

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

INES ČADEŽ

**MAGISTRSKA NALOGA**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA  
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

INES ČADEŽ

**VPLIV MATERINIH GENOTIPOV *TPMT* IN *MTHFR* NA  
OKSIDATIVNI STATUS MATERE IN OTROKA V DRUGEM  
TRIMESEČJU TER S TEM POVEZANE IZIDE  
NOSEČNOSTI**

**INFLUENCE OF MOTHER'S *TPMT* AND *MTHFR*  
GENOTYPES ON SECOND TRIMESTER MATERNAL AND  
FETAL OXIDATIVE STATUS AND PREGNANCY  
OUTCOMES**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA  
BIOMEDICINA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravila na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Nataše Karas Kuželički, mag.farm. in somentorstvom asist. dr. Alenke Šmid, mag. farm.

## ZAHVALA

Ob tej priložnosti bi se najprej zahvalila doc. dr. Nataši Karas Kuželički za vso pomoč, nasvete in napotke za statistično obdelavo, za teoretični del ter za vso prijaznost, spodbudo in pozitivno energijo. Zahvalila bi se tudi somentorici asist. dr. Alenki Šmid za vso pomoč in nasvete pri praktičnem delu. Hvala tudi prof. dr. Kseniji Geršak in dr. Barbari Rejc za rezultate matične raziskave ter za poslano gradivo.

Na koncu pa bi se rada iskreno zahvalila tudi staršema, ki sta mi omogočila študij in me tekom tega vedno podpirala in verjela vame. Hvala tudi fantu, prijateljem in sodelavcem za vso spodbudo in razumevanje.

## IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Nataše Karas Kuželički, mag.farm.

Ines Čadež

## KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
KAZALO SLIK.....	III
KAZALO PREGLEDNIC.....	IV
POVZETEK.....	V
ABSTRACT .....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VII
1 Uvod.....	1
1.1 Oksidativni stres.....	1
1.1.1 Oksidacija lipidov.....	1
1.1.2 Oksidacija proteinov.....	3
1.1.3 Oksidacije DNA .....	3
1.1.4 Nosečnost in oksidativni stres .....	4
1.2 Antioksidanti in antioksidativni encimi .....	5
1.2.1 Superoksid dismutaze .....	6
1.2.2 Glutation peroksidaze .....	7
1.3 TPMT.....	7
1.4 MTHFR.....	9
1.5 Vplivi oksidativnega stresa na izide nosečnosti.....	11
1.5.1 Predčasen porod.....	11
1.5.2 Ocena fiziološke zrelosti in telesnega stanja novorojenčka (Lestvica APGAR).....	11
1.5.3 Zapleti nosečnosti, vezani na posteljico .....	13
1.6 Genotipizacija s hibridizacijskimi TaqMan® sondami .....	14
1.6.1 Alelna diskriminacija.....	14
2 Namen dela.....	16
3 Materiali in metode .....	17
3.1 Preiskovanci .....	17
3.2 Uporabljeni reagenti in aparature.....	18
3.3 Izolacija DNA .....	19
3.3.1 Meritev koncentracij raztopin izolirane DNA .....	19
3.3.2 Redčenje izoliranih raztopin DNA .....	20

3.4	Genotipizacija raztopin DNA in alelna diskriminacija .....	20
3.5	Statistična analiza.....	22
4	Rezultati in razprava.....	24
4.1	Alelna diskriminacija .....	24
4.2	Testiranje normalnosti porazdelitve podatkov .....	26
4.3	Vplivi genotipa TPMT na kazalce oksidativnega stresa pri materi in otroku.....	27
4.3.1	Normalno porazdeljene spremenljivke .....	27
4.3.2	Nenormalno porazdeljene spremenljivke .....	28
4.4	Vplivi genotipa MTHFR na kazalce oksidativnega stresa pri materi in otroku ...	29
4.4.1	Normalno porazdeljene spremenljivke .....	29
4.4.2	Nenormalno porazdeljene spremenljivke .....	30
4.5	Vplivi kombinacij genotipov TPMT in MTHFR na kazalce oksidativnega stresa pri materi in otroku .....	31
4.5.1	Normalno porazdeljene spremenljivke .....	31
4.5.2	Nenormalno porazdeljene spremenljivke .....	36
4.6	Vplivi genotipa TPMT na izide nosečnosti .....	38
4.6.1	Nenormalno porazdeljene in kategorične spremenljivke .....	38
4.7	Vplivi genotipa MTHFR na izide nosečnosti .....	40
4.7.1	Nenormalno porazdeljene in kategorične spremenljivke .....	40
4.8	Vplivi kombinacij genotipov TPMT in MTHFR na izide nosečnosti .....	41
4.8.1	APGAR 1 .....	42
4.8.2	Posteljica.....	44
4.8.3	Gestacijska starost .....	44
5	Sklepi.....	47
6	Literatura in viri .....	48
7	Priloge .....	54

## KAZALO SLIK

Slika 1: ROS in RNS ter pripadajoči antioksidativni encimi .....	5
Slika 2: Povezava med metabolizmom folatov in metioniskim ciklom preko SAM .....	9
Slika 3: APGAR lestvica .....	12
Slika 4: Princip delovanja hibridizirajočih sond.....	14
Slika 5: Alelna diskriminacija .....	15
Slika 6: Prikaz rezultatov genotipizacij v končni točki za <i>MTHFR</i> 677 .....	24
Slika 7: Aktivnost SOD in GPX v eritrocitih v odvisnosti od <i>TPMT</i> genotipa (t-test).....	28
Slika 8: Srednja vrednost in interval zaupanja aktivnosti SOD v eritrocitih v odvisnosti od kombinacij <i>TPMT</i> in <i>MTHFR</i> genotipov.....	33
Slika 9: Srednja vrednost in interval zaupanja koncentracije PRL v urinu v odvisnosti od kombinacije <i>TPMT</i> in <i>MTHFR</i> genotipov.....	34
Slika 10: Srednja vrednost in interval zaupanja koncentracije DIY v urinu mater v odvisnosti od kombinacije genotipov <i>TPMT</i> in <i>MTHFR</i> . .....	35
Slika 11: Vpliv <i>TPMT</i> genotipov na vrsto posteljice. ....	39
Slika 12: Porazdelitev <i>TPMT</i> in <i>MTHFR</i> genotipov v dveh klinično relevantnih APGAR 1 kategorijah. ....	43
Slika 13: Graf odvisnosti gestacijske starosti od <i>MTHFR</i> genotipa. ....	45

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Uporabljeni kiti za genotipizacijo (Applied biosystems) .....	19
Preglednica II: Reakcijska mešanica za reakcijo qPCR za <i>MTHFR</i> 677 C>T in 1298 A>C .....	20
Preglednica III: Reakcijska mešanica za reakcijo qPCR za <i>TPMT</i> *2, *3B in *3C.....	21
Preglednica IV: Program izvedbe PCR s TaqMan® sondami .....	21
Preglednica V: Prikaz števila in frekvence izmerjenih genotipov <i>MTHFR</i> in <i>TPMT</i> pri 147 nosečnicah .....	25
Preglednica VI: Vpliv <i>TPMT</i> genotipa na kazalce oksidativnega stresa z normalno porazdelitvijo .....	27
Preglednica VII: Vpliv <i>TPMT</i> genotipa na kazalce oksidativnega stresa z nenormalno porazdelitvijo .....	28
Preglednica VIII: Vpliv <i>MTHFR</i> genotipa na kazalce oksidativnega stresa z normalno porazdelitvijo .....	29
Preglednica IX: Vpliv <i>MTHFR</i> genotipa na kazalce oksidativnega stresa z nenormalno porazdelitvijo .....	30
Preglednica X: Vpliv kombinacij <i>TPMT</i> in <i>MTHFR</i> genotipov na kazalce oksidativnega stresa z normalno porazdelitvijo.....	31
Preglednica XI: <i>Post hoc</i> test za vpliv kombinacij genotipov <i>TPMT</i> in <i>MTHFR</i> na aktivnost SOD v eritrocitih.....	32
Preglednica XII: Vpliv kombinacij genotipov <i>TPMT</i> in <i>MTHFR</i> na kazalce oksidativnega stresa z nenormalno porazdelitvijo .....	36
Preglednica XIII: Vpliv genotipov <i>TPMT</i> na kazalce povezane z izidi nosečnosti. ....	38
Preglednica XIV: Vpliv genotipov <i>MTHFR</i> na parametre povezane z izidi nosečnosti. ....	40
Preglednica XV: Vpliv kombinacije genotipov <i>TPMT</i> in <i>MTHFR</i> na parametre, ki nakazujejo izide nosečnosti .....	41

## POVZETEK

Nosečnost lahko opišemo kot spremenjeno fiziološko stanje pri katerem se v drugem trimesečju vzpostavi uteroplacentorni krvni obtok in koncentracija kisika pri plodu se hitro poveša. Omenjena fiziološka sprememba vodi tudi v povišanje verjetnosti za tvorbo reaktivnih kisikovih spojin (ROS) in z njimi povezanih nenadzorovanih oksidacij lipidov, proteinov, nukleinskih kislin in drugih celičnih sestavin pri materi in otroku.

Tiopurin S-metiltransferaza (TPMT) je glavni encim deaktivacije tiopurinskih zdravil, vendar je njegova endogena funkcija v telesu še neznana. Predvidevajo, da bi bil lahko povezan z odzivom na oksidativni stres. Poleg polimorfizmov v genu za tiopurin S-metil transferazo (TPMT) na aktivnost encima vpliva tudi količina S-adenozil-metionina (SAM) v celicah, le-ta pa je odvisna predvsem od aktivnosti encima 5,10-metilen-tetrahidrofolat reduktaze (MTHFR).

Namen našega dela v okviru magistrske naloge je bil preveriti vpliv polimorfizmov TPMT\*2 (rs1800462), \*3B (rs1800460), \*3C (rs1142345) in polimorfizmov MTHFR 677 (rs1801133) in MTHFR 1298 (rs1801131) na kazalce oksidativnega stresa v plodovnici, krvi in urinu mater v drugem trimesečju nosečnosti ter preveriti vpliv genotipov TPMT in MTHFR na kazalce, ki nakazujejo izide nosečnosti. S tem namenom smo iz hemolizatov 147 nosečnic izolirali DNA in s specifičnimi TaqMan® sondami določili genotipe. S standardnimi statističnimi metodami smo ovrednotili povezave med genotipi TPMT in/ali MTHFR ter kazalci oksidativnega stresa oziroma med genotipi in kazalci, ki nakazujejo izide nosečnosti.

V pilotski študiji smo ugotovili, da imajo najvišjo aktivnost superoksid dismutaz (SOD) v eritrocitih matere z mutiranimi TPMT genotipi in matere s kombinacijo genotipov z najnižjimi aktivnostmi TPMT in MTHFR (TPMT \*1/\*3 in MTHFR < 60 %). Najvišjo koncentracijo propanoil-lizina (PRL) in ditirozina (DIY) v urinu mater smo zaznali pri kombinaciji genotipov TPMT \*1/\*3 in MTHFR > 60 %. Pri izidih nosečnosti smo ugotovili povezavo med maternalnimi genotipi MTHFR, ki znižajo aktivnost encima, in nižjimi APGAR 1 ocenami otroka. Ugotovili smo tudi, da otroci mater z MTHFR aleli divjega tipa dosegajo višjo gestacijsko starost kot tisti, katerih matere imajo vsaj en mutiran alel.

Ključne besede: genotip TPMT, genotip MTHFR, oksidativni stres, izidi nosečnosti



## ABSTRACT

Pregnancy can be described as a modified physiological state where in the second trimester there is a change of fetal blood flow to uteroplacental bloodstream. This physiologic modification results in increased oxygen concentration in fetal blood thus leading to increased formation of reactive oxygen species which could lead to incontrollable oxidation of lipids, proteins, nucleic acids and other cell components in maternal and fetal cells.

Thiopurine methyltransferase (TPMT) is the most important enzyme for deactivation of thiopurine drugs, but its endogenic function in human body is still unknown. Researchers predict that TPMT is linked to oxidative stress response. Activity of TPMT is influenced by polymorphisms in TPMT gene and also by S-adenosyl methionine (SAM) concentrations in cells. Moreover, concentration of SAM depends on 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) activity.

Purpose of our experiments was to examine influence of TPMT polymorphisms (TPMT\*2 - rs1800462, \*3B - rs1800460), \*3C - rs1142345) and MTHFR polymorphisms (MTHFR 677 - rs1801133, MTHFR 1298 - rs1801131) on oxidative stress markers in amnion fluid, blood and urine of mothers in the second trimester of pregnancy and also to examine influence of TPMT and MTHFR polymorphisms on different pregnancy outcomes. DNA was extracted from venous blood hemolysates of 147 pregnant women in second trimester and genotyped for the TPMT and MTHFR variants using TaqMan® probes.

Our pilot study indicates that mothers with mutated TPMT genotypes and mothers with combinations of the lowest TPMT and MTHFR activity (TPMT \*1/\*3 and MTHFR < 60 %) have the highest superoxide dismutase (SOD) activities in red blood cells. We found the highest concentrations of propanoyl-lysine (PRL) and dityrosine (DIY) in urine of mothers which have combinations of genotypes TPMT \*1/\*3 and MTHFR > 60 %. Referring to pregnancy outcomes we discovered correlation between low activity MTHFR alleles in mother and lower APGAR 1 score of newborns. We also found that children of mothers with wild type MTHFR alleles reach highest gestational age compared to children of mothers with at least one mutated MTHFR allele.

Key words: TPMT genotype, MTHFR genotype, oxidative stress, pregnancy outcome

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>ROS</b>	reaktivne kisikove spojine
<b>RNS</b>	reaktivne dušikove spojine
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>PRL</b>	propanoil-lizin
<b>8-OHdG</b>	8-hidroksi-2-deoksigvanozin
<b>HEL</b>	heksanollizin
<b>NY</b>	3-nitrotirozin
<b>DIY</b>	ditirozin
<b>8-IP</b>	8-izoprostan
<b>GPx</b>	glutation peroksidaza
<b>SOD</b>	superoksid dismutaze
<b>TPMT</b>	tiopurin S-metiltransferaza
<b>SAM</b>	S-adenozilmetionin
<b>MTHFR</b>	5, 10-metilentetrahidrofolat-reduktaza
<b>TAC</b>	totalna antioksidativna kapaciteta
<b>μl</b>	mikroliter
<b>ml</b>	mililiter
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo
<b>ITM</b>	indeks telesne mase
<b>wt</b>	wild type =divji tip alela
<b>het</b>	heterozigotni tip alela
<b>hom</b>	homozigotni tip alela
<b>VIC barvilo</b>	fluorescentno barvilo
<b>FAM barvilo</b>	fluorescentno barvilo 6-carboxyfluorescein

# 1 Uvod

## 1.1 Oksidativni stres

Oksidacijske in redukcijske reakcije v biološkem sistemu predstavljajo osnovo za številne biokemijske mehanizme. V organizmu lahko pride do neuravnotežene proizvodnje reaktivnih kisikovih spojin (ROS), zaradi spremenjene zmožnosti biološkega sistema za njihovo odstranjevanje in zaradi povečanega nastajanja ROS (1). Vse našteje dejavnike skupaj poimenujemo oksidativni stres. Mehanizem oksidativnega stresa je v osnovi enak po vsem telesu, na posledice stresa pa vplivajo številnimi notranji (posameznikov genom, kronična vnetja, dvig ROS ali RNS v telesu ...) in zunanji dejavniki (ionizirajoče sevanje, sončna svetloba, fizične obremenitve, kajenje, idr.) (2).

Škodljiv oksidativni stres je sestavljen iz nenadzorovanih oksidacij lipidov, proteinov, deoksiribonukleinske kisline (DNA) v jedru, DNA v mitohondriju in oksidacij drugih celičnih sestavin.

### 1.1.1 Oksidacija lipidov

Lipidna peroksidacija je kompleksen večstopenjski proces oksidacije nenasičenih lipidov v bioloških membranah. Sprožajo jo vsi radikali, ki so dovolj močni, da lahko fosfolipidni molekuli odvzamejo vodikov atom. Zaradi oksidacije nastanejo manjši in bolj vodotopni produkti, ki lahko difundirajo v notranjost celice in reagirajo z nukleofilnimi skupinami proteinov, z nukleofilnimi deli purinov in pirimidinov v DNA (2). ROS povzročijo poškodbe celičnih sestavin in pri tem nastanejo najrazličnejši produkti, ki jih lahko uporabljamo kot posreden dokaz lipidne oksidacije v telesu in s tem dokaz oksidativnega stresa v telesu (3, 4).

#### 1.1.1.1 Produkti oksidacije lipidov

Produkti zgodnje faze nenadzorovane radikalske oksidacije fosfolipidov so tudi hidroperoksidi in njim pripadajoči aldehidi. Hidroperoksidi in aldehidi so visoko reaktivne molekule, ki lahko interagirajo z najrazličnejšimi proteini, nukleinskimi kislinami ali aminofosfolipidi. Aldehidi, kot so malondialdehid (MDA) in 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) se uporabljajo kot kazalniki lipidne peroksidacije. Njihova slabost je, da nastajajo v kasnejših stopnjah lipidne peroksidacije in z njimi odkrivamo že napredovane z lipidi

povzročene poškodbe. Iz tega razloga se MDA in 4-HNE nadomeščajo z novejšimi, zgodnejšimi kazalci lipidnih poškodb. Med nedavno odkrite in stabilne molekule uvrščamo propanoil-lizin (PRL) in heksanol-lizin (HEL). PRL in HEL sta proteinski molekuli, ki nastajata v zgodnji fazi lipidne peroksidacije (3, 4). PRL in HEL merimo v urinu in z njim lahko ovrednotimo količino oksidativnih poškodb lipidov.

Produkt oksidativnega stresa je tudi 8-izoprostan (8-IP), ki je stabilen in zanesljiv kazalec lipidne peroksidacije v človeškem telesu. Normalno je v nizkih koncentracijah prisoten v vseh tkivih, ob povečevanju oksidativnega stresa pa močno naraste. 8-IP je prostaglandinu podobna molekula, ki nastane z neencimsko peroksidacijo arahidonske kisline v fosfolipidih. Količina 8-IP je povišana pri najrazličnejših boleznih, vključno s sistemskim lupusom eritematozusom, fibrozo jeter, rakom, sladkorno boleznijo tipa 2 in aterosklerozo. Prav tako na povišanje vplivajo tudi kajenje, alkohol, zdravila, šport in drugo. 8-IP lahko merimo v različnih bioloških tekočinah, vendar se ga največkrat meri v urinu, ker je metoda neinvazivna in zbiranje dokaj enostavno (5). Pri nosečnicah so predhodno že opisali značilno povezavo med zapletom nosečnosti (abrupcijo membran) in povečano koncentracijo 8-IP v urinu matere (6). Prav tako študije omenjajo nihanje koncentracije 8-IP v urinu pri prezgodnjem porodu (7).

### **1.1.2 Oksidacija proteinov**

Oksidativne poškodbe proteinov običajno spremljajo različne koncentracije proteinskih molekul in njihova spremenjena aktivnost. Aromatske aminokisliline, predvsem tirozin, so močno podvržene oksidaciji in jih uporabljamo kot kazalce oksidativne poškodbe proteinov. Z reakcijo med superoksidnim anionom in dušikovim oksidom nastane peroksinitrit, ki nitrira tirozin do 3-nitrotirozina (NY). Z medmolekulskim premreženjem dveh tirozin-vsebujočih proteinov nastane stabilna komponenta dinitrotirozin (DIY). Kisla hidroliza ga ne razgradi, zato spada med obetajoče, s peroksinitritom povzročene kazalce *in vivo* proteinske oksidacije. Izloča se v urin, njegove povišane koncentracije izmerimo pri pacientih s sladkorno boleznijo, z različnimi nevrodegenerativnimi boleznimi (Parkinsonovo, Alzheimerjevo boleznijo, demenco), pri vnetnih boleznih in pri ostalih stanjih povečanega oksidativnega stresa v telesu (3).

