

Antioxidatives Milieu im Fruchtwasser: Gestationsabhängige Dynamik von SOD3, Glutathion und Redox-Balance

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Leah-Carolin Knieps

aus Hannover

2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Soyhan Bağcı
2. Gutachterin: PD Dr. Ramona Dolscheid-Pommerich

Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2026

Aus der Abteilung Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Deutsche Zusammenfassung	5
1.1 Einleitung	5
1.2 Material und Methoden	7
1.2.1 Patientenkollektiv und Einteilung	7
1.2.2 Probengewinnung und Analyse	8
1.2.3 Statistische Analyse	9
1.3 Ergebnisse	10
1.3.1 Ergebnisse der Fruchtwasseranalyse	10
1.3.2 Ergebnisse der Muttermilchanalyse	12
1.4 Diskussion	14
1.5 Zusammenfassung	17
1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	18
2. Veröffentlichung	22
3. Erklärung zum Eigenanteil	23
4. Danksagung	25
5. Publikation (PDF-Version)	26

Abkürzungsverzeichnis

8-OHdG	8-Hydroxydesoxyguanosin
CDH	Angeborener Zwerchfellhernie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FW	Fruchtwasser
GA	Gestationsalter
GIT	Gastrointestinaltrakt
GSH	Glutathion
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IA	Intestinale Atresie
ISC	Intestinale Stammzellen
MM	Muttermilch
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Molekularem Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxidanionen
·OH	Hydroxylradikale
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SOD1	Superoxiddismutase 1
SOD3	Superoxiddismutase 3
SSW	Schwangerschaftswoche

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Fruchtwasser (FW) ist eine komplexe biologische Flüssigkeit, die zwar zu ca. 98 Prozent aus Wasser besteht, jedoch eine Vielzahl von Bestandteilen enthält, darunter Proteine, Hormone, Prostaglandine, Katecholamine, Glukose, Elektrolyte, Enzyme und Wachstumsfaktoren (Tong et al., 2009; Underwood und Sherman, 2006). Ein Fetus beginnt in ca. der zehnten Schwangerschaftswoche (SSW) FW zu schlucken. Am Ende der Schwangerschaft umfasst dies ungefähr 700 ml pro Tag, entsprechend ca. 80 % des gesamten FW-Volumens (Bagci et al., 2016). Buchanan und Bohórquez (2018) bezeichnen das Trinken von FW, sogar als die erste Mahlzeit eines Fetus. Durch den dadurch entstehenden frühen Kontakt mit dem Gastrointestinaltrakt (GIT) erhält FW eine besondere Bedeutung im Rahmen der gastrointestinalen Entwicklung, dessen Wachstum und Reifung (Bagci et al., 2016; Buchanan und Bohórquez, 2018; Dasgupta et al., 2016; Underwood et al., 2005). Bei Frühgeburtlichkeit oder angeborenen Fehlbildungen (z. B. angeborener Zwerchfellhernie (CDH) oder intestinalen Atresien (IA)) wird dieser Prozess jedoch frühzeitig unterbrochen oder findet gar nicht erst statt. Dies beeinträchtigt die Darmentwicklung, führt zu einem geringeren Geburtsgewicht, schlechterer Nahrungsunverträglichkeit und kann das Risiko für Komplikationen wie die nekrotisierende Enterokolitis (NEC) erhöhen (Bagci et al., 2016; Østergaard et al., 2016; Underwood und Shermann, 2006).

Die Entwicklung des GIT beginnt damit im Mutterleib und dauert bis zu einem frühen postnatalen Zeitpunkt an. Commare und Tappenden (2007) teilten dies in vier sich überlappende Phasen ein: Zelldifferenzierung, Verdauung, Absorption und Motilität. In der Phase der Zelldifferenzierung kommt es unter anderem zur Entwicklung sowie strukturellen und funktionellen Reifung des intestinalen Epithels inklusive der Ausbildung der Krypten-Villus-Achse und damit einhergehenden Vorbereitung auf die postnatale Nahrung. Die Steuerung erfolgt durch ein komplexes Zusammenspiel genetischer Programme, endokriner Signale sowie parakriner Faktoren aus dem umgebenden Mesenchym und dem FW (Bagci et al., 2016; Commare und Tappenden, 2007).

Auch biochemische Faktoren im FW wie das Redox-Gleichgewicht beeinflussen die Reifung des fetalen Darms. Ein ausgewogenes Verhältnis zwischen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und antioxidativen Abwehrmechanismen ist dabei entscheidend für eine ungestörte Entwicklung des GIT (Bagci et al., 2022; Dennery, 2004; Nath et al., 2022).

Zu den häufigsten ROS-Spezies zählen Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$), Superoxidanionen (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). ROS sind nicht nur Nebenprodukte des Zellstoffwechsels, sondern spielen eine zentrale Rolle als intrazelluläre Signalmoleküle. In intestinalen Stammzellen (ISC) wirken sie als Schalter für Zellaktivierung, Differenzierung, Metabolismus und Apoptose. Moderate ROS-Level fördern die Aktivierung von ISCs und die Gewebeerneuerung, während zu hohe ROS-Konzentrationen zu oxidativem Stress führen können, der die Zellfunktion beeinträchtigt und damit einhergehend die intestinale Barrierefunktion gefährdet (Morris und Jasper, 2021; Nath et al., 2022). Gerade bei Frühgeborenen sind diese Mechanismen besonders anfällig, da Sauerstoffschwankungen, die frühe bakterielle Besiedlung und Ernährungsumstellungen die Balance zwischen Oxidantien und Antioxidantien beeinflussen.

Zu den Antioxidantien gehört die Superoxiddismutase (SOD). Sie ist ein zentrales enzymatisches Antioxidans, das die Dismutation von O_2^- zu molekularem Sauerstoff (O_2) und H_2O_2 katalysiert und dadurch oxidativen Stress mindert (Moore et al., 2018; Jauniaux et al., 2004). Beim Menschen lassen sich drei Varianten der Superoxiddismutase unterscheiden (SOD1, SOD2 und SOD3), die sich sowohl in ihrer intrazellulären Verteilung als auch in ihren metallischen Kofaktoren unterscheiden (Zelko et al., 2003). Frühere Untersuchungen zur Aktivität von SOD im FW haben diese Unterschiede bislang nicht untersucht (Bagci et al., 2022; Bogavac et al., 2012; Herway et al., 2013). Besonders hervorzuheben ist SOD3, die maßgeblich extrazellulär wirksame Form. Sie ist in zahlreichen Geweben und Körperflüssigkeiten nachweisbar und wirkt regulierend sowie schützend, unter anderem durch antiinflammatorische und antiangiogene Effekte und die Steuerung von Stickstoffmonoxid (NO)-abhängigen Signalwegen (Sah et al., 2020; Tak et al., 2021). Darüber hinaus weist SOD3 eine deutlich längere Halbwertszeit von etwa 20 Stunden auf, im Vergleich zu den Isoformen SOD1 und SOD2, deren Halbwertszeiten bei etwa 20 Minuten bzw. 5–6 Stunden liegen (Nguyen et al., 2020). Glutathion (GSH)

wiederum stellt das wichtigste intrazelluläre Thiol in Darmepithelzellen dar. Es trägt entscheidend dazu bei, das Redox-Gleichgewicht zu sichern, ROS zu neutralisieren und die Stabilität der epithelialen Barriere zu erhalten (Ren et al., 2018).

8-Hydroxy-2'-Desoxyguanosin (8-OHdG) dient als Marker für DNA-Schädigung durch ROS (Cundubey und Demir, 2023; Graille et al., 2020). Erhöhte 8-OHdG Level in FW wurden bereits im Rahmen von Frühgeburten im Vergleich zu reif geborenen Kindern nachgewiesen (Cundubey und Demir, 2023), was auf die Notwendigkeit einer ausgeglichenen Redoxbalance in der fetalen Entwicklung hinweist.

Ein vertieftes Verständnis der antioxidativen Eigenschaften des FW und ihrer Rolle in der fetalen Darmentwicklung spielt eine zentrale Rolle, um Störungen der FW-Aufnahme sowie den postnatalen Ernährungsaufbau gezielt durch Interventionsstrategien zu adressieren. Vor diesem Hintergrund untersuchte die vorliegende Studie das antioxidative Profil des FW, mit besonderem Augenmerk auf SOD1, SOD3 und GSH, die eine zentrale Rolle bei der Regulation von Stammzellproliferation, Differenzierung und der Aufrechterhaltung der epithelialen Barrierefunktion übernehmen (Tak et al., 2021; Wang et al., 2018).

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Patientenkollektiv und Einteilung

Insgesamt wurden 60 FW-Proben von schwangeren Patientinnen zwischen der 15. und 40. SSW gesammelt. In die Studie eingeschlossen wurden Patientinnen bei denen das Gestationsalter (GA) sowohl anhand der letzten Regelblutung als auch durch eine sonographische Biometrie im frühen oder mittleren Trimester zuverlässig bestimmt werden und bei denen die medizinische Indikation zur Amniozentese oder die Notwendigkeit sowie Wunsches einer Geburt per Kaiserschnitt vorlag. Nicht berücksichtigt wurden Fälle mit Konstellationen, die die Zusammensetzung des FWs verändern können – hierzu zählen unter anderem entzündliche oder geburtshilfliche Komplikationen wie Chorioamnionitis, vorzeitiger Blasensprung, Präeklampsie/Eklampsie, aber auch Stoffwechselstörungen wie ein insulinpflichtiger Gestationsdiabetes oder schwerwiegende fetale Fehlbildungen (z. B. bilaterale Nierenagenesie). Ebenso

ausgeschlossen wurden Frauen mit systemischen entzündlichen Erkrankungen oder einer langfristigen Medikamenteneinnahme, die die Bestimmung oxidativer Stressmarker beeinflussen könnte.

Die gesammelten Proben wurden anhand der Einteilung der World Health Organisation einer Frühgeburt, welche als eine Geburt vor Vollendung der 37. SSW definiert ist, eingeteilt. Insgesamt umfasste die erste Gruppe 36 frühgeburtliche Proben (< 37 SSW, $n = 36$) und die zweite Gruppe 24 Proben (> 37 SSW, $n = 24$).

Von 45 Frauen wurden insgesamt 90 Muttermilch-(MM-)Proben gewonnen. Entsprechend der Einteilung der FW-Proben wurden diese ebenfalls in zwei Gruppen nach SSW gegliedert: Gruppe 1 (< 37 SSW) und Gruppe 2 (> 37 SSW). Für jede MM-Probe wurde der postnatale Entnahmetag zum Geburtsdatum addiert, um den exakten Zeitpunkt relativ zur Geburt zu bestimmen.

Die Studie wurde gemäß der Deklaration von Helsinki von der Ethikkommission der Universität Bonn genehmigt (Votum 503/20, Beschluss vom 23. November 2020). Sämtliche Teilnehmende gaben nach schriftlicher Aufklärung ihre Einwilligung zur Teilnahme.

