Analiza korelacji wykazała również zależność pomiędzy tkliwością macicy zgłaszaną przez pacjentki z grupy badanej w przebiegu ciąży, a średnią ekspresją receptora CB1a ($p=0,029$) i CB1 ($p=0,039$). Im niższa była ekspresja receptorów w grupie badanej, tym częściej macica była określana przez pacjentki jako bardziej tkliwa.

10 DYSKUSJA

Jednym z celów przeprowadzonego badania było określenie związku ekspresji receptorów kanabinoidowych w łożysku z wystąpieniem porodu przedwczesnego. W niniejszym badaniu została zaobserwowana niższa ekspresja receptora CB2 w łożyskach pochodzących od kobiet, które urodziły przedwcześnie. Związek ten może wynikać z szeregu mechanizmów działania receptorów kanabinoidowych, do których należy zaliczyć mechanizm immunologiczny i wpływ na mięśniówkę gładką.

Układ kanabinoidowy moduluje działanie leukocytów poprzez pobudzanie receptorów CB2, które są obecne na komórkach układu opornościowego¹⁸⁵. Pobudzenie receptora CB2 przez odpowiedni ligand powoduje efekt przeciwzapalny¹⁸⁶, co zostało udowodnione także w obrębie mięśnia macicy objętego adenomiozą

w porównaniu do zdrowego endometrium^{168,187}. Podczas fizjologicznego porodu dochodzi do reakcji zapalnej na granicy połączenia maczyno-płodowego^{17,186}. Ważnym aspektem tego procesu jest brak czynnika zakaźnego powodującego powstanie omawianego odczynu zapalnego^{17,186}. Albowiem zapalenie nie musi być równoznaczne z zakażeniem²⁸. Prawdopodobną przyczyną wystąpienia przedwczesnego porodu jest rozwijający się w łożysku proces zapalny, spowodowany odhamowaniem przeciwzapalnego działania ligandów pobudzających receptory CB2 poprzez zmniejszenie ekspresji receptorów, bądź całkowity brak tej ekspresji¹⁸⁸. Pobudzone receptory CB2 przez całą ciążę zapewniają stan podwyższonej tolerancji na obce dla ciężarnej antygeny płodu w obrębie macicy¹⁸⁹. W związku z czym zmniejszenie ekspresji receptorów można powiązać z mechanizmem porodu przedwczesnego. Wynikiem zmniejszenia ekspresji receptorów CB2 i rozwoju procesu zapalnego jest patologicznie przedwcześnie rozwijająca się czynność skurczowa macicy i poród niedojrzałego płodu. Wprawdzie w przeprowadzonym badaniu nie badano ekspresji receptorów w trakcie ciąży, przed porodem i po porodzie, więc zaobserwowana niższa ekspresja receptorów CB2 w łożyskach zakwalifikowanych do grupy badanej mogła również występować u pacjentek przez cały okres ciąży. Rozstrzygnięcie tego problemu wymaga dalszych badań.

Podobne wyniki ekspresji receptorów kanabinoidowych zaobserwowane zostały przez Sun i wsp., którzy stwierdzili również obniżenie ekspresji w łożyskach myszy genu *Cnr2*, odpowiedzialnego za syntezę receptora CB2. Obniżenie ekspresji receptora występowało w obrębie grupy myszy, które urodziły przedwcześnie w porównaniu do tych, których porody odbyły się o czasie¹⁹⁰. W innym badaniu zaobserwowano zmniejszenie ekspresji receptora CB2 i wzrost ekspresji receptora CB1 w wyniku indukcji porodu przedwczesnego przez bakteryjną endotoksynę LPS (lipopolisacharyd)¹⁸⁶. Z kolei Wang i wsp. wykazali, iż zmniejszenie ekspresji receptorów CB1 w łożysku myszy powodowało poród przedwczesny¹⁹¹. Powyżej wymienione artykuły świadczą, iż zaobserwowany w badaniu związek nie jest przypadkowym znaleziskiem, jednakże nie został on potwierdzony w organizmach ludzkich.

Raba i wsp. w swoich badaniach badali wpływ profilu cytokin i interleukin na predykcję porodu przedwczesnego^{78,192}. W literaturze obecnych jest wiele prac opisujących modulujący wpływ pobudzenia receptorów CB2 na uwalnianie

cytokin^{156,188,193,194}. Receptory kanabinoidowe są pobudzane przez odpowiednie cytokiny. Dotychczas obecne są doniesienia o wzajemnym oddziaływaniu cytokin IL-1, IL-4, IL-10, IL-6, TNF- α , IL-8, MIP-1(CCL3 i CCL4), RANTES(CCL5) i receptorów CB1 i CB2^{156,157,160,161,195}. Niniejszym temat wpływu odpowiednich cytokin na ekspresję receptorów kanabinoidowych nie jest w pełni zbadany i dalsze badania w tej dziedzinie są niezbędne do wysnucia odpowiednich wniosków. Niemniej jednak korelacja pomiędzy odpowiednim profilem cytokinowym osobnika, a ekspresją receptorów CB wydaje się być bardzo prawdopodobna.

Omawiane zjawisko może być patomechanizmem wszystkich porodów przedwczesnych, bądź jedną z przyczyn przedwczesnej czynności skurczowej, spowodowanej zmianą w ekspresji receptorów kanabinoidowych.

Opisana w literaturze i zaobserwowana w przeprowadzonym badaniu niższa ekspresja receptorów kanabinoidowych w obrębie łożyska u kobiet rodzących przedwcześnie, niesie możliwość wykorzystania tej wiedzy w praktyce klinicznej w celu predykcji porodu przedwczesnego. Dysponując obecnymi technikami diagnostyki prenatalnej wydaje się być osiągalna ocena ekspresji receptorów kanabinoidowych, nie tylko w łożyskach pobranych od kobiet po porodzie, ale również w trakcie trwającej ciąży. Wczesna identyfikacja osób zagrożonych porodem przedwczesnym dałaby szansę na bardziej baczna obserwację pacjentek i umożliwiłaby wczesną interwencję lekarską. W przeprowadzonym badaniu ekspresję receptorów kanabinoidowych badano w łożyskach dopiero po porodzie, natomiast teoretycznie, w celu oceny ekspresji wymienionych receptorów, tkankę łożyskową można uzyskać w trakcie trwania ciąży na drodze amniopunkcji bądź biopsji łożyska, ale przyszłe badania są niezbędne do oceny funkcjonalności tych metod w predykcji porodu przedwczesnego i zastosowania tej metody w diagnostyce porodu przedwczesnego.

Drugim aspektem wynikającym z pracy jest próba wyjaśnienia subiektywnego odczuwania przez część kobiet ciężarnych wzmożonej tkliwości macicy. W prezentowanej pracy była ona zgłaszana statystycznie częściej przez pacjentki z grupy badanej. Opisywany objaw może świadczyć o wzmożonej czynności skurczowej mięśnia macicy. W przeprowadzonym badaniu tkliwość macicy korelowała z ekspresją receptorów CB1 i CB1a. W opublikowanych dotychczas badaniach została zaobserwowana zależność polegająca na relaksacyjnym efekcie pobudzenia receptorów kanabinoidowych w mięśniach szkieletowych^{163,196}, w mięśniach gładkich naczyń

krwionośnych¹⁶⁴ i w mięśniówce macicy¹⁹⁷. Wpływ pobudzenia receptorów CB w macicy został opisany jako tokolityczny efekt pobudzenia receptorów kanabinoidowych¹⁹⁸. W związku z czym obniżenie stężenia tych receptorów może skutkować przedwczesnym rozwinięciem czynności skurczowej macicy. Co prawda ekspresja receptorów CB1 i CB1a nie korelowała z wystąpieniem porodu przedwczesnego, natomiast w grupie pacjentek po porodzie przedwczesnym im niższa była ekspresja receptorów CB1 i CB1a, tym rodzące określały macicę jako bardziej tkliwą. Ta obserwacja może wiązać się z wpływem ekspresji receptorów CB1 i CB1a na poród przedwczesny. Z drugiej strony nadmierna tkliwość może być związana z większą czynnością skurczową, a nawet hiperstymulacją macicy w już rozwijającym się porodzie, nie będąc przyczyną rozpoczęcia tego porodu.

Związek niższego poziomu ekspresji receptora CB1 i CB1a z większą tkliwością macicy może także wynikać z nadmiernego odczuwania bólu przez pacjentki. Powszechnie znany jest wpływ układu kanabinoidowego na percepcję bólu, natomiast istotnym aspektem jest fakt, iż ta modulacja nie zachodzi wyłącznie na poziomie ośrodkowego układu nerwowego^{199–201}, lecz także na poziomie neuronów obwodowych^{201–203}, między innymi w układzie rozrodczym kobiety¹⁶⁸. Pobudzenie receptorów CB1 i CB2 powoduje zmniejszenie odczuwania bólu zaobserwowane na modelach zwierzęcych^{204,205}, co może stanowić mechanizm odmiennej percepcji bodźców bólowych u kobiet w trakcie porodu, gdyż powszechnie wiadome jest heterogenne odczuwanie bólu porodowego przez rodzące kobiety. Ten kierunek badań jest istotnym punktem uchwytu terapii przeciwbólowej w wielu jednostkach chorobowych, uwzględniając jednocześnie fakt, iż zastosowanie selektywnego agonisty receptora CB2 powoduje efekt przeciwbólowy bez efektu psychotycznego^{203,206,207}. Nie przeprowadzono dotychczas badań wpływu selektywnych agonistów receptorów kanabinoidowych w grupie pacjentek ciężarnych. Z kolei badania obserwacyjne w grupie pacjentek, które w trakcie ciąży nadużywały nioselektywnych agonistów receptorów CB (marihuana i inne pochodne konopii indyjskich) wykazały potencjalny efekt szkodliwy tych substancji na rozwijający się płód^{208–210}. Z tego powodu poszukiwanie agonistów receptorów CB, nie wywołujących negatywnych skutków na płód, wydaje się być potencjalnym rozwiązaniem okołoporodowej terapii bólu.

W grupie badanej występowanie porodu przedwczesnego w wywiadzie było tym częstsze, im niższa była ekspresja receptorów CB1 i CB1a w łożysku pacjentek

z grupy badanej. Ponadto z przeprowadzonego badania wynika, iż czynnikiem ryzyka porodu przedwczesnego jest wystąpienie porodu przedwczesnego w wywiadzie, gdyż czynnik ten pojawiał się statystycznie częściej wśród pacjentek z grupy badanej. W dostępnej literaturze występuje wiele doniesień o występowaniu porodów przedwczesnych w wywiadzie, jako niezależny czynnik ryzyka wystąpienia tej patologii w każdej kolejnej ciąży¹⁷⁻²¹.