### **1.1.3 Oksidacije DNA**

Nenadzorovane oksidacije lahko pretrgajo verigo DNA, spremenijo zaporedje nukleinskih baz ali jih poškodujejo. Ta proces lahko v nadaljevanju vodi do zamenjave posameznih nukleinskih baz in spreminjanja genske informacije. V celici se nahajajo številni mehanizmi, ki določene manjše spremembe odpravijo. Kljub vsemu pa določen delež sprememb ostane in se kopiči tekom življenja (2).

8-hidroksi-2-deoksigvanozin (8-OHdG) je eden najbolj uporabljenih kazalcev oksidativne poškodbe jedrne in mitohondrijske DNA, ki nastane z oksidacijo deoksigvanozina z najrazličnejšimi radikali (3, 8). Biološki kazalec 8-OHdG ima širšo uporabnost, saj je uporaben kot kazalec oksidativnih poškodb tkiv, fiziološkega staranja, nevrodegenerativnih obolenj ter začetka in napredovanja rakastih obolenj. Uporaben pa je tudi kot kazalec z eksogenimi snovmi povzročenih poškodb, kot so poškodbe s tobačnim dimom, azbestnimi vlakni in težkimi kovinami. Izloča se v urin, kjer ga tudi najlažje določamo (8).

#### **1.1.4 Nosečnost in oksidativni stres**

Nosečnost lahko opišemo kot spremenjeno fiziološko stanje, pri katerem se spremeni metabolizem v različnih organih. V prvih tednih nosečnosti poteka zgodnji razvoj organov. Zarodek je v tem obdobju najbolj občutljiv na koncentracije kisika v okolici, zato omenjena zgodnja faza poteka v hipoksičnem okolju in na ta način zavaruje zarodek pred s kisikom povzročenimi radikali in njihovimi poškodbami dednine (9). Po prvem trimesečju nosečnosti se vzpostavi uteroplacentarni krvni obtok in koncentracija kisika v posteljici se hitro poviša. Omenjeno stanje vodi v povišano verjetnost za tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti in z njimi povezanih poškodb tkiv (10, 11). Odziv posteljice na povišano koncentracijo kisika je večje izražanje genov za antioksidativne encime (superoksid dismutazo, katalazo, glutation peroksidazo).

Oksidativni stres v nosečnosti je kompleksen proces, ki večinoma izvira iz posteljice, iz materinih in/ali zarodkovih celic ali pa je posledica drugih dejavnikov (12). Tekom normalne nosečnosti pride do postopnega, a blagega višanja kazalcev oksidativnega stresa in nižanja antioksidativnih molekul v serumu. V prvih tednih je koncentracija ROS nizka. Od 10. do 12. tedna naprej pa koncentracija zaradi zarodkovega prehoda na aerobni metabolizem narašča (13). Poleg fiziološke tvorbe ROS in genetskih dejavnikov na višanje oksidativnega stresa v telesu nosečnice vplivajo tudi zunanji dejavniki (prehrana matere, kajenje, alkohol, izpostavljenost onesnaženemu zraku in drugi). V primeru neravnovesja med nastankom ROS in antioksidativno obrambo nosečnice lahko neravnovesje privede do številnih patofizioloških motenj. Številne študije dokazujejo, da so višje koncentracije oksidativnih kazalcev povezane z različnimi zapleti in kroničnimi boleznimi, ki povzročajo tveganje za zdravje matere in zarodka ter vplivajo na razvoj ploda. Med najpogosteje omenjene zaplete zaradi oksidativnega stresa v nosečnosti uvrščamo splav, gestacijski diabetes, preeklampsijo, intrauterini zastoj v rasti ploda, prezgodnji porod, inzulinsko rezistenco pri novorojenčku in nizko porodno težo (3, 9, 14-16).

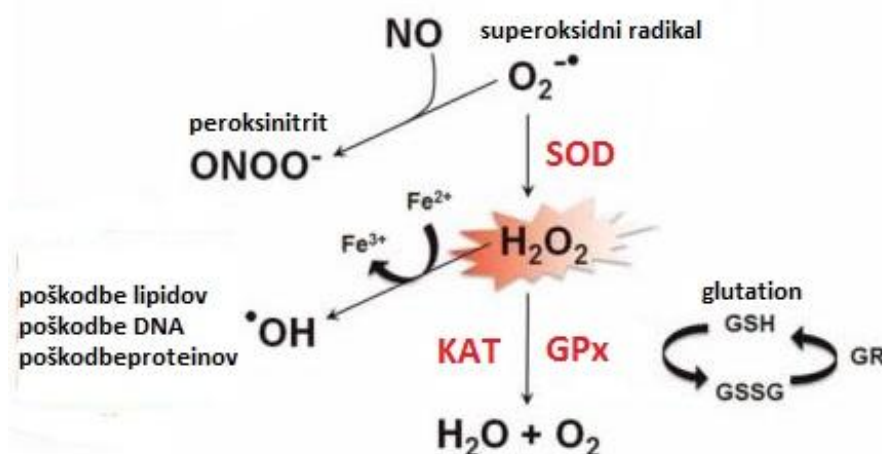
Med nosečnostjo se v materinem telesu zgodijo številne prilagoditve in spremembe. Materine žile se spremenijo tako, da omogočijo kar najboljši prehod kisika in hranil do zarodka. Povišajo se krvni tlak, endotelijski vazodilatatorji, koncentracija NO idr. (13). Ker pa oksidativni stres vpliva tudi na žilno funkcijo, lahko v številnih študijah najdemo povezavo med materino žilno funkcijo ter rastjo in razvojem zarodka (17). Znani so številni primeri novorojenčkov z znižano telesno težo, v kolikor je bila prisotna disfunkcija

žil pri materi. Spremeni se tudi presnova lipidov. V zgodnji stopnji nosečnosti so bolj izraženi anabolni procesi kot je kopičenje maščob, ki služijo kot rezerva za hitro rast zarodka. Zato je normalna nosečnost že sama po sebi povezana z nastajanjem več oksidirajočih lipidnih delcev in povišanim oksidacijskim stresom (18).

Dodatno pa lahko tudi OS povzročajo različni zunanji dejavniki, ki so prisotni v nosečnosti. Eden pogostejših je tobačni dim, ki vsebuje številne oksidirajoče spojine, ki so sposobne proizvajati ROS. Te zvrsti pa v verižni reakciji naprej okvarjajo še druge organe in tkiva. Kajenje je povezano s povečanim tveganjem perinatalne umrljivosti, kongenitalnimi nepravilnostmi, prezgodnjim rojstvom in nizko porodno težo (19).

## 1.2 Antioksidanti in antioksidativni encimi

Antioksidant lahko neposredno prekine radikalsko reakcijo ali se vključi v procese, ki vplivajo na tvorbo ROS. Tekom evolucije so se v človeškem telesu razvili številni ne-encimski in encimski sistemi, ki nas ščitijo pred škodljivimi reakcijami radikalov. Ti encimi lahko obnavljajo antioksidante ali pa pretvarjajo reaktivne spojine v manj reaktivne (2, 20). Encimski sistemi vključujejo številne produkte genov, kot so superoksid dismutaze, katalaze, askorbat peroksidaze in glutation peroksidaze (Slika 1).



**Slika 1: ROS in RNS ter pripadajoči antioksidativni encimi, prirejeno po (21).** NO = dušikov oksid, SOD = superoksid dismutaza,  $H_2O_2$  = vodikov peroksid,  $Fe^{2+}$  = železo $^{2+}$ ,  $\cdot OH$  = hidroksilni radikal, KAT = katalaza, GPx = glutation peroksidaza, GSH = glutation, GSSG = glutation disulfid, GR = glutation reduktaza.

Antioksidativni encimi so zapisani v genetskem materialu posameznika in njihova koncentracija se lahko prilagaja potrebam. Zaradi svoje velikosti ne morejo prehajati med celicami, zato se običajno nahajajo ter delujejo samo na določenih mestih v celici (2).

### 1.2.1 Superoksid dismutaze

Encimi iz družine superoksid dismutaz (SOD) EC 1.15.1.1 spadajo med najpomembnejše antioksidativne encime v človeškem telesu in odstranjujejo prvi radikal v skupini reaktivnih kisikovih spojin. SOD katalizirajo disproporcionacijo superoksidnega radikala do kisika in vodikovega peroksida. Hitrost reakcije je zelo visoka in encimi SOD že v trenutku nastanka superoksidnega radikala le-tega pretvorijo do vodikovega peroksida.

Med predstavniki SOD so razlike v vsebnosti prehodne kovine v aktivnem centru encima. V aktivnem mestu so lahko ioni bakra, mangana, železa ali niklja. Ioni lahko reverzibilno oddajo ali sprejmejo elektron in so posredniki prenosa elektrona med molekulami superoksidnega radikala. SOD se nahajajo skoraj v vseh celicah, največja količina encima pa je prisotna v lizosomih, jedru in prostoru med mitohondrijskima membranama (22).

Pri ljudeh so prisotne tri oblike SOD. SOD1 je dimer, ki v aktivnem mestu vsebuje baker in cink ter se nahaja v citoplazmi celic. SOD2 je mitohondrijska oblika tetramernega encima, ki ima v aktivnem mestu mangan. SOD3 ali zunajcelična SOD je prav tako tetramerna oblika, ki pa v aktivnem mestu encima vsebuje baker in cink (2). SOD3 ima večjo relativno molekulsko maso ter v vsaki tetramerni podenoti vsebuje po en atom bakra in cinka. Obstajajo številne izooblike zunajceličnega encima superoksid dismutaze. Ugotavljajo, da se SOD3 *in vivo* nahaja pripeta na celično površino, posebno na ogljikove hidrate v pljučih, ledvicah, maternici in krvnih žilah (23).

Fiziološki pomen SOD dokazujejo resna obolenja v primeru živali z izbitimi geni. Študije na miših kažejo, da pride zaradi izbitja gena za SOD2 do resnih poškodb funkcije mitohondrijev, živčevja in mišic. Homozigotne miši z izbitim genom za *SOD2* poginejo že kmalu po skotitvi (24, 25). Dokazano je tudi, da je znižano izražanje SOD1 povezano s povišanim oksidativnim stresom (26). Pri miših, ki nimajo SOD1, se razvije širok spekter patoloških pojavov, vključno s karcinomom jetrnih celic, pospešeno s starostjo povezano izgubo mišične mase, z zgodnejšo pojavnostjo sive mreže in skrajšano življenjsko dobo. Miši, ki nimajo SOD3, pa ne kažejo nobenih očitnih pomanjkljivosti in imajo normalno življenjsko dobo. Kljub temu pa so bolj občutljive na poškodbe zaradi povišane koncentracije kisika (2, 22).



## 1.2.2 Glutation peroksidaze

Z imenom glutacion peroksidaze (GPx) v splošnem poimenujemo številne izoencime (EC 1.11.1.9 in EC 1.11.1.12), ki katalizirajo redukcijo vodikovega peroksida in organskih peroksidov do vode in ustreznih alkoholov. Kot donor elektronov pa GPx uporabljajo glutacion (GSH).

V sesalčjih celicah se nahajajo štiri glavni izoencimi od selena odvisne glutacion peroksidaze. Klasično GPx (GPx1) najdemo v citoplazmi številnih tkiv, v eritrocitih, jetrih, pljučih, ledvicah idr. Njena najpomembnejša lastnost je, da prednostno odstranjuje vodikov peroksid. Med pomembnejše spadajo še gastrointestinalna GPx (GPx2), plazemska GPx (GPx3), ki je prisotna v različnih organih kot so ledvica, pljuča, posteljica, srce, mišice idr. ter fosfolipidna GPx (GPx4), ki je prav tako razporejena po vseh tkivih. GPx1, 2, in 3 so homotetrameri, ki imajo na vsaki podenoti v aktivnem mestu vezan selen. GPx4 pa ima monomerno obliko, ki prav tako vsebuje selen v aktivnem mestu. GPx1, 2 in 3 vsebujejo selenocistein, medtem ko GPx4 vsebuje cistein (27).

Podobno kot pri SOD je tudi spremenjena aktivnost GPx povezana s številnimi stanji povišanega oksidativnega stresa. Pri nosečnicah s sladkorno boleznijo je bila določena povišana aktivnost GPx v eritrocitih v primerjavi z nosečnicami brez sladkorne bolezni (28). Nasprotno pa so pri preeklampsiji zabeležili značilno znižanje koncentracije GPx, ki bi lahko bile posledica spremenjene oksigenacije placente in nižje koncentracije selena (29).

## 1.3 TPMT

Tiopurin S-metiltransferaza (TPMT) je citoplazemski encim, ki katalizira metilacijo tiopurinskih učinkovin, vendar njegova endogena funkcija v telesu še ni poznana. Predvidevajo, da bi lahko bil povezan z odzivom na oksidativni stres (30). Poleg polimorfizmov v genu za *TPMT* na aktivnost encima vpliva tudi količina S-adenozil-metionina (SAM) v celicah (31), le-ta pa je odvisna predvsem od aktivnosti 5,10-metilen-tetrahidrofolat reduktaze (MTHFR).

Humani *TPMT* gen je dolg približno 34 kb parov, vsebuje 10 eksonov in se nahaja na kratki ročici 6. kromosoma (6p22) (32). Študije so pokazale, da je porazdelitev TPMT aktivnosti pri zdravih kavkazijcih trimodalna, 90 % populacije ima normalno ali povišano

aktivnost TPMT, 10 % populacije ima srednjo aktivnost in 0,3 % ima znižano ali nezaznavno aktivnost TPMT (33).

Znižana aktivnost je posledica mutacij *TPMT* gena ter posledično nastanka enega ali dveh nefunkcionalnih alelov. Identificiranih je bilo osemindvajset različnih variant alelov, večina je povezanih z zmanjšanjem aktivnosti in vitro (34). S *TPMT\*1* označimo normalen alel (divji tip), z oznakami *TPMT\*2–\*28* pa variantne (mutirane) alele.

Alelske različice *TPMT\*2*, *\*3A*, *\*3B* in *\*3C* so odgovorne za odsotno ali znižano aktivnost encima TPMT pri 95 % kavkazijcev. Omenjene različice so hkrati tudi najbolj klinično pomembne, saj tvorijo drugačnosmiselne mutacije (35).

*TPMT\*2* je alelska različica kjer pride do enonukleotidne spremembe 238 G>C, pri tem se spremeni bralni okvir in alanin se zamenja s prolinom na mestu 80 (Ala80Pro). Posledica tega alela je nizka koncentracija TPMT proteina in nizka katalitična aktivnost (36).

*TPMT\*3C* nastane zaradi drugačnosmiselne mutacije na mestu 240, kjer pride do zamenjave tirozina s citozinom. Enonukleotidno spremembo, ki vodi v ta proces označimo z 719 A>C. *TPMT\*3C* je najpogostejši alel pri azijski in afriški populaciji. Povezan je z znižano encimsko aktivnostjo in znižano koncentracijo encima, zaradi pospešene razgradnje v sesalskih celicah (36).

*TPMT\*3B* je redko zastopan alel, vsebuje enonukleotidno spremembo 460 G>A, kar vodi do spremenjene aminokislinske sekvence na kodonu 154 (Ala154Thr). Običajno je v vezavnem ravnovesju z *\*3C* SNP-jem, kar rezultira v skupnem alelu *\*3A* (36, 37).

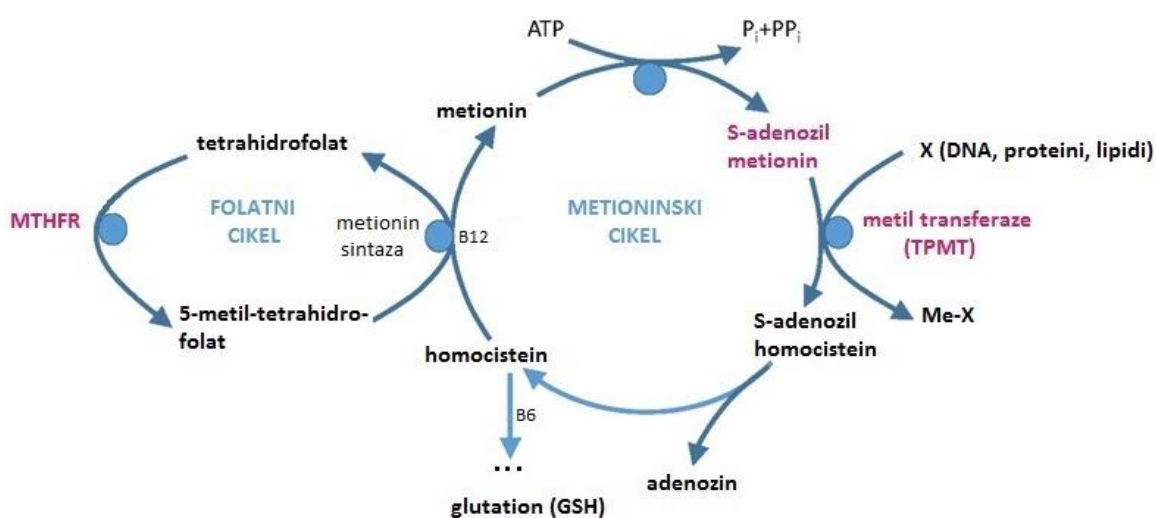
Alelska različica *\*3A* je posledica dveh drugačnosmiselnih mutacij (460G>A in 719A>G), prva se nahaja v 7. in druga v 10. eksonu (38). *TPMT\*3A* haplotip (*\*3B* in *\*3C*) je najbolj pogosta različica pri kavkazijcih, medtem ko je *\*3C* (719A>G) bolj pogosta pri azijskih in afričanih (33). Posledica haplotipa *TPMT\*3A* je signifikantno znižanje aktivnosti encima (39).

Vse omenjene mutacije destabilizirajo nativno strukturo TPMT encima, povzročijo nepravilno zvitje izooblik, kar vodi v hitrejšo intracelularno razgradnjo (39, 40).

## 1.4 MTHFR

Folate uvrščamo v skupino koencimov, ki imajo bistveno vlogo pri sintezi purinov, pirimidinov in proteinov, sodelujejo tudi pri metilacijskih reakcijah nukleinskih kislin, proteinov in lipidov. Pomanjkanje folatov poslabša funkcijo različnih metabolnih poti homocisteina, kar vodi v njegovo kopičenje in s tem povezanim pojavom oksidativnega stresa in spremenjenih metilacijskih reakcij. Ti spremenjeni procesi v celicah so vpleteni v najrazličnejše bolezni (41).

5,10-metilentetrahidrofolat-reduktaza (MTHFR, EC 1.5.1.20) je glavni regulatorni encim, ki je vključen v folatni metabolizem. Metionin je prekursor univerzalnega metilnega donorja S-adenzilmetionina (SAM) in nastane v nepovratnem prenosu metilne skupine s 5-metiltetrahidrofolata na homocistein (Slika 2). 5-metiltetrahidrofolat je glavna cirkulirajoča oblika folata v telesu. Reakcijo prenosa metilne skupine regulirata dva encima, metionin sintaza (MTR) in metionin sintazna reduktaza (MTRR) (41, 42).



**Slika 2: Povezava med metabolizmom folatov in metioninskim ciklom preko SAM, prirejeno po (43).** MTHFR= 5,10-metilentetrahidrofolat-reduktaza, ATP = adenin trifosfat,  $P_i$  = monofosfat,  $P_{ii}$  = difosfat, B12= kobalamin (vitamin B12), B6 = piridoksin (vitamin B6), Me-X = metilirani produkt (DNA, protein, lipid).

MTHFR katalizira reakcije folatnega cikla, ki so ozko grlo pri sintezi metionina in SAM. SAM stabilizira proteinsko molekulo encima TPMT in posledično poveča hitrost encimske reakcije. Poleg tega pa je SAM tudi donor metilne skupine v reakcijah, ki jih katalizira TPMT. Zato je celokupna izmerjena učinkovitost TPMT posredno odvisna od MTHFR (33). Arenas in sodelavci so dokazali signifikantno povezavo med homozigotnim

genotipom *MTHFR* 677 TT in TPMT v eritrocitih pri ljudeh z divjim tipom alelov TPMT (44).