1.2.2 Probengewinnung und Analyse

Die FW-Proben wurden unter sterilen Bedingungen im Rahmen einer Amniozentese oder eines Kaiserschnitts gewonnen. Die Proben, welche im Rahmen des Kaiserschnitts gewonnen wurden, erfolgten durch sonographisch gesteuerte Punktionen direkt vor der eigentlichen Durchführung des Kaiserschnitts. Sichtbar blutige Proben wurden verworfen. Innerhalb den ersten 30 Minuten nach der Probengewinnung erfolgte eine Zentrifugation ($3000 \times g$ für 10 min bei 4°C) um Zellbestandteile zu entfernen. Zur Vermeidung mehrfacher Gefrier-Tau-Vorgänge wurde der Überstand portionsweise (0,5 – 1 mL) in speziell beschichtete Röhrchen abgefüllt und bei -80°C konserviert. Für die biochemischen Analysen wurden die Proben lediglich einmal aufgetaut.

Die MM-Proben wurden zwischen dem 5. und 10. Tag post partum gewonnen. Die Mütter füllten selbstständig die abgepumpte MM in vorbereitet 2 ml Röhrchen und froren diese zunächst bei -20°C ein, bis sie diese zu uns ins Studienzentrum brachten. Dort erfolgte

eine Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Analyse. Vor der Untersuchung wurden die Proben aufgetaut und 10 Minuten bei $3000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert; der Überstand wurde anschließend für die Analysen verwendet.

Die Konzentrationen von SOD1, SOD3, GSH und 8-OHdG im FW wurden mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt (SOD1: Cat. Nr. BMS222; SOD3: Cat. Nr. EH432RB, ThermoFisher, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland; GSH: Cat. Nr. KTE62857, Abbkine, Atlanta, USA; 8-OHdG: Cat. Nr. KOG-200S/E, Japan Institute for the Control of Aging, Shizuoka, Japan). Die Messungen erfolgten strikt nach den Herstellerangaben, wobei alle Standards und Proben in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Für jede Messreihe wurden Kalibrationskurven erstellt und Kontrollproben analysiert. Die Intra-Assay-Variationskoeffizienten lagen bei 5,1 % für SOD1, $< 10,0\text{ }%$ für SOD3, $< 9\text{ }%$ für GSH und $4,0\text{ }%$ für 8-OHdG und die Inter-Assay-Variationskoeffizienten bei $5,8\text{ }%$, $< 12,0\text{ }%$, $< 11\text{ }%$ bzw. $5,4\text{ }%$. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen entsprachen den Herstellerangaben und wurden durch serielle Verdünnungen im eigenen Labor überprüft.

1.2.3 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurde SPSS Version 27.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) eingesetzt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ (zweiseitig) festgelegt. Die Ergebnisse wurden als Median und Interquartilsbereich dargestellt. Zur Überprüfung der Verteilungsform dienten Kolmogorov–Smirnov- und Shapiro–Wilk-Tests. Da die Werte für SOD1, SOD3 und 8-OHdG nicht normalverteilt waren, erfolgten Gruppenvergleiche mittels Mann–Whitney-U-Test. Korrelationen zwischen GA und den untersuchten Biomarkern (SOD1, SOD3, GSH, 8-OHdG) wurden anhand der Spearman-Analyse berechnet. Bei Mehrfachvergleichen erfolgte eine Anpassung der p-Werte durch die Bonferroni-Korrektur. Wie unter 1.2.1 bereits beschrieben wurden die Proben anhand der SSW in zwei Gruppen eingeteilt: 36 Proben vor und 24 Proben nach der 37. SSW. Die exakten Stichprobengrößen (n) sind in Tabellen und Abbildungslegenden angegeben.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Ergebnisse der Fruchtwasseranalyse

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Konzentrationen von SOD1, SOD3, GSH sowie 8-OHdG im FW während der gesamten Schwangerschaft sowie innerhalb der beiden Gruppen. Zwischen den beiden SOD Isoformen ergab sich eine signifikant höhere Konzentration für SOD1 im Vergleich zu SOD3 ($p < 0,001$). Des Weiteren bestand eine positive Korrelation zueinander ($r = 0,360$, $p = 0,006$, siehe Abbildung 1). Die Abbildungen 2 und 3 veranschaulichen die abnehmenden SOD-Konzentrationen (SOD1 und SOD3) im Verlauf der Schwangerschaft mit signifikant negativer Korrelation zum GA (Spearman Korrelation Koeffizient, $r = -0,450$, $p < 0,001$, and $r = -0,429$, $p < 0,001$, beziehungsweise). Im Gegensatz dazu zeigte sich für 8-OHdG mit zunehmendem GA eine signifikant steigende Konzentration im FW ($r = 0,636$, $p < 0,001$). Im Vergleich zwischen 8-OHdG und SOD3 bestand eine negative Korrelation ($r = -0,366$, $p = 0,004$), jedoch nicht zwischen 8-OHdG und SOD1 ($r = -0,214$, $p = 0,11$). GSH zeigte eine relativ konstante Konzentration im Verlauf der Schwangerschaft, sodass es keine signifikante Korrelation zwischen GSH und der SSW ($p = 0,165$) oder zwischen 8-OHdG und GSH ($r = -0,252$, $p = 0,056$) bestand.

Tab. 1: Konzentrationen von SOD1, SOD3, GSH und 8-OHdG im Fruchtwasser

Parameter	Gesamtkollektiv (n = 60)	Gruppe 1 (n = 36)	Gruppe 2 (n = 24)	p-Wert
Gestationsalter (SSW)	35,2 (15,0 – 40,0)	22,4 (15,0 – 36,7)	38,7 (37,1 – 40,0)	< 0,001
SOD1 (ng/ml)	35,6 (1,9 – 172,3)	51,6 (3,6 – 170,9)	19,2 (1,9 – 172,3)	0,002
SOD3 (ng/ml)	1,2 (0,1 – 26,5)	2,1 (0,1 – 26,5)	0,8 (0,1 – 4,4)	< 0,001
GSH (ng/l)	71,1 (50,4 – 103,9)	74,8 (55,2 – 100,9)	66,0 (50,4 – 103,9)	0,167
8-OHdG (ng/ml)	2,4 (0,2 – 15,2)	1,5 (0,2 – 7,6)	6,0 (0,2 – 15,2)	< 0,001

Daten dargestellt als Median (Interquartilsbereich, IQR). SSW: Schwangerschaftswoche; SOD: Superoxiddismutase; GSH: Glutathion; 8-OHdG: 8-Hydroxy-2'-Desoxyguanosin. Modifiziert nach: Knieps et al., 2025.

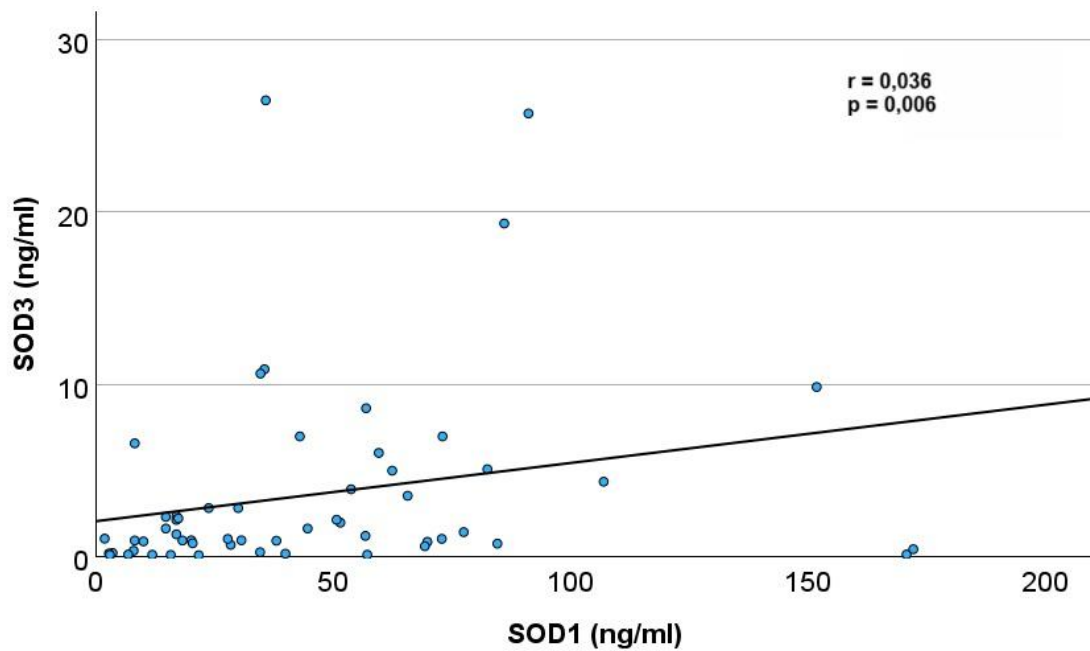


Abb. 1: Korrelation zwischen SOD1 und SOD3 Konzentrationen im Fruchtwasser. Modifiziert nach: Knieps et al., 2025.

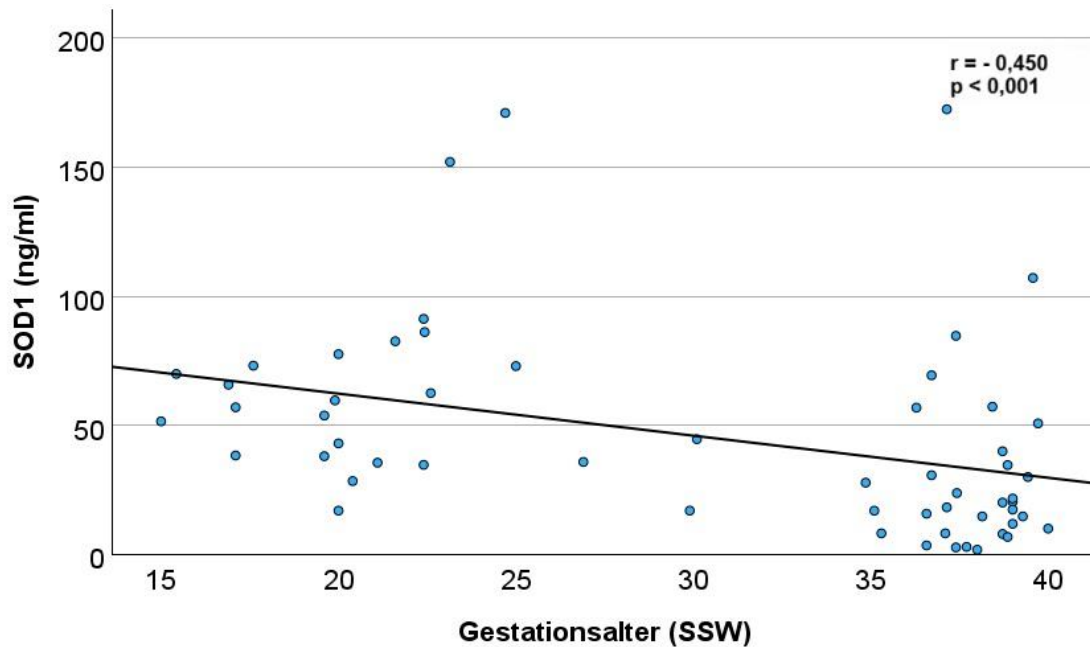


Abb. 2: Korrelation zwischen SOD1 und Gestationsalter (in Schwangerschaftswochen). Modifiziert nach: Knieps et al., 2025.

