

Analiza porównawcza wybranych parametrów angiogenezy naczyniowej w łożyskach pochodzących z ciąż bliźniaczych dwuzygotycznych

A comparative analysis of selected parameters of vascular angiogenesis in placentas from dizygotic twin pregnancies

Katarzyna Orłowska, Urszula Kowalska- Koprek, Agata Karowicz-Bilińska

Klinika Patologii Ciąży i Katedry Ginekologii i Potożnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Polska

Streszczenie

Wstęp. Większość przypadków ciąż pochodzących z technik wspomaganego rozrodu to ciąże bliźniacze dwuzygotyczne. Obserwuje się ścisłą zależność między rozwojem i funkcjonowaniem łożyska a wzrastaniem obu płodów. Angiogeneza to proces tworzenia nowych naczyń włosowatych.

Cel pracy. Porównanie wartości ekspresji czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego – VEGF oraz endotelialnej syntazy tlenku azotu – eNOs między łożyskami bliźniąt dwuzygotycznych z uwzględnieniem ich masy urodzeniowej.

Materiał i metody. Do badania zakwalifikowano 35 kobiet w ciąży bliźniaczej dwuzygotycznej po ukończonym 30 tygodniu ciąży rozwiązanych drogą cięcia cesarskiego. Grupa została podzielona na dwie części: bliźnięta, których masa nie różniła się o ponad 20% (grupa 1) i bliźnięta, których masa różniła się o ponad 20% (grupa 2). Bliźnię o wyższej masie urodzeniowej zakwalifikowane zostało jako A, natomiast bliźnię o niższej masie urodzeniowej jako B. Dokonana została analiza porównawcza łożysk bliźniąt A i B pod względem wybranych parametrów angiogenezy – VEGF i eNOs.

Wyniki. Stwierdzono silną ekspresję VEGF w grupie 1 u bliźnięcia B oraz silną ekspresję eNOs w grupie 2 u bliźniąt A i w grupie 1 u bliźniąt B.

Wnioski. Neowaskularyzacja jest bardziej nasiloną w łożyskach bliźniąt o niższej masie urodzeniowej, gdzie nie obserwowano istotnej różnicy mas, co być może jest wyrazem istnienia sprawnych mechanizmów kompensacyjnych. Wysoka ekspresja e-NOs może oznaczać zwiększone ryzyko niedotlenienia przy jednocześnie nieuszkodzonym śródbłonku.

Słowa kluczowe: **bliźnięta dwuzygotyczne / VEGF / eNOs / angiogeneza / łożysko /**

Adres do korespondencji:

Katarzyna Orłowska
Klinika Patologii Ciąży UM w Łodzi
ul. Wileńska 37, 94-029 Łódź
tel. +48 42 680 47 25
e-mail: md.orłowska@gmail.com

Otrzymano: 22.04.2013
Zaakceptowano do druku: 30.09.2013

Katarzyna Orłowska, et al. Analiza porównawcza wybranych parametrów angiogenezy naczyniowej...

Abstract

Introduction: Most pregnancies after assisted reproduction techniques are dizygotic twin gestations. There is a close relationship between the development and functioning of the placenta and the growth of both fetuses in dizygotic twin pregnancies. Angiogenesis is the process of creating new capillaries.

Objectives: The aim of the study was to compare the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and endothelial nitric oxide synthase (eNOs) between placentas of dizygotic twins, taking into account their birth weight.

Materials and Methods: The study included 35 women in dizygotic twin pregnancies, resolved after 30 completed weeks of gestation by a caesarean section. The patients were divided into two groups: twins whose weight did not differ by more than 20% (group 1) and twins whose weight differed by more than 20% (group 2). Twins with higher and lower birth weight were classified as A and B, respectively. A comparative analysis of the placentas of twins A and B with regard to the selected parameters of angiogenesis, i.e. VEGF and eNOs, was performed.

Results: A strong expression of VEGF was observed in twins with lower birth weight in group 1, as well as a strong expression of eNOs in twins with higher weight in group 2, and with lower weight in group 1.

Conclusions: Neovascularization is more expressed in the placentas of twins with lower birth weight (in the group with no significant differences in weight), possibly reflecting the existence of efficient mechanisms of compensation. High expression of e-NOS may indicate an increased risk of ischemia with intact endothelium.