Im niższa była ekspresja receptorów CB1 i CB1a w łożysku pacjentek z grupy badanej, tym częściej zgłaszały one ciężę obumarłą w wywiadzie. Przedwczesna, wewnątrzmaciczna śmierć płodu może wynikać z wielu czynników, do których należy między innymi ekstremalnie przedwczesny poród²³. Na wystąpienie przedwczesnego porodu może mieć wpływ ekspresja receptorów kanabinoidowych w łożysku w trakcie ciąży, bądź spadek tej ekspresji okołoporodowo. Niestety badacze nie mieli dostępu do materiału łożyskowego z poprzednich ciąż, więc nie było możliwe stwierdzenie ekspresji receptorów w poprzednich ciążach u tych samych pacjentek.

Kobiety zakwalifikowane do grupy badanej, istotnie częściej zgłaszały w wywiadzie zakończenie poprzedniej ciąży cięciem cesarskim. Cięcie cesarskie jest również czynnikiem ryzyka porodu przedwczesnego w kolejnych ciążach^{211,212}. Ekspresja receptorów kanabinoidowych nie korelowała z wystąpieniem cięcia cesarskiego w wywiadzie, w związku z tym można powiedzieć, że jest on niezależnym od ekspresji receptorów CB czynnikiem ryzyka porodu przedwczesnego. Prawdopodobnie ta różnica w otrzymanych wynikach własnych w porównaniu do cytowanych badań^{211,212} przeprowadzonych przez Dawesa i wsp. i Watsona i wsp., wynika z dużej swobody w kwalifikowaniu do cięcia cesarskiego w Polsce i z pewnością nadużywania tej techniki ukończenia ciąży (aktualnie odsetek ten przekracza 40%²¹³)

Zakażenie układu moczowego statystycznie częściej było stwierdzane przy przyjęciu u pacjentek, które urodziły przedwcześnie. Zakażenie układu moczowego jest znaczącym czynnikiem ryzyka porodu przedwczesnego, co potwierdzają liczne doniesienia naukowe²¹⁴⁻²¹⁹. Pomimo tego podwyższone parametry stanu zapalnego spowodowane zakażeniem np. górnego odcinka układu oddechowego, bądź spowodowane procesem zapalnym toczącym się w innym obszarze organizmu są również czynnikiem ryzyka porodu przedwczesnego z uwagi na stymulację uwalniania przez organizm cytokin prozapalnych²¹⁴. Leukocyturia także korelowała w badanej grupie pacjentek z niższą ekspresją receptorów CB1 i CB1a. Dodatkowo im wyższa była

temperatura ciała pacjentek z grupy badanej przyjmowanych do oddziału położniczego, tym niższa była ekspresja receptorów CB1a. Objawy takie, jak leukocyturia i podwyższona ciepłota ciała towarzyszą zakażeniu układu moczowego, więc związek tych objawów z obniżoną ekspresją receptorów CB1 i CB1a wydaje się być nieprzypadkowy.

Zgłaszanie przez pacjentki krwawienie na którymkolwiek z etapów trwania ciąży występowało tym częściej u pacjentek z grupy badanej, im niższa była ekspresja receptorów CB2. W literaturze występuje coraz więcej doniesień o krwawieniu w pierwszym trymestrze ciąży, jako czynnika ryzyka porodu przedwczesnego^{25,26}, z kolei krwawienie okołoporodowe może samo w sobie być przyczyną porodu zarówno w terminie jak i przed terminem. Na temat etiologii krwawień w początkowych etapach ciąży brak jest ewidentnych dowodów wśród doniesień w literaturze²⁶. Okołoporodowo krwawienie związane może być z łożyskiem przodującym czy przedwczesnym oddzieleniem się łożyska prawidłowo umiejscowionego¹⁹. Dodatkowo parametry homeostazy czerwonokrwinkowej (hematokryt i stężenie hemoglobiny) przy przyjęciu było istotnie niższe u pacjentek, które ostatecznie urodziły przedwcześnie. Wyniki parametrów czerwonokrwinkowych mogły wynikać w grupie badanej z częstszych utrat krwi w trakcie ciąży.

Zarówno masa ciała noworodka, jak i masa ciała ciężarnej i jej BMI w grupie badanej były istotnie niższe w porównaniu do grupy kontrolnej. Jest to dosyć oczywistym znaleziskiem zważywszy na fakt, iż pacjentki rodzące przedwcześnie miały mniej dojrzałą ciążę i z tego powodu płody takich pacjentek były mniejsze w porównaniu do płodów pacjentek, których ciąża skończyła się o czasie.

Ekspresja receptorów CB1 i CB1a korelowała ze sobą. Pomimo braku badań naukowych dotyczących receptora kanabinoidowego 1 alfa w obrębie układu rodnych kobiet, wnioski płynące z ekspresji obydwu receptorów i powiązania tych receptorów z prawdopodobnymi przyczynami porodu przedwczesnego i z czynnikami ryzyka porodu przedwczesnego są zbieżne, co może świadczyć o zależnej od siebie ekspresji obydwu receptorów. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska może być fakt iż receptor CB1a jest podtypem lub podjednostką receptora CB1, bądź jego ekspresja jest związana z ekspresją receptora CB1 poprzez taki sam czynnik zwiększający ekspresję obydwu receptorów. Udowodnienie tego wymaga jednakże przeprowadzenia dokładniejszych badań molekularnych oceniających strukturę receptora CB1a.

Wśród dostępnych publikacji w naukowych bazach danych (Pubmed/Medline, Web of Science, Scopus, Embase, Cochrane Library) wliczając szarą literaturę (Google Scholar) brak jest badań opisujących ekspresję receptorów kanabinoidowych w organizmach ludzkich podczas ciąży, bądź w krótkim czasie od porodu. W związku z czym przeprowadzone badanie jako pierwsze podejmuje temat wpływu ekspresji receptorów kanabinoidowych u ludzi na wystąpienie porodu przedwczesnego. Jest to mocną stroną badania, gdyż podjęta tematyka nie jest badaniem potwierdzającym istniejące doniesienia, lecz porusza praktycznie nieprzebadany wątek. Przeprowadzona rozprawa potwierdza na modelu ludzkim, istniejące już w literaturze doświadczenia na modelu zwierzęcym, dotyczące odmiennej ekspresji receptorów kanabinoidowych w łożyskach po porodzie przedwczesnym. Jedyne doniesienia co do ekspresji receptorów kanabinoidowych w obrębie macicy zostały przedstawione u pacjentek z rozpoznaną endometriozą^{165,166,168,187,220}.

Także mocną stroną przeprowadzonego badania jest wielośrodkowe pochodzenie badanej populacji, gdyż wyniki ekspresji receptorów kanabinoidowych w łożyskach pochodziły z trzech różnych ośrodków klinicznych, pochodzących z różnych części Polski.

Ograniczeniem przedstawionego badania jest ocena ekspresji receptorów w łożysku dopiero po dokonanym porodzie, w wyniku czego niemożliwe jest wyciąganie wniosków co do predykcji ekspresji receptorów kanabinoidowych na wystąpienie porodu przedwczesnego. Należałoby pogłębić badanie o poziom ekspresji receptorów kanabinoidowych na różnych etapach ciąży przy pomocy na przykład biopsji kosmówki, bądź amniopunkcji, co umożliwiłoby ocenę wartości predykcyjnej ekspresji omawianych receptorów i porodu przedwczesnego.

Istotnym kierunkiem dającym możliwości zbadania ekspresji receptorów kanabinoidowych, jest możliwość pobrania komórek doczesnowych z wydzieliny kanału szyjki macicy w trakcie trwania ciąży. Płynna cytologia wydzieliny z komórkami doczesnowymi umożliwiłaby nieinwazyjną diagnostykę ekspresji receptorów kanabinoidowych. Wykorzystanie tej techniki oceny ekspresji omawianych receptorów dałoby szansę wykorzystania jej w codziennej praktyce. Dalsze badania są niezbędne w celu oceny przydatności badania ekspresji receptorów kanabinoidowych w komórkach doczesnowych.

Zaprezentowane badanie jest badaniem retrospektywnie oceniającym obecność porodu przedwczesnego i ekspresji receptorów kanabinoidowych w łożyskach. W wyniku czego badacz nie miał wpływu na sposób zbierania materiału i nie jest w stanie idealnie zrandomizować przydzielanie do grup pacjentek.

Słabą stroną badania jest także mała grupa kontrolna pacjentek, w nawiązaniu do tego należałoby przeprowadzić kolejne doświadczenia na większej grupie pacjentek.

11 WNIOSKI

1. W patogenezie porodu przedwczesnego może mieć znaczenie ekspresja receptorów kanabinoidowych. Im niższa ekspresja receptora CB2 w łożysku, tym częściej występuje poród przedwczesny.
2. Występowanie dolegliwości bólowych macicy w przebiegu ciąży koreluje z ekspresją receptorów kanabinoidowych w łożysku. Im niższa ekspresja receptora CB1 i CB1a, tym boleśniej odczuwają pacjentki czynność skurczową macicy.
3. Stwierdzona w badaniu korelacja ekspresji receptorów CB1, CB1a, CB2 z powikłaniami przebiegu ciąży takimi jak: występowanie u kobiet rodzących w przeszłości porodu przedwczesnego, ciąż obumarłych, krwawień w przebiegu ciąży, podwyższonej ciepłoty ciała podczas porodu, oraz zakażeń układu moczowego, uzasadnia wniosek, iż należy pogłębić diagnostykę ekspresji receptorów kanabinoidowych u kobiet ciężarnych na różnych etapach ciąży.

12 PIŚMIENNICTWO

1. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008;371(9606):75-84. doi:10.1016/S0140-6736(08)60074-4
2. Steer P. The epidemiology of preterm labour. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2005;112(SUPPL. 1):1-3. doi:10.1111/j.1471-0528.2005.00575.x
3. Mandy GT. Incidence and mortality of the preterm infant. Uptodate. <https://www.uptodate.com/contents/incidence-and-mortality-of-the-preterm-infant>. Published 2019. Accessed April 29, 2020.
4. WHO. *WHO Recommendations on Interventions to Improve Preterm Birth Outcomes.*; 2015. www.who.int/reproductivehealth.
5. Hunter A. *Pregnancy Loss and the Death of a Baby: Guidelines for Professionals.*; 2007.
6. RM DDSMDRFMDTDF and MCW. *Late Intrauterine Fetal Death and Stillbirth. Guidelines Committee of the RCOG.*; 2013. doi:10.1017/cbo9781107338876.006
7. Pilliod RA, Cheng YW, Snowden JM, Doss AE, Caughey AB. The risk of intrauterine fetal death in the small-for-gestational-age fetus. *Am J Obstet Gynecol*. 2012;207(4):318.e1-318.e6. doi:10.1016/j.ajog.2012.06.039
8. Bomba-Opoń D, Drews K, Huras H, Laudański P, Paszkowski T, Wielgoś M. Polish gynecological society recommendations for labor induction. *Ginekol Pol*. 2017;88(4):224-234. doi:10.5603/GP.a2017.0043
9. WHO. *Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth*. Vol 13.; 2012. doi:http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503433_eng.pdf
10. Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, et al. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: A systematic analysis and implications. *Lancet*. 2012;379(9832):2162-2172. doi:10.1016/S0140-6736(12)60820-4
11. Główny Urząd Statystyczny. *Sytuacja Demograficzna Polski Do 2017 r . Urodzenia i Dzietność.*; 2017.