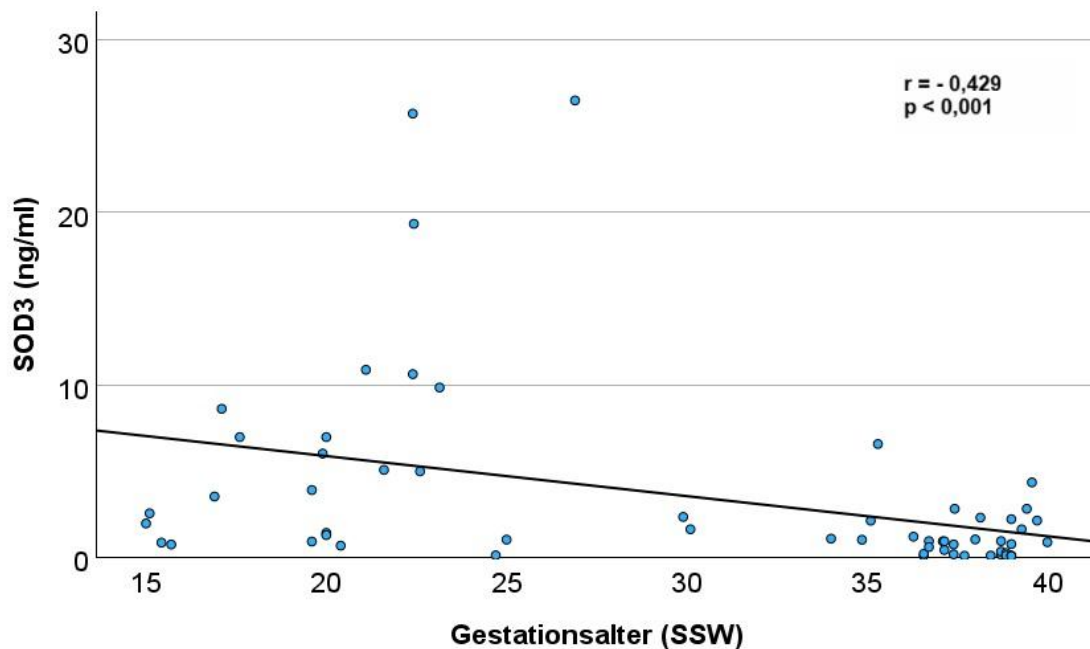


Abb. 3: Korrelation zwischen SOD3 und Gestationsalter (in Schwangerschaftswochen).
Modifiziert nach: Knieps et al., 2025.

1.3.2 Ergebnisse der Muttermilchanalyse

Die Ergebnisse der Gesamtkonzentrationen sowie der beiden Gruppen für SOD1 und SOD3 sind in Tabelle 2 repräsentiert. Im direkten Vergleich zwischen den FW- und MM-Proben zeigten sich in beiden Gruppen signifikant höhere SOD1 und SOD3 Konzentrationen in der MM als im FW (Gruppe 1: $p < 0,001$ und $p = 0,008$; Gruppe 2: $p < 0,001$). Wie auch im FW war die SOD1 Konzentration signifikant höher als die SOD3 Konzentration in der MM ($p < 0,001$) und beide waren positiv zueinander korreliert ($r = 0,351$, $p = 0,001$). Im Gegensatz zu der FW-Analyse zeigte sich eine positive Korrelation zwischen SOD1 und SOD3 in der MM zum GA ($r = 0,224$, $p = 0,034$ (siehe Abbildung 4), beziehungsweise $r = 0,248$, $p = 0,026$ (siehe Abbildung 5)). Trotzdem bestand kein signifikanter Unterschied von SOD1 und SOD3 im direkten Vergleich zwischen Proben vor der 37 SSW (Gruppe 1) und nach 37 SSW (Gruppe 2) ($p = 0,390$ und $p = 0,344$). SOD3 zeigte in den MM-Proben eine große interindividuelle Variabilität (0,1 bis 300 ng/ml).

Tab. 2: Konzentrationen von SOD1 und SOD3 in Abhängigkeit vom Gestationsalters der Muttermilchproben

Parameter	Gesamtkollektiv (n = 90)	Gruppe 1 (n = 65)	Gruppe 2 (n = 24)	p-Wert
Gestationsalter (SSW)	34,2 (25,6 – 42,0)	32 (25,6 – 36,7)	39,6 (37,6 – 39,0)	< 0,001
SOD1 (ng/ml)	267,9 (54,6 – 843,8)	252,2 (54,6 – 843,8)	316,8 (116,0 – 661,2)	0.390
SOD3 (ng/ml)	5,5 (0,1 – 300,0)	4,7 (0,1 – 300,0)	9,1 (0,1 – 292,5)	0,344

Daten dargestellt als Median (Interquartilsbereich, IQR). SSW: Schwangerschaftswoche; SOD: Superoxiddismutase. Modifiziert nach: Knieps et al., 2025.

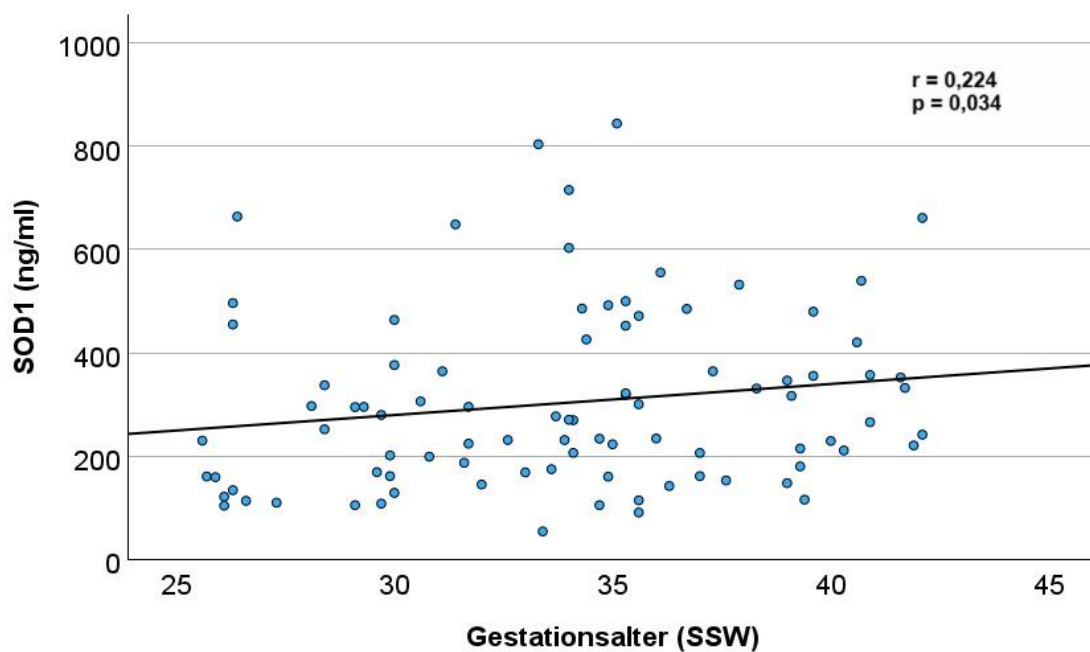


Abb. 4: Korrelation zwischen SOD1 und Gestationsalter (in Schwangerschaftswochen) in der Muttermilch. Modifiziert nach: Knieps et al., 2025.

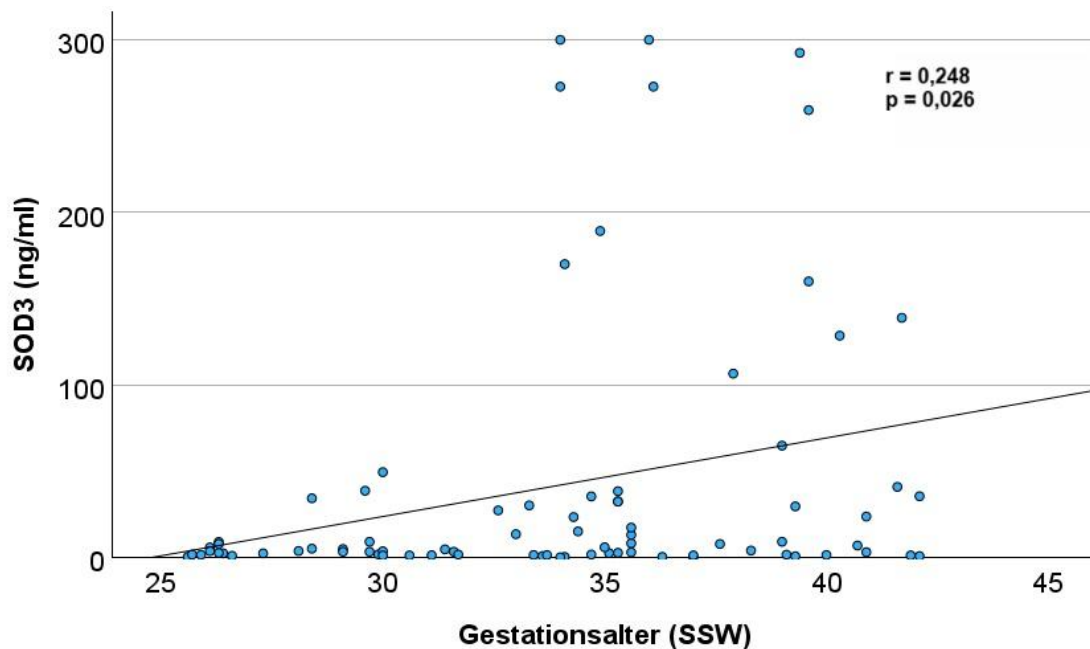


Abb. 5: Korrelation zwischen SOD3 und Gestationsalter (in Schwangerschaftswochen) in der Muttermilch. Modifiziert nach: Knieps et al., 2025.

1.4 Diskussion

Antioxidantien und Redoxsignalisierung haben einen besonderen Stellenwert in der fetalen und neonatalen gastrointestinalen Entwicklung. Ein fein abgestimmtes Redox-Milieu ist entscheidend, um Zellintegrität zu sichern, die Funktion der ISC zu erhalten und Differenzierungsprozesse zu steuern (Morris und Jasper, 2021; Nath et al., 2022). Sowohl intrazelluläre als auch luminale Redox-Umgebungen bedürfen einer präzisen Regulation, da ein Ungleichgewicht von ROS das Zellwachstum beeinträchtigen kann. Störungen dieser Balance haben Gewebeschäden, chronischer Entzündung oder vorzeitigem Zelltod zur Folge (Lin et al., 2022; Wang et al., 2020).