*MTHFR* gen se nahaja na 1. kromosomu (1p36.3), je 2.2 kb parov dolg in sestavljen iz enajstih eksonov (45). Gen za *MTHFR* je močno polimorfen, znanih je preko 40 točkovnih mutacij. Dva najpogostejša polimorfizma, ki povzročita nižjo aktivnost encima MTHFR, sta 677C>T in 1298A>C. Približno 10 % kavkazijske populacije je homozigotne za pogosto zamenjavo C>T na 677. mestu *MTHFR* gena. Ta mutacija pripelje do zamenjave alanina z valinom in znižane aktivnosti encima (46). Homozigoti za polimorfizem 677C>T imajo približno 30 % aktivnost encima MTHFR v primerjavi z divjim genotipom, heterozigoti pa približno 65 % aktivnost. Znižana encimska aktivnost lahko predstavlja težavo ob nizkem vnosu folatov. Zaradi znižane aktivnosti MTHFR se kopiči 5,10-metilen-tetrahidrofolat, ki se bolj porablja za purinsko sintezo in v manjši meri nadaljuje metabolno pot do 5-metil-tetrahidrofolata. Zaradi manjše količine 5-metil-tetrahidrofolata se zmanjša remetilacija homocisteina in zniža količina SAM v celici. Znižanje SAM pa vodi v hipometilacijo lipidov, proteinov in DNA (47). V Evropi je v severnih državah pogostost *MTHFR* C677T homozigotov približno 12 %, v južnih državah pa do 24 %. V Sloveniji je homozigotnih za preučevano enonukleotidno spremembo 12 %, heterozigotov pa 46 % (47).

Drugi pogosti polimorfizem *MTHFR* gena se nahaja na mestu 1298, kjer pride do zamenjave A>C. Posledično se glutamat na 429. mestu spremeni v alanin (46). Homozigoti za polimorfizem 1298A>C imajo aktivnost znižano na 60 % aktivnosti divjega genotipa, heterozigoti pa na 80 % aktivnosti divjega genotipa. Omenjeni polimorfizem bistveno ne vpliva na koncentracijo folata in/ ali homocisteina v krvi. Je pa klinično pomemben, ker vpliva na presnovo folatov (42, 47). V evropskih državah in Sloveniji je homozigotnih za enonukleotidno spremembo *MTHFR* 1298 približno 10 %, heterozigotov pa je okrog 42 % (47).

Oba omenjena polimorfizma sta redko prisotna na istem alelu (33), kljub temu pa so pri neviabilnih fetusih opazili višjo frekvenco genotipov z več kot dvema mutacijama (48). Obstajajo tudi sestavljeni heterozigoti za oba polimorfizma (677CT/1298AC), ki imajo encimsko aktivnost primerljivo s 677 TT homozigoti in imajo zato povišane koncentracije homocisteina ter moten metabolizem folatov.

Hiperhomocisteinemija in polimorfizmi so povezani s številnimi bolezenskimi procesi v otroški in odrasli dobi. Med njimi so bipolarna motnja, unipolarne depresije, diabetična retinopatija, ovularna neplodnost, srčno-žilne bolezni, ateroskleroza, tromboembolični zapleti, odpoved levic, demenca, kognitivne nepravilnosti in drugo (49). S polimorfizmi v genu *MTHFR* in nezadostnim vnosom folatov pa se poveča tudi tveganje za prirojene napake ploda kot so prirojene srčne napake, orofacialne shize, napake nevralne cevi in druge (47).

## **1.5 Vplivi oksidativnega stresa na izide nosečnosti**










### **1.5.1 Predčasen porod**

Predčasen porod je pogost klinični zaplet v ginekologiji in se nanaša na rojstvo otroka med 28. in 37. tednom. Takih novorojenčkov je od 5–15 %, v državah v razvoju pa okrog 25 %. Novorojenčka, ki tehta od 1000 g do 2499 g in je predčasno rojen, imenujemo nedonošenček. Nedonošenček ima nerazvite organe, nepopoln imunski sistem, zato lahko pride do zapletov po porodu ali celo do smrti. Vzroki za rojstvo nedonošenčka so lahko nenormalnosti kromosomov, imunskega sistema, zarodka in zarodkovega okolja (nepravilnosti maternice, infekcije reproduktivnega trakta in drugi zapleti nosečnosti) (50). Pomembno vplivajo tudi nepravilnosti v sistemu koagulacije in fibrinolize (51).

### **1.5.2 Ocena fiziološke zrelosti in telesnega stanja novorojenčka (Lestvica APGAR)**

Med presejalne preizkuse, ki jih zdravstveno osebje izvede takoj po porodu, spada tudi ocena novorojenčka po APGAR-jevi lestvici. Imenuje se po zdravnici Virginii Apgar, ki jo je uvedla v klinično prakso. Z lestvico dobimo grobo oceno fiziološke zrelosti in telesnega razvoja novorojenčka. Ocenjujemo novorojenčkov srčni utrip, dihanje, mišični tonus, telesno barvo in vzdražnost refleksov (Slika 1). Posamezno karakteristiko ovrednotimo z vrednostjo 0, 1 ali 2. Največje skupno število točk, ki jih novorojenček lahko prejme, je deset. Novorojenčka se prvič oceni prvo minuto po rojstvu, oceno se ponovi še 5 minut po rojstvu. Če je ocena po Apgarju pod 7, izvajamo tudi 5-minutne intervale meritev do 20 minut po rojstvu. Običajno 90 % novorojenčkov prejme oceno 7 ali več. Novorojenčki z oceno pod 7 potrebujejo pomoč pri vzpostavitvi dihanja in pri drugih vitalnih funkcijah. Dokazano je, da je vrednost APGAR < 7 po 5 minutah povezana z neonatalno umrljivostjo,

kasnejšimi nevrološkimi težavami ali nizko kognitivno funkcijo (52). Novorojenčki z oceno 4 potrebujejo nujno medicinsko pomoč, ker so v tako imenovanem kritičnem stanju. Ocena pod 3, ki tekom prvih 20 minut ne poraste, je znak resnejših nevroloških okvar pred ali po porodu (53).

<b>APGAR</b> lestvica		0 točk	1 točka	2 točki
<b>VIDEZ, BARVA NOVOROJENČKOVE KOŽE</b> (Appearance)				popolnoma moder moder na okončinah brez modre obarvanosti
<b>SRČNI UTRIP</b> (Pulse)	ni utripa	<100/udarcev na minuto	>100/udarcev na minuto	
<b>VZDRAŽNOST, ODZIV NA DRAŽLJAJE</b> (Grimace)				ni odziva na stimulacijo kremženje, slaboten jok ob stimulaciji kihanje, kašljanje ob stimulaciji
<b>MIŠIČNA AKTIVNOST</b> (Activity)				ni gibanja malo gibanja aktivno gibanje
<b>DIHANJE</b> (Respiration)	ni dihanja	šibko, počasno, nepravilno dihanje	normalno dihanje	

Slika 3: APGAR lestvica, prirejeno po (54).

Kljub dobri klinični uporabnosti APGAR lestvice ima slednja tudi številne omejitve. Na številčno vrednost pa lahko vplivajo zdravila, poškodbe (travme), kongenitalne nepravilnosti, okužbe, hipoksije, hipovolemije in predčasni porodi (55). Zaradi vseh naštetih dejavnikov, ki vplivajo na variabilnost, je Ameriško združenje pediatrov in ginekologov izdalo smernice za uporabo APGAR lestvice, da bi bila le-ta čim bolj smotrna (53).

### **1.5.3 Zapleti nosečnosti, vezani na posteljico**

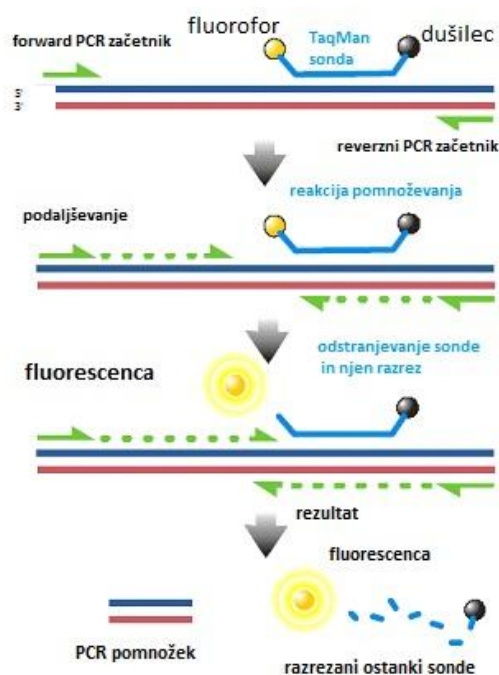
Zapleti nosečnosti, ki so vezani na nepravilnosti posteljice, prizadenejo približno tretjino nosečnic. Spremembe življenjskega sloga, kot so nosečnosti pri višji starosti matere in spremenjene prehranjevalne navade, višajo incidenco nepravilnosti. Oksidativni stres v utero-placentarnem področju je glavni razlog za razvoj nepravilnosti posteljice (56).

Abrupcija posteljice je zaplet nosečnosti, kjer se že pred porodom posteljica loči od stene maternice. Ločitev lahko moti prehajanje kisika in hranil do otroka in povzroči močne notranje krvavitve pri materi. Zaplet pogosto zahteva tudi sprožitev predčasnega poroda (57).

Adherentna posteljica je posteljica, ki je močnejše pripeta na steno maternice in se po porodu ne more sama izločiti. Potreben je zdravniški poseg, da posteljico odstranimo.

## 1.6 Genotipizacija s hibridizacijskimi TaqMan® sondami

Genotipizacija poteka na način, da se v stopnji denaturacije specifične TaqMan® sonde hibridizirajo na enoverižno matrično DNA. Specifično prilegajoča sonda ima na enem koncu vezano fluorescentno barvilo, na drugem pa dušilec fluorescence izbranega barvila (Slika 3). V primeru, da je sonda intaktna, sta barvilo in njegov dušilec na primerni razdalji. Pride do fluorescentno resonančnega prenosa energije, dušilec lahko duši fluorescenco barvila in le-to ne more fluorescirati. Pri podaljševanju novo-nastajajoče verige na matrični DNA pa pride do hidrolize TaqMan® sonde. DNA polimeraza s svojo 5'-3' eksonukleazno aktivnostjo sondo razreže. Barvilo in dušilec nista več povezana. Dušilec ne more dušiti fluorescence barvila, zato le-to fluorescira in oddaja merljiv signal (58, 59).



Slika 4: Princip delovanja hibridizirajočih sond, prirejeno po (60).

### 1.6.1 Alelna diskriminacija

Alelna diskriminacija je na PCR temelječ postopek za določanje enonukleotidne spremembe zaporedja DNA. Postopek temelji na podvajanju 100-150 baznih parov dolgega segmenta želenega gena s hibridizirajočima TaqMan® sondama. Obe sondi imata na 5' koncu vezani različni fluorescentni barvili (npr. VIC in FAM), na 3' koncu pa dušilec fluorescentnega barvila. Postopek je prikazan na sliki 4. Prva sonda z VIC barvilom



specifično prepoznava alel z nespremenjenim genotipom (divji tip alela). Druga sonda s FAM barvilom pa prepoznava preučevan variantni alel (mutiran tip alela) (61).

V nadaljnji PCR reakciji v realnem času lahko za posamezen iskani gen dobimo tri vrste rezultatov:

- Poveča se samo signal VIC barvila.

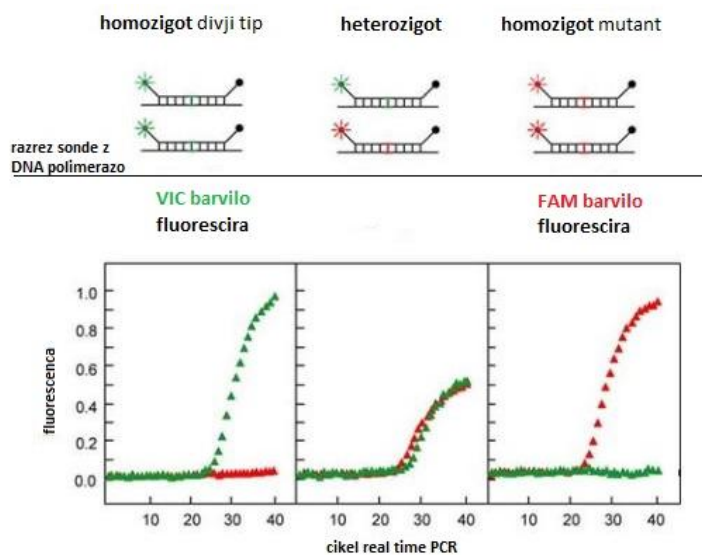
Pomeni, da pomnožek preučevanega genskega segmenta vsebuje samo divji tip alelov. Zaključimo, da je vzorec homozigoten za divji tip alela.

- Poveča se samo signal FAM barvila.

Pomeni, da pomnožek preučevanega genskega segmenta vsebuje samo variantne alele. Zaključimo, da je preiskovani vzorec homozigoten za mutiran tip alela.

- Poveča se signal tako VIC kot FAM barvila.

Pomnožek preučevanega genskega segmenta vsebuje tako alele divjega tipa kot tudi variantne alele. Zaključimo, da je izbrani vzorec heterozigoten za iskano gensko spremembo.



Slika 5: Alelna diskriminacija, prirejeno po (62).

## 2 Namen dela

Namen našega dela v okviru magistrske naloge bo preveriti vpliv polimorfizmov *TPMT* (rs1800462 238G>C, rs1800460 460G>A in rs1142345 719A>G) in *MTHFR* (rs1801133 677C>T in rs1801131 1298A>C) na kazalce oksidativnega stresa v plodovnici, krvi in urinu mater v drugem trimesečju nosečnosti. Poskušali bomo tudi ovrednotiti vpliv polimorfizmov omenjenih genov na različne izide iste nosečnosti.

S tem namenom bomo iz hemolizатов 147 nosečnic, ki so se na Ginekološki kliniki Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani odločile za amniocentezo, izolirali DNA in nato s specifičnimi TaqMan® sondami določili genotipe izbranih polimorfizmov s pomočjo reakcije PCR v realnem času.

S standardnimi statističnimi metodami bomo ovrednotili morebitno povezavo izbranih materinih polimorfizmov genov *TPMT* in *MTHFR* s kazalci oksidativnega stresa v plodovnici in urinu (SOD, GPX, IP, OHdG, PRL, DiY, NY) ter materinih eritrocitih (SOD, GPX). Ocenili bomo tudi vpliv omenjenih polimorfizmov na različne izide nosečnosti (APGAR, gestacijska starost, število predhodnih splavov, porodna teža, vrsta in abnormalnosti placente).

### 3 Materiali in metode

#### 3.1 Preiskovanke

Poskuse v okviru magistrske naloge smo izvajali na biološkem materialu, ki je bil del večje študije kazalcev oksidativnega stresa pri nosečnicah (3) in je del ARRS programa Metabolni in prirojeni dejavniki reproduktivnega zdravja, porod II (Vodja prof. dr. Ksenija Geršak UKC Ljubljana). Matična raziskava je potekala na Ginekološki kliniki Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Meritve kazalcev oksidativnega stresa v plodovnici, krvi in urinu so potekale na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Ljubljani. Naše raziskovalno delo, ki je vključevalo izolacijo DNA in genotipizacije pa smo izvedli na Katedri za klinično biokemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani. Vzorci za genotipizacijo v okviru magistrske naloge so bili hemolizati venske krvi, odvzeti nosečim ženskam v drugem trimesečju nosečnosti med preiskavo amniocenteze. Na amniocentezo so nosečnice odšle na podlagi lastne želje, povišane verjetnosti za Downov sindrom, višje starosti matere ob nosečnosti, povečane nuhalne svetline in/ali spremenjenih serumskih koncentracij kazalcev Downovega sindroma ali družinske zgodovine kariotipskih nepravilnosti.

Uporabili smo biološke vzorce 147 nosečnic, zbranih med januarjem 2011 in decembrom 2012. Nosečnice so bile med 15. in 26. tednom nosečnosti, brez znanih strukturnih ali genetskih nepravilnosti ploda. Vzorce hemolizatov smo do izolacije DNA hranili na -86 °C. Po izolaciji DNA in merjenju koncentracije pa smo razredčene delovne raztopine DNA hranili v zamrzovalniku na -70 °C .

V nadaljevanju smo izvedli še genotipizacije polimorfizmov v genih:

- *TPMT\*2 (238 G>C)*, rs1800462 (Ala80Pro),
- *TPMT\*3B (460 G>A)*, rs1800460 (Gly460Ala),
- *TPMT\*3C (719 A>G)*, rs1142345 (Ala719Cys),
- *MTHFR 677 C>T*, rs1801133 (Ala222Val),
- *MTHFR 1298 A>C*, rs1801131 (Glu429Ala).

## 3.2 Uporabljeni reagenti in aparature

Uporabljeni reagenti:

- komplet reagentov QIAamo DNA Mini Kit (QIAGEN),
- TaqMan® SNP Genotyping Assays (TPMT\*2, \*3B in \*3C 20x; MTHFR 677 in 1298 40x; Applied Biosystems). (Preglednica I).
- TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems),
- etanol 70 %,
- hipoklorit 3 %,
- visoko prečiščena in avtoklavirana voda.

Uporabljeni instrumenti in oprema:

- zamrzovalnik -75 °C za hranjenje vzorcev (Sanyo),
- avtoklav Steriltechnik AG (Semilab),
- avtoklavirane plastične Eppendorfove epruvetke (0,5 ml, 1,5 ml in 2,0 ml),
- vrtinčasto mešalo (Bio Vortex V1, Biosan),
- polavtomatske pipete (0,1-2,5 µl; 2-20 µl; 20-200 µl; 200-1000 µl; Eppendorf),
- mikrotitrna plošča s 398 vdolbinami AbiPrism (Applied Biosystems),
- namizna centrifuga Combi-spin FUL-2400N (Biosan),
- komora za sterilno delo DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-AR (Biosan),
- centrifuga Centric 322A (Biosan),
- Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific),
- analizator Light Cycler® 480 System (Roche).

### Preglednica I: Uporabljeni kiti za genotipizacijo (Applied biosystems)

Določan polimorfizem	Številka kita
TPMT*2	C__12091552_30
TPMT*3B	C__30634116_20
TPMT*3C	C_____19567_20
MTHFR 677	C__1202883_20
MTHFR 1298	C_____850486_20

### 3.3 Izolacija DNA

Iz vzorčnih hemolizatov smo izolirali DNA po protokolu Quiagen (QIAamo DNA Mini Kit) s kolono.

Izolacija DNA iz hemolizatov je potekala po originalnem postopku predpisanem s strani proizvajalca. Zaradi manjše koncentracije DNA v vzorcih smo spremenili samo količino dodanega elucijskega pufra, kjer smo namesto 200  $\mu$ l dodali samo 100  $\mu$ l.

#### 3.3.1 Meritev koncentracij raztopin izolirane DNA

Uporabili smo spektrofotometer NanoDrop<sup>TM</sup> ND-1000, ki s pomočjo površinske napetosti na merilni celici omogoča zanesljivo določitev koncentracije DNA v 1  $\mu$ l vzorca. Merilno območje naprave pokriva spekter valovnih dolžin od 220 nm do 750 nm. Prednost omenjenega spektrofotometra je določitev koncentracije DNA v koncentriranih vzorcih, brez potreb po dodatnem redčenju (63). Meritve smo izvedli tako, da smo najprej počasi, na sobni temperaturi, odtalili vzorce z izolirano DNA. Pred začetkom merjenja koncentracije smo merilno celico spektrofotometra temeljito očistili ter jo umerili z deionizirano vodo. V nadaljevanju smo v aparaturo zabeležili vsak posamezen vzorec, ga premešali na vrtničnem mešalu, odpipetirali 1,5  $\mu$ l kapljico in izmerili koncentracijo DNA. Meritve koncentracije so potekale pri valovni dolžini 260 in 280 nm, čistost DNA pa smo določili z razmerjem koncentracij 260/280 nm. Rezultati vseh meritev koncentracije in čistosti DNA raztopin so zbrani v Prilogi 1. Čiščenje merilne celice smo izvajali po vsaki meritvi, umerjanje spektrofotometrične celice z vodo pa večkrat med delom.