Key words: **twins / dizygotic / VEGF / eNOs / angiogenesis / placenta /**

Wstęp

Ostatnie lata przyniosły olbrzymi postęp w leczeniu niepłodności. W Polsce ok. 20 % kobiet ma rozpoznaną niepłodność, a problemy z prokreacją dotyczą 1,35 mln par małżeńskich. Większość przypadków ciąży pochodzących ze wspomaganego rozrodu to ciąży bliźniacze dwuzygotyczne, powstałe na skutek indukcji stymulacji lub jednoczasowego transferu więcej niż jednego embrionu podczas zabiegu zapłodnienia pozaustrojowego (IVF). Ciąże wielopłodowe są ciążami wysokiego ryzyka. Występują z częstością 1-2% wszystkich ciąży, podczas gdy ich udział w ogólnej śmiertelności okołoporodowej dzieci sięga 10-15%. Bliźnięta dwuzygotyczne powstają w wyniku zapłodnienia dwoma plemnikami dwóch komórek jajowych i stanowią około 2/3 wszystkich bliźniąt. Podobieństwo genetyczne takich bliźniąt jest równe podobieństwu rodzeństwa urodzonego w różnym czasie. Głównymi czynnikami determinującymi wzrost płodu jest potencjał genetyczny oraz funkcja łożyska. Płody z ciąży bliźniaczych jednozygotycznych wydają się dzielić ten sam potencjał genetyczny i to samo łożysko. Natomiast w ciążach dwuzygotycznych czynniki te mogą różnić się istotnie dla każdego z płodów [1, 2, 3].

Podstawową rolą łożyska jest transport substancji odżywczych do płodu dla zapewnienia jego prawidłowego wzrastania. Obserwuje się ścisłą zależność między rozwojem i funkcjonowaniem łożyska a wzrastaniem obu płodów w ciążach bliźniaczych [4]. Na prawidłowe funkcjonowanie łożyska wpływa wiele czynników, wśród których wymienić trzeba neoangiogenezę i równowagę w zakresie produkcji substancji wolnorodnikowych.

Angiogeneza to proces tworzenia nowych naczyń włosowatych, a neowaskularyzacja jest główną odpowiedzią naczyniową na zapalenie i niedotlenienie [5]. Główną cytokiną zapoczątkowującą angiogenezę jest czynnik wzrostu śródbłonnka naczyń VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Powoduje on wzrost przepuszczalności i poszerzenie naczyń krwionośnych stymulu-

jąc produkcję tlenu azotu przez pobudzony śródbłonek. Wykazuje on także zdolność ochrony komórek śródbłonnka naczyniowego przed apoptozą.

Endotelialna syntaza tlenu azotu (eNOS) jest jednym z trzech enzymów zdolnych do produkcji tlenu azotu (NO). Gromadzi się w zagłębieniach błony komórkowej, które stanowią centralne miejsca (tzw. mikrodomeny) w transdukcji sygnałów docierających do komórki z zewnątrz. Wykazano, że funkcjonalna eNOS jest niezbędna w procesie angiogenezy i przebudowy naczyń krwionośnych. Ze względu na wolnorodnikowy charakter NO, którego nadmierne stężenie stanowi niebezpieczeństwo uszkodzenia i nekrozy dla otaczających komórek, aktywność eNOS podlega ścisłej i skomplikowanej regulacji. Na przestrzeni ostatnich kilku lat udowodniono, że jej ekspresja podlega silnym wahaniom w odpowiedzi na czynniki wzrostu, hormony, cytokiny i czynniki fizyczne.

Tlenek azotu oraz VEGF są czynnikami w istotny sposób warunkującymi niepowikłany przebieg ciąży i optymalne wzrastanie płodu, między innymi poprzez wpływ na prawidłowy rozwój jednostki maciczno-łożyskowej, angiogenezę, napięcie mięśni macicy podczas ciąży oraz obkurczanie się naczyń pępowinowych w czasie porodu [6].

Cel pracy

Celem badań jest porównanie wybranych parametrów angiogenezy łożyskowej -VEGF, eNOs między łożyskami bliźniąt dwuzygotycznych z uwzględnieniem ich masy urodzeniowej.