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass FW eine dynamische antioxidative Umgebung bereitstellt, die möglicherweise mit der Entwicklungsregulation, der Gewebereifung, den sich verändernden Anforderungen des Fetus oder mit Veränderungen in der Zusammensetzung der FW-Quelle in Zusammenhang steht. Mit zunehmendem GA nehmen die Konzentrationen von SOD1 und SOD3 ab, während der Marker oxidativer DNA-Schädigung 8-OHdG ansteigt. Auffällig ist die positive Korrelation zwischen SOD1

und SOD3, welche auf eine koordinierte Regulation und auch mögliche gemeinsame Quelle hindeuten könnte. Die negative Korrelation zwischen dem GA und den SOD-Konzentrationen kann darauf hinweisen, dass die frühe fetale gastrointestinale Entwicklung stärker auf antioxidativen Schutz angewiesen ist. Mit zunehmender struktureller und funktioneller Reifung des fetalen GIT nimmt dieses Schutzbedürfnis ab. Der Anstieg von 8-OHdG kann zum einem zunehmenden oxidativen Stress darstellen, zum anderen eine verstärkte Phase mit ROS-vermittelten Kaskaden zur epithelialen Differenzierung, Morphogenese und Immunreifung am Ende der Schwangerschaft darstellen (Cundubey und Demir, 2023; Moore et al., 2018). Entsprechend könnte die Abnahme der SOD-Konzentrationen im Verlauf der Schwangerschaft eine physiologische Verschiebung hin zu einem stärker pro-oxidativen Milieu anzeigen, das Differenzierung und Immunreifung begünstigt. Nennenswert ist hierbei noch die negative Korrelation zwischen 8-OHdG und SOD3, jedoch nicht zu SOD1, was auf die spezifische extrazelluläre Funktion von SOD3 bei der Begrenzung oxidativer DNA-Schäden hinweisen kann, möglicherweise durch direkten Kontakt zwischen geschlucktem FW und dem Darmepithel. So könnte SOD3 einerseits Schutz vor oxidativem Stress bieten und andererseits die Aufrechterhaltung kontrollierter ROS-Signale ermöglichen, die für Entwicklungsprozesse erforderlich sind.

SOD1 wurde bereits im FW nachgewiesen (Bagci et al., 2022); unsere Studie liefert jedoch erstmals eine Quantifizierung von SOD3 im FW. SOD3 wirkt als zentrales extrazelluläres Antioxidans, schützt vor oxidativem Stress, reguliert die NO-Signalisierung und trägt damit zur Gefäß- sowie Gewebeentwicklung bei (Nguyen et al., 2020; Sah et al., 2020). Tak et al. (2021) zeigten zudem, dass SOD3 in intestinale Zellkulturen durch Zytokine oder ROS induzierten Schäden schützt, die Expression von Tight Junction-Proteinen erhält und so die epitheliale Integrität sowie die Regulation von Entzündungs- und oxidativem Stress fördert. Neben SOD3 konnte auch GSH nachgewiesen werden, welches über die apikale sowie basolaterale Oberfläche der intestinalen Epithelzellen aufgenommen werden kann und so die Integrität des Epithels unterstützt (Aw, 2005; Kovacs-Nolan et al., 2014; Ren et al., 2018). Diese Studien deuten darauf hin, dass luminales GSH das gastrointestinale Epithel vor entzündlichen, ischämischen und oxidativen Schäden schützen kann (Aw, 2005; Mårtensson et al., 1990; Ren et al., 2018). Zusammenfassend lässt die Präsenz von SOD3 und GSH im FW vermuten, dass beide

Faktoren die fetale Darmentwicklung fördern könnten, indem sie die Funktion von ISC unterstützen, das Redox-Gleichgewicht stabilisieren und die epitheliale Integrität während der Reifung sichern. Es bleibt jedoch zu betonen, dass diese Hinweise zwar auf physiologische Rollen von SOD3 und GSH verweisen, ein kausaler Zusammenhang bislang aber nicht belegt ist.

Während der Fetus in einem hypoxisch-reduzierenden intrauterinen Milieu heranreift, erfolgt nach der Geburt ein abrupter Wechsel zu einer stark oxidativen Umgebung. Faktoren wie erhöhte Sauerstoffexposition, der Beginn enteraler Ernährung und die frühe mikrobielle Besiedlung verstärken diesen Übergang und stellen die Redox-Homöostase vor erhebliche Herausforderungen. Für Frühgeborene ist dieser Effekt besonders kritisch, da sie gleichzeitig den Einfluss von antioxidant-reichem FW abrupt verlieren und ihr unreifes antioxidatives System erhöhtem oxidativem Stress ausgesetzt ist (Almeida et al. 2022; Lembo et al., 2021). Oxidativer Stress gilt als ein zentraler Risikofaktor für Komplikationen bei Frühgeborenen, wie beispielsweise für die NEC (Lembo et al., 2021). Ebenso betroffen sind Neugeborene mit angeborenen Fehlbildungen wie CDH oder IA, die während der Schwangerschaft kein bis kaum FW aufnehmen können und postnatal häufig unter einer schweren gastrointestinalen Unreife leiden. Dies hat meist einen verzögerten Nahrungsaufbau und lange parenterale Ernährung sowie eine hohe Rate an Komplikationen wie intestinale Ischämie, Wachstums-/Entwicklungsverzögerung, Dysphagie, Nahrungsintoleranz und gastrointestinalen Reflux zur Folge (Leyens et al., 2024; Power et al., 2020). Obwohl die Konzentrationen von SOD1 und SOD3 in der MM deutlich höher waren als im FW und theoretisch den frühen Verlust des FW-Kontakts kompensieren könnten, ist eine rechtzeitiger enteraler Nahrungsbeginn mit MM insbesondere bei Neugeborenen mit CDH oder IA häufig verzögert. Diese Kinder erhalten MM erst nach operativer Korrektur oder – im Falle eines Chylothorax – zeitweise gar nicht. Formulanahrung enthält zudem keine antioxidativen Faktoren, wodurch die antioxidative Unterstützung in dieser vulnerablen Phase fehlt. Für diese Risikogruppen könnten frühpostnatale Ernährungsstrategien, die die trophischen und redoxregulierenden Eigenschaften von FW imitieren, ein vielversprechender Ansatz sein. Denkbar sind sowohl Supplementierungen mit Antioxidantien (z. B. SOD3, GSH) als auch die gezielte Nutzung von FW-basierten Ernährungsansätzen. Alles mit dem Ziel die Darmreifung bei diesen Hochrisiko-Neugeborenen zu unterstützen.

Die Studie weist jedoch Limitationen auf: Die Stichprobengröße erlaubt nur eine begrenzte Generalisierbarkeit – trotz ausreichender Größe für eine statistische Analyse - andere Antioxidantien wie Katalase oder Glutathionperoxidase wurden nicht berücksichtigt und funktionelle Assays zur Beurteilung der biologischen Wirksamkeit fehlen bislang. Zukünftige Studien – insbesondere in präklinischen Modellen und Organoid-Systemen – sind notwendig, um die Rolle einzelner Antioxidantien für die fetale Darmentwicklung kausal zu klären und damit einhergehend das Nahrungsregime und therapeutische Maßnahmen bei (vulnerablen) Neugeborenen zu optimieren.

1.5 Zusammenfassung

Diese Arbeit analysiert die antioxidative Dynamik des FW im Verlauf der Schwangerschaft, um dessen möglichen Einfluss auf die fetale gastrointestinale Entwicklung besser zu verstehen. Neben SOD1 konnte erstmalig die extrazelluläre Isoform SOD3 und GSH im FW nachgewiesen werden. Mit zunehmendem GA zeigte sich ein Rückgang beider SOD-Isoformen bei gleichzeitigem Anstieg des Markers oxidativer DNA-Schädigung (8-OHdG).

Die Ergebnisse legen nahe, dass Antioxidantien im FW wesentlich zur Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichts und zur Unterstützung der intestinalen Reifung beitragen. Für Frühgeborene und Kinder mit Fehlbildungen wie CDH oder IA, die kein oder nur wenig FW aufnehmen, könnten diese Mechanismen von besonderer klinischer Bedeutung sein. Zukünftige Studien sollten klären, in welchem Ausmaß antioxidative Faktoren wie SOD3 und GSH tatsächlich an der intestinalen Reifung beteiligt sind und ob sich deren Effekte durch gezielte Ernährungs- oder Supplementierungsstrategien nachahmen lassen. Ein besseres Verständnis dieser Mechanismen könnte langfristig zu innovativen Therapiekonzepten beitragen, die das Risiko gastrointestinaler Komplikationen senken, die Morbidität vulnerabler Neugeborener verringern und deren langfristige Entwicklungschancen verbessern.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Almeida VO, Pereira RA, Amantéa SL, Rhoden CR, Colvero MO. Neonatal diseases and oxidative stress in premature infants: an integrative review. *Jornal de Pediatria* 2022; 98: 455–462

Aw TY. Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 204: 320-328

Bagci S, Brosens E, Tibboel D, ..., Reutter HM. More than fetal urine: enteral uptake of amniotic fluid as a major predictor for fetal growth during late gestation. *Eur J Pediatr* 2016; 175: 825-831

Bagci S, Katzer D, Altuntas Ö, Alsat EA, Berg C, Rebeggiani L, Bartmann P, Müller A. The fetal gastrointestinal tract is exposed to melatonin and superoxide dismutase rich amniotic fluid throughout prenatal development. *J Clin Biochem Nutr* 2022; 71: 64-68

Bogavac M, Lakic N, Simin N, Nikolic A, Sudji J, Bozin B. Biomarkers of oxidative stress in amniotic fluid and complications in pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25: 104-108

Buchanan KL, Bohórquez DV. You are what you (first) eat. *Front Hum Neurosci* 2018; 12: 323

Commare CE, Tappenden KA. Development of the infant intestine: implications for nutrition support. *Nutr Clin Pract* 2007; 22: 159–173

Cundubey CR, Demir MB. 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine, a product of oxidative DNA degradation, is increased in the amniotic fluid of preterm births. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2023; 27: 5184-5189

Dasgupta S, Arya S, Choudhary S, Jain SK. Amniotic fluid: Source of trophic factors for the developing intestine. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2016; 7: 38-47

Dennery PA. Role of redox in fetal development and neonatal diseases. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6: 147–153

Graille M, Wild P, Sauvain JJ, Hemmendinger M, Guseva Canu I, Hopf NB. Urinary 8-OHdG as a Biomarker for Oxidative Stress: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 3743

