

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

REBEKA AHAČIČ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

REBEKA AHAČIČ

**DOLOČANJE HEKSANOILLIZINA, PROPANOILLIZINA,
DITIROZINA IN NITROTIROZINA KOT OZNAČEVALCEV
OKSIDATIVNEGA STRESA V URINU IN AMNIJSKI
TEKOČINI NOSEČNIC**

**IDENTIFICATION OF HEXANOYL-LYSINE, PROPANOYL-LYSINE,
DITYROSINE AND NITROTYROSINE AS OXIDATIVE STRESS MARKERS IN
URINE AND AMNIOTIC FLUID OF PREGNANT WOMEN**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Meritve so bile opravljene na različnih oddelkih inštituta JaICA (Japan Institute for the Control of Aging, Fukuroi, Japan). Določitev koncentracije heksanoillizina in celokupne antioksidantne kapacitete pa smo izvedli v UKC Ljubljana na Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo.

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Jošku Osredkarju, ki mi je omogočil izvedbo diplomske naloge ter za pomoč in vodenje le-te.

Zahvala gre prav tako vsem mojim bližnjim, ki so mi stali ob strani in me kakorkoli spodbujali pri nastajanju tega diplomskega dela.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Rebeka Ahačič

Ljubljana, 2013

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Samo Kreft

Članica diplomske komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar

KAZALO

SEZNAM TABEL.....	iii
SEZNAM SLIK.....	iv
SEZNAM GRAFOV.....	iv
POVZETEK.....	v
ABSTRACT.....	vi
1 UVOD.....	1
1.1 OKSIDATIVNI STRES.....	2
1.2 REAKTIVNE KISIŠKOVE ZVRSTI.....	3
1.2.1 Radikalske vrste kisika.....	4
1.2.2 Neradikalske vrste kisika.....	4
1.2.3 Nastanek radikalov.....	5
1.2.4 Reakcije radikalov.....	6
1.2.5 Nastanek ROS v fizioloških procesih.....	7
1.2.6 Učinki ROS v patoloških procesih.....	8
1.3 REAKTIVNE DUŠIKOVE ZVRSTI.....	10
1.4 DEJAVNIKI POVEČANJA OKSIDATIVNEGA STRESA.....	10
1.5 ANTIOKSIDANTNI SISTEM.....	11
1.5.1 Encimski antioksidantni sistem.....	11
1.5.2 Neencimski antioksidantni sistem.....	12
1.6 NOSEČNOST IN OKSIDATIVNI STRES.....	13
1.6.1 Vloga reaktivnih kisikovih zvrsti v nosečnosti.....	14
1.6.2 Zapleti v nosečnosti in oksidativni stres.....	14
1.6.3 Ocena oksidativnega stresa v nosečnosti.....	17
2 NAMEN DELA.....	24
3 SKUPINA PREISKOVANK.....	26
4 MATERIALI IN METODE.....	27
4.1 ELISA za določevanje HEL (heksanoillizina).....	27
4.1.1 Princip metode.....	27
4.1.2 Priprava vzorca.....	28
4.1.3 Reagenti in oprema.....	28
4.1.4 Aparature in ostali pripomočki.....	29

4.1.5	Postopek kvantitativnega določanja HEL.....	29
4.2	Reagenčni komplet za določevanje TAC (celokupne antioksidantne kapacitete)	31
4.2.1	Princip metode.....	31
4.2.2	Priprava vzorca.....	32
4.2.3	Reagenti in oprema.....	32
4.2.4	Aparature in ostali pripomočki.....	33
4.2.5	Postopek določanja celokupne antioksidantne kapacitete.....	33
4.3	Statistične metode.....	34
4.3.1	Korelacija.....	34
4.3.2	T-test za neodvisna vzorca.....	34
5	REZULTATI.....	36
6	RAZPRAVA.....	65
7	SKLEP.....	71
8	LITERATURA.....	73