Materiał i metody

Badania zostały przeprowadzone w Klinice Patologii Ciąży I Katedry Ginekologii i Położnictwa Uniwersytetu Medycznego w Łodzi w latach 2010- 2012. Do badania zakwalifikowanych zostało 35 kobiet w ciąży bliźniaczej dwuzygotycznej po ukończonym 30 tygodniu ciąży hospitalizowanych i rozwiązanych

drogą cięcia cesarskiego. Spośród nich 19 urodziło bliźnięta różnych płci, a u pozostałych dwukosmówkowość i dwuowodniowość ciąży została potwierdzona wynikiem USG z I trymestru. U badanych ciężarnych przeprowadzono uprzednio szczegółowy wywiad dotyczący wieku, rodności, przebiegu poprzednich ciąż, chorób towarzyszących, a następnie dokładne badanie kliniczne z USG włącznie.

Podczas cięcia cesarskiego po wydobyciu łożysk w warunkach jałowych pobierano dwa fragmenty łożyska o wymiarach 2 x 2 cm z centralnej części w odległości około 2 cm od przyczepu powiny każdego z bliźniąt. Pobrane dwa wycinki były umieszczone w oddzielnych pojemnikach z 10% zbuforowanym roztworem formaliny i przekazane do zatopienia w bloki parafinowe. Bloki parafinowe pocięte zostały na skrawki parafinowe o grubości 3-4 mikrometrów, które posłużyły do sporządzenia rutynowych preparatów barwionych hematoksyliną i eozyną (H+E) oraz do badań immunohistochemicznych w systemie detekcyjnym PowerVision firmy ImmunoLogic według metody immunoperoxydazowej, z użyciem pierwotnych, mysich przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciw: Nitric Oxide Synthase-3 (NOS-3) firmy (Novocastra) Leica Microsystems oraz VEGF firmy (upstate/Chemicon) Millipore.

Po urodzeniu bliźnię o wyższej masie urodzeniowej zakwalifikowane zostało jako A, natomiast bliźnię o niższej masie urodzeniowej jako B. Dokonana została analiza porównawcza łożysk bliźniąt A i B pod względem wybranych parametrów angiogenezy.

Procent rozbieżności mas urodzeniowych pomiędzy bliźniętami obliczano według wzoru:

$$\frac{[(\text{masa większego płodu} - \text{masa mniejszego płodu}) / \text{masa większego płodu}] \times 100\%}{}$$

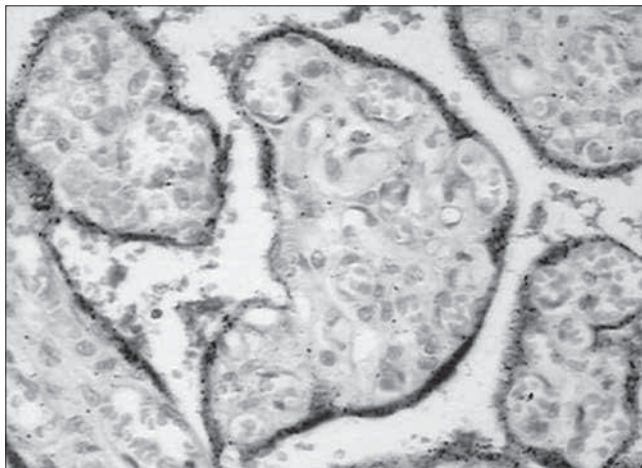
W oparciu o obliczenia dokonane za pomocą wyżej wymienionego wzoru, zastosowano następującą klasyfikację rozbieżności mas ciała pomiędzy bliźniętami:

1. grupa 1 – bliźnięta, których masa nie różniła się o ponad 20% (23 pacjentki).
2. grupa 2 – bliźnięta, których masa różniła się o ponad 20% (12 pacjentek).

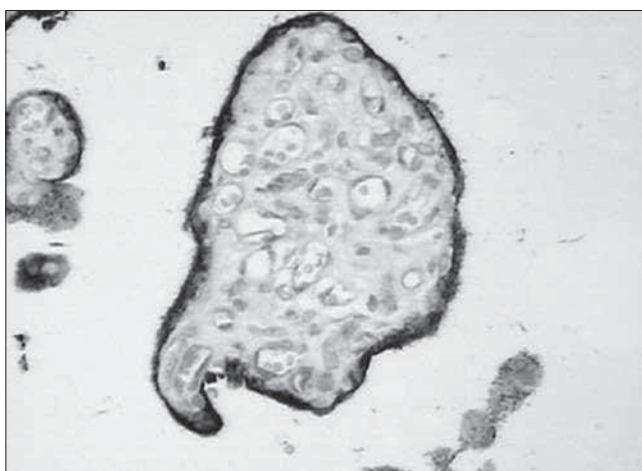
Do oceny preparatów mikroskopowych wykorzystano mikroskop firmy Nikon ze zintegrowanym systemem pomiarowym MultiScanBase v.8.08. do oceny morfometrycznej obrazów. W każdym preparacie oceniano 10 losowo wybranych pól widzenia, pod powiększeniem 200 x, korzystając z półilościowej metody analizy immunoreakcji analizując lokalizację odczynu, jego charakter, intensywność i liczbę komórek (w %).