12. Gleicher N, Barad DH. Assessing in-vitro fertilisation at age 40 years. *Lancet*. 2019;393(10177):1181-1183. doi:10.1016/S0140-6736(18)32070-1
13. Fuller E. Which nation has the most in vitro babies? Here are the Top 5.<https://www.csmonitor.com/Business/2010/1008/Which-nation-has-the-most-in-vitro-babies-Here-are-the-Top-5/Belgium-3.2-percent>. Published 2010. Accessed May 2, 2020.
14. Lui MW, Yeung WSB, Ho PC, Ng EHY. In vitro fertilisation in hong kong: The situation in 2019. *Hong Kong Med J*. 2019;25(6):468-472. doi:10.12809/hkmj198057
15. Qublan HS, Malkawi HY, Tahat YA, et al. In-vitro fertilisation treatment: Factors affecting its results and outcome. *J Obstet Gynaecol (Lahore)*. 2005;25(7):689-693. doi:10.1080/01443610500292353
16. Robinson JN, Norwitz ER. Preterm birth: Risk factors, interventions for risk reduction, and maternal prognosis. Uptodate. [https://www-1uptodate-1com-100022cfw14f4.han3.wum.edu.pl/contents/preterm-birth-risk-factors-interventions-for-risk-reduction-and-maternal-prognosis?search=Preterm birth: Risk factors, interventions for risk reduction, and maternal prognosis&source=search](https://www-1uptodate-1com-100022cfw14f4.han3.wum.edu.pl/contents/preterm-birth-risk-factors-interventions-for-risk-reduction-and-maternal-prognosis?search=Preterm%20birth:Risk%20factors,%20interventions%20for%20risk%20reduction,%20and%20maternal%20prognosis&source=search). Published 2019. Accessed April 30, 2020.
17. Raba G, Kotarski J. Evaluation of risk factors can help to predict preterm delivery within 7 days in women hospitalized for threatened preterm labour. *J Matern Neonatal Med*. 2016;29(19):3142-3146. doi:10.3109/14767058.2015.1115477
18. Huusko JM, Karjalainen MK, Graham BE, et al. Whole exome sequencing reveals HSPA1L as a genetic risk factor for spontaneous preterm birth. *PLoS Genet*. 2018;14(7). doi:10.1371/journal.pgen.1007394
19. Erez O, Novack L, Klaitman V, et al. Early preterm delivery due to placenta previa is an independent risk factor for a subsequent spontaneous preterm birth. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2012;12(1):1. doi:10.1186/1471-2393-12-82
20. Haram K, Mortensen JHS, Wollen AL. Preterm delivery: An overview. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2003;82(8):687-704. doi:10.1034/j.1600-0412.2003.00218.x

21. Krymko H, Bashiri A, Smolin A, et al. Risk factors for recurrent preterm delivery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;113(2):160-163. doi:10.1016/j.ejogrb.2003.08.006
22. Ferrero DM, Larson J, Jacobsson B, et al. Cross-Country individual participant analysis of 4.1 million singleton births in 5 countries with very high human development index confirms known associations but provides no biologic explanation for 2/3 of all preterm births. *PLoS One.* 2016;11(9). doi:10.1371/journal.pone.0162506
23. Malacova E, Tippaya S, Bailey HD, et al. Stillbirth risk prediction using machine learning for a large cohort of births from Western Australia, 1980-2015. *Sci Rep.* 2020;10(1):5354. doi:10.1038/s41598-020-62210-9
24. Rodrigues T, Barros H. Short interpregnancy interval and risk of spontaneous preterm delivery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;136(2):184-188. doi:10.1016/j.ejogrb.2007.03.014
25. Hossain R, Harris T, Lohsoonthorn V, Williams MA. Risk of preterm delivery in relation to vaginal bleeding in early pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007;135(2):158-163. doi:10.1016/j.ejogrb.2006.12.003
26. Hackney DN, Glantz JC. Vaginal bleeding in early pregnancy and preterm birth: Systemic review and analysis of heterogeneity. *J Matern Neonatal Med.* 2011;24(6):778-786. doi:10.3109/14767058.2010.530707
27. Lam CM, Wong SF. Risk factors for preterm delivery in women with placenta praevia and antepartum haemorrhage: retrospective study. *Hong Kong medical journal = Xianggang yi xue za zhi / Hong Kong Academy of Medicine.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055359>. Published 2002. Accessed May 2, 2020.
28. Raba G. *Ocena Czynn timerów Ryzyka i Wybranych Markerów Biochemicznych w Predykcji Porodu Przedwczesnego. Rozprawa Na Stopień Naukowy Doktora Habilitowanego.* Przemys ł: F.U.H. TIM GRAFIK; 2011.
29. Gravett MG, Hitti J, Hess DL, Eschenbach DA. Intrauterine infection and preterm delivery: Evidence for activation of the fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182(6):1404-1413. doi:10.1067/mob.2000.106180

30. R M, MA W, EH K. Prevention of Preterm Delivery and Low Birth Weight Associated With Asymptomatic Bacteriuria. *Clin Infect Dis*. 1992;14(4). doi:10.1093/CLINIDS/14.4.927
31. Owens DK, Davidson KW, Krist AH, et al. Screening for Bacterial Vaginosis in Pregnant Persons to Prevent Preterm Delivery: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;323(13):1286-1292. doi:10.1001/jama.2020.2684
32. Weiss G, Goldsmith LT, Sachdev R, Von Hagen S, Lederer K. Elevated first-trimester serum relaxin concentrations in pregnant women following ovarian stimulation predict prematurity risk and preterm delivery. *Obstet Gynecol*. 1993;82(5):821-828.
33. Fuchs F, Monet B, Ducruet T, Chaillet N, Audibert F. Effect of maternal age on the risk of preterm birth: A large cohort study. *PLoS One*. 2018;13(1). doi:10.1371/journal.pone.0191002
34. Shapiro-Mendoza CK, Barfield WD, Henderson Z, et al. CDC grand rounds: Public health strategies to prevent preterm birth. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2016;65(32):826-830. doi:10.15585/mmwr.mm6532a4
35. Fraser AM, Brockert JE, Ward RH. Association of young maternal age with adverse reproductive outcomes. *N Engl J Med*. 1995;332(17):1113-1118. doi:10.1056/NEJM199504273321701
36. Neaton JD, Wentworth DN, Cutler J, Stamler J, Kuller L. Risk factors for death from different types of stroke. *Ann Epidemiol*. 1993;3(5):493-499. doi:10.1016/1047-2797(93)90103-B
37. Covington DL, Hage M, Hall T, Mathis M. Preterm delivery and the severity of violence during pregnancy. *Journal of Reproductive Medicine for the Obstetrician and Gynecologist*. doi:10.1097/00006254-200206000-00002
38. Almario C V., Seligman NS, Dysart KC, Berghella V, Baxter JK. Risk factors for preterm birth among opiate-addicted gravid women in a methadone treatment program. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;201(3):326.e1-326.e6. doi:10.1016/j.ajog.2009.05.052

39. Ling C, Liew Z, von Ehrenstein OS, et al. Prenatal exposure to ambient pesticides and preterm birth and term low birthweight in agricultural regions of California. *Toxics*. 2018;6(3). doi:10.3390/toxics6030041
40. Yıldırım E, Derici MK, Demir E, et al. Is the Concentration of Cadmium, Lead, Mercury, and Selenium Related to Preterm Birth? *Biol Trace Elem Res*. 2019;191(2):306-312. doi:10.1007/s12011-018-1625-2
41. Savitz DA, Ananth C V. Residential magnetic fields, wire codes, and pregnancy outcome. *Bioelectromagnetics*. 1994;15(3):271-273. doi:10.1002/bem.2250150309
42. Agarwal A, Agarwal S, Chandak S. Role of acoustic radiation force impulse and shear wave velocity in prediction of preterm birth: a prospective study. *Acta radiol*. 2018;59(6):755-762. doi:10.1177/0284185117730689
43. Takami M, Tsuchida A, Takamori A, et al. Effects of physical activity during pregnancy on preterm delivery and mode of delivery: The Japan Environment and Children's Study, birth cohort study. *PLoS One*. 2018;13(10). doi:10.1371/journal.pone.0206160
44. van Beukering MDM, van Melick MJGJ, Mol BW, Frings-Dresen MHW, Hulshof CTJ. Physically demanding work and preterm delivery: a systematic review and meta-analysis. *Int Arch Occup Environ Health*. 2014;87(8):809-834. doi:10.1007/s00420-013-0924-3
45. Serrano-Lomelin J, Nielsen CC, Jabbar MSM, et al. Interdisciplinary-driven hypotheses on spatial associations of mixtures of industrial air pollutants with adverse birth outcomes. *Environ Int*. 2019;131. doi:10.1016/j.envint.2019.104972
46. Tomfohr-Madsen L, Cameron EE, Schetter CD, et al. Pregnancy Anxiety and Preterm Birth: The Moderating Role of Sleep. *Heal Psychol*. 2019;38(11):1025-1035. doi:10.1037/hea0000792
47. Malacova E, Regan A, Nassar N, et al. Risk of stillbirth, preterm delivery, and fetal growth restriction following exposure in a previous birth: systematic review and meta-analysis. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2018;125(2):183-192. doi:10.1111/1471-0528.14906

48. Zijlmans MAC, Beijers R, Riksen-Walraven MJ, de Weerth C. Maternal late pregnancy anxiety and stress is associated with children's health: a longitudinal study. *Stress*. 2017;20(5):495-504. doi:10.1080/10253890.2017.1348497
49. Cirino NH, Knapp JM. Perinatal Posttraumatic Stress Disorder: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *Obstet Gynecol Surv*. 2019;74(6):369-376. doi:10.1097/OGX.0000000000000680
50. Hibino Y, Takaki J, Kambayashi Y, et al. Health impact of disaster-related stress on pregnant women living in the affected area of the Noto Peninsula earthquake in Japan. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2009;63(1):107-115. doi:10.1111/j.1440-1819.2008.01911.x
51. Feduniw S, Szymusik I. Depressive symptoms during pregnancy and their risk factors – a cross-sectional study. *Eur J Clin Exp Med*. 2020;1361(March):10-15. doi:10.15584/ejcem.2020.1.2
52. Park JH, Karmaus W, Zhang H. Prevalence of and risk factors for depressive symptoms in Korean women throughout pregnancy and in postpartum period. *Asian Nurs Res (Korean Soc Nurs Sci)*. 2015;9(3):219-225. doi:10.1016/j.anr.2015.03.004
53. Biaggi A, Conroy S, Pawlby S, Pariante CM. Identifying the women at risk of antenatal anxiety and depression: A systematic review. *J Affect Disord*. 2016;191:62-77. doi:10.1016/j.jad.2015.11.014
54. Silva MM de J, Leite EPRC, Nogueira DA, Clapis MJ. Depression in pregnancy. Prevalence and associated factors. *Investig y Educ en Enferm*. 2016;34(2):342-350. doi:10.17533/udea.iee.v34n2a14
55. Minister of Health. Regulation of organizational standards of perinatal care. *J Laws Repub Pol*. item 1756:1-21.
56. Royal College of Obstetricians and Gynaecologists R. Preterm Labour, Antibiotics, and Cerebral Palsy. *R Coll Obstet Gynaecol*. 2013;(33):1-8. https://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/scientific-impact-papers/sip_33.pdf.
57. Arias F, Rodriguez L, Rayne SC, Kraus FT. Maternal placental vasculopathy and