SEZNAM TABEL

Tabela I: Pomembne reaktivne kisikove zvrsti.....	3
Tabela II: Opisne statistike za metodi ELISA in LC-MS/MS.....	37
Tabela III: Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije za metodi ELISA in LC-MS/MS in enačba regresijske premice	39
Tabela IV: Opisne statistike BMI za URIN.....	40
Tabela V: Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije med BMI in spremenljivkami s področja URIN.....	40
Tabela VI: Opisne statistike BMI in AMNIJSKA TEKOČINA	41
Tabela VII: Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije med BMI in spremenljivkami s področja AMNIJSKE TEKOČINE.....	42
Tabela VIII: Osnovne opisne statistike sklopa URIN glede na to, ali je BMI do 25 kg/m ² ali pa nad 25 kg/m ²	43
Tabela IX: T-test sklopa URIN glede na to, ali je BMI do 25 kg/m ² ali nad 25 kg/m ²	44
Tabela X: Osnovne opisne statistike področja AMNIJSKA TEKOČINA glede na to, ali je BMI do 25 kg/m ² ali pa nad 25 kg/m ²	46
Tabela XI: T-test sklopa AMNIJSKA TEKOČINA glede na to, ali je BMI do 25 kg/m ² ali nad 25 kg/m ²	47
Tabela XII: Opisne statistike STAROST za področje URIN	49
Tabela XIII: Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije med STAROSTJO in spremenljivkami s področja URIN	49
Tabela XIV: Opisne statistike STAROST in skupine AMNIJSKA TEKOČINA	50
Tabela XV: Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije med STAROSTJO in skupino AMNIJSKA TEKOČINA.....	50
Tabela XVI: Osnovne opisne statistike področja URIN glede na to, ali je STAROST do 37 ali pa nad 37 let.....	52
Tabela XVII: T-test sklopa URIN glede na to, ali je STAROST do 37 ali nad 37 let	52
Tabela XVIII: Osnovne opisne statistike področja AMNIJSKA TEKOČINA glede na to, ali je STAROST do 37 ali pa nad 37 let.....	54
Tabela XIX: T-test sklopa AMNIJSKE TEKOČINE glede na to, ali je STAROST do 37 ali pa nad 37 let.....	55
Tabela XX: Opisne statistike spremenljivk, uporabljenih pri testiranju hipoteze H ₆	57

Tabela XXI: Izračun Spearmanovega ali Pearsonovega koeficienta korelacije med spremenljivkami, uporabljenimi pri testiranju hipoteze H6	58
Tabela XXII: Osnovne opisne statistike sklopa URIN glede na to, ali je vzorec brez anomalij ali vzorec sestoji samo iz anomalij	61
Tabela XXIII: T-test neodvisnih spremenljivk skupine URIN	62
Tabela XXIV: Osnovne opisne statistike sklopa AMNIJSKA TEKOČINA glede na to, ali je vzorec brez anomalij ali vzorec sestoji samo iz anomalij.....	63
Tabela XXV: T-test neodvisnih spremenljivk skupine AMNIJSKA TEKOČINA.....	64

SEZNAM SLIK

Slika 1: Nastanek HEL in PRL.....	18
Slika 2: Nastanek ditirozina.....	21
Slika 3: Nastanek nitrotirozina	22
Slika 4: Princip metode ELISA	27
Slika 5: Sestava reagenčnega kompleta za metodo ELISA.....	29
Slika 6: Princip metode za določevanje TAC.....	31
Slika 7: Sestava reagenčnega kompleta za določevanje TAC.....	32

SEZNAM GRAFOV

Graf 1: Histogram frekvenčne porazdelitve ELISA-HEL.....	38
Graf 2: Histogram frekvenčne porazdelitve LC-MS/MS-HEL	38
Graf 3: Kvantilni diagram s prikazom porazdelitve meritev U-DYI (nmol/mmol kreatinin) pri BMI $\leq 25 \text{ kg/m}^2$ oz. BMI $> 25 \text{ kg/m}^2$	45
Graf 4: Kvantilni diagram s prikazom porazdelitve meritev U-LC-MS/MS (nmol/mmol kreatinin) pri BMI $\leq 25 \text{ kg/m}^2$ oz. BMI $> 25 \text{ kg/m}^2$	45
Graf 5: Kvantilni diagram s prikazom porazdelitve meritev U-ELISA-HEL (nmol/mmol kreatinin) pri starosti ≤ 37 let oz. > 37 let	53
Graf 6: Kvantilni diagram s prikazom porazdelitve meritev PRL (nM) pri starosti ≤ 37 let oz. > 37 let	55

POVZETEK

Oksidativni stres je neizogibno povezan z našim življenjem. Tako v fizioloških kot patoloških razmerah igrajo reaktivne kisikove zvrsti pomembno vlogo. Nosečnost je sama po sebi fiziološko stanje povečanega oksidativnega stresa zaradi povečane metabolične aktivnosti. Sistem oksidantov in antioksidantov se lahko poruši, kar privede do različnih patoloških izidov. Biokemično okolje matere je zelo pomembno za razvoj ploda. Problem se pokaže v tem, da oksidativnega stresa ne moremo meriti, lahko zaznamo le njegove posledice. Radikali so namreč dokaj kratkoživi, zato lahko merimo le produkte reaktivnih kisikovih zvrsti z biološkimi molekulami.