Charakter odczynu oceniano w 4-stopniowej skali: 0 – śladowy lub brak, 1 – nierówny (fot. 1), 2 – równy (fot. 2), 3 – pełny (fot. 3).

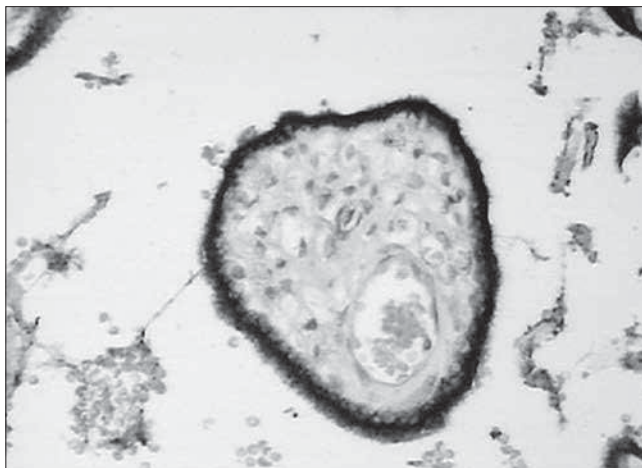
Do oceny ekspresji markerów użyto dwóch półilościowych metod. Pierwsza z nich wg Volma polegała na stworzeniu skali korespondującej z sumą intensywności (0 – brak, 1 – słaby, 2 – średni, 3 – silny) i liczby komórek (0 – 0-10%, 1 – 11-25%, 2 – 26-50%, 3 – 51-100%). Suma 6 punktów stanowiła maksymalny wynik. Ekspresja markera była silna, gdy suma 5-6, średnia 3-5 i słaba 0-3 [7, 8]. Druga metoda wg Tsenga oparta była na skali uzyskanej z iloczynu intensywności i liczby komórek, dając wynik od 0 do 9. Ekspresja markera sklasyfikowana została jako silna, gdy końcowy iloczyn wynosił >6, średnia gdy 3-6 i słaba <3 [9].



Fot. 1.



Fot. 2.



Fot. 3.

Uzyskane wyniki zostały poddane analizie. Obliczenia wykonano z wykorzystaniem pakietu statystycznego STATISTICA PL 9.0. Normalność zmiennych mierzalnych weryfikowano za pomocą testu normalności Shapiro-Wilka. Do porównania podgrup wyróżnionych wg różnicy mas urodzeniowych ze względu na zmienne mierzalne wykorzystano test t Studenta oraz test U Manna-Whitneya.

Katarzyna Orłowska, et al. Analiza porównawcza wybranych parametrów angiogenezy naczyniowej...

W przypadku zmiennych jakościowych wykorzystano test niezależności chi-kwadrat. Do oceny siły korelacji między 2 zmiennymi mierzonymi co najmniej na skali porządkowej wykorzystano współczynnik korelacji rang Spearmana.

Na potrzeby analizy na początku uśredniono wyniki z 10 pól. Do porównania wartości markerów VEGF, eNOs z uwzględnieniem co najmniej 2 zmiennych grupujących wykorzystano dwuczynnikową i trójczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz testy porównań wielokrotnych (test Duncana). Za istotne statystycznie przyjęto wyniki przy $p < 0,05$.

Wyniki

Średni wiek ciężarnych wynosił 31 lat. Badane miały prawidłową wartość BMI przed ciążą (średnio 24). Średni przyrost masy ciała w ciąży wynosił ok. 16 kg. W obu badanych grupach średni czas trwania ciąży wynosił 36 tygodni.

Badane w 71,43% stanowiły pierwiastki, pracujące, a w trakcie ciąży przebywające na zwolnieniu lekarskim. Ok. 91% badanych objęta była dostateczną opieką lekarską (przynajmniej 10 wizyt ginekologicznych) w trakcie trwania ciąży. 31,43% badanych uzyskało ciążę zapłodnieniem pozaustrojowym. 88,57% badanych rozwiązano drogą cięcia cesarskiego ze względu na nieprawidłowe położenie jednego lub obu płodów.