- infection: Two distinct subgroups among patients with preterm labor and preterm ruptured membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;168(2):585-591. doi:10.1016/0002-9378(93)90499-9
58. Salafia CM, Ghidini A, Lopèz-Zeno JA, Pezzullo JC. Uteroplacental pathology and maternal arterial mean blood pressure in spontaneous prematurity. *J Soc Gynecol Investig.* 1998;5(2):68-71. doi:10.1016/S1071-5576(97)00104-4
 59. McLean M, Bisits A, Davies J, Woods R, Lowry P, Smith R. A placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nat Med.* 1995;1(5):460-463. doi:10.1038/nm0595-460
 60. Zoumakis E, Makrigiannakis A, Margioris AN, Stournaras C, Gravanis A. Endometrial corticotropin-releasing hormone. Its potential autocrine and paracrine actions. In: *Annals of the New York Academy of Sciences.* Vol 828. Blackwell Publishing Inc.; 1997:84-94. doi:10.1111/j.1749-6632.1997.tb48525.x
 61. Smith R. Parturition. *N Engl J Med.* 2007;356(3):271-283. doi:10.1056/NEJMra061360
 62. Korebrits C, Ramirez MM, Watson L, Brinkman E, Bocking AD, Challis JRG. Maternal corticotropin-releasing hormone is increased with impending preterm birth. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(5):1585-1591. doi:10.1210/jcem.83.5.4804
 63. Ellis MJ, Livesey JH, Inder WJ, Prickett TCR, Reid R. Plasma corticotropin-releasing hormone and unconjugated estriol in human pregnancy: Gestational patterns and ability to predict preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;186(1):94-99. doi:10.1067/mob.2002.119188
 64. Li D, Liu L, Odouli R. Presence of depressive symptoms during early pregnancy and the risk of preterm delivery: A prospective cohort study. *Human Reproduction.* doi:10.1093/humrep/den342
 65. Doktorchik C, Premji S, Slater D, Williamson T, Tough S, Patten S. Patterns of change in anxiety and depression during pregnancy predict preterm birth. *J Affect Disord.* 2018;227(October):71-78. doi:10.1016/j.jad.2017.10.001
 66. Mochache K, Mathai M, Gachuno O, Stoep A, Kumar M. Depression during

- pregnancy and preterm delivery: A prospective cohort study among women attending antenatal clinic at Pumwani Maternity Hospital. *Ann Gen Psychiatry*. 2018;17(1):1-2. doi:10.1186/s12991-018-0202-6
67. Grammatopoulos DK, Hillhouse EW. Role of corticotropin-releasing hormone in onset of labour. *Lancet*. 1999;354(9189):1546-1549. doi:10.1016/S0140-6736(99)03418-2
 68. Gibb W. The role of prostaglandins in human parturition. *Ann Med*. 1998;30(3):235-241. doi:10.3109/07853899809005850
 69. Schatz F, Guzeloglu-Kayisli O, Basar M, et al. Enhanced Human Decidual Cell-Expressed FKBP51 May Promote Labor-Related Functional Progesterone Withdrawal. *Am J Pathol*. 2015;185(9):2402-2411. doi:10.1016/j.ajpath.2015.05.014
 70. Lockwood CJ. Pathogenesis of spontaneous preterm birth Pathogenesis of spontaneous preterm birth. UpToDate. [https://www-1uptodate-1com-100022cfw14d9.han3.wum.edu.pl/contents/pathogenesis-of-spontaneous-preterm-birth?search=Pathogenesis of spontaneous preterm birth&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1](https://www-1uptodate-1com-100022cfw14d9.han3.wum.edu.pl/contents/pathogenesis-of-spontaneous-preterm-birth?search=Pathogenesis%20of%20spontaneous%20preterm%20birth&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1). Published 2019. Accessed April 30, 2020.
 71. Smith R, Mesiano S, Chan E-C, Brown S, Jaffe RB. Corticotropin-Releasing Hormone Directly and Preferentially Stimulates Dehydroepiandrosterone Sulfate Secretion by Human Fetal Adrenal Cortical Cells*. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(8):2916-2920. doi:10.1210/jcem.83.8.5020
 72. Chakravorty A, Mesiano SAM, Jaffe RB. Corticotropin-releasing hormone stimulates P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase in human fetal adrenal cells via protein kinase C. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(10):3732-3738. doi:10.1210/jc.84.10.3732
 73. Matsui K, Higashi K, Fukunaga K, Miyazaki K, Maeyama M, Miyamoto E. Hormone treatments and pregnancy alter myosin light chain kinase and calmodulin levels in rabbit myometrium. *J Endocrinol*. 1983;97(1):11-19. doi:10.1677/joe.0.0970011
 74. Windmoller R, Lye SJ, Challis JRG. Estradiol modulation of ovine uterine activity.

- Can J Physiol Pharmacol.* 1983;61(7):722-728. doi:10.1139/y83-112
75. Bale TL, Dorsa DM. Cloning, novel promoter sequence, and estrogen regulation of a rat oxytocin receptor gene. *Endocrinology.* 1997;138(3):1151-1158. doi:10.1210/endo.138.3.4998
 76. Melekoglu R, Yilmaz E, Ciftci O, Kafadar YT, Celik E. Associations between second-trimester amniotic fluid levels of ADAMTS4, ADAMTS5, IL-6, and TNF- α and spontaneous preterm delivery in singleton pregnancies. *J Perinat Med.* 2019;47(3):304-310. doi:10.1515/jpm-2018-0297
 77. Houben ML, Nikkels PGJ, van Bleek GM, et al. The association between intrauterine inflammation and spontaneous vaginal delivery at term: A cross-sectional study. *PLoS One.* 2009;4(8). doi:10.1371/journal.pone.0006572
 78. Laudanski P, Lemancewicz A, Kuc P, et al. Chemokines profiling of patients with preterm birth. *Mediators Inflamm.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/185758
 79. Laudanski P, Pierzynski P, Laudanski T. Reductionist and system approaches to study the role of infection in preterm labor and delivery. In: *BMC Pregnancy and Childbirth.* Vol 7. ; 2007. doi:10.1186/1471-2393-7-S1-S9
 80. Romero R, Gonzalez R, Sepulveda W, et al. Infection and labor: VIII. Microbial invasion of the amniotic cavity in patients with suspected cervical incompetence: Prevalence and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;167(4):1086-1091. doi:10.1016/S0002-9378(12)80043-3
 81. Siegel JD, Mccracken GH, Mccracken GH. Sepsis Neonatorum. *N Engl J Med.* 1981;304(11):642-647. doi:10.1056/NEJM198103123041105
 82. Olgun NS, Hanna N, Reznik SE. BQ-123 prevents LPS-induced preterm birth in mice via the induction of uterine and placental IL-10. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015;282(3):275-284. doi:10.1016/j.taap.2014.09.008
 83. Li L, Kang J, Lei W. Role of toll-like receptor 4 in inflammation-induced preterm delivery. *Molecular Human Reproduction.* doi:10.1093/molehr/gap106
 84. Oppenheim JJ. The future of the cytokine discipline. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(9). doi:10.1101/cshperspect.a028498

85. K K. [Cytokine]. *Rinsho Byori*. 2001;(Suppl 115:111-20.).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11391927>. Accessed May 1, 2020.
86. Gołab J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T. *Immunologia*. PWN; 2012.
<https://ksiegarnia.pwn.pl/Nanotechnologie,68728960,p.html>. Accessed May 1, 2020.
87. Vigeh M, Yokoyama K, Seyedaghamiri Z, et al. Blood lead at currently acceptable levels may cause preterm labour. *Occup Environ Med*. 2011;68(3):231-234. doi:10.1136/oem.2009.050419
88. Lamont RF, Taylor-Robinson D, Wigglesworth JS, Furr PM, Evans RT, Elder MG. The role of mycoplasmas, ureaplasmas and chlamydiae in the genital tract of women presenting in spontaneous early preterm labour. *J Med Microbiol*. 1987;24(3):253-257. doi:10.1099/00222615-24-3-253
89. Ahn AC, Tewari M, Poon CS, Phillips RS. The limits of reductionism in medicine: Could systems biology offer an alternative? *PLoS Med*. 2006;3(6):0709-0713. doi:10.1371/journal.pmed.0030208
90. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, et al. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2010;126(3):443-456. doi:10.1542/peds.2009-2959
91. Martin R. Pathophysiology, clinical manifestations, and diagnosis of respiratory distress syndrome in the newborn. UpToDate.
[https://www.uptodate.com/contents/pathophysiology-clinical-manifestations-and-diagnosis-of-respiratory-distress-syndrome-in-the-newborn?search=respiratory distress syndrome in neonate&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&dis](https://www.uptodate.com/contents/pathophysiology-clinical-manifestations-and-diagnosis-of-respiratory-distress-syndrome-in-the-newborn?search=respiratory%20distress%20syndrome%20in%20neonate&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&dis). Published 2018. Accessed April 30, 2020.
92. Frank L, Ilene Sosenko RS. Development of lung antioxidant enzyme system in late gestation: Possible implications for the prematurely born infant. *J Pediatr*. 1987;110(1):9-14. doi:10.1016/S0022-3476(87)80279-2
93. Carlton DP, Albertine KH, Cho SC, Lont M, Bland RD. Role of neutrophils in lung vascular injury and edema after premature birth in lambs. *J Appl Physiol*. 1997;83(4):1307-1317. doi:10.1152/jappl.1997.83.4.1307