- Herway C, Kanninen T, Witkin SS, Saade G, Fortunato SJ, Menon R. Ethnic disparity in amniotic fluid levels of hyaluronan, histone H2B and superoxide dismutase in spontaneous preterm birth. *J Perinat Med* 2013; 41: 277-282
- Jauniaux E, Cindrova-Davies T, Johns J, Dunster C, Hempstock J, Kelly FJ, Burton GJ. Distribution and transfer pathways of antioxidant molecules inside the first trimester human gestational sac. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 1452-1458
- Knieps L, Alsat EA, Melaku T, Mueller A, Bagci S. Evidence for Extracellular Superoxide Dismutase (SOD3), Glutathione and Redox Dynamics in Amniotic Fluid Throughout Gestation. *Children* 2025; 12: 1086
- Kovacs-Nolan J, Rupa P, Matsui T, Tanaka M, Konishi T, Sauchi Y, Sato K, Ono S, Mine Y. In vitro and ex vivo uptake of glutathione (GSH) across the intestinal epithelium and fate of oral GSH after in vivo supplementation. *J Agric Food Chem* 2014; 62: 9499-9506
- Lembo C, Buonocore G, Perrone S. Oxidative Stress in Preterm Newborns. *Antioxidants* 2021; 10: 1672
- Leyens J, Bo B, Heydweiller A, Schaible T, Boettcher M, Schroeder L, Müller A, Kipfmüller F. Parents-reported nutrition and feeding difficulties in infants with congenital diaphragmatic hernia after hospital discharge. *Early Hum Dev* 2024; 195: 106074
- Lin PY, Stern A, Peng HH, Chen JH, Yang HC. Redox and Metabolic Regulation of Intestinal Barrier Function and Associated Disorders. *Int J Mol Sci* 2022; 23: 14463
- Mårtensson J, Jain A, Meister A. Glutathione is required for intestinal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 1715-1719
- Moore TA, Ahmad IM, Zimmerman MC. Oxidative Stress and Preterm Birth: An Integrative Review. *Biol Res Nurs* 2018; 20: 497-512
- Morris O, Jasper H. Reactive oxygen species in intestinal stem cell metabolism, fate and function. *Free Radic Biol Med* 2021; 160: 140–146
- Nath A, Chakrabarti P, Sen S, Barui A. Reactive oxygen species in modulating intestinal stem cell dynamics and function. *Stem Cell Rev Rep* 2022; 18: 2328–2350
- Nguyen NH, Tran GB, Nguyen CT. Anti-oxidative effects of superoxide dismutase 3 on inflammatory diseases. *J Mol Med (Berl)* 2020; 98: 59-69

Østergaard MV, Shen RL, Støy ACF, ..., Sangild PT. Provision of Amniotic Fluid During Parenteral Nutrition Increases Weight Gain With Limited Effects on Gut Structure, Function, Immunity, and Microbiology in Newborn Preterm Pigs. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2016; 40: 552-566

Power B, Shibuya S, Lane B, Eaton S, De Coppi P. Long-term feeding issues and their impact on the daily life of congenital diaphragmatic hernia survivors: results of the first patient-led survey. *Pediatr Surg Int* 2020; 36: 63-68

Ren H, Meng Q, Yepuri N, Du X, Sarpong JO, Cooney RN. Protective effects of glutathione on oxidative injury induced by hydrogen peroxide in intestinal epithelial cells. *J Surg Res* 2018; 228: 1-9

Sah SK, Agrahari G, Kim TY. Insights into superoxide dismutase 3 in regulating biological and functional properties of mesenchymal stem cells. *Cell Biosci* 2020; 10: 22

Tak LJ, Kim HY, Ham WK, ..., Kim TY. Superoxide dismutase 3-transduced mesenchymal stem cells preserve epithelial tight junction barrier in murine colitis and attenuate inflammatory damage in epithelial organoids. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 6431

Tong XL, Wang L, Gao TB, Qin YG, Qi YQ, Xu YP. Potential function of amniotic fluid in fetal development — novel insights by comparing the composition of human amniotic fluid with umbilical cord and maternal serum at mid and late gestation. *J Chin Med Assoc* 2009; 72: 368-373

Underwood MA, Gilbert WM, Sherman MP. Amniotic fluid: Not just fetal urine anymore. *J Perinatol* 2005; 25: 341–348

Underwood MA, Sherman MP. Nutritional Characteristics of Amniotic Fluid. *NeoReviews* 2006; 7: e310-e316

Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol* 2018; 217: 1915–1928

Wang Y, Chen Y, Zhang X, Lu Y, Chen H. New insights in intestinal oxidative stress damage and the health intervention effects of nutrients: A review. *J Funct Foods* 2020; 75: 104248

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 337-349

2. Veröffentlichung

Dieser Publikationsdissertation liegt die folgende, unabhängig begutachtete Veröffentlichung zugrunde:

Knieps L, Alsat EA, Melaku T, Mueller A, Bagci S. Evidence for Extracellular Superoxide Dismutase (SOD3), Glutathione and Redox Dynamics in Amniotic Fluid Throughout Gestation. Children 2025; 12: 1086

<https://doi.org/10.3390/children12081086>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin am Zentrum für Kinderheilkunde des Universitätsklinikum Bonn unter Betreuung von Professor Dr. med. Soyhan Bagci durchgeführt. Unter dessen Betreuung entstand auch die Konzeption und Durchführung dieser Arbeit. Das Erstmanuskript für den Ethikantrag sowie den Förderungsantrag beim Studienzentrum habe ich verfasst.

Vor geplanten Kaiserschnitten erfolgte die Aufklärung der Patientinnen überwiegend durch mich, ebenso wie die direkte Übernahme und Aufbereitung der FW-Proben. Bei gewonnen FW-Proben im Rahmen einer Amniozentese im Verlauf der Schwangerschaft kooperierten wir mit der Geburtshilfe und Pränatalmedizin, die die Patientinnen aufklärten, uns über die Entnahme informierten und die gewonnen Proben bis zu unserer Abholung lagerten. Die Durchführung der Amniozentese während der Schwangerschaft sowie kurz vor einem Kaiserschnitt erfolgte durch die ärztlichen gynäkologischen Kolleg*innen.

Die Dokumentation der gewonnen Proben sowie Recherche der Stammdaten der Patientinnen und Neugeborenen (z.B. ermittelte SSW, Alter, Risikofaktoren) erfolgte durch mich. Die Aufklärung und Rekrutierung der Patientinnen für unsere Muttermilchproben erfolgte durch ein breites Team (neonatologisches Personal, insb. Prof. Dr. Bagci, Herr Melaku und Frau Dr. Alsat), da ich zu diesem Zeitpunkt mich in meinem praktischen Jahr befand und nicht immer anwesend sein konnte.

Die Analysen und Konservierung der Fruchtwasser und Muttermilchproben wurden in unserem Neonatologischen Labor des Universitätsklinikums Bonn von unserem Laborassistenten Tamene Melaku durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte in gemeinsamer Zusammenarbeit mit meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Soyhan Bagci.

Bei der Erstellung dieser Arbeit verwendete ich ChatGPT, um die Lesbarkeit und Sprache der Arbeit zu verbessern. Nach der Verwendung dieses Tools habe ich die entsprechenden Passagen überprüft und bearbeitet und übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertationsschrift.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Soyhan Bagci, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in der Neonatologie des Universitätsklinikums Bonn anzufertigen. Insbesondere danke ich ihm für seine herzliche und kontinuierliche Betreuung über all die Jahre, die nicht nur die Entstehung dieser Dissertation, sondern auch die Umsetzung unserer AFFEN-Studie (Amniotic Fluid For Enteral Nutrition (AFFEN) in newborn infants with congenital diaphragmatic hernia and esophageal/intestinal atresia) ermöglicht hat. Durch seine Unterstützung konnte ich wissenschaftliches Arbeiten erlernen und mein Interesse an Forschung weiter vertiefen.

Mein Dank gilt ebenso dem gesamten Team unserer AFFEN-Studie, insbesondere Frau Dr. Ebru Alsat für ihre wertvolle Erfahrung in der Neonatologie und die stets hilfreichen Ratschläge sowie Herrn Tamene Melaku, für die Durchführung der Analysen und seine tatkräftige Unterstützung bei der Probengewinnung und -aufbereitung.

Ein weiterer Dank geht an die Geburtshilfe und Pränatalmedizin des Universitätsklinikums Bonn, die uns durch ihre enge Kooperation die Sammlung der erforderlichen FW-Proben ermöglichten. Die reibungslose Zusammenarbeit hat wesentlich zum Erfolg dieses Projektes beigetragen.

Von Herzen danke ich meiner Familie, die mich während meiner gesamten akademischen Reise begleitet hat. Auch wenn ich das ein oder andere Mal von den wiederkehrenden Nachfragen nach dem Fortschritt meiner Arbeit etwas genervt war, haben mir genau diese Gespräche immer wieder Motivation und Mut gegeben, dranzubleiben und den Weg bis zum Ende zu gehen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Partner Alexander Winter, der mich unermüdlich motiviert hat, stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und mir durch seine eigene wissenschaftliche Laufbahn eine große Stütze war.

Diese Arbeit ist nicht nur mein persönlicher Abschluss, sondern auch das Ergebnis der Unterstützung vieler – meiner Familie, meines Partners, meiner Freunde, Kommiliton*innen und Kolleg*innen –, denen ich von Herzen danke.

5. Publikation (PDF-Version)



Article

Evidence for Extracellular Superoxide Dismutase (SOD3), Glutathione and Redox Dynamics in Amniotic Fluid Throughout Gestation

Leah Knieps, Ebru Aileen Alsat, Tamene Melaku, Andreas Mueller and Soyhan Bagci *

Neonatology and Pediatric Intensive Care, Children's Hospital, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany; leah.knieps@gmail.com (L.K.); ebru_aileen.alsat@ukbonn.de (E.A.A.); tamene.melaku@ukbonn.de (T.M.); a.mueller@ukbonn.de (A.M.)

* Correspondence: soyhan.bagci@ukbonn.de

Highlights

What are the main findings?

- Our study provides novel insights by characterising the antioxidant profiles of amniotic fluid (AF), with a specific focus on superoxide dismutase isoforms (SOD1 and SOD3), glutathione (GSH), and 8-OHdG.
- AF provides a redox-regulated microenvironment during foetal development of the gastrointestinal tract (GIT).
- Antioxidant environment of AF is dynamic, undergoing substantial modulation of the oxidative–antioxidative balance throughout gestation.

What is the implication of the main finding?

- Gestational age-specific components of AF, including enzymatic antioxidants such as SOD1, SOD3, and GSH, should be considered in the development of targeted nutritional and pharmacological interventions, particularly for vulnerable populations such as preterm infants and those with congenital gastrointestinal anomalies.



Academic Editor: Elizabeth Asztalos

Received: 30 June 2025

Revised: 11 August 2025

Accepted: 17 August 2025

Published: 19 August 2025

Citation: Knieps, L.; Alsat, E.A.; Melaku, T.; Mueller, A.; Bagci, S. Evidence for Extracellular Superoxide Dismutase (SOD3), Glutathione and Redox Dynamics in Amniotic Fluid Throughout Gestation. *Children* **2025**, *12*, 1086. <https://doi.org/10.3390/children12081086>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract

Introduction: Amniotic fluid (AF) plays a pivotal role in foetal gastrointestinal development by delivering bioactive factors that support intestinal maturation. However, the redox environment of AF and its potential contribution to foetal intestinal homeostasis remain insufficiently characterised. This study aimed to quantify key antioxidant markers—superoxide dismutase isoforms (SOD1, SOD3), glutathione (GSH), and the oxidative DNA damage marker 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG)—in AF across gestational ages and compare them with those in human milk (HM). **Methods:** AF samples ($n = 60$) were collected from pregnancies between 15 and 40 weeks of gestation, grouped into preterm (<37 weeks) and term (≥ 37 weeks). SOD1, SOD3, GSH, and 8-OHdG concentrations were quantified using ELISA. HM samples ($n = 45$) were similarly analysed. **Results:** SOD1 and SOD3 in AF concentrations decreased significantly with gestational age (GA) ($p < 0.001$), while 8-OHdG levels increased ($p < 0.001$). SOD3 showed a negative correlation with 8-OHdG ($p = 0.004$). HM contained significantly higher levels of both SOD isoforms compared to AF (AF vs. HM: 35.6 (1.9–172.3) vs. 267.9 (54.6–843.8), $p < 0.001$ for SOD1 and 1.2 ng/mL (0.1–26.5) vs. 5.5 ng/mL (0.1–300.0), $p < 0.001$ for SOD3), regardless of GA. **Conclusions:** Our findings highlight the dynamic nature of the redox environment in AF and its potential importance for foetal GIT development. The disruption of redox balance by preterm birth or inadequate AF intake during foetal life may have long-term

consequences for intestinal development and function. These insights provide a foundation for future clinical studies aimed at enhancing neonatal feeding regimens, particularly for preterm infants and those with congenital gastrointestinal disorders.