Pozostałe ciężarne z położeniem obu bliźniąt podłużnym główkowym rozwiązano drogą cięcia cesarskiego ze względu na stan po IVF. 19 spośród 35 pacjentek rozwiązano planowym cięciem cesarskim. Pozostałe 16 rozwiązano w trybie pilnym lub nagłym ze względu na rozpoczęty poród lub przedwczesne odpływanie płynu owodniowego. U 97,14% bliźniąt oceniono stan urodzeniowy jako dobry (Apgar 8-10). W grupie 1 średnia masa bliźnięcia A wynosiła 2628 gramów, bliźnięcia B 2414 gramów. W grupie 2 średnia masa bliźnięcia A wynosiła 2770 gramów, a bliźnięcia B 1994 gramów. (Tabela I).

Porównując grupę 1 i 2 stwierdzono istotną różnicę między grupami ze względu na obecność obrzęków – w grupie 2 (25%), przy ich braku w grupie 1 ($p=0,01320$). W grupie 1 znacznie większy jest odsetek bliźniąt bez IUGR (78,26%) w porównaniu z grupą 2 (41,67%) ($p=0,09549$). W grupie 1 stwierdzono w 21,74% cholestazę ciążową, której nie obserwowano w grupie 2 ($p=0,08107$). (Tabela II).

Porównując ekspresję VEGF w obu grupach stwierdzono silną ekspresję markera w grupie 1 u bliźnięcia B. Ekspresja markera była silna zarówno oceniana metodą wg Volma jak i metodą Tsenga. (Tabela III).

Ponadto stwierdzono silną ekspresję eNOs w grupie 2 u bliźniąt A przy użyciu obu metod i w grupie 1 u bliźniąt B jedynie przy użyciu metody wg Tsenga. (Tabela IV).

Tabela I. Charakterystyka porównywanych grup.

Charakterystyka porównywanych grup		Grupa 1	Grupa 2	poziom p
Średni wiek	średnia	31,13	31	0,9312
	SD	4,2	4,22	
BMI przed ciążą	średnia	23,66	24,69	0,6291
	SD	5,56	4,84	
Średni przyrost masy ciała w ciąży w kg	średnia	16,11	16,13	0,9957
	SD	5,55	3,04	
Ciąża	średnia	1,91	2	0,8506
	SD	1,62	1,35	
Poród	średnia	1,48	1,5	0,9318
	SD	1,08	1	
Tydzień ciąży	średnia	36,13	36,42	0,959
	SD	2,1	1,51	
Pacjentka pracująca		82,61%	91,67%	0,46729
Dostateczna opieka lekarska w ciąży*		91,3%	91,67%	0,97101

*przynajmniej 10 wizyt ginekologicznych w czasie trwania ciąży

Tabela II. Choroby towarzyszące w ciąży.

Choroby towarzyszące i występujące w ciąży	Grupa 1	Grupa 2	poziom p
Cholestaza ciążowa	21,74%	0,00%	0,08107
Ciąże bez IUGR	78,26%	41,67%	0,09549
Obrzęki	0,00%	25,00%	0,0132

Tabela III. VEGF dla 2 grup wg różnicy mas urodzeniowych.

Grupa	Bliźnię	Charakter odczynu			Intensywność odczynu x liczba komórek			Intensywność odczynu + liczba komórek		
		średnia	SD	poziom p	średnia	SD	poziom p	średnia	SD	poziom p
Grupa 1	A	1,63	0,23	0,9996	5,74	1,33	0,3976	4,86	0,55	0,4132
	B	1,64	0,31		6,27	1,07		5,06	0,38	
Grupa 2	A	1,62	0,26	0,9988	5,80	0,89	0,9996	4,92	0,32	1,0000
	B	1,63	0,27		5,85	1,15		4,93	0,40	
poziom p dla interakcji		0,9534			0,4050			0,3871		

Tabela IV. eNOs dla 2 grup wg różnicy mas urodzeniowych.