94. Cheah FC, Winterbourn CC, Darlow BA, Mocatta TJ, Vissers MCM. Nuclear factor κ B activation in pulmonary leukocytes from infants with hyaline membrane disease: Associations with chorioamnionitis and *Ureaplasma urealyticum* colonization. *Pediatr Res.* 2005;57(5 I):616-623. doi:10.1203/01.PDR.0000156209.37627.82
95. Hendrikje Buss I, Senthilmohan R, Darlow BA, Mogridge N, Kettle AJ, Winterbourn CC. 3-Chlorotyrosine as a marker of protein damage by myeloperoxidase in tracheal aspirates from preterm infants: Association with adverse respiratory outcome. *Pediatr Res.* 2003;53(3):455-462. doi:10.1203/01.PDR.0000050655.25689.CE
96. Clark RH, Gerstmann DR, Jobe AH, Moffitt ST, Slutsky AS, Yoder BA. Lung injury in neonates: Causes, strategies for prevention, and long-term consequences. *J Pediatr.* 2001;139(4):478-486. doi:10.1067/mpd.2001.118201
97. Turunen R, Nupponen I, Siitonen S, Repo H, Andersson S. Onset of mechanical ventilation is associated with rapid activation of circulating phagocytes in preterm infants. *Pediatrics.* 2006;117(2):448-454. doi:10.1542/peds.2005-0123
98. Nitta K, Kobayashi T. Impairment of surfactant activity and ventilation by proteins in lung edema fluid. *Respir Physiol.* 1994;95(1):43-51. doi:10.1016/0034-5687(94)90046-9
99. Eric C Eichenwald M, Ann R Stark M. Bronchopulmonary dysplasia: Definition, pathogenesis, and clinical features. UpToDate. https://www-1uptodate-1com-100022cfw13b3.han3.wum.edu.pl/contents/bronchopulmonary-dysplasia-definition-pathogenesis-and-clinical-features?search=Short-term complications of the preterm infant&topicRef=4965&source=see_link. Published 2020. Accessed April 30, 2020.
100. Baraldi E, Filippone M. *Chronic Lung Disease after Premature Birth*. Vol 357. Massachusetts Medical Society; 2007:1946-1955. doi:10.1056/NEJMra067279
101. Mourani PM, Abman SH. Pulmonary vascular disease in bronchopulmonary dysplasia: Pulmonary hypertension and beyond. *Curr Opin Pediatr.* 2013;25(3):329-337. doi:10.1097/MOP.0b013e328360a3f6
102. Thibeault DW, Mabry SM, Ekekezie II, Truog WE. Lung elastic tissue maturation

- and perturbations during the evolution of chronic lung disease. *Pediatrics*. 2000;106(6):1452-1459. doi:10.1542/peds.106.6.1452
103. Siffel C, Kistler KD, Lewis JFM, Sarda SP. Global incidence of bronchopulmonary dysplasia among extremely preterm infants: a systematic literature review. *J Matern Neonatal Med*. 2019. doi:10.1080/14767058.2019.1646240
 104. Guo Y, Jiang Y, Tang H, Fan W, Ai C, Liu P. Effect of sustained inflations and intermittent positive pressure ventilation on bronchopulmonary dysplasia or death among neonatal: A protocol for systematic review. *Med (United States)*. 2020;99(8). doi:10.1097/MD.00000000000019084
 105. Martin R. Management of apnea of prematurity. UpToDate. [https://www.uptodate.com/contents/management-of-apnea-of-prematurity?search=management of apnea of prematurity&source=search_result#H12](https://www.uptodate.com/contents/management-of-apnea-of-prematurity?search=management%20of%20apnea%20of%20prematurity&source=search_result#H12). Published 2019. Accessed April 30, 2020.
 106. Ahmad KA, Bennett MM, Ahmad SF, Clark RH, Tolia VN. Morbidity and mortality with early pulmonary haemorrhage in preterm neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2019;104(1):F63-F68. doi:10.1136/archdischild-2017-314172
 107. Philips JB. Patent ductus arteriosus in preterm infants: Pathophysiology, clinical manifestations, and diagnosis - UpToDate. https://www.uptodate.com/contents/patent-ductus-arteriosus-in-preterm-infants-pathophysiology-clinical-manifestations-and-diagnosis?search=pda&topicRef=15814&source=see_link. Published 2019. Accessed April 30, 2020.
 108. Kluckow M, Evans N. Low superior vena cava flow and intraventricular haemorrhage in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2000;82(3). doi:10.1136/fn.82.3.f188
 109. Giliberti P, De Leonibus C, Giordano L, Giliberti P. The physiopathology of the patent ductus arteriosus. *J Matern Neonatal Med*. 2009;22(SUPPL. 3):6-9. doi:10.1080/14767050903198215
 110. Liebowitz M, Koo J, Wickremasinghe A, Allen IE, Clyman RI. Effects of

- Prophylactic Indomethacin on Vasopressor-Dependent Hypotension in Extremely Preterm Infants. *J Pediatr*. 2017;182:21-27.e2. doi:10.1016/j.jpeds.2016.11.008
111. Bouissou A, Rakza T, Klosowski S, Tourneux P, Vanderborght M, Storme L. Hypotension in Preterm Infants with Significant Patent Ductus Arteriosus: Effects of Dopamine. *J Pediatr*. 2008;153(6):790-794. doi:10.1016/j.jpeds.2008.06.014
 112. Clyman RI, Wickremasinghe A, Merritt TA, et al. Hypotension following patent ductus arteriosus ligation: The role of adrenal hormones. *J Pediatr*. 2014;164(6). doi:10.1016/j.jpeds.2014.01.058
 113. Noori S, McNamara P, Jain A, et al. Catecholamine-resistant hypotension and myocardial performance following patent ductus arteriosus ligation. *J Perinatol*. 2015;35(2):123-127. doi:10.1038/jp.2014.151
 114. Wyckoff MH, Aziz K, Escobedo MB, et al. Part 13: Neonatal resuscitation: 2015 American Heart Association guidelines update for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care. *Circulation*. 2015;132(18):S543-S560. doi:10.1161/CIR.0000000000000267
 115. Perlman JM, Wyllie J, Kattwinkel J, et al. Part 7: Neonatal resuscitation: 2015 international consensus on cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care science with treatment recommendations. *Circulation*. 2015;132:S204-S241. doi:10.1161/CIR.0000000000000276
 116. Wilson E, Norman M, Wilson E, et al. Admission Hypothermia in Very Preterm Infants and Neonatal Mortality and Morbidity. *J Pediatr*. 2016;175:61-67.e4. doi:10.1016/j.jpeds.2016.04.016
 117. Laptook AR, Bell EF, Shankaran S, et al. Admission Temperature and Associated Mortality and Morbidity among Moderately and Extremely Preterm Infants. *J Pediatr*. 2018;192:53-59.e2. doi:10.1016/j.jpeds.2017.09.021
 118. Ting JY, Synnes AR, Lee SK, Shah PS. Association of admission temperature and death or adverse neurodevelopmental outcomes in extremely low-gestational age neonates. *J Perinatol*. 2018;38(7):844-849. doi:10.1038/s41372-018-0099-6
 119. Stark AR, Simmons R. Neonatal hyperglycemia - UpToDate. Noviembre 28. <https://www.uptodate.com/contents/neonatal-hyperglycemia?search=neonatal>

- diabetes&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1. Published 2017. Accessed April 29, 2020.
120. Kim JH, Abrams SA, Kim MS. Neonatal necrotizing enterocolitis: pathology and pathogenesis. UpToDate. [https://www-1uptodate-1com-100022cfw1195.han3.wum.edu.pl/contents/neonatal-necrotizing-enterocolitis-pathology-and-pathogenesis?sectionName=Circulatory instability&search=preterm infant&topicRef=5057&anchor=H11&source=see_link#H11](https://www-1uptodate-1com-100022cfw1195.han3.wum.edu.pl/contents/neonatal-necrotizing-enterocolitis-pathology-and-pathogenesis?sectionName=Circulatory%20instability&search=preterm%20infant&topicRef=5057&anchor=H11&source=see_link#H11). Published 2018. Accessed April 30, 2020.
 121. Neu J, Walker WA. Necrotizing enterocolitis. *N Engl J Med*. 2011;364(3):255-264. doi:10.1056/NEJMra1005408
 122. Ballance WA, Dahms BB, Shenker N, Kliegman RM. Pathology of neonatal necrotizing enterocolitis: A ten-year experience. *J Pediatr*. 1990;117(1 PART 2). doi:10.1016/S0022-3476(05)81124-2
 123. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: The experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2002;110(2 I):285-291. doi:10.1542/peds.110.2.285
 124. Mandy George T M, Leonard E Weisman M, Melanie S Kim M. Short-term complications of the preterm infant - UpToDate. UpToDate. [https://www.uptodate.com/contents/short-term-complications-of-the-preterm-infant?search=parto prematuro&source=search_result&selectedTitle=3~150&usage_type=default&display_rank=3](https://www.uptodate.com/contents/short-term-complications-of-the-preterm-infant?search=parto%20prematuro&source=search_result&selectedTitle=3~150&usage_type=default&display_rank=3). Published 2019. Accessed April 29, 2020.
 125. Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, et al. Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *J Am Med Assoc*. 2004;292(19):2357-2365. doi:10.1001/jama.292.19.2357
 126. Hussain N, Clive J, Bhandari V. Current incidence of retinopathy of prematurity, 1989-1997. *Pediatrics*. 1999;104(3). doi:10.1542/peds.104.3.e26
 127. K David MD. Retinopathy of prematurity: Pathogenesis, epidemiology, classification and screening. UpToDate. <https://www-1uptodate-1com-100022cfw1195.han3.wum.edu.pl/contents/retinopathy-of-prematurity->

- pathogenesis-epidemiology-classification-and-screening?search=preterm infant&topicRef=4965&source=see_link. Published 2019. Accessed April 30, 2020.
128. Hong HS, Lee JY. Intracranial hemorrhage in term neonates. *Child's Nerv Syst.* 2018;34(6):1135-1143. doi:10.1007/s00381-018-3788-8
 129. Fuchs P, Czech I, Lorek M, Fuchs J, Krzych Ł. Noworodki po przebytych krwawieniu dokomorowym – ich charakterystyka kliniczna i rozwój po wypisie z Oddziału Anestezjologii i Intensywnej Terapii Neonates after intraventricular hemorrhage –. 2018:242-248.
 130. Inder TE, Perlman JM, Volpe JJ. Intracranial Hemorrhage: Subdural, Subarachnoid, Intraventricular (Term Infant), Miscellaneous. Subdural, Subarachnoid, Intraventricular (Term Infant), Miscellaneous. In: *Volpe's Neurology of the Newborn*. Elsevier; 2017:593-622. doi:10.1016/B978-0-323-42876-7.00022-3
 131. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: A study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *J Pediatr.* 1978;92(4):529-534. doi:10.1016/S0022-3476(78)80282-0
 132. Romero-Guzmán GJ, López-Muñoz F. Prevalencia y factores de riesgo de leucomalacia periventricular en recién nacidos prematuros. Revisión sistemática. *Rev Neurol.* 2017;65(2):57-62. doi:10.33588/rn.6502.2017002
 133. Huang J, Zhang L, Kang B, et al. Association between perinatal hypoxic-ischemia and periventricular leukomalacia in preterm infants: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184993. doi:10.1371/journal.pone.0184993
 134. Gotardo JW, de Freitas Valle Volkmer N, Stangler GP, Dornelles AD, de Athayde Bohrer BB, Carvalho CG. Impact of peri-intraventricular haemorrhage and periventricular leukomalacia in the neurodevelopment of preterms: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2019;14(10). doi:10.1371/journal.pone.0223427
 135. Sellier E, Platt MJ, Andersen GL, et al. Decreasing prevalence in cerebral palsy:

- A multi-site European population-based study, 1980 to 2003. *Dev Med Child Neurol*. 2016;58(1):85-92. doi:10.1111/dmcn.12865
136. Van Naarden Braun K, Doernberg N, Schieve L, Christensen D, Goodman A, Yeargin-Allsopp M. Birth prevalence of cerebral palsy: A population-based study. *Pediatrics*. 2016;137(1). doi:10.1542/peds.2015-2872
 137. Hirvonen M, Ojala R, Korhonen P, et al. Cerebral palsy among children born moderately and late preterm. *Pediatrics*. 2014;134(6):e1584-e1593. doi:10.1542/peds.2014-0945
 138. Oskoui M, Coutinho F, Dykeman J, Jetté N, Pringsheim T. An update on the prevalence of cerebral palsy: A systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol*. 2013;55(6):509-519. doi:10.1111/dmcn.12080
 139. Mathews TJ, Macdorman MF, Thoma ME. Infant mortality statistics from the 2013 period linked birth/infant death data set. National Vital Statistics Reports. <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-100022cfw1475.han3.wum.edu.pl/pubmed?term=26270610>. Published 2015. Accessed April 30, 2020.
 140. Depression During and After Pregnancy: When It's More Than the Baby Blues. *Am Fam Physician*. 2016;93(10).
 141. Zivoder I, Martic-Biocina S, Veronek J, Ursulin-Trstenjak N, Sajko M, Paukovic M. Mental disorders/difficulties in the postpartum period. *Psychiatr Danub*. 2019;31:338-344.
 142. Berglund J. Treating Postpartum Depression: Beyond the Baby Blues. *IEEE Pulse*. 2020;11(1):17-20. doi:10.1109/MPULS.2020.2972723
 143. Degner D. Differentiating between “baby blues,” severe depression, and psychosis. *BMJ*. 2017;359. doi:10.1136/bmj.j4692
 144. Koshchavtsev AG, Mul'Tanovskaya VN, Lorer V V. Baby blues syndrome as an adaptation disorder in the early tages of formation of the mother-child system. *Neurosci Behav Physiol*. 2008;38(4):439-442. doi:10.1007/s11055-008-0063-6
 145. Serati M, Carnevali G. Perinatal depression. *Clin Cases Psychiatry Integr Transl Neurosci Approaches*. 2018;35(3):155-170. doi:10.1007/978-3-319-91557-9_9

146. Molenaar NM, Kamperman AM, Boyce P, Bergink V. Guidelines on treatment of perinatal depression with antidepressants: An international review. *Aust N Z J Psychiatry*. 2018;52(4):320-327. doi:10.1177/0004867418762057
147. Aktas S, Yesilcicek Calik K. Factors Affecting Depression During Pregnancy and the Correlation Between Social Support and Pregnancy Depression. *Iran Red Crescent Med J*. 2015;17(9):e16640. doi:10.5812/ircmj.16640
148. Wollner HJ, Hatchett JR, Levine J, Loewe S. Isolation of a Physiologically Active Tetrahydrocannabinol from Cannabis Sativa Resin. *J Am Chem Soc*. 1942;64(1):26-29. doi:10.1021/ja01253a008
149. Adams R, Mackenzie S, Loewe S. Tetrahydrocannabinol Homologs with Doubly Branched Alkyl Groups in the 3-Position. XVIII. *J Am Chem Soc*. 1948;70(2):664-668. doi:10.1021/ja01182a068
150. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, Structure, and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc*. 1964;86(8):1646-1647. doi:10.1021/ja01062a046
151. Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 1988;34(5):605-613.
152. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990;346(6284):561-564. doi:10.1038/346561a0
153. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. doi:10.1038/365061a0
154. Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995;50(1):83-90. doi:10.1016/0006-2952(95)00109-D
155. Devane WA, Hanuš L, Breuer A, et al. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (80-)*. 1992;258(5090):1946-1949. doi:10.1126/science.1470919
156. Silver RJ. The Endocannabinoid System of Animals. *Animals*. 2019;9(9):686.

doi:10.3390/ani9090686

157. Hua T, Vemuri K, Pu M, et al. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB1. *Cell*. 2016;167(3):750-762.e14. doi:10.1016/j.cell.2016.10.004
158. Tuccinardi T, Ferrarini PL, Manera C, Ortore G, Saccomanni G, Martinelli A. Cannabinoid CB2/CB1 selectivity. Receptor modeling and automated docking analysis. *J Med Chem*. 2006;49(3):984-994. doi:10.1021/jm050875u
159. Griffin G, Tao Q, Abood ME. Cloning and pharmacological characterization of the rat CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000;292(3):886-894.
160. Li X, Hua T, Vemuri K, et al. Crystal Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB2. *Cell*. 2019;176(3):459-467.e13. doi:10.1016/j.cell.2018.12.011
161. Xing C, Zhuang Y, Xu TH, et al. Cryo-EM Structure of the Human Cannabinoid Receptor CB2-Gi Signaling Complex. *Cell*. 2020;180(4):645-654.e13. doi:10.1016/j.cell.2020.01.007
162. Thakur G, Nikas S, Makriyannis A. CB1 Cannabinoid Receptor Ligands. *Mini-Reviews Med Chem*. 2005;5(7):631-640. doi:10.2174/1389557054368772
163. Baldassano S, Serio R, Mule' F. Cannabinoid CB1 receptor activation modulates spontaneous contractile activity in mouse ileal longitudinal muscle. *Eur J Pharmacol*. 2008;582(1-3):132-138. doi:10.1016/j.ejphar.2007.12.016
164. Romano MR, Lograno MD. Cannabinoid agonists induce relaxation in the bovine ophthalmic artery: Evidences for CB 1 receptors, nitric oxide and potassium channels. *Br J Pharmacol*. 2006;147(8):917-925. doi:10.1038/sj.bjp.0706687
165. Brighton PJ, McDonald J, Taylor AH, et al. Characterization of anandamide-stimulated cannabinoid receptor signaling in human ULTR myometrial smooth muscle cells. *Mol Endocrinol*. 2009;23(9):1415-1427. doi:10.1210/me.2009-0097
166. Tanaka K, Mayne L, Khalil A, et al. The role of the endocannabinoid system in aetiopathogenesis of endometriosis: A potential therapeutic target. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2020;244:87-94. doi:10.1016/j.ejogrb.2019.11.012
167. Sanchez AM, Quattrone F, Pannese M, et al. The cannabinoid receptor CB1 contributes to the development of ectopic lesions in a mouse model of

- endometriosis. *Hum Reprod.* 2017;32(1):175-184. doi:10.1093/humrep/dew281
168. Bilgic E, Meydanli EG, Kose S, et al. Endocannabinoids modulate apoptosis in endometriosis and adenomyosis. *Acta Histochem.* 2017;119(5):523-532. doi:10.1016/j.acthis.2017.05.005
 169. Jarlenski M, Koma JW, Zank J, Bodnar LM, Bogen DL, Chang JC. Trends in perception of risk of regular marijuana use among US pregnant and nonpregnant reproductive-aged women. *Am J Obstet Gynecol.* 2017;217(6):705-707. doi:10.1016/j.ajog.2017.08.015
 170. Young-Wolff KC, Sarovar V, Tucker LY, et al. Self-reported Daily, Weekly, and Monthly Cannabis Use among Women before and during Pregnancy. *JAMA Netw Open.* 2019;2(7). doi:10.1001/jamanetworkopen.2019.6471
 171. Volkow ND, Han B, Compton WM, McCance-Katz EF. Self-reported Medical and Nonmedical Cannabis Use among Pregnant Women in the United States. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2019;322(2):167-169. doi:10.1001/jama.2019.7982
 172. Corsi DJ, Walsh L, Weiss D, et al. Association between Self-reported Prenatal Cannabis Use and Maternal, Perinatal, and Neonatal Outcomes. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2019;322(2):145-152. doi:10.1001/jama.2019.8734
 173. van Gelder MMHJ, Reefhuis J, Caton AR, Werler MM, Druschel CM, Roeleveld N. Characteristics of pregnant illicit drug users and associations between cannabis use and perinatal outcome in a population-based study. *Drug Alcohol Depend.* 2010;109(1-3):243-247. doi:10.1016/j.drugalcdep.2010.01.007
 174. Fergusson DM, Horwood LJ, Northstone K. Maternal use of cannabis and pregnancy outcome. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2002;109(1):21-27. doi:10.1111/j.1471-0528.2002.01020.x
 175. Holecki M, Hryniewicz W, Duława J, et al. *Rekomendacje Diagnostyki, Terapii i Profilaktyki Zakażeń Układu Moczowego u Dorosłych.* Warszawa: Narodowy Instytut Leków; 2015. <http://www.antybiotyki.edu.pl/pdf/uklmoczowyinternet.pdf>.
 176. Kokot F, Klekot H, Drabczyk R. Nefrologia – postępy 2013. *Med Prakt.* 2013:1-23.

177. National guideline for the management of bacterial vaginosis. Clinical Effectiveness Group (Association of Genitourinary Medicine and the Medical Society for the Study of Venereal Diseases. *Sex Transm Infect.* 1999;75(Suppl 1):16-18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10616375>. Accessed April 29, 2020.
178. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KCS, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med.* 1983;74(1):14-22. doi:10.1016/0002-9343(83)91112-9
179. van Schalkwyk J, Yudin MH, Allen V, et al. Vulvovaginitis: Screening for and Management of Trichomoniasis, Vulvovaginal Candidiasis, and Bacterial Vaginosis. *J Obstet Gynaecol Canada.* 2015;37(3):266-274. doi:10.1016/S1701-2163(15)30316-9
180. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Nadciśnienia Tętniczego Polskiego Towarzystwa Kardiologicznego oraz Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników. Postępowanie w nadciśnieniu tętniczym u kobiet w ciąży. Zapobieganie, diagnostyka, leczenie i odległe rokowanie. *Ginekol i Perinatol Prakt.* 2019;4(2):43-111. doi:10.5603/AH.a2019.011.
181. Cypryk K. Cukrzyca ciążowa — rozpoznawanie i leczenie. *Ginekol i Perinatol Prakt.* 2016;1(2):41-44.
182. WHO. Diagnostic Criteria and Classification of Hyperglycaemia First Detected in Pregnancy: a World Health Organization Guideline. 2014:1-63.
183. Ewa Wender-Ożegowska, Dorota Bomba-Opoń, Jacek Brązert, Zbigniew Celewicz, Krzysztof Czajkowski, Paweł Gutaj, Aneta Malinowska-Polubiec, Agnieszka Zawiejska MW. Standardy Polskiego Towarzystwa Ginekologów i Położników postępowania u kobiet z cukrzycą. *Ginekol i Perinatol Prakt.* 2017;2(5):215-229.
184. Janusz Gumprecht, Wojciech Młynarski KS. *Zalecenia Kliniczne Dotyczące Postępowania u Chorych Na Cukrzycę 2019. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego.* Vol 5. Zabrze: Via Medica; 2019.
185. Sun X, Deng W, Li Y, et al. Sustained endocannabinoid signaling compromises decidual function and promotes inflammation-induced preterm birth. *J Biol Chem.*