### 3.3.2 Redčenje izoliranih raztopin DNA

Iz vsakega vzorca smo pripravili 30  $\mu\text{l}$  delovne raztopine DNA s koncentracijo 4 ng/ $\mu\text{l}$ . S pomočjo enačbe 1 smo izračunali kolikšen volumen originalnega vzorca potrebujemo. Z enačbo 2 pa smo izračunali volumen deionizirane vode, ki ga je potrebno dodati vzorcu izvorne DNA, da bo razredčen na 4 ng/ $\mu\text{l}$  delovne raztopine DNA.

$$\text{Enačba 1: } V_{\text{DNA}_1} = \frac{c_{\text{DNA}_2} * V_{\text{DNA}_2}}{c_{\text{DNA}_1}} \quad \text{Enačba 2: } V_{\text{H}_2\text{O}} = 30 \mu\text{l} - V_{\text{DNA}_1}$$

### 3.4 Genotipizacija raztopin DNA in alelna diskriminacija

Postopek analize je potekal tako, da smo najprej pripravili sterilno komoro. Očistili smo jo s 70 % etanolom, s 3 % hipokloritom pa smo očistili ves pribor. Vse skupaj smo za približno 20 minut izpostavili UV-svetlobi. Med tem časom smo na sobni temperaturi odtalili delovne raztopine vzorcev DNA, visoko prečiščeno vodo, ostale reagente in pripravili načrt dela ter si izračunali potrebne volumne vzorcev.

V prvem koraku smo v očiščeni in prežarčeni komori najprej pripravili zadostno količino reakcijske mešanice in jo nanесли na mikrotitrsko ploščico. Na vseh stopnjah smo bili pozorni na sterilnost dela. V naslednjem koraku smo po pripravljenem načrtu dodali delovne raztopine DNA s koncentracijo 4 ng/ $\mu\text{l}$  ter raztopine kontrolnih vzorcev iskanih genov (pozitivne kontrole). V določenih vdolbinicah smo pustili samo reakcijsko mešanico, ki nam je služila kot negativna kontrola.

Sestava reakcijske mešanice za genotipizacijo obeh polimorfizmov v genu *MTHFR* je zapisana v preglednici II. Sestava mešanice je bila identična za genotipizacijo *MTHFR* 677 in *MTHFR* 1289.

**Preglednica II: Reakcijska mešanica za reakcijo qPCR za *MTHFR* 677 C>T in 1298 A>C**

Komponenta	Volumen
izolirana DNA	1,5 $\mu\text{l}$
TaqMan Universal Mastermix	2,5 $\mu\text{l}$
sonde TaqMan®	0,125 $\mu\text{l}$
ultra prečiščena voda	0,875 $\mu\text{l}$
skupni volumen reakcijske mešanice	5 $\mu\text{l}$

Navedena reakcijska mešanica zadošča za analizo enega vzorca.

Sestava reakcijske mešanice za genotipizacijo treh polimorfizmov v genu *TPMT* je zapisana v preglednici III. Sestava mešanice je bila identična za genotipizacijo *TPMT* \*2, *TPMT* \*3B ter *TPMT* \*3C in zadošča za analizo enega vzorca.

**Preglednica III: Reakcijska mešanica za reakcijo qPCR za *TPMT* \*2, \*3B in \*3C**

Komponenta	Volumen
izolirana DNA	1,5 µl
TaqMan Universal Mastermix	2,5 µl
sonde TaqMan®	0,25 µl
ultra prečiščena voda	0,75 µl
skupni volumen reakcijske mešanice	5 µl

Vsaka vdolbinica na mikrotitrski plošči je predstavljala svojo reakcijsko posodico in vsebovala skupno 5 µl reakcijske mešanice (reagentov in tarčne DNA). Pripravljeno laboratorijsko ploščo smo pokrili s prozorno folijo, jo centrifugirali 2 minuti pri 2000 obratih/minuto. Po centrifugiranju smo ploščo vstavili v analizator Light Cycler® 480 System (Roche) (64). Program verižne reakcije s polimerazo v realnem času je potekal po stopnjah, zapisanih v preglednici IV.

**Preglednica IV: Program izvedbe PCR s TaqMan® sondami**

Stopnja	Temperatura [°C]	Čas [min]	Število ciklov
<b>Začetna inkubacija</b>	50	2 min	1
<b>Aktivacija</b> Taq DNA polimeraze	95	10 min	1
<b>PCR reakcija</b>			
Denaturacija DNA	95	15 s	50
Prileganje oligonukleotidnih začetnikov	60	1 min	

Po končani reakciji smo izvedli alelni diskriminacijo. Glede na tip fluorescence in dodane kontrolne vzorce smo dobljene rezultate ločili v tri skupine (homozigoti divjega tipa, heterozigoti in mutirani homozigoti).

### 3.5 Statistična analiza

Statistično analizo smo izvedli s pomočjo programa Statistical Package for the Social Science (SPSS) za operacijski sistem Windows, različica 21.

Shapiro-Wilk test smo uporabili za ugotavljanje normalnosti porazdelitve kontinuiranih spremenljivk.

Za preverjanje asociacij med *TPMT* in *MTHFR* genotipi ter kazalci oksidativnega stresa in izidi nosečnosti smo uporabili sledeče teste:

- Parametrični t-test dveh neodvisnih vzorcev, test ANOVA za normalno porazdeljene spremenljivke. Pri testu ANOVA smo v primeru statistično značilne razlike izvedli še *post hoc* analize; in sicer LSD, če je Levenov test homogenosti varianc pokazal homogeno varianco in Games-Howell, če je bila varianca nehomogena.
- Neparametrični Mann-Whitneyev test za testiranje dveh neodvisnih vzorcev in Kruskal-Wallis test kot neparametrični analog testa ANOVA za več neodvisnih vzorcev smo uporabili za nenormalno porazdeljene spremenljivke.
- Fisherjev natančni test smo uporabili za kategorične spremenljivke.

Kot mejo statistične značilnosti smo upoštevali  $\alpha=0,05$ .

Za grafične prikaze pa smo uporabili tudi program Microsoft Excel, verzija 2007.

Število določenih mutiranih heterozigotov, še bolj pa mutiranih homozigotov je bilo v pilotni študiji zelo nizko. Posledično zaradi prenizkega števila preiskovancev v podskupinah nismo mogli zagotoviti relevantnosti multiplega regresijskega modela. Multiplega regresijskega modela iz navedenega razloga nismo izvedli.

V praktičnem delu magistrske naloge smo v celotni statistični obdelavi primerjali določene genotipe *TPMT* in *MTHFR* z ostalimi parametri, ki so bili izmerjeni tekom primarne študije na Ginekološki kliniki. V prvi sklop smo uvrstili primerjave s parametri, ki so povezani s kazalci oksidativnega stresa v plodovnici (SOD, GPX, IP, OHdG, PRL, DiY, NY) in urinu matere (IP, OHdG, PRL, DiY, NY) ter materinih eritrocitih (SOD, GPX). Iskali smo najrazličnejše povezave z materinimi genotipi. Najprej smo posamezne



parametre primerjali s *TPMT* oziroma z *MTHFR* genotipom. Pri *MTHFR* genotipu smo upoštevali dve kategoriji in sicer aktivnost encima *MTHFR* > 60 % in aktivnost encima < 60 %. V skupino *MTHFR* > 60 % smo vključili vse variantne alele, ki imajo glede na objavljeno literaturo aktivnost *MTHFR* višjo od 60% (677 CC/1298 AA, 677 CC/1298 AC, 677 CT/1298 AA in 677 CC/1298 CC), v skupino s predvideno aktivnostjo < 60% pa 677 CT/1298 AC in 677 TT/1298 AA. V nadaljevanju pa smo *TPMT* in *MTHFR* genotipe smo združili v 4 kategorije na osnovi predvidene aktivnosti obeh encimov. V prvo in drugo skupino smo uvrstili genotip *TPMT*\*1/\*1 in kombinaciji obeh polimorfizmov *MTHFR* (aktivnost encima > 60 % in < 60 % ). V tretjo in četrto skupino pa smo uvrstili *TPMT*\*1/\*3 in kombinaciji obeh polimorfizmov *MTHFR* (aktivnost encima > 60 % in < 60 % ).

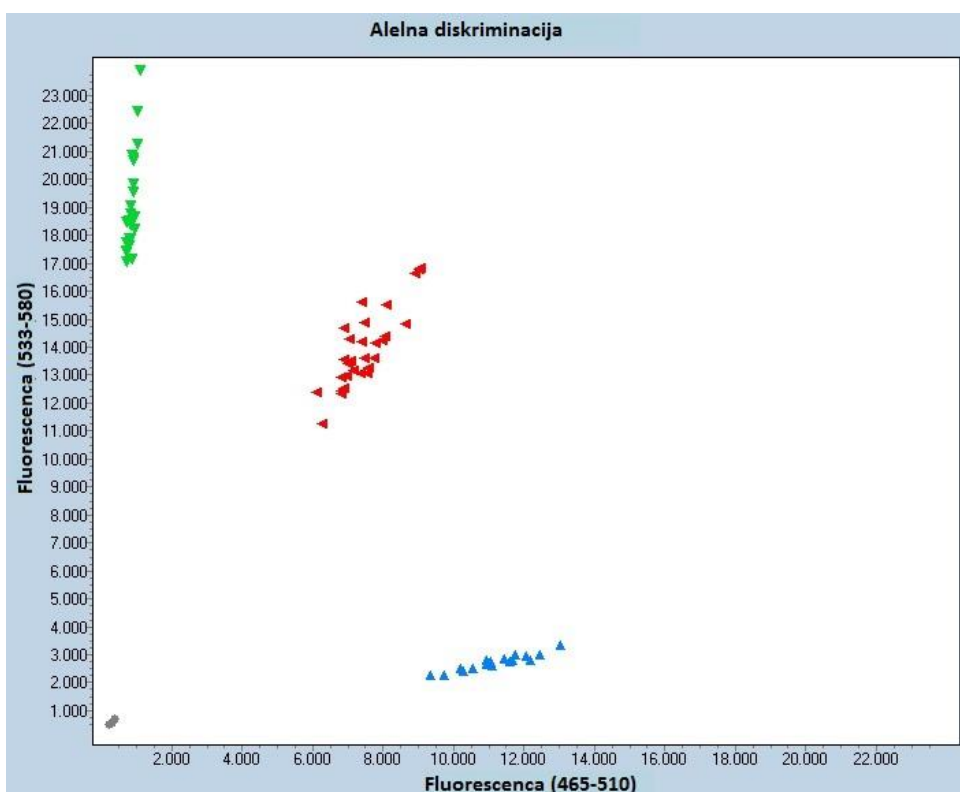
V drugi sklop pa smo uvrstili primerjave s parametri povezanimi z izidi nosečnosti: starost nosečnic; število predhodnih splavov; gestacijska starost ob porodu, otrokova teža in telesna dolžina; APGAR v 1., 5. in 10. minuti po rojstvu ter lastnosti posteljice (abruptivna, normalna, adherentna). Tudi parametre povezane z izidi nosečnosti smo primerjali z genotipi mater po zgoraj opisanem postopku. Spremenljivke APGAR 1, 5 in 10 smo najprej obravnavali kot nenormalno porazdeljene, v nadaljevanju pa smo APGAR 1 preoblikovali v dve klinično relevantni kategoriji: APGAR 0-7 in APGAR 8-10 ter ju analizirali kot kategorični spremenljivki.

## 4 Rezultati in razprava

V našem raziskovalnem delu smo poskušali opredeliti povezavo med genotipom *TPMT* in/ali *MTHFR* ter izbranimi parametri oksidativnega stresa in parametri, povezanimi z izidi nosečnosti. Nosečnost in z njo povezan oksidativni stres je kompleksen proces in vsaka opredelitev povezav je pomembna za nadaljnje raziskave. S tem znanjem in z njim povezanimi ukrepi bi lahko zmanjšali oksidativni stres v nosečnosti in pomembno vplivali tudi na zmanjšanje neugodnih izidov nosečnosti. Poleg tega pa bi lahko z zmanjšanjem oksidativnega stresa v nosečnosti tudi preventivno delovali na številne kronične bolezni, ki se lahko v nadaljevanju razvijejo tako pri otroku kot pri materi.

### 4.1 Alelna diskriminacija

Z alelna diskriminacijo s pomočjo specifičnih TaqMan® sond smo določili genotipe *TPMT* in *MTHFR*. Na sliki 6 so prikazani naši rezultati genotipizacije za *MTHFR* 677. V preglednici V pa so zbrani vsi številčni rezultati genotipov ter njihove frekvence.



Slika 6: Prikaz rezultatov genotipizacij v končni točki za *MTHFR* 677.

Na sliki 6 imamo prikazan diagram, kjer os x prikazuje fluorescenco barvila FAM, os Y pa fluorescenco barvila VIC. V primeru *MTHFR* encima so homozigoti za divji tip alela

*MTHFR* 677 CC prikazani z modro barvo, homozigoti za variantni alel *MTHFR* 677 TT pa z zeleno barvo. Heterozigoti *MTHFR* 677 CT so predstavljeni z rdečo barvo. Sive pike v izhodišču grafa pa predstavljajo slepe vzorčne raztopine (vsi reagenti brez DNA). Genotipe preiskovanih vzorcev nosečnic smo določili na podlagi kontrolnih vzorcev, s predhodno znanimi genotipi, ki smo jih analizirali v isti seriji.

**Preglednica V: Prikaz števila in frekvenca izmerjenih genotipov *MTHFR* in *TPMT* pri 147 nosečnicah.**

Pri *MTHFR* 677 C predstavlja alel divjega tipa, T pa variantni alel, pri *MTHFR* 1298 pa je A alel divjega tipa in C variantni alel. Oznaka *TPMT*\*1/\*1 predstavlja divji tip *TPMT* alela, oznaka *TPMT* \*1/\*3B predstavlja heterozigota za alel *TPMT*\*3B, oznaka *TPMT* \*1/\*3C pa heterozigota za alel *TPMT*\*3C. Oznaka *TPMT*\*1/\*3A predstavlja heterozigota za oba alela (*TPMT*\*3B in \*3C) ter oznaka *TPMT*\*1/\*2 predstavlja heterozigota za alel *TPMT*\*2. S *TPMT*\*2/\*2 so označeni mutirani homozigoti za *TPMT*\*2 in s *TPMT*\*3/\*3 so označeni mutirani homozigoti za mutacijo *TPMT*\*3B in/ali \*3C.

Genotip	Število nosečnic z določenim genotipom	Frekvenca genotipa
<i>MTHFR</i> 677 CC	61	41,5 %
<i>MTHFR</i> 677 CT	65	44,2 %
<i>MTHFR</i> 677 TT	21	14,3 %
<i>MTHFR</i> 1298 AA	64	43,5 %
<i>MTHFR</i> 1298 AC	68	46,3 %
<i>MTHFR</i> 1298 CC	15	10,2 %
<i>TPMT</i> *1/*1	139	94,5 %
<i>TPMT</i> *1/*3A	7	4,8 %
<i>TPMT</i> *1/*3B	0	0 %
<i>TPMT</i> *1/*3C	1	0,7 %
<i>TPMT</i> *1/*2	0	0 %
<i>TPMT</i> *2/*2	0	0 %
<i>TPMT</i> *3/*3	0	0 %

Iz preglednice V je razvidno, da sta v splošni populaciji polimorfizma *MTHFR* veliko bolj pogosta kot *TPMT* mutacije.

Ugotovili smo, da enonukleotidna mutacija *TPMT\*2* med našimi vzorci nosečnic ni bila prisotna. Prav tako nismo določili nobene nosečnice s homozigotnim genotipom *TPMT\*3B*, *TPMT\*3C* ali *TPMT\*3A*. Rezultati sovpadajo s predhodnimi raziskavami (33). Število heterozigotnih nosečnic za *TPMT\*3A* in *\*3C* je bilo zelo nizko (7 oz. 1). Skupaj je bilo vseh *TPMT\*1/\*3* heterozigotov 8, zato kompleksnejših statističnih testov nismo mogli opraviti.

*TPMT* in *MTHFR* genotipi za posamezne vzorce so predstavljeni v prilogi 2.

## 4.2 Testiranje normalnosti porazdelitve podatkov

Uporabili smo test Shapiro-Wilk. Ugotovili smo, da se porazdelitev nekaterih spremenljivk statistično značilno razlikuje od normalne porazdelitve, saj smo dobili p vrednost, ki je manjša od 0,05. V primeru, da smo dobili p vrednost večjo od 0,05, pri uporabljeni stopnji tveganja  $\alpha=0,05$ , pa smo zaključili, da se porazdelitev vzorca signifikantno ne razlikuje od normalne porazdelitve (65).

Po kategorijah genotipov *TPMT*, *MTHFR* ter njihovih kombinacij so se normalno porazdeljevale spremenljivke: SOD v eritrocitih, GPX v eritrocitih, PRL v urinu, DIY v urinu, NY in totalna antioksidativna kapaciteta matere v amnijski tekočini. Nenormalno so bile porazdeljene spremenljivke: SOD, GPX, OHdG, PRL in DIY v amnijski tekočini, NY, OHdG in HEL v urinu. Nenormalno so bile porazdeljene tudi spremenljivke z vplivom na izide nosečnosti: število splavov, gestacijska starost, porodna teža, dolžina in obseg glavice ter APGAR ocene. Med kategorično spremenljivko smo uvrstili lastnosti posteljice.

Normalnost oziroma nenormalnost porazdelitve statističnih spremenljivk smo preverjali, ker je ključna za nadaljnjo izbiro statističnih testov. Za normalno porazdeljene spremenljivke smo uporabili t-test ali ANOVA test, za nenormalno porazdeljene spremenljivke pa Mann-Whitneyev U test ali Kruskal-Wallisov test.

### 4.3 Vplivi genotipa TPMT na kazalce oksidativnega stresa pri materi in otroku

#### 4.3.1 Normalno porazdeljene spremenljivke

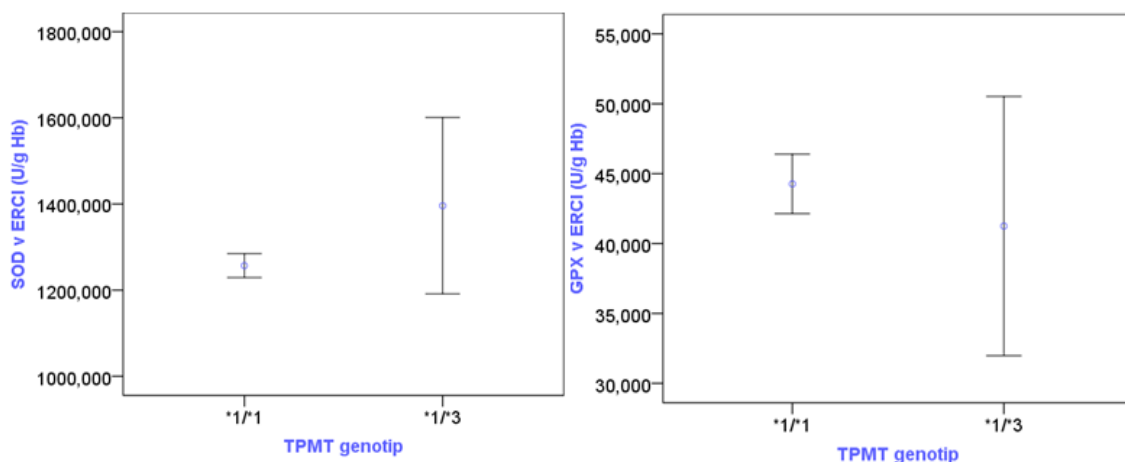
Pri analiziranju povezav med *TPMT* genotipi in normalno porazdeljenimi kazalci oksidativnega stresa pri materah in otrocih smo dobili sledeče rezultate (Preglednica VI). Najmočnejše povezave smo zaznali med aktivnostjo superoksid dismutaz v eritrocitih mater ter njihovim *TPMT* genotipom.