Grupa	Bliźnię	Charakter odczynu			Intensywność odczynu x liczba komórek			Intensywność odczynu + liczba komórek		
		średnia	SD	poziom p	średnia	SD	poziom p	średnia	SD	poziom p
Grupa 1	A	1,43	0,28	0,9357	5,52	1,65	0,4871	4,73	0,68	0,4950
	B	1,49	0,44		6,15	1,32		4,98	0,52	
Grupa 2	A	1,41	0,32	0,9666	6,38	1,48	0,5439	5,06	0,58	0,5769
	B	1,48	0,30		5,57	1,53		4,74	0,62	
poziom p dla interakcji		0,9740			0,0594			0,0662		

Dyskusja

Ciąża bliźniacza jest przedmiotem wielu badań i publikowanych prac naukowych. W materiale własnym, do którego kwalifikowano wyłącznie cięższe bliźniacze dwuzygotyczne wykazano 31,43% ciężych bliźniaczych uzyskanych po zastosowaniu IVF. Dane europejskie z 2012 roku wskazują na utrzymujący się na stałym poziomie odsetek ciężych bliźniaczych po zapłodnieniu pozaustrojowym (21,3%) [10].

W obu badanych grupach średni czas trwania ciąży wynosił 36 tygodni. Najczęściej rozpoznawanym powikłaniem ciąży bliźniaczej jest poród przedwczesny. Średni czas jej trwania wynosi 35 tygodni [11, 12]. Najniższe ryzyko zgonu i zachorowalności okołoporodowej obserwuje się przy porodzie między 36 a 38 tygodniem ciąży [13, 14].

88,57% badanych rozwiązano drogą cięcia cesarskiego z powodu nieprawidłowego położenia jednego lub obu płodów. Pozostałe były ciężzami po zapłodnieniu pozaustrojowym. Według Rekomendacji Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego w zakresie postępowania w ciąży po zapłodnieniu pozaustrojowym, cięższe wielopłodowe uzyskane na drodze IVF powinny być zakończone cesarskim cięciem. Najczęstszym wskazaniem do cięcia cesarskiego w ciąży bliźniaczej jest nieprawidłowe położenie jednego lub obu płodów [15].

W przedstawionym materiale badane podzielono na dwie grupy w zależności od wielkości rozbieżności mas urodzeniowych: poniżej 20% i powyżej 20%. Obecnie uważa się, że z punktu widzenia medycznego znaczenie posiada już rozbieżność wynosząca powyżej 20% [16]. Grupę 2 z różnicą mas między bliźniętami powyżej 20% stanowiło 12 ciężarnych (34,29%).

Niektórzy autorzy twierdzą, że cięcie cesarskie należy również wykonać, gdy stopień rozbieżności mas między płodami wynosi więcej niż 20% [11].

W pracy uzyskano silną ekspresję VEGF u bliźnięcia B z grupy 1. Podwyższona ekspresja VEGF może wskazywać na jego udział w patogenezie wewnątrzmacicznego opóźnienia wzrostu płodu – IUGR. Wszystkie przypadki ograniczenia wzrostu wewnątrzmacicznego płodu nie są do końca zrozumiałe i najprawdopodobniej wynikają z wielu przyczyn. Jednym z wiodących mechanizmów do nich prowadzących jest obniżenie perfuzji łożyskowej [17]. Istotnie podwyższona ekspresja VEGF może potwierdzać obserwacje, że IUGR wiąże się w większości przypadków z nieprawidłowościami naczyń łożyskowych [18]. IUGR o nieznanym przyczynie, który pojawia się w II trymestrze ciąży jest formą niedotlenienia ograniczonego jedynie do mięśnia macicy, łożyska i płodu [19]. Proces ten ma potencjalny wpływ na zachowanie się naczyniowych czynników angiogennych. Ekspresja VEGF jest regulowana przez różne czynniki, głównie wzrostu i hormony [20]. Jest ona indukowana również przez ekspozycję na niedotlenienie w różnych patomechanizmach [21]. Według prac T. R. Regnaulta i wsp. hipertermia, która skutkuje podwyższeniem przepływu krwi przez macicę wyrażona na kg płodu, osłabia dyfuzję tlenu przez łożysko i skutkuje zwiększeniem ekspresji VEGF we wczesnej ciąży, lecz redukuje tę ekspresję w późnej ciąży [22].

Wymiana przezłożyskowa zależy od szybkości przepływu krwi przez łożysko, a to od rozwoju naczyń w łożysku. Angiogeneza łożyskowa jest więc ważna dla prawidłowego rozwoju płodu [5].