- 2016;291(15):8231-8240. doi:10.1074/jbc.M115.707836
186. Bariani MV, Rubio APD, Cella M, Burdet J, Franchi AM, Aisemberg J. Role of the endocannabinoid system in the mechanisms involved in the LPS-induced preterm labor. *Reproduction*. 2015;150(6):463-472. doi:10.1530/REP-15-0211
 187. Shen X, Duan H, Wang S, Hong W, Wang YY, Lin SL. Expression of Cannabinoid Receptors in Myometrium and its Correlation With Dysmenorrhea in Adenomyosis. *Reprod Sci*. 2019;26(12):1618-1625. doi:10.1177/1933719119833483
 188. Liu YJ, Fan HB, Jin Y, et al. Cannabinoid receptor 2 suppresses leukocyte inflammatory migration by modulating the JNK/c-Jun/Alox5 pathway. *J Biol Chem*. 2013;288(19):13551-13562. doi:10.1074/jbc.M113.453811
 189. Taylor AH, Amoako AA, Bambang K, et al. Endocannabinoids and pregnancy. *Clin Chim Acta*. 2010;411(13-14):921-930. doi:10.1016/j.cca.2010.03.012
 190. Sun X, Cappelletti M, Li Y, Karp CL, Divanovic S, Dey SK. Cnr2 deficiency confers resistance to inflammation- induced preterm birth in mice. *Endocrinology*. 2014;155(10):4006-4014. doi:10.1210/en.2014-1387
 191. Wang H, Xie H, Dey SK. Loss of cannabinoid receptor CB1 induces preterm birth. *PLoS One*. 2008;3(10):e3320. doi:10.1371/journal.pone.0003320
 192. Raba G, Tabarkiewicz J. Cytokines in preterm delivery: Proposal of a new diagnostic algorithm. *J Immunol Res*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/8073476
 193. Fechtner S, Singh AK, Srivastava I, et al. Cannabinoid receptor 2 agonist JWH-015 inhibits interleukin-1 β induced inflammation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and in adjuvant induced arthritis rat via glucocorticoid receptor. *Front Immunol*. 2019;10(MAY):1027. doi:10.3389/fimmu.2019.01027
 194. Kapellos TS, Taylor L, Feuerborn A, et al. Cannabinoid receptor 2 deficiency exacerbates inflammation and neutrophil recruitment. *FASEB J*. 2019;33(5):6154-6167. doi:10.1096/fj.201802524R
 195. Klein TW, Lane B, Newton CA, Friedman H. The cannabinoid system and cytokine network (44546). *Exp Biol Med*. 2000;225(1):1-8. doi:10.1046/j.1525-1373.2000.22501.x

196. Lipina C, Stretton C, Hastings S, et al. Regulation of MAP kinase-directed mitogenic and protein kinase B-mediated signaling by cannabinoid receptor type 1 in skeletal muscle cells. *Diabetes*. 2010;59(2):375-385. doi:10.2337/db09-0979
197. Denny MC, Friel AM, Houlihan DD, Broderick VM, Smith T, Morrison JJ. Cannabinoids and the human uterus during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;190(1):2-9. doi:10.1016/j.ajog.2003.07.013
198. Asghari-Roodsari A, Lesani A, Javadi-Paydar M, et al. Tocolytic effect of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in mice model of lipopolysaccharide-induced preterm delivery: Role of nitric oxide. *Reprod Sci*. 2010;17(4):391-400. doi:10.1177/1933719109358456
199. Wang J. Glial endocannabinoid system in pain modulation. *Int J Neurosci*. 2019;129(1):94-100. doi:10.1080/00207454.2018.1503178
200. Yuill MB, Hale DE, Guindon J, Morgan DJ. Anti-nociceptive interactions between opioids and a cannabinoid receptor 2 agonist in inflammatory pain. *Mol Pain*. 2017;13:1744806917728227. doi:10.1177/1744806917728227
201. Woodhams SG, Sagar DR, Burston JJ, Chapman V. The role of the endocannabinoid system in pain. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;227:119-143. doi:10.1007/978-3-662-46450-2_7
202. Thapa D, Cairns EA, Szczesniak AM, et al. Allosteric cannabinoid receptor 1 (CB1) ligands reduce ocular pain and inflammation. *Molecules*. 2020;25(2):11-13. doi:10.3390/molecules25020417
203. Malan TP, Ibrahim MM, Vanderah TW, Makriyannis A, Porreca F. Inhibition of pain responses by activation of CB2 cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids*. 2002;121(1-2):191-200. doi:10.1016/S0009-3084(02)00155-X
204. Starowicz K, Finn DP. Cannabinoids and Pain: Sites and Mechanisms of Action. *Adv Pharmacol*. 2017;80:437-475. doi:10.1016/bs.apha.2017.05.003
205. Malan TP, Ibrahim MM, Lai J, Vanderah TW, Makriyannis A, Porreca F. CB2 cannabinoid receptor agonists: Pain relief without psychoactive effects? *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3(1):62-67. doi:10.1016/S1471-4892(02)00004-8
206. Grenald SA, Young MA, Wang Y, et al. Synergistic attenuation of chronic pain

- using mu opioid and cannabinoid receptor 2 agonists. *Neuropharmacology*. 2017;116:59-70. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.12.008
207. Sánchez-Aparicio P, Florán B, Rodríguez Velázquez D, Ibancovich JA, Varela Guerrero JA, Recillas S. Cannabinoids CB2 Receptors, One New Promising Drug Target for Chronic and Degenerative Pain Conditions in Equine Veterinary Patients. *J Equine Vet Sci*. 2020;85:102880. doi:10.1016/j.jevs.2019.102880
 208. Metz TD, Allshouse AA, Hogue CJ, et al. Maternal marijuana use, adverse pregnancy outcomes, and neonatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol*. 2017;217(4):478.e1-478.e8. doi:10.1016/j.ajog.2017.05.050
 209. Chang X, Bian Y, He Q, et al. Suppression of STAT3 Signaling by Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) Induces Trophoblast Dysfunction. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42(2):537-550. doi:10.1159/000477603
 210. Natale B V., Gustin KN, Lee K, et al. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol Exposure During Rat Pregnancy Leads To Symmetrical Fetal Growth Restriction and Labyrinth-Specific Vascular Defects in the Placenta. *Sci Rep*. 2020;10(1):1-15. doi:10.1038/s41598-019-57318-6
 211. Dawes L, Groom K, Jordan V, Waugh J. The use of specialised preterm birth clinics for women at high risk of spontaneous preterm birth: A systematic review. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2020;20(1). doi:10.1186/s12884-020-2731-7
 212. Watson HA, Carter J, David AL, Seed PT, Shennan AH. Full dilation cesarean section: a risk factor for recurrent second-trimester loss and preterm birth. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2017;96(9):1100-1105. doi:10.1111/aogs.13160
 213. Wielgos M, Bomba-Opon D, Breborowicz GH, et al. Recommendations of the Polish Society of Gynecologists and Obstetricians regarding caesarean sections. *Ginekol Pol*. 2018;89(11):644-657. doi:10.5603/GP.a2018.0110
 214. Morken NH, Gunnes N, Magnus P, Jacobsson B. Risk of spontaneous preterm delivery in a low-risk population: The impact of maternal febrile episodes, urinary tract infection, pneumonia and ear-nose-throat infections. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011;159(2):310-314. doi:10.1016/j.ejogrb.2011.08.006
 215. Figueroa R. Infection and preterm labor. *Infect Dis Obstet Gynecol Sixth Ed*.

- 2008;43(4):422-432. doi:10.3109/9781439801994-69
216. Mittendorf R, Williams MA, Kass EH. Prevention of Preterm Delivery and Low Birth Weight Associated with Asymptomatic Bacteriuria. *Clin Infect Dis*. 1992;14(4):927-932. doi:10.1093/clinids/14.4.927
 217. Acosta-Terriquez JE, Ramos-Martínez MA, Zamora-Aguilar LM, Murillo-Llanes J. [Prevalence of urinary tract infection in hospitalized patients with preterm labor]. *Ginecol Obstet Mex*. 2014;82(11):737-743. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25826955>. Accessed April 24, 2020.
 218. Ollberding NJ, Völgyi E, Macaluso M, et al. Urinary microbiota associated with preterm birth: Results from the conditions affecting neurocognitive development and learning in early childhood (CANDLE) study. *PLoS One*. 2016;11(9). doi:10.1371/journal.pone.0162302
 219. Molina JP, Meza JG, Reyes JCL, Barón GP, Hernández JFC. Preterm delivery and asymptomatic bacteriuria. *Ginecol Obstet Mex*. 2008;76(8):454-460. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18798448>. Accessed April 24, 2020.
 220. Taylor AH, Abbas MS, Habiba MA, Konje JC. Histomorphometric evaluation of cannabinoid receptor and anandamide modulating enzyme expression in the human endometrium through the menstrual cycle. *Histochem Cell Biol*. 2010;133(5):557-565. doi:10.1007/s00418-010-0695-9

13 SPIS TABEL I RYCIN

Tabela 1. Sekwencje primerów (5' - 3').	47
Tabela 2. Charakterystyka badanych grup.	49
Tabela 3. Ekspresja receptora CB1 w badanych łożyskach.	62
Tabela 4. Ekspresja receptora CB1a w badanych łożyskach.	63
Tabela 5. Ekspresja receptora CB2 w badanych łożyskach.	64
Tabela 6. Korelacja ekspresji receptorów z wystąpieniem w przeszłości porodu przedwczesnego u kobiet w badanej grupie.	67
Tabela 7. Korelacja ekspresji receptorów z występowaniem w wywiadzie ciąż obumarłych u kobiet w badanej grupie.	69
Tabela 8. Korelacja ekspresji receptorów z podwyższoną temperaturą ciał rodzących w grupie.	70
Tabela 9. Korelacja względnej ekspresji receptorów CB2 z krwawieniem w ciąży u kobiet w badanej grupie.	73
Tabela 10. Korelacja ekspresji receptorów z tkliwością macicy u kobiet w badanej grupie.	73
Rycina 1. Rozkład wieku wśród badanej grupy pacjentek.	52
Rycina 2. Struktura badanej populacji w zależności od liczby przebytych ciąż.	53
Rycina 3. Struktura badanej populacji w zależności od liczby przebytych porodów.	53
Rycina 4. Masa ciała noworodków.	54
Rycina 5. Sposób ukończenia ciąży.	54
Rycina 6. Wywiad położniczy.	55
Rycina 7. Choroby ciężarnych.	56
Rycina 8. Infekcje układu moczowo-płciowego.	56
Rycina 9. Masa ciała badanej populacji.	57
Rycina 10. BMI badanej populacji.	57
Rycina 11. Wzrost pacjentek.	58
Rycina 12. Temperatura ciała rodzących przy przyjęciu do szpitala [°C].	58
Rycina 13. Krwawienie w ciąży.	59
Rycina 14. Hemoglobina i Hematokryt badanej populacji.	60
Rycina 15. pH pochwy pacjentek przy przyjęciu.	61