Preglednica VI: Vpliv *TPMT* genotipa na kazalce oksidativnega stresa z normalno porazdelitvijo

Kazalec oksidativnega stresa	TPMT genotip	$\bar{x}$	$\pm$ SD	p
<b>SOD v eritrocitih (U/g Hb)</b>	*1/*1	1256,87	158,00	<b>0,021</b>
	*1/*3	1396,00	245,07	
GPX v eritrocitih (U/g Hb)	*1/*1	44,27	12,06	0,492
	*1/*3	41,25	11,09	
PRL v urinu (nmol/mmol kreat)	*1/*1	25,84	10,47	0,251 <sup>♦</sup>
	*1/*3	33,87	18,03	
DiY v urinu (nmol/mmol kreat)	*1/*1	9,11	2,04	0,249 <sup>♦</sup>
	*1/*3	11,60	5,60	
NY v amnijski tekočini (nmol/L)	*1/*1	1,35	0,59	0,189
	*1/*3	1,07	0,56	
TAC (μmol/L)	*1/*1	576,46	81,78	0,216
	*1/*3	620,32	119,75	

<sup>♦</sup>nehomogena varianca med skupinama (Levene test p <0,05)

Preiskovanke z mutiranimi *TPMT* genotipi so imele statistično značilno višje aktivnosti SOD v eritrocitih kot tiste z genotipom divjega tipa ( $p=0,021$ ), medtem ko statističnih razlik med *TPMT* genotipom in aktivnostjo GPX v eritrocitih ni bilo ( $p=0,492$ ), Slika 7.



Slika 7: Aktivnost SOD in GPX v eritrocitih v odvisnosti od *TPMT* genotipa (t-test).

### 4.3.2 Nenormalno porazdeljene spremenljivke

Pri nenormalno porazdeljenih spremenljivkah pa nismo zaznali nobene statistično značilne povezave med materinimi genotipi *TPMT* in kazalci oksidativnega stresa (Mann Whitney test, Preglednica VII).

Preglednica VII: Vpliv *TPMT* genotipa na kazalce oksidativnega stresa z nenormalno porazdelitvijo

Kazalec oksidativnega stresa	TPMT genotip	TPMT			p
		min	max	mediana	
SOD v amnijski tekočini (U/mL)	*1/*1	0,39	2,57	0,79	0,329
	*1/*3	0,56	1,49	1,09	
GPX v amnijski tekočini (U/L)	*1/*1	12,1	557,7	100	0,179
	*1/*3	12,1	80,3	71,5	
IP v amnijski tekočini (ng/L)	*1/*1	2,6	123,2	16,0	0,348
	*1/*3	5,3	32,1	13,2	
IP v urinu (ng/mg kreat)	*1/*1	0,16	3,63	1,03	0,520
	*1/*3	0,58	2,35	0,90	
OHdG v amnijski tekočini (µg/L)	*1/*1	0,00	1,30	0,00	0,396
	*1/*3	0,00	0,20	0,00	

OHdG v urinu (ng/mg kreat)	*1/*1	0,07	102,68	5,86	0,817
	*1/*3	2,21	8,61	5,86	
HEL v urinu (nmol/mmol kreat)	*1/*1	0,30	15,71	2,91	0,989
	*1/*3	1,04	5,03	3,09	
DiY v amnijski tekočini (nmol/L)	*1/*1	1,38	11,30	3,68	0,832
	*1/*3	1,17	5,65	3,67	
NY v urinu (nmol/mmol kreat)	*1/*1	0,16	5,35	0,63	0,107
	*1/*3	0,62	2,03	1,07	
PRL v amnijski tekočini (nmol/L)	*1/*1	0,04	6,45	3,76	0,156
	*1/*3	0,12	4,37	3,23	

#### 4.4 Vplivi genotipa MTHFR na kazalce oksidativnega stresa pri materi in otroku

##### 4.4.1 Normalno porazdeljene spremenljivke

S t-testom dveh neodvisnih vzorcev nismo uspeli dokazati nobene statistično značilne povezave med maternalnimi genotipi *MTHFR* in kazalci oksidativnega stresa (Preglednica VIII).

##### **Preglednica VIII: Vpliv *MTHFR* genotipa na kazalce oksidativnega stresa z normalno porazdelitvijo.**

V drugem stolpcu so prikazane skupine kombinacij genotipov *MTHFR* 677 in 1298 s predvideno aktivnostjo encima > ali < kot 60% aktivnosti encima divjega tipa. V skupino s predvideno aktivnostjo > 60% spadajo kombinacije genotipov: 677 CC/1298 AA, 677 CC/1298 AC, 677 CT/1298 AA in 677 CC/1298 CC, v skupino s predvideno aktivnostjo < 60% pa 677 CT/1298 AC in 677 TT/1298 AA.

Kazalec oksidativnega stresa	MTHFR Genotip	$\bar{x}$	$\pm$ SD	p
SOD v eritrocitih	aktivnost > 60%	1247,025	154,646	0,128
	aktivnost < 60%	1291,436	180,433	
GPX v eritrocitih	aktivnost > 60%	44,802	12,044	0,409
	aktivnost < 60%	43,056	11,928	
PRL v urinu	aktivnost > 60%	26,857	12,089	0,493
	aktivnost < 60%	25,518	9,546	

DiY v urinu	aktivnost > 60%	9,222	2,669	0,855
	aktivnost < 60%	9,300	2,036	
NY v amnijski tekočini	aktivnost > 60%	1,308	0,585	0,564 <sup>♦</sup>
	aktivnost < 60%	1,368	0,604	
TAC	aktivnost > 60%	577,356	87,009	0,827
	aktivnost < 60%	580,946	80,977	

<sup>♦</sup>nehomogena varianca med skupinama (Levene test  $p < 0,05$ )

#### 4.4.2 Nenormalno porazdeljene spremenljivke

Prav tako z Mann Whitney testom nismo uspeli dokazati nobene statistično značilne povezave med materinimi genotipi *MTHFR* in nenormalno porazdeljenimi kazalci oksidativnega stresa (Preglednica IX).

**Preglednica IX: Vpliv *MTHFR* genotipa na kazalce oksidativnega stresa z nenormalno porazdelitvijo**

Kazalec oksidativnega stresa	MTHFR genotip	min	max	mediana	p
SOD v amnijski tekočini (U/mL)	aktivnost > 60 %	0,49	2,57	0,79	0,804
	aktivnost < 60 %	0,39	2,52	0,80	
GPX v amnijski tekočini (U/L)	aktivnost > 60 %	12,1	517,0	80,3	0,106
	aktivnost < 60 %	12,1	557,7	113,3	
IP v amnijski tekočini (ng/L)	aktivnost > 60 %	2,6	92,5	14,9	0,204
	aktivnost < 60 %	5,2	123,2	17,5	
IP v urinu (ng/mg kreat)	aktivnost > 60 %	0,32	3,63	1,01	0,708
	aktivnost < 60 %	0,16	3,33	1,05	
OHdG v amnijski tekočini (µg/L)	aktivnost > 60 %	0,00	0,5	0,00	0,431
	aktivnost < 60 %	0,00	1,30	0,00	
OHdG v urinu (ng/mg kreat)	aktivnost > 60 %	0,147	16,9	5,7	0,397
	aktivnost < 60 %	0,07	102,68	6,48	
HEL v urinu (nmol/mmol kreat)	aktivnost > 60 %	0,40	15,71	3,14	0,307
	aktivnost < 60 %	0,3	12,25	2,73	
DiY v amnijski tekočini (nmol/L)	aktivnost > 60 %	1,16	10,27	3,67	0,832
	aktivnost < 60 %	1,74	11,3	3,69	



NY v urinu (nmol/mmol kreat)	aktivnost > 60 %	0,16	4,21	0,68	0,107
	aktivnost < 60 %	0,19	5,35	0,62	
PRL v amnijski tekočini (nmol/L)	aktivnost > 60 %	0,04	6,45	3,66	0,156
	aktivnost < 60 %	0,05	5,9	3,83	

## 4.5 Vplivi kombinacij genotipov TPMT in MTHFR na kazalce oksidativnega stresa pri materi in otroku

### 4.5.1 Normalno porazdeljene spremenljivke

V nadaljevanju smo s parametričnim testom ANOVA preverjali ali obstajajo razlike med skupinami genotipov *TPMT* in *MTHFR* ter normalno porazdeljenimi kazalci oksidativnega stresa. Za referenčno skupino smo izbrali skupino genotip *TPMT* \*1/\*1 & aktivnost *MTHFR* > 60 %.

V prvem koraku smo primerjali variance z Levenovim testom. Kjer je bila p vrednost večja od 0,05, smo potrdili homogenost varianc (65, 66) in nadaljevali *post hoc* analizo po LSD metodi, če pa je bila varianca nehomogena ( $p < 0,05$ ) smo uporabili Games-Howell metodo. Signifikantne in nesignifikantne rezultate ANOVA testa smo zbrali v preglednici X.

**Preglednica X: Vpliv kombinacij *TPMT* in *MTHFR* genotipov na kazalce oksidativnega stresa z normalno porazdelitvijo.**

Kazalec oksidativnega stresa	TPMT in MTHFR	$\bar{x}$	$\pm$ SD	p
<b>SOD v eritrocitih</b> (U/g Hb)	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	1247,91	155,70	<b>0,011</b>
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	1270,68	162,10	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	1224,33	150,67	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	1499,00	241,64	
GPX v eritrocitih (U/g Hb)	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	45,03	12,21	0,707
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	43,11	11,84	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	39,07	3,40	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	42,56	14,28	

<b>PRL v urinu</b> (nmol/mmol kreat)	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	26,25	11,28	<b>0,066*</b>
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	25,20	9,12	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	42,54	23,67	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	28,67	14,08	
<b>DiY v urinu</b> (nmol/mmol kreat)	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	8,96	2,01	<b>&lt;0,0001*</b>
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	9,34	2,08	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	16,12	7,43	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	8,89	1,66	
NY v amnijski tekočini (nmol/L)	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	1,33	0,58	0,428
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	1,38	0,61	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	0,83	0,56	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	1,21	0,57	
TAC (µmol/L)	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	572,88	82,57	0,136
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	581,65	81,33	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	713,92	147,68	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	573,53	88,73	

\*nehomogena varianca med skupinami (Levene test  $p < 0,05$ )

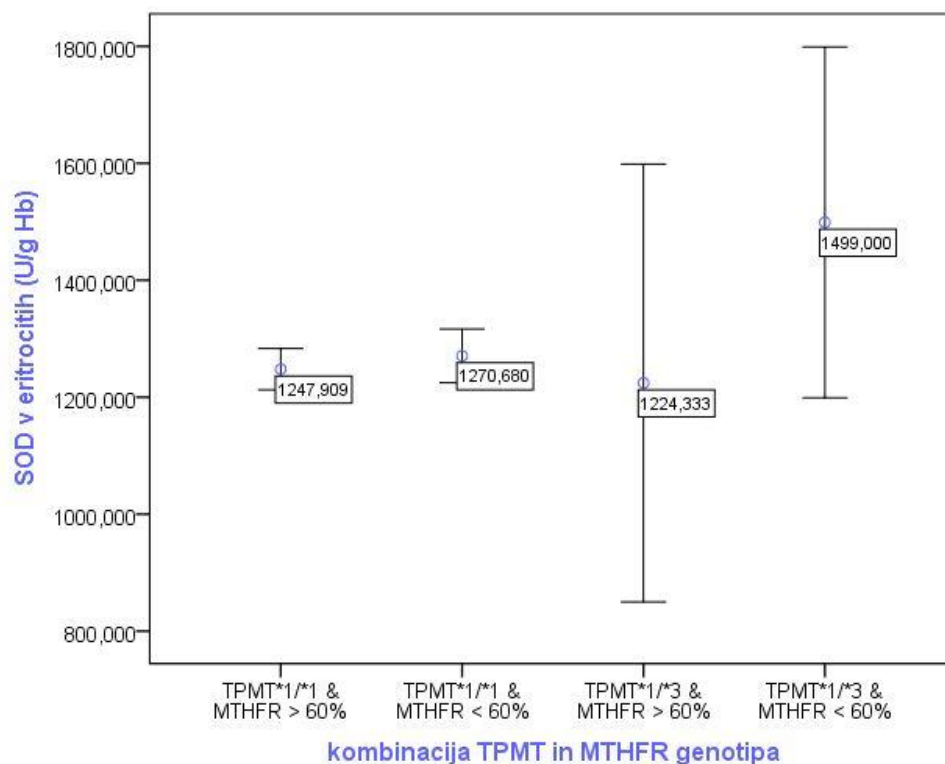
#### 4.5.1.1 Superoksid dismutaza

Ponovno smo statistično značilno razliko ( $p=0,011$ , ANOVA) zaznali med aktivnostjo SOD in kombinacijami *TPMT* in *MTHFR* genotipov. Želeli smo ugotoviti, med katerima skupinama obstajajo statistično značilne razlike v aktivnosti SOD v eritrocitih, zato smo izvedli še LSD *post hoc* test (Preglednica XI).

**Preglednica XI: Post hoc test za vpliv kombinacij genotipov TPMT in MTHFR na aktivnost SOD v eritrocitih**

Post hoc test	referenčna skupina		p vrednost
<b>LSD</b>	<i>TPMT*1/*1 &amp; MTHFR &gt; 60%</i>	<i>TPMT*1/*1 &amp; MTHFR &lt; 60%</i>	0.438
		<i>TPMT*1/*3 &amp; MTHFR &gt; 60%</i>	0.804
		<b><i>TPMT*1/*3 &amp; MTHFR &lt; 60%</i></b>	<b>0.001</b>
	<i>TPMT*1/*1 &amp; MTHFR &lt; 60%</i>	<i>TPMT*1/*3 &amp; MTHFR &gt; 60%</i>	0.630
		<b><i>TPMT*1/*3 &amp; MTHFR &lt; 60%</i></b>	<b>0.003</b>
	<i>TPMT*1/*3 &amp; MTHFR &gt; 60%</i>	<b><i>TPMT*1/*3 &amp; MTHFR &lt; 60%</i></b>	<b>0.021</b>

Ugotovili smo, da imajo nosilke kombinacij genotipov z najnižjo aktivnostjo TPMT in MTHFR (genotip *TPMT*\*1/\*3 & *MTHFR* < 60 %) v povprečju višjo aktivnost SOD v eritrocitih kot nosilke ostalih kombinacij genotipov (Preglednica XI in Slika 8). Iz tega sklepamo, da imata *TPMT* in *MTHFR* genotip sinergistični vpliv na aktivnost SOD.



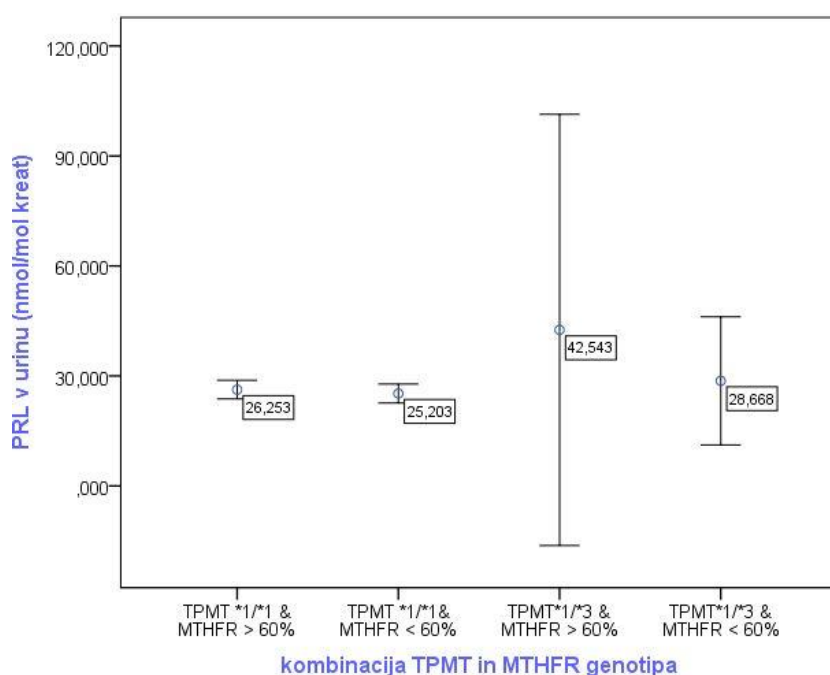
**Slika 8: Srednja vrednost in interval zaupanja aktivnosti SOD v eritrocitih v odvisnosti od kombinacij *TPMT* in *MTHFR* genotipov.**

Povezava med TPMT in SOD v literaturi še ni bila opisana, Peyrin-Biroulet in sodelavci pa so ugotovili, da je *MTHFR* 677 TT genetska determinanta, ki je signifikantno povezana s povišano koncentracijo homocisteina tako pri zdravih posameznikih kot tudi pri bolnikih s Crohnovo boleznijo. Povišane vrednosti homocisteina pa dokazano vplivajo na povišanje aktivnosti superoksid dismutaze (SOD), ki je znani kazalec oksidativnega stresa (67). Zanimivo je, da v naši preiskovani skupini sam *MTHFR* ni imel značilnega vpliva na aktivnost SOD, medtem ko je imel TPMT sam in v kombinaciji z genotipi, ki vodijo v nizko aktivnost *MTHFR*, vpliv na SOD. Iz tega lahko sklepamo, da v našem primeru homocistein ne igra glavne vloge pri povišanju aktivnosti SOD, ampak je glavni dejavnik vpliva TPMT genotip, ki vpliva na SOD aktivnost po še neznanem mehanizmu. *MTHFR* genotip deluje kot kofaktor, ki je v sinergističnem odnosu s TPMT, izoliran pa nima zelo močnega vpliva na SOD.

#### 4.5.1.2 Propanoil-lizin

Pri propanoil-lizinu (PRL) v urinu s t-testom nismo ugotovili signifikantne razlike med *TPMT*\*1/\*1 in *TPMT*\*1/\*3 genotipom ( $p=0,251$ ), Preglednica VI. Z ANOVO (Preglednica X) pa smo uspeli ugotoviti mejne statistično značilne razlike v koncentraciji PRL v urinu med posameznimi skupinami kombinacij genotipov *TPMT* in *MTHFR* ( $p$  vrednost=0.066).

Na sliki 9 je viden trend, da imajo nosilke kombinacije genotipa *TPMT*\*1/\*3 & *MTHFR* > 60 % v povprečju višjo koncentracijo PRL v urinu kot nosilke drugih kombinacij genotipov, vključno z *TPMT*\*1/\*3 & *MTHFR* < 60 %. Ugotovitev je v luči rezultatov za SOD nekoliko nepričakovana.