Wykazano silną ekspresję eNOs u bliźniąt B z grupy 1 oraz u bliźniąt A z grupy 2. Powstało wiele prac dotyczących ekspresji eNOs w łożysku ludzkim pochodzącym z ciąży pojedynczej [23]. Wykazano, że kosmki podstawne cytotrofoblastu są pozbawione ekspresji eNOs, a tlenek węgla jest zaangażowany w chemotaksję leukocytów i migrację komórek endotelialnych i może być niezbędny do wnikania trofoblastu do macicy w trakcie pierwszego i drugiego trymestru ciąży [24, 25, 26]. Może to mieć odzwierciedlenie we wzroście płodu w trakcie trzeciego trymestru, co starano się zbadać na naszym materiale potwierdzając tę hipotezę.

Silna ekspresja eNOs i VEGF u bliźniąt B z grupy 1 może świadczyć o wzmożonej angiogenezie w łożyskach tych bliźniąt, natomiast w przypadku bliźniąt A z grupy 2 silna ekspresja eNOs nie znalazła potwierdzenia w ekspresji VEGF, bowiem płody te pomimo zwiększonego ryzyka niedotlenienia nie mają uszkodzonego śródbłonka naczyniowego [27]. W ludzkich komórkach śródbłonka badanych in vitro, zwiększenie eNOS przez VEGF ma zasadnicze znaczenie dla aktywności angiogennej VEGF. Krótkotrwałe niedotlenienie zwiększa ekspresję VEGF w łożysku owiec, a długotrwałe niedotlenienie podwyższa poziom ekspresji eNOS w śródbłonku tętnic macicznych w ciężarnej macicy owiec [28, 29]. Tak więc w odniesieniu do materiału własnego można by sądzić, że bliźnięta z wyższą masą urodzeniową pochodzące z grupy 2, czyli ciąż z wysoką, powyżej 20 % różnicą mas są narażone na długotrwałe niedotlenienie.

Wnioski

1. Neowaskularyzacja jest bardziej nasiloną w łożyskach bliźniąt o niższej masie urodzeniowej, gdzie nie obserwowano istotnej różnicy mas, co być może jest wyrazem istnienia sprawnych mechanizmów kompensacyjnych.
2. Wysoka ekspresja e-NOs może oznaczać zwiększone ryzyko niedotlenienia przy jednocześnie nieuszkodzonym śródbłonku.

Oświadczenie autorów:

1. Katarzyna Orłowska – autor koncepcji i założeń pracy, przygotowanie manuskryptu i piśmiennictwa, zebranie materiału, analiza statystyczna wyników, przygotowanie manuskryptu, opracowanie wyników badań, przechowywanie dokumentacji, autor zgłaszający i odpowiedzialny za manuskrypt.
2. Urszula Kowalska-Koprek – współautor tekstu pracy i współautor protokołu, korekta i aktualizacja literatury, ostateczna weryfikacja i akceptacja manuskryptu.
3. Agata Karowicz-Bilińska – współautor założeń pracy, analizy i interpretacji wyników, przygotowanie, korekta i akceptacja ostatecznego kształtu manuskryptu.

Źródło finansowania:

Praca finansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi z projektu badawczego nr 502-03/1-004-04/502-14-101 i funduszy KBN Nr NN 407242640.

Konflikt interesów:

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów oraz nie otrzymali żadnego wynagrodzenia związanego z powstawaniem pracy.