Keywords: amniotic fluid; human milk; foetus; gastrointestinal development; redox signalling; superoxide dismutase 1; superoxide dismutase 3

1. Introduction

The development and maturation of the gastrointestinal tract (GIT) is a dynamic, multi-stage process that begins in utero and continues into early postnatal life. After mid-gestation, the intestinal epithelium undergoes structural and functional maturation, characterised by coordinated cellular proliferation, differentiation, and apoptosis to establish the crypt–villus axis and prepare the gut for the transition to extra-uterine nutrition [1]. This process is governed by a complex interplay of genetic programming, endocrine signals, and paracrine factors derived from the surrounding mesenchyme and amniotic fluid (AF) [1,2]. Among the key regulators of these processes is redox signalling, wherein reactive oxygen species (ROS) serve as critical signalling molecules that play a key role in cellular processes such as cell proliferation, differentiation, and apoptosis [3,4]. It is established that both cellular and luminal redox environments are crucial in preserving cellular integrity and maintaining the overall redox homeostasis of tissues [4,5]. The developmental regulation of intestinal growth and adaptation relies on an appropriate balance between the antioxidant system and ROS. Investigating this relationship in vivo presents challenges due to the dual role of ROS: at physiological levels, ROS serve as signalling molecules, whereas an imbalance between ROS production and antioxidant defence—known as oxidative stress—can disrupt these signalling pathways, impair tight junction formation, and promote inflammatory responses, thereby compromising intestinal barrier function [3]. This redox-dependent regulation may be relevant in the neonatal gut, especially in preterm infants, where varying oxygen levels, microbial colonisation, and nutritional changes modulate ROS levels and redox-sensitive pathways that shape postnatal intestinal adaptation.

Recent research has highlighted that foetal gastrointestinal development, growth, and maturation are critically dependent on the ingestion of AF [2,6,7]. By around the tenth week of gestation, the foetus begins to swallow AF, and this process increases steadily so that near term, the daily intake reaches approximately 700 mL [2]. AF is a complex biological fluid containing a diverse array of components, including proteins, hormones, prostaglandins, catecholamines, glucose, electrolytes, enzymes, and growth factors—all of which directly interact with the intestinal epithelium to help prepare the gut for an extra-uterine environment [7,8]. In preterm infants, however, early delivery interrupts this natural process, terminating the normal period of AF ingestion and intestinal absorption that generally occurs in the third trimester. Similarly, in-term infants with certain congenital anomalies—such as congenital diaphragmatic hernia, oesophageal atresia, or intestinal atresia—the anatomical abnormalities physically obstruct the normal flow of AF into the gut. This disruption in AF uptake can compromise gut maturation, alter mucosal development, and increase the risk of postnatal feeding difficulties, as well as complications such as necrotising enterocolitis. A thorough understanding of the composition and functions of AF is therefore essential for enhancing nutritional strategies and reducing both short- and long-term morbidity in critically ill preterm and term newborn infants.

Despite our growing understanding of its many constituents, much less is known about the redox environment in AF. Superoxide dismutase (SOD) is a key enzymatic antioxidant

that catalyses the dismutation of superoxide anions (O_2^-) into molecular oxygen (O_2) and hydrogen peroxide (H_2O_2), thereby mitigating oxidative stress [9]. In humans, SOD exists in three isoforms—SOD1, SOD2, and SOD3—each differing in cellular localisation and metal cofactor requirements [10]. To date, studies measuring SOD activity in AF have not distinguished between SOD isoforms [11–13]. SOD3, the principal extracellular isoform, is present in various tissues and fluids, where it exerts distinct immunomodulatory and protective functions, including anti-inflammatory and anti-angiogenic effects, as well as the regulation of nitric oxide (NO)-mediated signalling [14,15]. Glutathione (GSH) is the most abundant intracellular thiol in intestinal epithelial cells and plays a central role in maintaining redox homeostasis, detoxifying ROS, and supporting epithelial barrier integrity [16]. A deeper exploration of the antioxidative system in AF could offer valuable insights for improving postnatal outcomes, particularly in preterm newborns.

Gaining a deeper understanding of the antioxidative system in AF could be key to improving postnatal outcomes in preterm and term newborn infants by supporting optimal gut development and overall health. Our study aimed to provide novel insights into the characterisation of the antioxidant profiles of AF, with a specific focus on superoxide dismutase isoforms (SOD and SOD3) and glutathione (GSH), which are critical for stem/progenitor cell proliferation, differentiation, and barrier function in the developing gut [15,17]. Moreover, we analysed 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG), a marker of oxidative DNA damage [18].

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

Sixty pregnant women were included in the study. Inclusion criteria were: availability of GA determination by both last menstrual period and first- or second-trimester ultrasonographic foetal biometry, and clinical indication for amniocentesis or cesarean delivery. Exclusion criteria were the presence of maternal or foetal conditions that could affect AF composition, including chorioamnionitis, premature rupture of membranes, pre-eclampsia/eclampsia, gestational diabetes requiring insulin, and bilateral renal agenesis. Women with any systemic inflammatory disease or chronic medication use known to influence oxidative stress markers were also excluded.

GA was evaluated using the last menstrual period and ultrasonographic foetal biometry; discrepancies > 7 days prompted correction using biometric dating. Participants were grouped according to GA into Group 1 (<37 completed weeks; $n = 36$) and Group 2 (≥ 37 weeks; $n = 24$), with the cut-off reflecting the World Health Organization's definition of term pregnancy. In accordance with the Declaration of Helsinki, the study was approved by the Ethics Committee of the University of Bonn (503/20, approved on 23 November 2020). An informed consent form for participation was distributed to all participants and signed.

2.2. AF and Human Milk (HM) Collection Procedure

AF samples were obtained under sterile conditions either during clinically indicated amniocentesis or at the time of elective or emergency cesarean section performed under general anaesthesia. AF samples were obtained by needle aspiration that was visually free of bloody contamination. Within 30 min of collection, AF was centrifuged at $3000 \times g$ for 10 min at $4^\circ C$ to remove cellular debris. The supernatant was aliquoted into low-protein-binding tubes in 0.5–1 mL volumes to minimise repeated freeze–thaw cycles and stored at $-80^\circ C$ until analysis. All samples underwent only a single freeze–thaw cycle prior to biochemical assays.

For HM samples, the mothers were enrolled in the study between the 5th and 10th day postpartum. All women were asked to fill 2 mL of breast milk in tubes after expressing and

to freeze them at -20°C . The women carried the tubes to us, and they were then frozen at -80°C until analysis. Prior to analysis, the samples were thawed and centrifuged at $3000\times g$ for 10 min at 4°C . The supernatant was pipetted and used for analysis.

2.3. Analytical Methods

The concentrations of SOD1, SOD3, GSH, and 8-OHdG in AF were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method (SOD1: Cat. No.: BMS222, SOD3: Cat. No.:EH432RB, Thermofisher, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Germany; GSH: Cat. No: KTE62857, Abbkine, Atlanta, GA, USA, and 8-OHdG: Cat. No. KOG-200S/E, Japan Institute for the Control of Aging, Shizuoka, Japan). Assays were performed strictly according to the manufacturers' instructions, with all standards and samples run in duplicate. Calibration curves were generated for each plate, and both positive and negative controls provided by the manufacturer were included to verify assay performance. Intra-assay coefficients of variation (CV) were 5.1% for SOD1, <10.0% for SOD3, <9% for GSH, and 4.0% for 8-OHdG; inter-assay CVs were 5.8%, <12.0%, <11%, and 5.4%, respectively. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were as specified by the kit manufacturers and verified in our laboratory using serial dilution of pooled samples.

2.4. Statistical Analyses

The statistical analyses were performed using SPSS 27.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). All data are presented as median (interquartile range (IQR)). The normality of the variables was tested using the Kolmogorov–Smirnov and Shapiro–Wilk tests. Because SOD1, SOD3, and 8-OHdG levels were not normally distributed, we used the two-tailed non-parametric Mann–Whitney U-test for the group comparison. Spearman correlation analysis was used to analyse associations among GA, SOD1, SOD3, GSH, and 8-OHdG levels. Where multiple comparisons were made, the Bonferroni correction was applied to adjust p -values. According to GA, the samples were divided into two categories: Group 1 ($n = 36$) includes AF samples obtained before 37 weeks of gestation, and Group 2 ($n = 24$) includes AF samples obtained after 37 weeks of gestation. For each statistical test, exact sample sizes (n) are reported in the tables and figure legends. A p -value < 0.05 (two-tailed) was considered statistically significant

3. Results

Table 1 demonstrates the concentrations of SOD1, SOD3, GSH, and 8-OHdG in AF. The concentration of SOD1 was significantly higher than that of SOD3 ($p < 0.001$). SOD1 and SOD3 concentrations in AF showed a significant negative correlation with GA, indicating a progressive decrease in their levels as pregnancy progressed (Spearman correlation coefficient, $r = -0.450$, $p < 0.001$, and $r = -0.429$, $p < 0.001$, respectively). GSH showed no correlation with GA ($p = 0.165$). Furthermore, a positive correlation was observed between SOD1 and SOD3 concentrations ($r = 0.360$, $p = 0.006$) (Figure 1). The concentration of 8-OHdG in AF increased as pregnancy advanced ($r = 0.636$, $p < 0.001$). There was also a significant negative correlation between 8-OHdG and SOD3 ($r = -0.366$, $p = 0.004$) (Figure 2), while SOD1 and GSH showed no correlation with 8-OHdG level ($r = -0.214$, $p = 0.11$ and -0.252 , $p = 0.056$, respectively).

Table 1. SOD1, SOD3, GSH, and 8-OHdG concentration in amniotic fluid.

	All Samples (<i>n</i> = 60)	Group 1 (<i>n</i> = 36)	Group 2 (<i>n</i> = 24)	<i>p</i> -Value
Gestational Age (GA) (weeks)	35.2 (15.0–40.0)	22.4 (15.0–36.7)	38.7 (37.1–40.0)	<0.001
SOD1 (ng/mL)	35.6 (1.9–172.3)	51.6 (3.6–170.9)	19.2 (1.9–172.3)	0.002
SOD3 (ng/mL)	1.2 (0.1–26.5)	2.1 (0.1–26.5)	0.8 (0.1–4.4)	<0.001
GSH (ng/L)	71.1 (50.4–103.9)	74.8 (55.2–100.9)	66.0 (50.4–103.9)	0.167
8-OHdG (ng/mL)	2.4 (0.2–15.2)	1.5 (0.2–7.6)	6.0 (0.2–15.2)	<0.001

The data are expressed as the median (IQR). SOD: superoxide dismutase; 8-OHdG: 8-hydroxy-2-deoxyguanosine. Group 1: <37 weeks of gestation; Group 2: ≥37 weeks of gestation.