Rycina 16. Stosowanie używek w trakcie ciąży.....	61
Rycina 17. Ekspresja genów referencyjnych.....	62
Rycina 18. Ekspresja receptora CB1.	63
Rycina 19. Różnica ekspresji receptora CB1a.....	64
Rycina 20. Różnica ekspresji receptora CB2.	65
Rycina 21. Wzajemna korelacja ekspresji receptorów CB1 i CB1a	66
Rycina 22. Korelacja wystąpienia porodu przedwczesnego ze średnią ekspresją receptora CB2.	67
Rycina 23. Korelacja porodu przedwczesnego w wywiadzie ze średnią ekspresją receptora CB1.	68
Rycina 24. Korelacja porodu przedwczesnego w wywiadzie ze średnią ekspresją receptora CB1a.	68
Rycina 25. Korelacja pomiędzy ekspresją receptora CB1a i występowaniem ciąż obumarłych w wywiadzie.	69
Rycina 26. Korelacja średniej ekspresji receptora CB1a i temperatury ciała podczas przyjęcia.....	70
Rycina 27. Korelacja względnej ekspresji CB1 i leukocyturii pacjentek w grupie badanej i kontrolnej.	71
Rycina 28. Korelacja względnej ekspresji CB1a i leukocyturii pacjentek w grupie badanej i kontrolnej.	71
Rycina 29. Korelacje średniej ekspresji receptora CB2 z wystąpieniem zakażenia układu moczowego.	72
Rycina 30. Korelacja tkliwości macicy i średniej ekspresji receptora CB1.....	73
Rycina 31. Korelacja tkliwości macicy i średniej ekspresji receptora CB1a.	74

14 STRESZCZENIE

Wstęp

Problematyka porodu przedwczesnego dotyczy na szczęście mniejszości porodów na całym świecie. Nie mniej jednak wystąpienie omawianej patologii wiąże się ze znacznymi komplikacjami ze strony nieprzygotowanego do życia pozamacicznego organizmu pod postacią przedłużonej hospitalizacji noworodków, ich pobytu na oddziale intensywnej terapii noworodkowej, a także jest główną przyczyną śmiertelności noworodków. Znaczny postęp w dziedzinie biologii molekularnej dokonany w ostatnich latach dał możliwość dokładnej analizy wielu dotychczas niezbadanych mechanizmów powstawania porodu przedwczesnego. Rola rozwijającej się reakcji zapalnej w obrębie jamy macicy i profilu cytokin prozapalnych w patogenezie porodu przedwczesnego wydaje się być bardzo prawdopodobna. Niezbadane są dotychczas bezpośrednie mechanizmy łączące odpowiedni profil cytokinowy z produkcją prostaglandyn wyzwalających czynność skurczową mięśnia macicy. Znaczącym punktem uchwytu wydaje się być system endokanabinoidowy, mający udowodniony wpływ w patogenezie reakcji zapalnej. Ekspresja receptorów kanabinoidowych, będących kluczowym ogniwem w działaniu systemu endokanabinoidowego, jest obecna w prawie każdej komórce ciała ludzkiego.

Cel pracy

Zbadanie zależności pomiędzy ekspresją receptorów kanabinoidowych w obrębie łożyska po porodzie, a problemem porodu przedwczesnego.

Zbadanie zależności pomiędzy ekspresją receptorów CB1, CB1a i CB2 w łożyskach, a długością trwania ciąży / wiekiem ciążowym w momencie porodu i wystąpieniem porodu przedwczesnego, a także występowaniem wybranych powikłań w przebiegu ciąży.

Material i Metody

Badanie przeprowadzono na materiale wieloośrodkowym 150 kobiet rodzących w terminie od marca 2004 do grudnia 2012 roku. U 115 kobiet wystąpił poród

przedwczesny i stanowiły Grupę Badaną, u 35 kobiet poród odbył się w fizjologicznym terminie i określono Je mianem Grupy Kontrolnej.

W celu określenia ekspresji receptorów kanabinoidowych CB1, CB1a, oraz CB2 w łożyskach, bezpośrednio po zakończeniu III okresu porodu i wydaleniu płodu, z łożysk pobierano 4 wycinki; po jednym z każdego kwadrantu, z miejsc makroskopowo niezmiennych. Wycinki umieszczano w RNA - Later na okres 24 godzin, po czym po osuszeniu mrożono materiał w temperaturze -80°C . Następnie użyto następujących technik: izolacji RNA, w dalszej kolejności odwrotnej transkrypcji (RT) i reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR) w celu oceny ekspresji receptorów kanabinoidowych w badanym materiale. Otrzymane wyniki porównano do ekspresji genów referencyjnych GAPDH (dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego) i ACT (β -aktyna).

Wyniki

Przeprowadzona analiza statystyczna pomiędzy badanymi grupami wykazała, że ekspresja receptora CB2 była niższa w łożyskach pochodzących od kobiet, które urodziły przedwcześnie. W przeprowadzonym badaniu tkliwość macicy korelowała z ekspresją receptorów CB1 i CB1a i była zgłaszana statystycznie częściej przez pacjentki z grupy badanej. Pobudzenie receptorów CB1 i CB2 powoduje zmniejszenie odczuwania bólu zaobserwowane na modelach zwierzęcych, co może stanowić mechanizm odmiennej percepcji bodźców bólowych u kobiet w trakcie porodu, gdyż powszechnie wiadome jest, że odczuwanie bólu porodowego przez rodzące kobiety jest heterogenne.

W grupie badanej występowanie porodu przedwczesnego w wywiadzie, ciąż obumarłych w wywiadzie i ciąż zakończonych cięciem cesarskim było tym częstsze, im niższa była ekspresja receptorów CB1 i CB1a w łożysku pacjentek z grupy badanej. Wymienione powikłania są powszechnie znanymi czynnikami ryzyka porodu przedwczesnego w kolejnych ciążach.

Zakażenie układu moczowego i zgłaszane przez pacjentki krwawienie na którymkolwiek z etapów trwania ciąży statystycznie częściej występowało w grupie badanej i korelowało z ekspresją receptorów CB2.

Wnioski

1. W patogenezie porodu przedwczesnego może mieć znaczenie ekspresja receptorów kanabinoidowych. Im niższa ekspresja receptora CB2 w łożysku, tym częściej występuje poród przedwczesny.
2. Występowanie dolegliwości bólowych macicy w przebiegu ciąży koreluje z ekspresją receptorów kanabinoidowych w łożysku. Im niższa ekspresja receptora CB1 i CB1a, tym boleśniej odczuwają pacjentki czynność skurczową macicy.
3. Stwierdzona w badaniu korelacja ekspresji receptorów CB1, CB1a, CB2 z powikłaniami przebiegu ciąży takimi jak: występowanie u kobiet rodzących w przeszłości porodu przedwczesnego, ciąż obumarłych, krwawień w przebiegu ciąży, podwyższonej ciepłoty ciała podczas porodu, oraz zakażeń układu moczowego, uzasadnia wniosek, iż należy pogłębić diagnostykę ekspresji receptorów kanabinoidowych u kobiet ciężarnych na różnych etapach ciąży.

15 ABSTRACT

Title: Premature delivery and cannabinoid receptor expression in the placenta.

Introduction

Fortunately, premature delivery concerns a minority of births around the world. Nevertheless, the occurrence of this pathology is associated with significant complications for not prepared to an extrauterine life newborn in the form of prolonged hospitalization and their stay in the neonatal intensive care unit. It is also the leading cause of infant mortality. The significant progress in the field of molecular biology made in recent years has allowed analyzing many unexplored mechanisms of preterm labor. The role of the developing inflammatory response within the uterine cavity and the pro-inflammatory cytokine profile in the pathogenesis of preterm labor appears to be very likely. Direct mechanisms combining the appropriate cytokine profile with the production of prostaglandins that triggers uterine contractile function are not yet studied. A significant fixation point seems to be the endocannabinoid system, which has a proven effect on the pathogenesis of the inflammatory response. Expression of cannabinoid receptors, which are a crucial link in the endocannabinoid system, is present in almost every cell of the human body.

Study objectives

To investigate the relationship between cannabinoid receptor expression within the placenta after delivery and the problem of preterm delivery.

To investigate the relationship between the expression of CB1, CB1a and CB2 receptors in the placenta, and the duration of pregnancy / gestational age at delivery and the occurrence of preterm delivery, as well as the occurrence of selected pregnancy complications.

Material and methods

The study was conducted on multicenter material of 150 women giving birth in the period from March 2004 to December 2012. 115 women were diagnosed with premature delivery and were qualified to the Study Group, 35 women had a delivery at the physiological time and were qualified to the Control Group.

In order to determine the expression of cannabinoid CB1, CB1a, and CB2 receptors in the placenta, immediately after the end of the 3rd delivery period and excretion of the postpartum, 4 sections were taken from the placenta; one from each quadrant, from macroscopically unchanged locations. Sections were placed in RNA-Later for 24 hours and then, after drying, material was frozen at -80 ° C. The following techniques were then used: RNA isolation, followed by reverse transcription (RT) and real-time polymerase chain reaction (Real-Time PCR) to assess the expression of cannabinoid receptors in the tested material. The obtained results were compared to the expression of the reference genes GAPDH (3-phosphoglyceroldehyde dehydrogenase) and ACT (β -actin).

Results

In statistical analysis following differences between the study group and control group showed that CB2 receptor expression was lower in the placenta from women who undergo preterm delivery. In the study, uterine tenderness correlated with the expression of CB1 and CB1a receptors and was reported statistically more often by patients from the study group. Stimulation of CB1 and CB2 receptors causes a decrease in pain perception observed in animal models, which may be a mechanism for a different perception of pain in women during childbirth.

In the study group, the history of preterm labor, history of intrauterine fetal deaths, and pregnancies terminated by Caesarean section correlated with lower expression of the CB1 and CB1a receptors in the placenta in patients from the study group. These complications are well-known risk factors for preterm labor in subsequent pregnancies.

Urinary tract infection and bleeding reported by patients at any stage of pregnancy statistically more frequently occurred in the study group and correlated with CB2 receptor expression.

Conclusions

1. Expression of cannabinoid receptors could be an essential tool in the pathogenesis of preterm labor. The lower CB2 receptor expression more often occurs in the placenta delivered after preterm labor.
2. The occurrence of uterine pain during pregnancy correlates with the expression of cannabinoid receptors in the placenta. The lower level of the CB1 and CB1a expression was connected with more painful contraction perception of the uterus during labor.
3. The correlation between CB1, CB1a, CB2 receptors expression and pregnancy complications found in the study, such as the occurrence of preterm delivery occurrence in the past, intrauterine death of the fetus in the past, vaginal bleeding during pregnancy, increased body temperature during delivery, and urinary tract infections, justifies that the diagnosis of cannabinoid receptor expression in pregnant women at various stages of pregnancy should be performed.