Piśmiennictwo

1. Bręborowicz G, Malinowski W, Ronin- Walknowska E. Ciąża wielopłodowa. Poznań: *Ośrodek Wydawnictw Naukowych*. 2003, 19-35.
2. Källén B, Finnström O, Lindam A, [et al.]. Selected neonatal outcomes in dizygotic twins after IVF versus non-IVF pregnancies. *BJOG*. 2010, 117 (6), 676-682.
3. Felberbaum RE. Multiple pregnancies after assisted reproduction – international comparison. *Reprod Biomed*. 2007, 15, Suppl 3, 53-60.
4. Bręborowicz G, Malinowski W, Ronin- Walknowska E. Ciąża wielopłodowa. Poznań: *Ośrodek Wydawnictw Naukowych*. 2003, 333-343.
5. Markowska A, Drews K. Angiogeneza w rozrodczości. *Adv Clin Exp Med*. 2005, 14, 1, 123-127.
6. Perlik M, Seremak-Mrozikiewicz A, Barlik M, [et al.]. Warianty genetyczne śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) w nadciśnieniu ciążowym i stanie przedzruciawkowym. *Ginekol Pol*. 2012, 83, 652-659.
7. Volm M, Koomägi R, Mattern J. Heat shock (hsp 70) and resistance proteins in non- small cell lung carcinomas. *Cancer Lett*. 1995, 95, 195-200.
8. Alkim C, Savas B, Ensari A, [et al.]. Expression of p53, VEGF, Microvessel Density and Cyclin-D1 in Noncancerous Tissue of Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci*. 2009, 54, 1979-1984.
9. Tseng JJ, Chou MM, Hsieh YT, [et al.]. Differential Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Placenta Growth Factor and Their Receptors in Placentae from Pregnancies Complicated by Placenta Accreta. *Placenta*. 2006, 27, 70-78.
10. de Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S, [et al.]. Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*. 2012, 27, 954-966.
11. Malinowski W, Bręborowicz GH. Ciąża wielopłodowa. Ciąża wysokiego ryzyka. Poznań: *OWN*. 2010, 259-294.
12. Petrova I, Nikolov A, Markov P et al. Gestational age of delivery in multiple gestation. *Akush Ginekol (Sofia)*. 2013, 52 (1), 6-13.
13. Hartley R, Emanuel I, Hitti J. Perinatal mortality and neonatal morbidity rates among twin pairs at different gestational ages: optimal delivery timing at 37-38 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol*. 2001, 184, 451-458.
14. Cheung Y, Yip P, Karlberg J. Mortality of twins and singletons by gestational age: a varyingcoefficient approach. *Am J Epidemiol*. 2000, 152, 1107-1116.
15. Hogle KL, Hutton EK, McBrien KA, [et al.]. Cesarean delivery for twins: a systematic review and meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol*. 2003, 188 (1), 220-227.
16. Blickstein I, Keith LG. Neonatal mortality rates among growth- discordant twins, classified according to the birth weight of the smaller twin. *Am J Obstet Gynecol*. 2004, 190 (1), 170-174.
17. Demir R, Kayisli UA, Seval Y, [et al.]. Sequential Expression of VEGF and its Receptors in Human Placental Villi During Very Early Pregnancy: Differences Between Placental Vasculogenesis and Angiogenesis. *Placenta*. 2004, 25, 560-572.
18. Kayisli UA, Cayli S, Seval Y, [et al.]. Spatial and Temporal Distribution of Tie-1 and Tie-2 During Early Development of the Human Placenta. *Placenta*. 2006, 27: 648- 659.
19. Crispi F, Dominguez C, Llurba E, [et al.]. Placental angiogenic growth factors and uterine artery Doppler findings for characterization of different subsets in preeclampsia and in isolated intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 2006, 195, 201-207.
20. Koedam JA, Smink JJ, van Buul-Offers SC. Glucocorticoids inhibit vascular endothelial growth factor expression in growth plate chondrocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2002, 197, 35-44.
21. Matsumoto LC, Bogic L, Brace RA, Cheung CY. Prolonged hypoxia upregulates vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in ovine fetal membranes and placenta. *Am J Obstet Gynecol*. 2002, 186, 303-310.
22. Regnault TR, de Vrijer B, Galan HL, [et al.]. The relationship between transplacental O2 diffusion and placental expression of PlGF, VEGF and their receptors in a placental insufficiency model of fetal growth restriction. *J Physiol*. 2003, 550, 641-656.
23. Martina D, Conrads KB. Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Extravillous Trophoblast Cells in the Human Placenta. *Placenta*. 2000, 21, 23-31.
24. Eis ALW, Brockman DE, Pollock JS, [et al.]. Immunohistochemical localisation of endothelial nitric oxide synthase in human villous and extravillous trophoblast population and expression during syncytiotrophoblast formation in vitro. *Placenta*. 1995, 16, 113-126.
25. Belenky SN, Robbins RA, Rubinstein I. Nitric oxide synthase inhibitors attenuate human monocyte chemotaxis in vitro. *J Leukocyte Biol*. 1993, 53, 498-503.
26. Noiri E, Pereslenti T, Srivastava N, [et al.]. Nitric oxide is necessary for a switch from stationary to locomoting phenotype in epithelial cells. *Am J Physiol*. 1996, 270, 794- 802.
27. Valdés G, Corthorn J. Review: The angiogenic and vasodilatory utero-placental network. *Placenta*. 2011, 32, Suppl 2, S170-175.
28. Bouloumié A, Schini-Kerth VB, Busse R. Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 1999, 41, 773-780.
29. Victor HP, Mijlenko AA, Bessie U, [et al.]. Expression of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase is increased in the placenta of sheep at high altitude in the Andes. *Can J Vet Res*. 2010, 74 (3) 193-199.