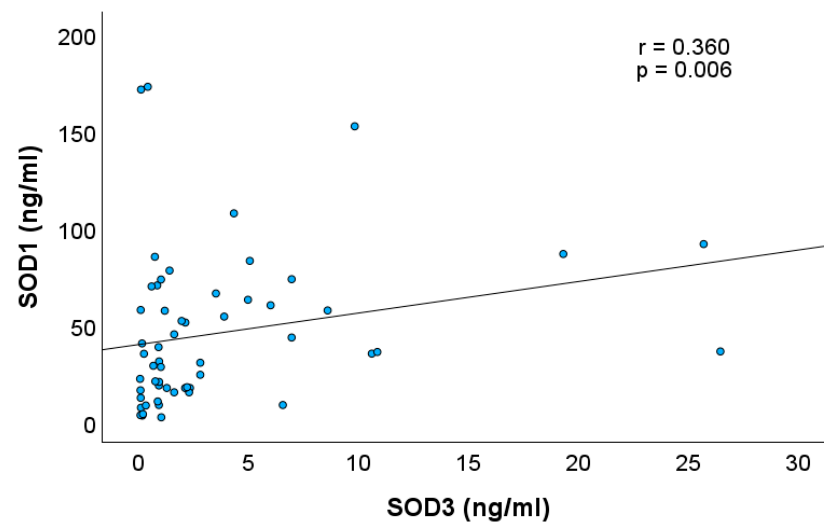
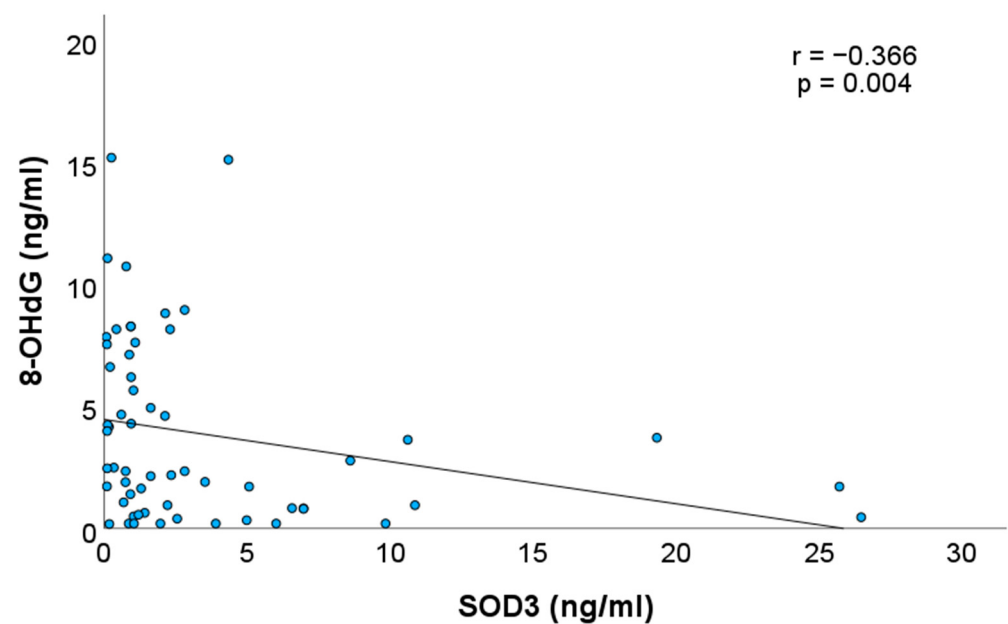
**Figure 1.** Correlation between SOD1 and SOD3 concentrations.**Figure 2.** Correlation between 8-OHdG and SOD3 concentrations.

Table 2 presents the concentrations of SOD1 and SOD3 in human milk (HM) samples from 45 women. SOD3 levels showed marked interindividual variability, ranging from 0.1 to 300 ng/mL. SOD1 concentrations were significantly higher than those of SOD3 ($p < 0.001$). Both SOD1 and SOD3 in HM were positively correlated with GA ($r = 0.224$, $p = 0.034$, and $r = 0.248$, $p = 0.026$, respectively). However, no significant differences were observed between preterm and term samples ($p = 0.390$ and $p = 0.344$). A significant positive correlation was also found between SOD1 and SOD3 concentrations ($r = 0.351$, $p = 0.001$). In comparison to AF, SOD1 and SOD3 levels were significantly higher in both preterm ($p < 0.001$ and $p = 0.008$) and term HM ($p < 0.001$).

Table 2. SOD1 and SOD3 concentration and GA of the analysed human milk samples.

	All Samples (<i>n</i> = 90)	Group 1 (<i>n</i> = 65)	Group 2 (<i>n</i> = 25)	<i>p</i> -Value
Gestational Age (weeks)	34.2 (25.6–42.1)	32.0 (25.6–36.7)	39.6 (37.6–39.0)	<0.001
SOD1 (ng/mL)	267.9 (54.6–843.8)	252.2 (54.6–843.8)	316.8 (116.0–661.2)	0.390
SOD3 (ng/mL)	5.5 (0.1–300.0)	4.7 (0.1–300.0)	9.1 (0.1–292.5)	0.344

The data are expressed as the median (Range). SOD: superoxide dismutase; Group 1: <37 weeks of gestation; Group 2: ≥37 weeks of gestation.

4. Discussion

The role of antioxidants and redox signalling in intestinal development is a critical and complex aspect of gastrointestinal physiology, particularly in the context of early life, including foetal and neonatal gastrointestinal development. The findings of this study support the hypothesis that AF provides a redox-regulated microenvironment. We observed a decline in the concentrations of both SOD isoforms with increasing GA, accompanied by an increase in the oxidative DNA damage marker 8-OHdG. These results suggest that the antioxidant environment of AF is dynamic, undergoing substantial modulation of the oxidative–antioxidative balance throughout gestation. This modulation may be related to developmental regulation, tissue maturation, the evolving demands of the developing foetus, or changes in the composition of the AF source.

It is well established that the redox environment plays a crucial role in preserving cellular integrity and maintaining overall tissue redox homeostasis in the intestine, whose high regenerative capacity is primarily attributed to Intestinal Stem Cells (ISCs) [5]. Intracellular and luminal redox environments must be tightly regulated; too much or too little ROS could inhibit cell growth. When the intestinal redox environment is disrupted, for instance, by sustained oxidative stress or an imbalance in antioxidant defences, the resulting redox dysregulation can compromise cell fate decisions and lead to tissue dysfunction, chronic inflammation, or programmed cell death [19]. Our study offers novel insights into the antioxidant profiles of AF, with a specific focus on superoxide dismutase isoforms (SOD1 and SOD3), GSH, and 8-OHdG. The presence of SOD1 in AF has been previously reported, yet our study is the first to quantify SOD3 in AF [11]. SOD3 is a key antioxidant in the extracellular matrix, protecting against oxidative stress and thereby maintaining tissue health. It also regulates nitric oxide signalling, which is essential for vascular and tissue development [14,20]. Moreover, SOD3 can significantly mitigate enteritis symptoms by preserving the integrity of epithelial junctions and regulating inflammatory and oxidative stress responses [15]. In addition to SOD3, we identified GSH, which can be transported intact into the small intestine in vivo, may contribute to maintaining mucosal thiol bal-

ance [16,21]. Moreover, Kovacs-Nolan et al. [22] demonstrated in their *in vitro* and *ex vivo* uptake study of GSH that intact GSH can be transported across both the basolateral and apical surfaces of intestinal epithelial cells. The studies suggest that luminal GSH could help protect the gastrointestinal epithelium from inflammatory, ischemic, and oxidative injury [16,21,23]. Taken together, the presence of SOD3 and GSH in AF therefore raises the possibility that they contribute to foetal gastrointestinal development by supporting ISC function, maintaining redox balance, and safeguarding epithelial integrity during gut maturation. Importantly, while these patterns suggest physiological roles for SOD3 and GSH, causal relationships remain to be demonstrated. Preclinical studies—such as functional assays on intestinal epithelial barrier integrity, antioxidant supplementation trials in animal models, and the use of organoid systems—are needed to clarify mechanisms and assess whether modulating antioxidant exposure could influence developmental outcomes. For preterm neonates, who may experience an abrupt loss of SOD3-rich AF, such studies would help determine whether supplementation strategies can safely replicate aspects of the intrauterine redox environment.

The positive correlation between SOD1 and SOD3 concentrations suggests coordinated regulation or a shared source, meriting further investigation into their developmental control and interaction with other redox-sensitive signalling networks [24]. The significant negative correlation between GA and concentrations of SOD1 and SOD3 suggests that the early intrauterine environment is more reliant on antioxidant protection, which diminishes as structural and functional maturation of the foetal GIT progresses. SOD3 concentrations were low overall and highly variable between individuals. Given its extracellular localisation and role in NO signalling and vascular integrity [20], a late gestational decline in SOD3 may reflect a physiological shift toward a more pro-oxidant state, potentially facilitating terminal differentiation and immune priming. The gestational increase in 8-OHdG could represent both a rise in oxidative stress and enhanced ROS-mediated signalling necessary for epithelial differentiation, morphogenesis, and immune maturation. This finding is consistent with previous studies, which have demonstrated that redox signalling plays a crucial role in orchestrating epithelial proliferation, differentiation, and apoptosis [3,4]. The observed correlations between SOD isoforms, 8-OHdG, and GA reinforce the concept of a dynamic yet balanced antioxidant network in the foetal compartment. Moreover, the negative correlation between 8-OHdG and SOD3—but not SOD1—may point to the unique extracellular role of SOD3 in mitigating oxidative DNA damage, potentially in the foetal gut mucosa directly exposed to swallowed AF. This may serve to protect against basal or environmentally induced oxidative stress, while allowing controlled ROS signalling necessary for developmental cues. However, in preterm neonates lacking this gradual transition, the premature loss of SOD3-rich AF may exacerbate redox vulnerability in the immature gut. From a translational perspective, our findings support the notion that gestational age-specific components of AF, including enzymatic antioxidants such as SOD1 and SOD3, should be considered in the development of targeted nutritional and pharmacological interventions for at-risk neonates.

Many aspects of how redox signalling influences foetal intestinal development remain poorly understood. In particular, it is unclear how fluctuations in ROS and the activity of antioxidant systems influence epithelial cell differentiation, proliferation, and maturation during the early neonatal period, especially in preterm infants. Clarifying this mechanism could help reduce morbidity and mortality in two vulnerable neonatal populations: preterm infants and those with congenital anomalies that prevent swallowing of amniotic fluid, such as congenital diaphragmatic hernia (CDH), oesophageal or intestinal atresia.