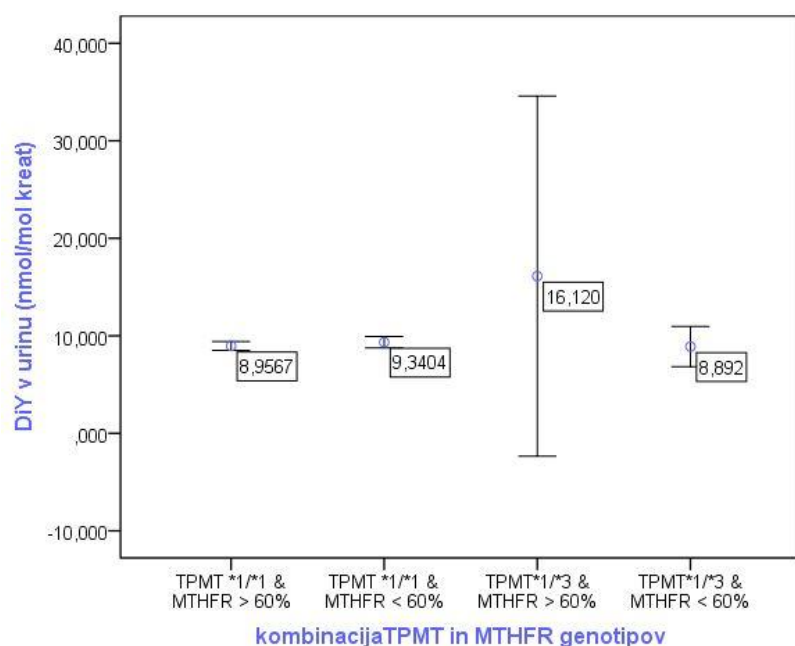


**Slika 9: Srednja vrednost in interval zaupanja koncentracije PRL v urinu v odvisnosti od kombinacije *TPMT* in *MTHFR* genotipov.**

Glede na to, da *TPMT* in *MTHFR* kot izolirana dejavnika nista imela značilnega vpliva na PRL v urinu, so takšni rezultati verjetno posledica majhnega števila preiskovancev v nekaterih podskupinah, lahko pa nakazujejo na možen sinergistični vpliv specifične kombinacije *TPMT* in *MTHFR* genotipov na nivo PRL v urinu, ki je kazalnik oksidativnega stresa. Podobne rezultate so Rejc in sodelavci (3) dokazali v svoji študiji, kjer so zabeležili statistično značilno povezavo med PRL v urinu nosečnic, ki so kadile, in nosečnic, ki niso kadile ( $p=0,034$ ). Prav tako so v tej študiji dokazali tudi povezavo med povišanim PRL in NY v urinu ter znižano vrednostjo APGAR 1.

### 4.5.1.3 Ditirozin

S t-testom smo določili nesignifikantno povezavo med povprečnimi koncentracijami ditirozina (DIY) v urinu in *TPMT* genotipom ( $p=0,249$ ) ter *MTHFR* genotipom ( $p=0,855$ ). Z ANOVO pa smo določili, da se povprečne koncentracije DIY v urinu med kombinacijami genotipov *TPMT* in *MTHFR* značilno razlikujejo med skupinami ( $p<0,001$ , Slika 10). Čeprav tega nismo uspeli potrditi s *post hoc* testom Games-Howell, je trend višje koncentracije DIY v urinu v primerjavi z ostalimi kombinacijami *TPMT* in *MTHFR* genotipov viden pri posameznicah s kombinacijo genotipov *TPMT*\*1/\*3 & *MTHFR* > 60 %, ne pa pri tistih z najnižjo predvideno aktivnostjo *TPMT* in *MTHFR* (*TPMT*\*1/\*3 & *MTHFR* < 60 %).



Slika 10: Srednja vrednost in interval zaupanja koncentracije DIY v urinu mater v odvisnosti od kombinacije genotipov *TPMT* in *MTHFR*.

Razlog za takšen rezultat bi lahko bilo premajhno število preiskovank v tej kategoriji (kar je razvidno tudi iz širokega intervala zaupanja) ali pa višji oksidativni stres pri osebah s to kombinacijo *TPMT* in *MTHFR* genotipov. Našo študijo bi bilo potrebno ponoviti na večjem številu nosečnic, saj bi na ta način dobili več vzorcev homo- in heterozigotnih vzorcev za *TPMT*.

Na podoben način so parametre oksidativnega stresa preiskovali tudi Hsieh in sodelavci (68). Dokazali so povišano koncentracijo kazalcev oksidativnega stresa pri nosečnicah, ki

so v nadaljevanju razvile zaplete nosečnosti (preeklampsijo, nizko porodno težo ali spontani predčasni porod).

#### 4.5.2 Nenormalno porazdeljene spremenljivke

Pri nenormalno porazdeljenih spremenljivkah pa s Kruskal Wallis testom nismo zaznali značilnih povezav med kombinacijami genotipov *TPMT* in *MTHFR* ter kazalci oksidativnega stresa pri nosečnicah (Preglednica XII).

**Preglednica XII: Vpliv kombinacij genotipov *TPMT* in *MTHFR* na kazalce oksidativnega stresa z nenormalno porazdelitvijo**

Kazalec oksidativnega stresa	Kombinacija <i>TPMT</i> in <i>MTHFR</i> genotipa	min	max	mediana	p
SOD v amnijski tekočini (U/mL)	<i>TPMT</i> *1/*1 & <i>MTHFR</i> > 60%	0,49	2,57	0,79	0,751
	<i>TPMT</i> *1/*1 & <i>MTHFR</i> < 60%	0,39	2,52	0,80	
	<i>TPMT</i> *1/*3 & <i>MTHFR</i> > 60%	0,65	1,49	1,24	
	<i>TPMT</i> *1/*3 & <i>MTHFR</i> < 60%	0,56	1,25	0,93	
GPX v amnijski tekočini (U/L)	<i>TPMT</i> *1/*1 & <i>MTHFR</i> > 60%	12,1	517,0	80,3	0,117
	<i>TPMT</i> *1/*1 & <i>MTHFR</i> < 60%	12,1	557,7	119,9	
	<i>TPMT</i> *1/*3 & <i>MTHFR</i> > 60%	12,1	80,3	52,8	
	<i>TPMT</i> *1/*3 & <i>MTHFR</i> < 60%	66,0	80,3	71,5	
IP v amnijski tekočini (ng/L)	<i>TPMT</i> *1/*1 & <i>MTHFR</i> > 60%	2,6	92,5	15,1	0,195
	<i>TPMT</i> *1/*1 & <i>MTHFR</i> < 60%	5,2	123,5	17,75	
	<i>TPMT</i> *1/*3 & <i>MTHFR</i> > 60%	6,6	19,7	10,5	
	<i>TPMT</i> *1/*3 & <i>MTHFR</i> < 60%	5,3	32,1	15,9	

IP v urinu (ng/mg kreat)	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	0,32	3,63	1,03	0,525
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	0,16	3,33	1,04	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	0,59	0,85	0,70	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	0,58	2,35	1,08	
OHdG v amnijski tekočini (µg/L)	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	0,0	0,5	0,0	0,250
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	0,0	1,3	0,0	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	0,0	0,2	0,0	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	/	/	/	
OHdG v urinu (ng/mg kreat)	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	0,147	16,89	5,72	0,445
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	0,07	102,68	6,55	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	2,21	7,90	5,44	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	4,79	8,61	6,28	
HEL v urinu (nmol/mmol kreat)	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	0,4	15,71	3,13	0,394
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	0,3	12,25	2,73	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	2,53	5,03	4,24	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	1,04	4,86	2,88	
NY v urinu (nmol/mmol kreat)	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	0,16	4,21	0,66	0,559
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	0,19	5,35	0,60	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	0,67	2,03	1,35	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	0,62	1,15	1,07	

## 4.6 Vplivi genotipa TPMT na izide nosečnosti

### 4.6.1 Nenormalno porazdeljene in kategorične spremenljivke

Pri nenormalno porazdeljenih spremenljivkah nismo zaznali nobene statistično značilne povezave med materinimi genotipi *TPMT* in kazalci oksidativnega stresa (Mann Whitney test, Preglednica XIII).

Preglednica XIII: Vpliv genotipov *TPMT* na kazalce povezane z izidi nosečnosti.

Kazalec izida nosečnosti	TPMT	min	max	mediana	p
	genotip				
APGAR 1 min	*1/*1	3	9	9,0	0,416
	*1/*3	3	9	9,0	
APGAR 5 min	*1/*1	5	10	9,0	0,339
	*1/*3	8	9	9,0	
APGAR 10 min	*1/*1	7	10	9,0	0,160
	*1/*3	8	9	9,0	
št. spontanih splavov	*1/*1	0	3	0,0	0,225
	*1/*3	0	1	0,0	
materin ITM (kg/m <sup>2</sup> )	*1/*1	17,9	40,5	22,7	0,871
	*1/*3	20,1	29,6	23,5	
gestacijska starost (dan)	*1/*1	193	290	276,0	0,181
	*1/*3	268	288	282,0	
otrokova teža ob rojstvu (g)	*1/*1	680	4590	3390	0,758
	*1/*3	2370	4215	3425	
otrokova dolžina ob rojstvu (cm)	*1/*1	32,0	56,0	51,0	0,369
	*1/*3	48,0	55,0	52,0	

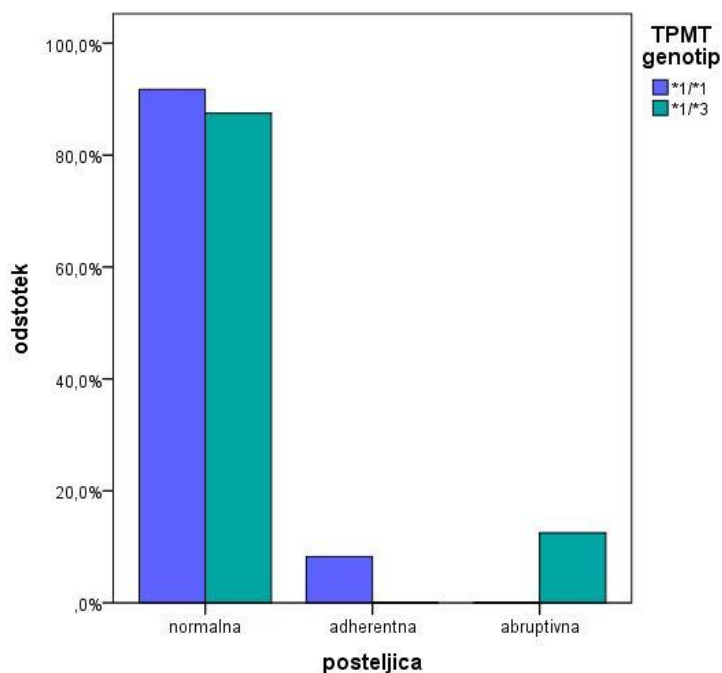
Spremenljivke APGAR 1, 5 in 10 smo najprej obravnavali kot nenormalno porazdeljene in jih analizirali z Mann Whitney testom, v nadaljevanju pa smo APGAR 1 preoblikovali v dve klinično relevantni kategoriji: APGAR 0-7 in APGAR 8-10 ter ju analizirali kot kategorični spremenljivki.

Za analizo kategoričnih spremenljivk smo uporabili Fisherjev natančni test. Opazovali smo vrednosti p pri stopnji tveganja  $\alpha=0,05$ . Ugotovili smo, da *TPMT* genotip nima povezave s



kategorijo APGAR 1 ( $p=0,373$ ) in abrupcijo posteljice ( $p=0,142$ ). Vpliv *TPMT* genotipa na vrsto posteljice (normalna, adherentna, abrupтивna) je bil mejno signifikanten ( $p=0,077$ ).

#### 4.6.1.1 Posteljica



Slika 11: Vpliv *TPMT* genotipov na vrsto posteljice.

Adherentna placenta je bila pogosteje povezana s *TPMT* genotipom divjega tipa, medtem ko je bila abrupcija posteljice bolj pogosta pri materah z mutiranim *TPMT* (Slika 11). V literaturi nismo našli pojasnila o vplivu *TPMT* na posteljico. Menimo pa, da bi lahko znižane aktivnosti *TPMT* pomembno vplivale na povišanje oksidativnega stresa in posledično na zaplete povezane s posteljico.

Ker je konkordanca med *TPMT* genotipom in fenotipom približno 86 % (69), bi bilo smiselno izmeriti še aktivnost *TPMT* ter oba podatka primerjati z zapleti posteljice. Potrebno pa bi bilo uporabiti veliko večji vzorec, da bi zajeli potrebno število nosečnic z mutiranimi *TPMT* genotipi. Znano je namreč, da ima 90 % kavkazijcev normalno ali povišano aktivnost *TPMT*, 10 % ima srednjo aktivnost in le 0,3 % znižano ali nezaznavno aktivnost *TPMT* (33).

Smiselno bi bilo vključiti tudi parametre koagulacije in fibrinolize. Domnevamo, da bi lahko bili adherentna ali abrupтивna posteljica povezani tako s koagulacijo kot tudi s številnimi drugimi dejavniki (50).

## 4.7 Vplivi genotipa MTHFR na izide nosečnosti

### 4.7.1 Nenormalno porazdeljene in kategorične spremenljivke

Z Mann Whitney testom smo med materinimi genotipi MTHFR (aktivnost encima > 60 % in < 60 %) in kazalci, ki nakazujejo izide nosečnosti zaznali statistično značilno povezavo samo z APGAR 1 ( $p=0,047$ ). Rezultate prikazuje preglednica XIV.

Preglednica XIV: Vpliv genotipov *MTHFR* na parametre povezane z izidi nosečnosti.

Kazalec izida nosečnosti	MTHFR	min	max	mediana	p
	genotip				
APGAR 1 min	> 60 %	3	9	9,0	0,047
	< 60 %	3	9	9,0	
APGAR 5 min	> 60 %	5	10	9,0	0,260
	< 60 %	8	9	9,0	
APGAR 10 min	> 60 %	7	10	9,0	0,220
	< 60 %	8	9	9,0	
št. spontanah splavov	> 60 %	0	3	0,0	0,318
	< 60 %	0	1	0,0	
materin ITM (kg/m <sup>2</sup> )	> 60 %	17,9	40,5	22,7	0,581
	< 60 %	20,1	29,6	23,5	
gestacijska starost (dan)	> 60 %	193	290	276,0	0,363
	< 60 %	268	288	282,0	
otrokova teža ob rojstvu (g)	> 60 %	680	4590	3390	0,368
	< 60 %	2370	4215	3425	
otrokova dolžina ob rojstvu (cm)	> 60 %	32,0	56,0	51,0	0,157
	< 60 %	48,0	55,0	52,0	

Spremenljivke APGAR 1, 5 in 10 smo najprej obravnavali kot nenormalno porazdeljene in jih analizirali z Mann Whitney testom, v nadaljevanju pa smo APGAR 1 preoblikovali v dve klinično relevantni kategoriji: APGAR 0-7 in APGAR 8-10 ter ju analizirali kot kategorični spremenljivki.

S Fisherjevim natančnim testom pa smo ugotovili, da *MTHFR* genotip ne vpliva na kategorijo APGAR 1 ( $p=0,122$ ) ter na vrsto placente ( $p=0,847$ ) in na njeno abrupcijo ( $p=0,713$ ).

## 4.8 Vplivi kombinacij genotipov TPMT in MTHFR na izide nosečnosti

Preglednica XV: Vpliv kombinacije genotipov TPMT in MTHFR na parametre, ki nakazujejo izide nosečnosti (Kruskal Wallis).

Kazalec izida nosečnosti	Kombinacija TPMT in MTHFR genotipa	min	max	mediana	p
<b>APGAR 1</b>	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	5	9	9,0	<b>0,014</b>
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	3	9	9,0	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	3	9	9,0	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	/	/	/	
APGAR 5	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	7	10	9,0	0,155
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	5	10	9,0	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	8	9	9,0	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	/	/	/	
<b>APGAR 10</b>	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	9	10	9,0	<b>0,044</b>
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	7	10	9,0	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	8	9	9,0	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	/	/	/	
št. spont. splavov	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	0	3	0,0	0,374
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	0	3	0,5	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	0	1	0,0	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	0	1	0,0	
materin ITM	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	18,29	40,48	22,72	0,949
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	17,99	38,62	22,51	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	20,10	26,57	24,22	

gestacijska starost	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	20,08	29,64	22,77	0,393
	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	200	289	277	
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	193	290	276	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	268	288	283	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	271	284	281	
teža ob rojstvu	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	1220	4340	3392,5	0,722
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	680	4590	3370,0	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	2730	3830	3610,0	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	2370	4215	3240,0	
dolžina ob rojstvu	TPMT *1/*1 & MTHFR > 60%	39,0	55,0	21,0	0,388
	TPMT *1/*1 & MTHFR < 60%	32,0	56,0	52,0	
	TPMT*1/*3 & MTHFR > 60%	48,0	54,0	54,0	
	TPMT*1/*3 & MTHFR < 60%	50,0	55,0	51,0	

#### 4.8.1 APGAR 1

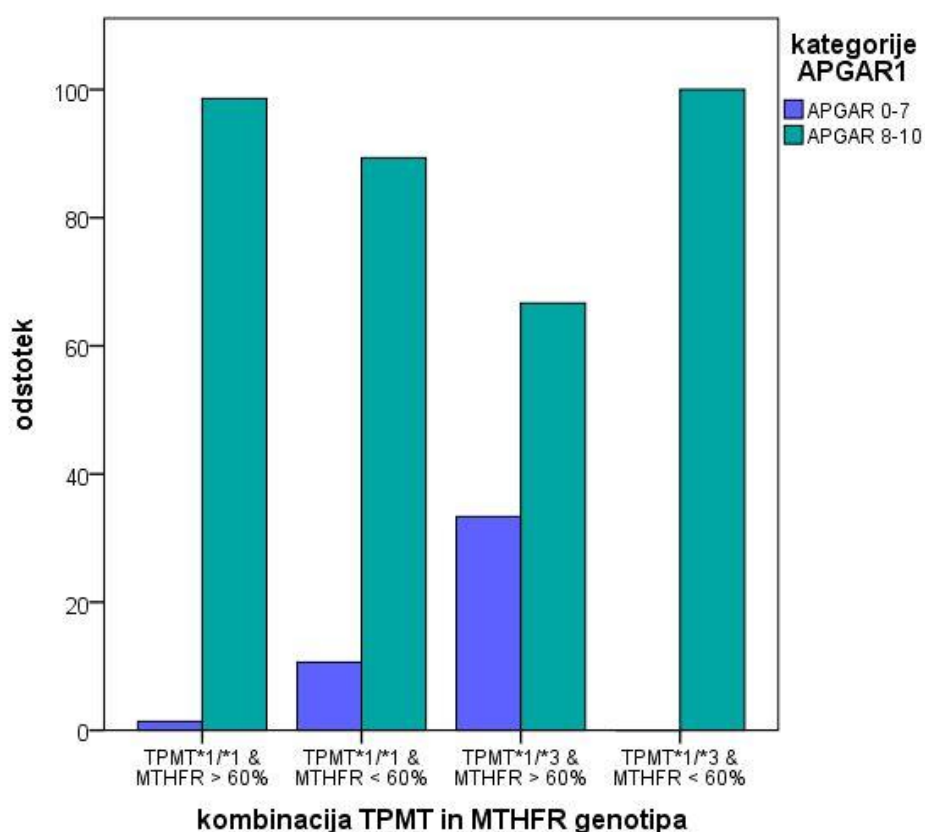
Tudi z neparametričnim Kruskal Wallis testom smo uspeli dokazati, da materina kombinacija *TPMT* in *MTHFR* genotipov najverjetneje vpliva na otrokov APGAR1 (**p=0,014**). Rezultati so prikazani v preglednici XV. Predhodno smo že dokazali, da na APGAR 1 vpliva genotip *MTHFR* (p=0,047), medtem ko za *TPMT* genotip tega nismo mogli dokazati (p=0,416). Iz preglednice XV pa je razvidno, da ima kombinacija obeh genotipov skupaj še večji vpliv na APGAR 1 in tudi na APGAR 10 kot vsak posamezen genotip.

Eden od možnih vzrokov za povezavo APGAR 1 z genotipom bi lahko bil vpliv mutacij *MTHFR* na žile. Zaradi mutacije *MTHFR* se poviša plazemska koncentracija homocisteina, kar je pomemben dejavnik tveganja pri žilnih boleznih. Predvidevamo, da bi to lahko rahlo

vplivalo na oceno videza novorojenčka in na njegove vitalne znake (srčni utrip, mišična aktivnost).

Spremenljivko APGAR 1 smo najprej obravnavali kot nenormalno porazdeljeno in jo analizirali s Kruskal Wallis testom, v nadaljevanju pa smo APGAR 1 preoblikovali v dve klinično relevantni kategoriji: APGAR 0-7 in APGAR 8-10 ter ju analizirali kot kategorični spremenljivki s Fisherjevim natančnim testom.