V okviru naše diplome smo ugotavljali medsebojno odvisnost pojavljanja določenih kazalcev oksidativnega stresa tako v urinu kot v amnijski tekočini. Amniocenteza je namreč invaziven in neprijeten poseg za nosečnico. Naš namen je bil ugotoviti, če rezultati iz urina korelirajo z rezultati iz amnijske tekočine. V preiskavo smo zajeli 129 nosečnic med 16. in 19. tednom nosečnosti. Določali smo heksanoillizin in propanoillizin, ki sta kazalca poškodbe lipidov, ditirozin in nitrotirozin, ki kažeta na poškodbe proteinov, ter celokupno antioksidantno kapaciteto, ki kaže na celoten antioksidantni status v organizmu. Največ korelacij z ostalimi označevalci se je izkazalo pri ditirozinu določenem v urinu. Heksanoillizin smo določali z encimsko imunsko metodo ELISA, ki je hitra in cenovno ugodna, in primerjali rezultate s tekočinsko kromatografijo s tandemsko masno spektroskopijo (LC-MS/MS, meritve opravljene na inštitutu JaICA). Ugotovili smo, da obstaja pozitivna korelacija med omenjenima metodama. Celokupno antioksidantno kapaciteto smo določali z za to namenjenim reagenčnim kompletom (Jaica, Fukuroi, Japan, kataloška številka KPA-050), ostale kazalce pa z metodo LC-MS/MS (meritve, opravljene na inštitutu JaICA). Proučevali smo tudi vpliv indeksa telesne mase in starosti nosečnice na pojavljanje kazalcev oksidativnega stresa in prišli do rezultatov, ki so bili v nasprotju z našimi pričakovanji. Vse, razen štirih nosečnosti (dva otroka sta se rodila z Downovim sindromom, en z Edwardsovim sindromom in en z avtizmom), so se zaključile normalno, zato smo poskušali ugotoviti, če je bil oksidativni stres med nosečnostjo v teh štirih primerih kakorkoli povišan, vendar se je izkazalo, da ni signifikantnih razlik v primerjavi z nosečnicami pri katerih se je nosečnost zaključila normalno. Zaključimo lahko, da v določenih primerih govorimo o statistično značilnih korelacijah, vsekakor pa bi bile potrebne še dodatne raziskave in vključitev več parametrov.

ABSTRACT

Oxidative stress is inevitably connected to our lives since reactive oxygen species play an important role in both physiological and pathological circumstances. Pregnancy in itself is a physiological state of increased oxidative stress as a result of more intensive metabolic activity. The system of oxidants and antioxidants can collapse, which can lead to various pathological outcomes. The mother's biochemical environment is vital for fetal development. The problem is that it is impossible to measure oxidative stress; we can only recognize its consequences. We can measure the products of reactive oxygen species with biological molecules because radicals are quite short-lived.

In the thesis we tried to establish the interdependence of occurrence of certain indicators of oxidative stress in urine and amniotic fluid. For a pregnant woman amniocentesis is an invasive and unpleasant procedure. Our goal was to determine whether the results from urine samples correlate to the results from amniotic fluid samples. The research involved 129 women who were 16–19 week pregnant. We tried to detect the following: hexanoyl-lysine and propanoyl-lysine pointing to oxidative damage of lipids; dityrosine and nitrotyrosine indicating protein damage; and the total antioxidant capacity reflecting the general antioxidant status in the organism. Most correlations with other markers have been shown to dityrosine determined in the urine. We determined hexanoyl-lysine using the enzymatic immune method ELISA, which is fast and inexpensive, and compared the results with liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS/MS, measurements performed at the Japan Institute for the Control of Aging–JaICA). We found that there is a positive correlation between these two methods. The total antioxidant capacity was detected with a test kit designed for this purpose (JaICA, Fukuroi, code KPA-050), while other indicators were determined with LC-MS/MS (measurements performed at JaICA). In addition, we examined the influence of body mass index and the age of the pregnant women on the occurrence of indicators of oxidative stress and we have come up with results that were contrary to our expectations. All pregnancies except for four ended normally (two babies were born with Down syndrome, one with Edwards syndrome and one with autism). To this end, we attempted to establish whether oxidative stress increased in any way during the four pregnancies, but it turned out that there is no significant difference in comparison with pregnant women whose pregnancy ended normally. We can conclude that it is possible to draw statistically significant correlations in certain cases, but additional research involving more parameters is required.