In preterm infants, the intestinal redox environment rapidly shifts from a hypoxic, reducing intrauterine state to a more oxidative postnatal state due to oxygen exposure,

microbial colonisation, and underdeveloped antioxidant defences—factors that collectively increase oxidative stress. Our comparative analyses show that SOD1 and SOD3 levels are significantly higher in HM than in AF, especially during early gestation. However, the biological impact of this abrupt redox transition, compounded by the shift from amniotic fluid to human milk or formula feeding, remains insufficiently studied. Another critical concern is the gastrointestinal development of foetuses with CDH or intestinal atresia, who experience a complete or near-complete lack of AF ingestion during gestation. These infants often present with severe gastrointestinal immaturity, resulting in delayed initiation of enteral feeding, extended reliance on parenteral nutrition, and a high incidence of complications such as intestinal ischemia, feeding intolerance, dysphagia, growth failure, and gastro-oesophageal reflux, with lasting effects on nutrition and quality of life [25]. In CDH, delayed enteral nutrition—independent of pulmonary pathology—has emerged as a major contributor to prolonged hospitalisation and reduced postnatal outcomes. Given the shared pathophysiology of AF deprivation, early postnatal enteral nutrition strategies should aim to mimic the trophic, protective, and maturational roles of swallowed AF. These insights also underscore the importance of investigating whether exogenous antioxidant enzyme supplementation—via fortified milk, parenteral solutions, or pharmacological agents—can replicate the protective effects of AF and enhance outcomes in neonatal care. To accelerate gastrointestinal maturation in these high-risk neonates, postnatal enteral nutrition with AF may serve as a physiologically tailored strategy to replicate the trophic and redox-regulatory roles of prenatal AF ingestion. Further preclinical and translational studies are needed to evaluate its feasibility and safety.

This study has several limitations. First, the sample size, although adequate for statistical analysis, limits the generalisability of the findings and warrants validation in larger cohorts. Second, we did not account for other antioxidants present in AF, such as catalase, which could provide a more comprehensive view of the antioxidant landscape. We did not analyse glutathione peroxidase in this study, as our previous work showed that glutathione peroxidase concentrations in AF were very low or below the limit of detection. Third, the lack of functional assays limits our ability to directly link enzyme concentrations to biological effects on intestinal development. Future studies should investigate the temporal expression and function of these enzymes in foetal intestinal tissue and assess whether exogenous supplementation of antioxidants in preterm feeding regimens can recapitulate intrauterine conditions and improve outcomes.

5. Conclusions

Our findings highlight the dynamic nature of the antioxidant environment in AF and its potential importance for foetal GIT development. The gestational decline in SOD1 and SOD3 levels, coupled with an increase in oxidative DNA damage, underscores the importance of a tightly regulated redox balance that may be crucial for proper intestinal maturation. The disruption of this balance by preterm birth or lack of AF intake during foetal life, followed by formula feeding, may have long-term consequences for intestinal integrity and function. These insights provide a foundation for future clinical studies aimed at enhancing neonatal feeding regimens, particularly for preterm infants and those with congenital gastrointestinal disorders. While mimicking the trophic and protective effects of swallowed AF is an attractive concept, the safety, feasibility, and efficacy of interventions such as AF-derived nutritional supplementation must be rigorously evaluated in preclinical models before clinical application.

Author Contributions: Conceptualisation, L.K. and S.B.; methodology, S.B.; validation, S.B., and A.M.; formal analysis, L.K., T.M. and S.B.; investigation, L.K. and E.A.A.; resources, S.B. and A.M.; data curation, L.K. and S.B.; writing—original draft preparation, L.K.; writing—review and editing,

S.B.; visualisation, S.B.; supervision, A.M.; project administration, S.B.; funding acquisition, L.K. and S.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Studienzentrum Bonn (SZB) of Universitätsklinikum of Bonn, grant number O-421.0001.

Institutional Review Board Statement: In accordance with the Declaration of Helsinki, the study was approved by the Ethics Committee of the University of Bonn on 23 November 2020 (Approval code: 503/20).

Informed Consent Statement: An informed consent form for participation was distributed to all participants and signed.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

AF	Amniotic fluid
CDH	Congenital diaphragmatic hernia
GA	Gestational age
GIT	Gastrointestinal tract
HM	Human milk
ISCs	Intestinal Stem Cells
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
NO	Nitric oxide
O ₂	Molecular oxygen
O ₂ [−]	Superoxide anions
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
SOD1	Intracellular Cu/Zn superoxide dismutase
SOD3	Extracellular Cu/Zn superoxide dismutase
8-OHdG	8-hydroxy-2-deoxyguanosine

References

1. Commare, C.E.; Tappenden, K.A. Development of the Infant Intestine: Implications for Nutrition Support. *Nutr. Clin. Pract.* **2017**, *22*, 159–173. [\[CrossRef\]](#)
2. Bagci, S.; Brosens, E.; Tibboel, D.; de Klein, A.; Ijsselstijn, H.; Wijers, C.H.W.; Roeleveld, N.; de Blaauw, I.; Broens, P.M.; van Rooij, I.A.L.M.; et al. More than fetal urine: Enteral uptake of amniotic fluid as a major predictor for fetal growth during late gestation. *Eur. J. Pediatr.* **2016**, *175*, 825–831. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Morris, O.; Jasper, H. Reactive Oxygen Species in intestinal stem cell metabolism, fate and function. *Free Radic. Biol. Med.* **2021**, *166*, 140–146. [\[CrossRef\]](#)
4. Nath, A.; Chakrabarti, P.; Sen, S.; Barui, A. Reactive Oxygen Species in Modulating Intestinal Stem Cell Dynamics and Function. *Stem Cell Rev. Rep.* **2022**, *18*, 2328–2350. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Circu, M.L.; Aw, T.Y. Intestinal redox biology and oxidative stress. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2012**, *23*, 729–737. [\[CrossRef\]](#)
6. Buchanan, K.L.; Bohórquez, D.V. You Are What You (First) Eat. *Front. Hum. Neurosci.* **2018**, *12*, 323. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Underwood, M.A.; Gilbert, W.M.; Sherman, M.P.; Underwood, M.A.; Gilbert, W.M.; Sherman, M.P. Amniotic Fluid: Not Just Fetal Urine Anymore. *J. Perinatol. Off. J. Calif. Perinat. Assoc.* **2005**, *25*, 341–348. [\[CrossRef\]](#)
8. Tong, X.L.; Wang, L.; Gao, T.B.; Qin, Y.G.; Qi, Y.Q.; Xu, Y.P. Potential Function of Amniotic Fluid in Fetal Development—Novel Insights by Comparing the Composition of Human Amniotic Fluid with Umbilical Cord and Maternal Serum at Mid and Late Gestation. *J. Chin. Med. Assoc.* **2009**, *72*, 368–373. [\[CrossRef\]](#)
9. Rosa, A.C.; Corsi, D.; Cavi, N.; Bruni, N.; Dosio, F. Superoxide Dismutase Administration: A Review of Proposed Human Uses. *Molecules* **2021**, *26*, 1844. [\[CrossRef\]](#)
10. Zelko, I.N.; Mariani, T.J.; Folz, R.J. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Economica* **2003**, *70*, 691–697. [\[CrossRef\]](#)

11. Bagci, S.; Katzer, D.; Altuntas, Ö.; Alsat, E.A.; Berg, C.; Rebeggiani, L.; Bartmann, P.; Müller, A. The fetal gastrointestinal tract is exposed to melatonin and superoxide dismutase rich amniotic fluid throughout prenatal development. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2022**, *71*, 64–68. [\[CrossRef\]](#)
12. Herway, C.; Kanninen, T.; Witkin, S.S.; Saade, G.; Fortunato, S.J.; Menon, R. Ethnic disparity in amniotic fluid levels of hyaluronan, histone H2B and superoxide dismutase in spontaneous preterm birth. *J. Perinat. Med.* **2013**, *41*, 277–282. [\[CrossRef\]](#)
13. Bogavac, M.; Lakic, N.; Simin, N.; Nikolic, A.; Sudji, J.; Bozin, B. Biomarkers of oxidative stress in amniotic fluid and complications in pregnancy. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **2012**, *25*, 104–108. [\[CrossRef\]](#)
14. Sah, S.K.; Agrahari, G.; Kim, T.-Y. Insights into superoxide dismutase 3 in regulating biological and functional properties of mesenchymal stem cells. *Cell Biosci.* **2020**, *10*, 22. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Tak, L.-J.; Kim, H.-Y.; Ham, W.-K.; Agrahari, G.; Seo, Y.; Yang, J.W.; An, E.-J.; Bang, C.H.; Lee, M.J.; Kim, H.-S.; et al. Superoxide Dismutase 3-Transduced Mesenchymal Stem Cells Preserve Epithelial Tight Junction Barrier in Murine Colitis and Attenuate Inflammatory Damage in Epithelial Organoids. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6431. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Ren, H.; Meng, Q.; Yepuri, N.; Du, X.; Sarpong, J.O.; Cooney, R.N. Protective effects of glutathione on oxidative injury induced by hydrogen peroxide in intestinal epithelial cells. *J. Surg. Res.* **2018**, *222*, 39–47. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Wang, Y.; Branicky, R.; Noë, A.; Hekimi, S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J. Cell Biol.* **2018**, *217*, 1915–1928. [\[CrossRef\]](#)
18. Graille, M.; Wild, P.; Sauvain, J.-J.; Hemmendinger, M.; Guseva Canu, I.; Hopf, N.B. Urinary 8-OHdG as a Biomarker for Oxidative Stress: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 3743. [\[CrossRef\]](#)
19. Lin, P.-Y.; Stern, A.; Peng, H.-H.; Chen, J.-H.; Yang, H.-C. Redox and Metabolic Regulation of Intestinal Barrier Function and Associated Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 14463. [\[CrossRef\]](#)
20. Nguyen, N.H.; Tran, G.-B.; Nguyen, C.T. Anti-oxidative effects of superoxide dismutase 3 on inflammatory diseases. *J. Mol. Med.* **2020**, *98*, 59–69. [\[CrossRef\]](#)
21. Aw, T.Y. Intestinal glutathione: Determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *204*, 320–328. [\[CrossRef\]](#)
22. Kovacs-Nolan, J.; Rupa, P.; Matsui, T.; Tanaka, M.; Konishi, T.; Sauchi, Y.; Sato, K.; Ono, S.; Mine, Y. In vitro and ex vivo uptake of glutathione (GSH) across the intestinal epithelium and fate of oral GSH after in vivo supplementation. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 9499–9506. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Mårtensson, J.; Jain, A.; Meister, A. Glutathione is required for intestinal function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1715–1719. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Lewandowski, Ł.; Kepinska, M.; Milnerowicz, H. Alterations in Concentration/Activity of Superoxide Dismutases in Context of Obesity and Selected Single Nucleotide Polymorphisms in Genes: SOD1, SOD2, SOD3. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5069. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Leyens, J.; Bo, B.; Heydweiller, A.; Schaible, T.; Boettcher, M.; Schroeder, L.; Mueller, A.; Kipfmueller, F. Parents-reported nutrition and feeding difficulties in infants with congenital diaphragmatic hernia after hospital discharge. *Early Hum. Dev.* **2024**, *195*, 106074. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.