S Fisherjevim natančnim testom smo ugotovili, da kombinacija *TPMT* in *MTHFR* genotipa ne izraža povezave z abrupcijo posteljice ( $p=0,404$ ). Statistično značilno povezavo pa smo zaznali tudi med kombinacijo genotipoma *TPMT* in *MTHFR* ter dvema klinično pomembnima kategorijama **APGAR 1** ( $p=0,025$ ).



Slika 12: Porazdelitev TPMT in MTHFR genotipov v dveh klinično relevantnih APGAR 1 kategorijah.

Opazen je trend naraščanja pogostosti nižjih ocen APGAR 1 od manj proti bolj mutiranim genotipom *TPMT* in *MTHFR*, Slika 12. Ugotavljamo, da imajo verjetno otroci mater s kombinacijami genotipov, ki vodijo do nižje aktivnosti *TPMT* in *MTHFR*, tudi nižje APGAR 1 ocene.

Kljub značilni povezavi pa bi bile potrebne nadaljnje študije na večjem številu homo- in heterozigotnih nosečnic za gen *TPMT*. Naša pilotna študija bi lahko služila zgolj kot primer, da so spremembe prisotne in jih je potrebno še raziskati.

Pazljivost je potrebna tudi pri interpretaciji vrednosti APGAR1, ki predstavlja oceno izgleda novorojenčka v prvi minuti po rojstvu. Ocena je močno subjektivna in odvisna od izkušenosti medicinskega osebja. Na APGAR v prvi minuti po rojstvu otroka vplivajo še številni drugi dejavniki, med najpomembnejšimi so zdravila, poškodbe (travme), kongenitalne nepravilnosti, okužbe, hipoksije, hipovolemije in predčasni porodi (55).

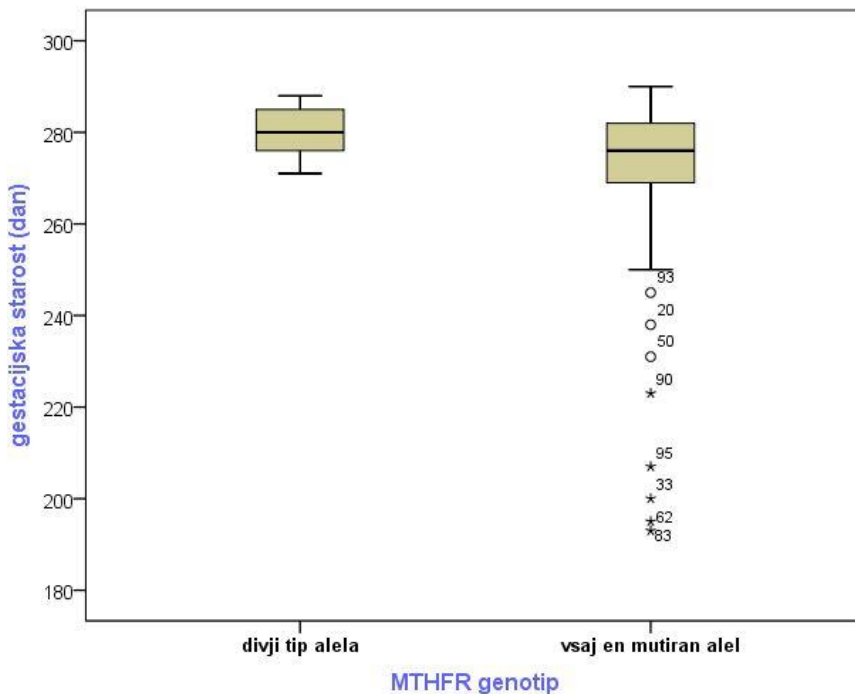
#### **4.8.2 Posteljica**

Mejno statistično značilnost smo opazili še pri vplivu kombinacije genotipov *TPMT* in *MTHFR* na vrsto posteljice (**p=0,099**). Predhodno smo že dokazali mejni vpliv genotipa *TPMT* (**p=0,077**) na vrsto posteljice, medtem ko samostojenega vpliva genotipov *MTHFR* nismo uspeli potrditi (p=0,847). Na podlagi rezultatov sklepamo, da na normalno posteljico oziroma na njene patološke oblike močnejše vpliva *TPMT* genotip, vendar pa ima določen vpliv tudi kombinacija *TPMT* in *MTHFR* genotipov. Če bi želeli vpliv potrditi bi rabili več preiskovank z mutacijami v *TPMT* genu.

#### **4.8.3 Gestacijska starost**

Statistično značilno razliko v gestacijski starosti otrok smo z Mann Whitney testom dokazali med preiskovankami z divjim tipom *MTHFR* alela ter preiskovankami z vsaj enim mutiranim alelom (**p=0,049**). Pri tej analizi smo *MTHFR* genotipe razvrstili v drugačne kategorije kot pri dosedanjih analizah.

Ugotovili smo, da novorojenčki mater, ki imajo divji tip *MTHFR* encima, dosegajo višjo gestacijsko starost ob rojstvu (Slika 13).



Slika 13: Graf odvisnosti gestacijske starosti od MTHFR genotipa.

Vpliva *TPMT* genotipa na gestacijsko starost nismo uspeli dokazati ( $p=0,181$ ), prav tako pa nam s Kruskal Wallis testom ni uspelo dokazati vpliva kombinacije *TPMT* in *MTHFR* genotipov na gestacijsko starost ( $p=0,393$ ).

Nadalje smo podatke o gestacijski starosti razdelili na dve kategoriji, na predčasni porod ( $< 37$  tednov) in porod ob terminu ( $\geq 37$  tednov). Podatke smo analizirali s Fisherjevim natančnim testom, ki pa ni pokazal statistično značilnih razlik med kategorijami *TPMT* genotipov ( $p=1,000$ ), *MTHFR* genotipov ( $p=0,613$ ) in kombinacij obeh genotipov ( $p=0,667$ ).

V literaturi najdemo podatke, da lahko polimorfizem gena *MTHFR 677* vpliva na povzročitev prezgodnjega poroda (50). Pri polimorfizmu *MTHFR* gena lahko pride do znižane aktivnosti encima, posledica znižane aktivnosti encima pa je zmanjšana metilacija homocisteina in njegovo kopičenje. Hiperhomocisteinemija sproži aktivacijo NADPH oksidaze in poviša nastajanje ROS, katere med drugim lahko poškodujejo sistem koagulacije in fibrinolize (50, 70). Višje koncentracije homocisteina pri materi vplivajo na uteroplacentarni krvni obtok in posledično na bolezni posteljice, kot so preeklampsija, spontani splav in abrupcija posteljice. Vsi ti zapleti pa lahko povzročijo rojstvo otroka pri nižji gestacijski starosti (56).

V raziskavah najdemo tudi druge podatke, da na gestacijsko starost pomembno vplivajo tudi nepravilnosti v sistemu koagulacije in fibrinolize (51). Vries in sodelavci (71) so v svoji študiji ugotovili, da zapleti nosečnosti, kot so abrupcija posteljice, intrauterina smrt zarodka in nizka gestacijska starost, lahko kažejo na metabolične in hemostatske zaplete pri materi. Še več, ti zapleti lahko vodijo v intravaskularno trombozo in pomembno vplivajo tudi na nadaljne izide nosečnosti.



## 5 Sklepi

- V pilotski študiji smo zaznali možen vpliv *TPMT* na kazalce oksidativnega stresa in z njim povezane izide nosečnosti, vendar je nujno potrebna replikacija na večjem številu preiskovancev.
- Najvišjo aktivnost SOD v eritrocitih mater smo ugotovili v skupini z mutiranimi *TPMT* genotipi in pri materah s kombinacijo genotipov z najnižjo aktivnostjo *TPMT* in *MTHFR* (*TPMT* \*1/\*3 in *MTHFR* < 60 %). To kaže na sinergistični vpliv obeh genov, verjetno preko vpliva encima *MTHFR* na koncentracijo SAM, ki je kofaktor in stabilizator encima *TPMT*.
- Najvišje koncentracije kazalnikov oksidativnega stresa PRL in DIY v urinu mater smo zaznali v skupini s kombinacijo genotipov *TPMT* \*1/\*3 in *MTHFR* > 60 %.
- Zaznali smo mejno značilen vpliv *TPMT* genotipa matere na lastnosti posteljice. Adherentna posteljica je bila bolj pogosta pri materah z genotipom divjega tipa, abruptivna pa pri tistih z mutiranimi genotipi.
- Maternalni genotipi *MTHFR*, ki znižajo aktivnost encima, so povezani z nižjimi APGAR 1 ocenami otroka. Ta vpliv je bolj izražen pri materah s polimorfizmi v genu za *TPMT*, ki vodijo v nižjo encimsko aktivnost.
- Otroci mater z *MTHFR* aleli divjega tipa dosegajo višjo gestacijsko starost kot tisti, katerih matere imajo vsaj en mutiran alel na dveh preiskovanih lokusih *MTHFR* gena.
- Rezultati imajo relevantnost tako v povezavi z raziskavami vpliva oksidativnega stresa na izide nosečnosti, kot tudi v kontekstu razjasnitve endogene funkcije encima *TPMT*.

## 6 Literatura in viri

1. Rodrigo R: Oxidative Stress and Antioxidants: Their Role in Human Disease, Nova Science Publishers Inc, New York, 2009: 1-25.
2. Pečar S, Mravljak J: Šumi življenja ali radikali in druge reaktivne snovi v telesu, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2015: 26-32, 77-96, 101-152, 199-230.
3. Rejc B, Kato Y, Karas-Kuželički N, Osredkar J, Geršak K: Lipid-lysine adducts and modified tyrosines as markers of oxidative stress in the second trimester of pregnancy and their association with infant characteristics. *Experimental and therapeutic medicine* 2016; 11(3): 797-805.
4. Sakai K, Kino S, Masuda A, Takeuchi M, Ochi T, Osredkar J: Determination of HEL (Hexanoyl-lysine adduct): a novel biomarker for omega-6 PUFA oxidation. *Sub-cellular biochemistry* 2014; 77: 61-72.
5. Mizuno K, Kataoka H. Analysis of urinary 8-isoprostane as an oxidative stress biomarker by stable isotope dilution using automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015;112:36-42.
6. Ilhan N, Celik E, Kumbak B. Maternal plasma levels of interleukin-6, C-reactive protein, vitamins C, E and A, 8-isoprostane and oxidative status in women with preterm premature rupture of membranes. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet.* 2015;28(3):316-9.
7. Mestan K, Matoba N, Arguelles L, Harvey C, Ernst LM, Farrow K, et al. Cord blood 8-isoprostane in the preterm infant. *Early Hum Dev.* 2012;88(8):683-9.
8. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of environmental science and health Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews* 2009; 27(2): 120-139.
9. Chandra N, Mehndiratta M, Banerjee B D, Guleria K, Tripathi A K: Idiopathic Fetal Growth Restriction: Repercussion of Modulation in Oxidative Stress. *Indian journal of clinical biochemistry* 2016; 31(1): 30-37.
10. Aksoy H, Aksoy A N, Ozkan A, Polat H: Serum lipid profile, oxidative status, and paraoxonase 1 activity in hyperemesis gravidarum. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2009; 23(2): 105-109.
11. Camkurt M A, Findikli E, Tolun F I, Bakacak M, Bal N G, Sakalli H: Probable preventive effects of placenta from oxidative stress; Evaluation of total antioxidant status, total oxidant status and oxidative stress index in fetal cord blood during the delivery. *Psychiatry research* 2016; 240: 222-225.

12. Rejc B, Karas-Kuželički N, Osredkar J, Geršak K: Correlation between markers of DNA and lipid oxidative damage in maternal and fetoplacental compartment in the mid-trimester of pregnancy. *Journal of perinatal medicine* 2016.
13. Avila J G O, Echeverri I, de Plata C A, Castillo A: Impact of oxidative stress during pregnancy on fetal epigenetic patterns and early origin of vascular diseases. *Nutrition Reviews* 2015; 73(1): 12-21.
14. Saker M, Soulimane Mokhtari N, Merzouk S A, Merzouk H, Belarbi B, Narce M: Oxidant and antioxidant status in mothers and their newborns according to birthweight. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2008 ;141(2): 95-99.
15. Orhon F S, Ulukol B, Kahya D, Cengiz B, Baskan S, Tezcan S: The influence of maternal smoking on maternal and newborn oxidant and antioxidant status. *European journal of pediatrics* 2009; 168(8): 975-981.
16. Agarwal A, Gupta S, Sikka S: The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Current opinion in obstetrics & gynecology* 2006; 18(3): 325-332.
17. Elvan-Taspinar A, Franx A, Bots M L, Koomans H A, Bruinse H W: Arterial stiffness and fetal growth in normotensive pregnancy. *American journal of hypertension* 2005; 18(3): 337-341.
18. Toescu V, Nuttall S L, Martin U, Nightingale P, Kendall M J, Brydon P: Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. *Clinical science* 2004; 106(1): 93-98.
19. Windham G C, Hopkins B, Fenster L, Swan S H: Prenatal active or passive tobacco smoke exposure and the risk of preterm delivery or low birth weight. *Epidemiology* 2000; 11(4): 427-433.
20. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M T, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2007; 39(1): 44-84.
21. Vlahos R, Bozinovski S: Glutathione peroxidase-1 as a novel therapeutic target for COPD. *Redox report: communications in free radical research*. 2013; 18(4): 142-149.
22. Sheshadri P, Kumar A: Managing odds in stem cells: insights into the role of mitochondrial antioxidant enzyme MnSOD. *Free Radic Res* 2016; 50(5): 570-584.
23. Halliwell B, Gutteridge J M C: *Free Radicals in Biology and Medicine*: OUP, Oxford 2015; 79-90.
24. Lebovitz R M, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Jr., Dionne L, Lu N: Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ;93(18): 9782-9787.

25. Li Y, Huang T T, Carlson E J, Melov S, Ursell P C, Olson J L: Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature genetics* 1995; 11(4): 376-381.
26. Troy C M, Shelanski M L: Down-regulation of copper/zinc superoxide dismutase causes apoptotic death in PC12 neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(14): 6384-6387.
27. Margis R, Dunand C in sodelavci: Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *The FEBS journal* 2008; 275(15): 3959-3970.
28. Wdowiak A, Brzozowski I, Bojar I: Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in pregnancy complicated by diabetes. *Annals of agricultural and environmental medicine* 2015; 22(2): 297-300.
29. Mistry HD, Gill CA, Kurlak LO in sodelavci: Association between maternal micronutrient status, oxidative stress, and common genetic variants in antioxidant enzymes at 15 weeks' gestation in nulliparous women who subsequently develop preeclampsia. *Free Radical Biology & Medicine* 2015; 78: 147-155.
30. Milek M, Šmid A, Mlinarič-Raščan I: Impact of thiopurine S-methyltransferase overexpression on cell redox capacity in hepG2 Cells. *European journal of Pharmaceutical Science* 2011; 44: 63-64.
31. Karas-Kuzelicki N, Šmid A, Tamm R, Metspalu A, Mlinarič-Raščan I: From pharmacogenetics to pharmacometabolomics: SAM modulates TPMT activity. *Pharmacogenomics* 2014; 15(11): 1437-1449.
32. Tamm R, Oselin K, Kallassalu K in sodelavci: Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) pharmacogenetics: three new mutations and haplotype analysis in the Estonian population. *Clinical Chemistry And Laboratory Medicine* 2008; 46(7): 974-979.
33. Karas-Kuželički N, Mlinarič-Raščan I: Individualization of thiopurine therapy: thiopurine S-methyltransferase and beyond. *Pharmacogenomics* 2009; 10(8): 1309-1322.
34. Ujiie S, Sasaki T, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M: Functional characterization of 23 allelic variants of thiopurine S-methyltransferase gene (TPMT\*2 - \*24). *Pharmacogenetics and genomics* 2008; 18(10): 887-893.
35. Appell M L, Berg J, Duley J, Evans W E, Kennedy M A, Lennard L: Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenetics and genomics* 2013; 23(4): 242-248.
36. Wang L, Pelleymounter L, Weinshilboum R, Johnson J A, Hebert J M, Altman R B: Very important pharmacogene summary: thiopurine S-methyltransferase. *Pharmacogenetics and genomics* 2010; 20(6): 401-405.
37. Szumlanski C, Otterness D, Her C, Lee D, Brandriff B, Kelsell D: Thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: human gene cloning and characterization of a common polymorphism. *DNA And Cell Biology* 1996; 15(1): 17-30.

38. McLeod H L, Pritchard S C, Githang'a J, Indalo A, Ameyaw M M, Powrie R H: Ethnic differences in thiopurine methyltransferase pharmacogenetics: evidence for allele specificity in Caucasian and Kenyan individuals. *Pharmacogenetics* 1999; 9(6): 773-776.
39. Wang L, Nguyen T V, McLaughlin R W, Sikkink L A, Ramirez-Alvarado M, Weinshilboum R M: Human thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: variant allozyme misfolding and aggresome formation. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 2005; 102(26): 9394-9399.
40. Tai H L, Krynetski E Y, Schuetz EG, Yanishevski Y, Evans W E: Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT\*3A, TPMT\*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 1997; 94(12): 6444-6449.
41. Liu K, Zhao R, Shen M, Ye J, Li X, Huang Y: Role of genetic mutations in folate-related enzyme genes on Male Infertility. *Scientific reports* 2015; 5: 1-13.
42. Žager U: Farmakogenetska analiza polimorfizma 677 C>T v genu za 5,10-metilentetrahidrofolatno reduktazo pri otrocih z akutno limfoblastno levkemijo 2007. Magistrsko delo. 15-25.
43. Goszcz K, Deakin SJ, Duthie GG, Stewart D, Leslie SJ, Megson IL: Antioxidants in Cardiovascular Therapy: Panacea or False Hope? *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2015; 2: 29-41.
44. Arenas M, Simpson G, Lewis C M, Shobowale-Bakre E-M, Escuredo E, Fairbanks L D: Genetic variation in the MTHFR gene influences thiopurine methyltransferase activity. *Clinical chemistry* 2005; 51(12): 2371-2374.
45. Lorenzo D, Botto Q Y: 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants and Congenital Anomalies: A HuGE Review. *American Journal of Epidemiology* 2000; 151: 862-876.
46. Nuckel H, Frey U H, Durig J, Duhrsen U, Siffert W.: Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene 677C>T and 1298A>C polymorphisms are associated with differential apoptosis of leukemic B cells in vitro and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2004; 18(11): 1816-1823.
47. Vidmar M, Gerželj J, Geršak Ksenija, Mlinarič-Raščan I: Spremenjena aktivnost encima 5,10-metiltetrahidrofolat reduktaze (MTHFR) kot dejavnik tveganja za številne bolezni. *Zdrav Vestnik* 2016; 85: 324-337.
48. Ogino S, Wilson R B: Genotype and haplotype distributions of MTHFR677C>T and 1298A>C single nucleotide polymorphisms: a meta-analysis. *Journal Of Human Genetics* 2003; 48(1): 1-7.
49. Jongbloet P H, Verbeek A L, den Heijer M, Roeleveld N: Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms resulting in suboptimal oocyte maturation: a discussion of folate status, neural tube defects,

- schizophrenia, and vasculopathy. *Journal of experimental & clinical assisted reproduction* 2008; 5: 5.
50. Nan Y, Li H: MTHFR genetic polymorphism increases the risk of preterm delivery. *International journal of clinical and experimental pathology* 2015; 8(6): 7397-7402.
  51. Erez O, Romero R, Vaisbuch E, Kusanović J P, Mazaki-Tovi S, Chaiworapongsa T: High tissue factor activity and low tissue factor pathway inhibitor concentrations in patients with preterm labor. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine: the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 2010; 23(1): 23-33.
  52. Ensing S, Schaaf J M, Abu-Hanna A, Mol B W J, Ravelli A C J: Recurrence risk of low Apgar score among term singletons: a population-based cohort study. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 2014; 93(9): 897-904.
  53. Committee Opinion No. 644: The Apgar Score. *Obstetrics and gynecology* 2015; 126 (4): 52-55.
  54. Internetni vir. Dostopano, oktober 2016, na <https://m.nichd.nih.gov/topics/labor-delivery/topicinfo/PublishingImages/apgar.jpg>.
  55. Li F, Wu T, Lei X, Zhang H, Mao M, Zhang J. The apgar score and infant mortality. *PloS one* 2013; 8(7): 1-8.
  56. Micle O, Muresan M, Antal L, Bodog F, Bodog A: The influence of homocysteine and oxidative stress on pregnancy outcome. *Journal of medicine and life* 2012; 5(1): 68-73.
  57. Internetni vir. Dostopano, november 2016, na <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/placental-abruption/multimedia/placental-abruption/img-20008593>.
  58. Martinez-Lopez J, Crooke A, Grande S, Ayala R, Jimenez-Velasco A, Gamarra S: Real-time PCR quantification of haematopoietic chimerism after transplantation: a comparison between TaqMan and hybridization probes technologies. *International journal of laboratory hematology* 2010; 32(1): 17-25.
  59. Shintani-Ishida K, Zhu B L, Maeda H: TaqMan fluorogenic detection system to analyze gene transcription in autopsy material. *Methods in molecular biology* 2014; 1105: 117-24.
  60. Internetni vir. Dostopano, november 2016, na <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/07/Taqman.png>.
  61. Hui L, DelMonte T, Ranade K: Genotyping using the TaqMan assay. *Current protocols in human genetics/editorial board* 2008; Chapter 2.
  62. Internetni vir. Dostopano, november 2016, na <http://slideplayer.com/slide/4643123/>.
  63. NanoDrop™ ND-1000 Spectrophotometer User's Manual. NanoDrop Technologies Inc, Rev 9. 2006.

64. Priročnik za uporabo Light Cycler® 480 System (Roche). Internetni vir. Dostopano, oktober 2016 na [http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/bio-chem/Core%20Facilities/Data/R401-core/LightCycler480%20II\\_Manual\\_V1.5.pdf](http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/bio-chem/Core%20Facilities/Data/R401-core/LightCycler480%20II_Manual_V1.5.pdf).
65. Field A: *Discovering Statistics using IBM SPSS Statistics*: Sage Publications Ltd, London, 2013: 952.
66. Rudolf C N: *ANOVA in practice, and complex ANOVA designs* 2004: 1-222.
67. Peyrin-Biroulet L, Guéant-Rodriguez R M, Chen M, Bronowicki J P, Bigard M A, Guéant J L: Association of MTRR 66A>G polymorphism with superoxide dismutase and disease activity in patients with Crohn's disease. *The American journal of gastroenterology* 2008; 103(2): 399-406.
68. Hsieh T T, Chen S F, Lo L M, Li M J, Yeh Y L, Hung T H: The association between maternal oxidative stress at mid-gestation and subsequent pregnancy complications. *Reprod Sci* 2012; 19(5): 505-512.
69. Schaeffeler E, Fischer C, Brockmeier D, Wernet D, Moerike K, Eichelbaum M: Comprehensive analysis of thiopurine S-methyltransferase phenotype-genotype correlation in a large population of German-Caucasians and identification of novel TPMT variants. *Pharmacogenetics* 2004; 14(7): 407-417.
70. Chakraborty P, Goswami S K, Rajani S, Sharma S, Kabir S N, Chakravarty B: Recurrent pregnancy loss in polycystic ovary syndrome: role of hyperhomocysteinemia and insulin resistance. *PloS one* 2013; 8(5): 1-6.
71. De Vries J I, Dekker G A, Huijgens P C, Jakobs C, Blomberg B M, van Geijn H P: Hyperhomocysteinaemia and protein S deficiency in complicated pregnancies. *British journal of obstetrics and gynaecology* 1997; 104(11): 1248-1254.

## 7 Priloge

**Priloga 1:** Meritve koncentracije DNA izoliranih vzorcev na aparaturi Nanodrop. Zadnja dva stolpca vsebujeta izračunano prostornino DNA raztopine in vode za pripravo 30 $\mu$ l vzorca s koncentracijo DNA 4 ng/ $\mu$ l.

Šifra vzorca	[ng/ $\mu$ l]	A260	A280	260/280
2016_1	26,47	0,529	0,293	1,81
2016_2	6,43	0,129	0,061	2,1
2016_3	22,25	0,445	0,237	1,88
2016_4	9,21	0,184	0,085	2,18
2016_5	11,25	0,225	0,121	1,87
2016_6	7,67	0,153	0,074	2,07
2016_7	8,9	0,178	0,112	1,58
2016_8	7,64	0,153	0,093	1,64
2016_9	8,55	0,171	0,083	2,06
2016_10	13,69	0,274	0,157	1,74
2016_11	17,7	0,354	0,204	1,74
2016_12	14,57	0,291	0,162	1,79
2016_13	14,32	0,286	0,167	1,72
2016_14	22,79	0,456	0,263	1,73
2016_15	18,91	0,378	0,237	1,59
2016_16	11,52	0,23	0,127	1,81
2016_17	20,06	0,401	0,252	1,59
2016_18	11,82	0,236	0,144	1,64
2016_19	24,81	0,496	0,288	1,72
2016_20	11,3	0,226	0,137	1,64
2016_21	5,34	0,107	0,068	1,57
2016_22	10,32	0,206	0,146	1,41
2016_23	4,34	0,087	0,054	1,61
2016_24	7,4	0,148	0,077	1,93



<b>2016_25</b>	11,1	0,222	0,134	1,66
<b>2016_26</b>	6,39	0,128	0,066	1,92
<b>2016_27</b>	9,5	0,19	0,107	1,78
<b>2016_28</b>	18,77	0,375	0,203	1,85
<b>2016_29</b>	24,44	0,489	0,283	1,73
<b>2016_30</b>	20,95	0,419	0,259	1,62
<b>2016_31</b>	9,24	0,185	0,088	2,11
<b>2016_32</b>	9,58	0,192	0,088	2,19
<b>2016_33</b>	18,36	0,367	0,219	1,68
<b>2016_34</b>	11,45	0,229	0,125	1,84
<b>2016_35</b>	14,94	0,299	0,183	1,63
<b>2016_36</b>	10,59	0,212	0,1	2,13
<b>2016_37</b>	13,92	0,278	0,168	1,65
<b>2016_38</b>	13,82	0,276	0,179	1,54
<b>2016_39</b>	9,54	0,191	0,101	1,89
<b>2016_40</b>	8,46	0,169	0,096	1,76
<b>2016_41</b>	6,19	0,124	0,055	2,25
<b>2016_42</b>	19,58	0,392	0,202	1,94
<b>2016_43</b>	8,5	0,17	0,072	2,38
<b>2016_44</b>	7,89	0,158	0,111	1,43
<b>2016_45</b>	9,49	0,19	0,089	2,13
<b>2016_46</b>	10,27	0,205	0,091	2,25
<b>2016_47</b>	6,92	0,138	0,054	2,56
<b>2016_48</b>	15,52	0,31	0,174	1,78
<b>2016_49</b>	9,03	0,181	0,127	1,42
<b>2016_50</b>	23,79	0,476	0,262	1,82
<b>2016_51</b>	16,99	0,34	0,196	1,73
<b>2016_52</b>	7,48	0,15	0,089	1,67
<b>2016_53</b>	15,67	0,313	0,166	1,88
<b>2016_54</b>	8,47	0,169	0,106	1,6

<b>2016_55</b>	21,2	0,424	0,24	1,77
<b>2016_56</b>	22,95	0,459	0,264	1,74
<b>2016_57</b>	11,97	0,239	0,121	1,98
<b>2016_58</b>	17,72	0,354	0,21	1,69
<b>2016_59</b>	7,04	0,141	0,068	2,06
<b>2016_60</b>	10,72	0,214	0,135	1,59
<b>2016_61</b>	13,08	0,262	0,16	1,64
<b>2016_62</b>	23,15	0,463	0,265	1,75
<b>2016_63</b>	19,21	0,384	0,206	1,86
<b>2016_64</b>	11,06	0,221	0,089	2,49
<b>2016_65</b>	9,5	0,19	0,126	1,5
<b>2016_66</b>	9,37	0,187	0,117	1,61
<b>2016_67</b>	11,25	0,225	0,125	1,8
<b>2016_68</b>	11,89	0,238	0,127	1,87
<b>2016_69</b>	10,17	0,203	0,13	1,56
<b>2016_70</b>	63,41	1,268	0,693	1,83
<b>2016_71</b>	33,84	0,677	0,344	1,97
<b>2016_72</b>	20,46	0,409	0,245	1,67
<b>2016_73</b>	19,6	0,392	0,23	1,7
<b>2016_74</b>	11,98	0,24	0,129	1,86
<b>2016_75</b>	27,79	0,556	0,276	2,01
<b>2016_76</b>	6,06	0,121	0,074	1,65
<b>2016_77</b>	6,08	0,122	0,069	1,77
<b>2016_78</b>	5,19	0,104	0,053	1,97
<b>2016_79</b>	12,58	0,252	0,132	1,91
<b>2016_80</b>	8,39	0,168	0,087	1,93
<b>2016_81</b>	49,58	0,992	0,533	1,86
<b>2016_82</b>	27,27	0,545	0,29	1,88
<b>2016_83</b>	29,15	0,583	0,303	1,92
<b>2016_84</b>	43,12	0,862	0,491	1,76

<b>2016_85</b>	18,22	0,364	0,234	1,55
<b>2016_86</b>	5,96	0,119	0,077	1,56
<b>2016_87</b>	3,79	0,076	0,056	1,35
<b>2016_88</b>	6,88	0,138	0,09	1,53
<b>2016_89</b>	7,62	0,152	0,098	1,55
<b>2016_90</b>	18,93	0,379	0,22	1,72
<b>2016_91</b>	11,07	0,221	0,143	1,55
<b>2016_92</b>	5,92	0,118	0,083	1,43
<b>2016_93</b>	9,29	0,186	0,128	1,45
<b>2016_94</b>	8,72	0,174	0,136	1,29
<b>2016_95</b>	6,61	0,132	0,102	1,3
<b>2016_96</b>	12,2	0,244	0,159	1,53
<b>2016_97</b>	9,03	0,181	0,134	1,35
<b>2016_98</b>	17,62	0,352	0,198	1,78
<b>2016_99</b>	5,83	0,117	0,1	1,16
<b>2016_100</b>	20,97	0,419	0,241	1,74
<b>2016_101</b>	6,51	0,13	0,086	1,52
<b>2016_102</b>	18,48	0,37	0,212	1,75
<b>2016_103</b>	10,68	0,214	0,149	1,43
<b>2016_104</b>	4,19	0,084	0,057	1,48
<b>2016_105</b>	7,71	0,154	0,102	1,51
<b>2016_106</b>	27,05	0,541	0,329	1,64
<b>2016_107</b>	19,82	0,396	0,214	1,85
<b>2016_108</b>	20,91	0,418	0,277	1,51
<b>2016_109</b>	20,4	0,408	0,249	1,64
<b>2016_110</b>	17,6	0,352	0,207	1,7
<b>2016_111</b>	12,67	0,253	0,157	1,62
<b>2016_112</b>	30,3	0,606	0,361	1,68
<b>2016_113</b>	28,28	0,566	0,337	1,68
<b>2016_114</b>	39,15	0,783	0,409	1,91

<b>2016_115</b>	17,57	0,351	0,183	1,92
<b>2016_116</b>	18,12	0,362	0,219	1,65
<b>2016_117</b>	11,94	0,239	0,135	1,77
<b>2016_118</b>	15,73	0,315	0,169	1,86
<b>2016_119</b>	15,84	0,317	0,202	1,57
<b>2016_120</b>	22,63	0,453	0,247	1,83
<b>2016_121</b>	36,82	0,736	0,41	1,8
<b>2016_122</b>	5,26	0,105	0,06	1,75
<b>2016_123</b>	22,66	0,453	0,247	1,83
<b>2016_124</b>	17,72	0,354	0,195	1,82
<b>2016_125</b>	29,63	0,593	0,291	2,04
<b>2016_126</b>	28,95	0,579	0,337	1,72
<b>2016_127</b>	12,11	0,242	0,15	1,61
<b>2016_128</b>	8,54	0,171	0,092	1,86
<b>2016_129</b>	23,26	0,465	0,285	1,64
<b>2016_130</b>	17,65	0,353	0,2	1,76
<b>2016_131</b>	26,18	0,524	0,303	1,73
<b>2016_132</b>	9,21	0,184	0,114	1,61
<b>2016_133</b>	25,36	0,507	0,307	1,65
<b>2016_134</b>	20,28	0,406	0,234	1,74
<b>2016_135</b>	12,51	0,25	0,131	1,91
<b>2016_136</b>	13,28	0,266	0,165	1,61
<b>2016_137</b>	11,17	0,223	0,131	1,71
<b>2016_138</b>	43,25	0,865	0,493	1,76
<b>2016_139</b>	28,7	0,574	0,309	1,86
<b>2016_140</b>	16,35	0,327	0,166	1,97
<b>2016_141</b>	23,96	0,479	0,267	1,8
<b>2016_142</b>	45,32	0,906	0,528	1,72
<b>2016_143</b>	14,37	0,287	0,16	1,79
<b>2016_144</b>	14,65	0,293	0,165	1,77

2016_145	46,64	0,933	0,526	1,77
2016_146	16,28	0,326	0,2	1,63
2016_147	26,63	0,533	0,319	1,67

**Priloga 2:** Rezultati genotipizacij *MTHFR 677 C>T*, *MTHFR 1298 A>C*, *TPMT\*2*, *TPMT\*3B*, *TPMT\*3C*.

Šifra vzorca	MTHFR 677 C>T	MTHFR 1298 A>C	TPMT *1/*1 , *1/*3A ali *1/*3C
2016_1	CC	AA	*1/*1
2016_2	CT	AC	*1/*1
2016_3	CC	AA	*1/*1
2016_4	CT	AA	*1/*1
2016_5	CC	AC	*1/*1
2016_6	CT	AC	*1/*1
2016_7	CC	AA	*1/*1
2016_8	CT	AC	*1/*1
2016_9	CC	AC	*1/*1
2016_10	CC	CC	*1/*1
2016_11	CT	AA	*1/*1
2016_12	CC	AC	*1/*1
2016_13	CT	AC	*1/*1
2016_14	CT	AA	*1/*1
2016_15	CT	AC	*1/*1
2016_16	CT	AC	*1/*1
2016_17	CC	CC	*1/*1
2016_18	CC	AA	*1/*1
2016_19	CC	AC	*1/*1
2016_20	CC	AA	*1/*1
2016_21	CC	AC	*1/*1
2016_22	CT	AA	*1/*1

2016_23	CC	CC	*1/*1
2016_24	CC	CC	*1/*3A
2016_25	CT	AC	*1/*1
2016_26	CT	AA	*1/*1
2016_27	CC	AC	*1/*1
2016_28	CC	AC	*1/*1
2016_29	CC	AC	*1/*1
2016_30	CC	AA	*1/*1
2016_31	TT	AA	*1/*1
2016_32	TT	AA	*1/*1
2016_33	CC	CC	*1/*1
2016_34	TT	AA	*1/*3C
2016_35	CT	AC	*1/*1
2016_36	CC	AC	*1/*1
2016_37	CC	AA	*1/*1
2016_38	CC	AC	*1/*1
2016_39	CT	AC	*1/*1
2016_40	CC	AC	*1/*1
2016_41	CC	AC	*1/*1
2016_42	CC	AA	*1/*1
2016_43	CT	AA	*1/*1
2016_44	CC	CC	*1/*1
2016_45	CT	AC	*1/*1
2016_46	CC	AC	*1/*1
2016_47	CT	AC	*1/*1
2016_48	CT	AC	*1/*3A
2016_49	CT	AC	*1/*1
2016_50	CT	AC	*1/*1
2016_51	CT	AC	*1/*3A
2016_52	CT	AA	*1/*1

2016_53	CT	AC	*1/*1
2016_54	CT	AC	*1/*3A
2016_55	CT	AC	*1/*1
2016_56	CT	AA	*1/*1
2016_57	CC	CC	*1/*1
2016_58	TT	AA	*1/*1
2016_59	CC	AA	*1/*3A
2016_60	CT	AA	*1/*1
2016_61	CC	AC	*1/*1
2016_62	CT	AA	*1/*1
2016_63	CT	AA	*1/*1
2016_64	CC	CC	*1/*1
2016_65	CT	AC	*1/*1
2016_66	CT	AA	*1/*1
2016_67	CT	AA	*1/*1
2016_68	CT	AA	*1/*1
2016_69	CC	CC	*1/*3A
2016_70	TT	AA	*1/*1
2016_71	CT	AC	*1/*1
2016_72	CT	AA	*1/*1
2016_73	CT	AA	*1/*1
2016_74	CC	AA	*1/*1
2016_75	CC	CC	*1/*1
2016_76	CT	AC	*1/*1
2016_77	CC	AC	*1/*1
2016_78	CC	AC	*1/*1
2016_79	CC	AA	*1/*1
2016_80	CC	AC	*1/*1
2016_81	CT	AA	*1/*1
2016_82	CT	AA	*1/*1

2016_83	TT	AA	*1/*1
2016_84	CT	AA	*1/*1
2016_85	TT	AA	*1/*1
2016_86	TT	AA	*1/*1
2016_87	CT	AC	*1/*1
2016_88	CC	AA	*1/*1
2016_89	CT	AA	*1/*1
2016_90	CC	AC	*1/*1
2016_91	CT	AC	*1/*1
2016_92	TT	AA	*1/*1
2016_93	CC	AC	*1/*1
2016_94	CT	AC	*1/*1
2016_95	CC	CC	*1/*1
2016_96	CC	AC	*1/*1
2016_97	CT	AA	*1/*1
2016_98	TT	AA	*1/*1
2016_99	CT	AC	*1/*1
2016_100	CC	AC	*1/*1
2016_101	TT	AA	*1/*3A
2016_102	TT	AA	*1/*1
2016_103	CC	AC	*1/*1
2016_104	CC	CC	*1/*1
2016_105	CC	AA	*1/*1
2016_106	CC	CC	*1/*1
2016_107	CT	AC	*1/*1
2016_108	CC	CC	*1/*1
2016_109	CC	AC	*1/*1
2016_110	CC	AC	*1/*1
2016_111	CC	AC	*1/*1
2016_112	CT	AC	*1/*1



2016_113	TT	AA	*1/*1
2016_114	CT	AC	*1/*1
2016_115	CC	CC	*1/*1
2016_116	CT	AA	*1/*1
2016_117	TT	AA	*1/*1
2016_118	CC	AC	*1/*1
2016_119	CT	AC	*1/*1
2016_120	CT	AA	*1/*1
2016_121	CT	AC	*1/*1
2016_122	CT	AC	*1/*1
2016_123	CC	AC	*1/*1
2016_124	CT	AC	*1/*1
2016_125	CT	AC	*1/*3A
2016_126	CT	AA	*1/*1
2016_127	CC	AC	*1/*1
2016_128	TT	AA	*1/*1
2016_129	CT	AC	*1/*1
2016_130	CT	AC	*1/*1
2016_131	CC	AC	*1/*1
2016_132	CC	AA	*1/*1
2016_133	TT	AA	*1/*1
2016_134	CT	AA	*1/*1
2016_135	TT	AA	*1/*1
2016_136	TT	AA	*1/*1
2016_137	TT	AA	*1/*1
2016_138	CT	AA	*1/*1
2016_139	CT	AA	*1/*1
2016_140	CC	AC	*1/*1
2016_141	CC	AC	*1/*1
2016_142	CT	AA	*1/*1

<b>2016_143</b>	TT	AC	*1/*1
<b>2016_144</b>	CT	AC	*1/*1
<b>2016_145</b>	CT	AA	*1/*1
<b>2016_146</b>	CC	AA	*1/*1
<b>2016_147</b>	TT	AA	*1/*1

\*Oznaka TPMT\*1/\*1 predstavlja divji tip alela, oznaka TPMT\*1/\*3A predstavlja heterozigotni tip alela TPMT\*3B in \*3C, oznaka TPMT \*1/\*3C pa heterozigotni tip alela TPMT\*3C.