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	adenozin trifosfat
BMI	indeks telesne mase (angl. body mass index)
BSA	goveji serumski albumin
CAT	katalaza
COX	ciklooksigenaza
DHA	dokozaheksaenojska kislina
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DNFH	dinitrofenilhidrazin
DYI	ditirozin
ELISA	encimsko imunsko metoda na trdnem nosilcu (angl. enzyme linked immuno sorbent assay)
ELISA-HEL	heksanoillizin, določen z metodo ELISA
EPA	eikozapentaenojska kislina
GC-MS/MS	plinska kromatografija s tandemsko masno spektroskopijo
GPx	glutation-peroksidaza
GR	glutation-reduktaza
GSH	glutation
GSSG	glutation disulfid
HEL	heksanoillizin
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. high-performance liquid chromatography)
JaICA	Japan Institute for the Control of Aging
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija s tandemsko masno spektroskopijo
LC-MS/MS-HEL	heksanoillizin, določen z metodo LC-MS/MS
LDL	lipoproteini majhne gostote
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NO	dušikov oksid
p	vrednost signifikance
PRL	propanoillizin
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (angl. reactive oxygen species)
rpm	obratov na minuto (angl. rotations per minute)

SA	superoksidni anion
SOD	superoksid-dismutaza
TAC	celokupna antioksidantna kapaciteta
TrxP	tioredoksin-peroksidaza
TrxR	tioredoksin-reduktaza
U-DYI	ditirozin, določen v urinu
U-ELISA-HEL	heksanoillizin, določen z metodo ELISA v urinu
U-LC-MS/MS-HEL	heksanoillizin, določen z metodo LC-MS/MS v urinu
U-PRL	propanoillizin, določen v urinu
UV	ultravijolično valovanje

1 UVOD

Pred dvema milijardama let je na Zemlji prevladovalo anaerobno življenje. Tedaj se je zgodila ena najhujših ekoloških katastrof, saj je delež kisika v ozračju dosegel okrog 10 odstotkov, kar je bilo pogubno za anaerobne organizme. Kisik je reagiral z biomolekulami in jih inaktiviral ali kako drugače poškodoval. Največ poškodb je bilo na hidrofobnih delih evkariontskih celic in bakterijah, saj je kisik bolje topen v lipidih kot v vodi. Bitja, ki so lahko uporabljala kisik pri svojih normalnih presnovnih procesih, so preživela to ekološko katastrofo. Razvila so tudi mehanizme, s katerimi so kompenzirala toksične učinke kisika. Pri tem so adaptacije posegle tudi v fiziološke procese. Kisik je najbolj razširjen element v zemeljski skorji (zastopanost v obliki spojin, zlasti silikatov, je okrog 50 odstotkov), molekulskega kisika v suhem zraku pa je 21 odstotkov. K aerobnemu življenju prispeva tudi raztopljeni kisik v hidrosferi, kjer ga je okrog 90 odstotkov. Pomemben za reakcije v hidrofobnih membranski lipidih pa je molekularni kisik, saj je bolj topen v organskih topilih kot v vodi. Na kisik odpadeta tudi dve tretjini mase človeškega telesa (1).

Živimo v okolju, v katerem je človeški organizem izpostavljen vplivom različnih oblik stresa, tako fizičnega, psihičnega ali kemičnega, vsem pa je skupno, da lahko negativno vplivajo na naš organizem. Določena količina stresa je vedno prisotna in nekako usmerja, pospešuje ali zavira delovanje človeškega telesa. Žal pa smo dandanes preveč in prepogosto izpostavljeni čezmernemu stresu, kar ima zagotovo škodljive posledice. Vsi aerobni organizmi so zaradi pridobivanja energije s pomočjo kisika izpostavljeni posebni vrsti stresa, ki jo imenujemo oksidativni stres. Ta pa je prav nevidno vpleten v naše življenje, saj opozori nase šele ob izbruhu določenih bolezni. Škodljivega vpliva radikalov, katerih presežek predstavlja glavni razlog za oksidativni stres, se danes že dobro zavedamo. Ključni problem pri tem pa ostaja zaznavanje oksidativnega stresa, kar bi nam omogočilo pravočasno ukrepanje in preprečilo izbruh mnogokaterih bolezni današnjega časa. Dejavnikov, ki pospešujejo oksidativni stres, je namreč veliko, mednje prav gotovo sodi hiter življenjski slog in onesnaženost okolja (2). Lahko pa se pojavi tudi v določenih fizioloških primerih, kot so na primer nosečnost, intenzivni mišični napor in mnoge bolezni.

1.1 OKSIDATIVNI STRES

V živih organizmih stalno nastajajo reaktivne kisikove zvrsti (ROS). To so radikali in neradikali, ki lahko nenadzorovano oksidirajo gradnike celic. Oksidativni procesi, ki vključujejo reaktivne zvrsti, so v organizmu "pod nadzorom". Vlada dinamično ravnovesje. Ko pa se poveča količina teh potencialno škodljivih agensov, pride ko oksidativnega stresa.

Po definiciji je oksidativni stres neposredna posledica škodljivega delovanja povečane količine teh visoko reaktivnih zvrsti na celice in tkiva v organizmu (3). Oksidativni stres je vrsta "kemičnega stresa", ki je posledica znižanega nivoja antioksidantov ali povečane tvorbe ROS. Pride torej do porušenega ravnotežja med tvorbo ROS in antioksidativno obrambo, kar vodi do možnih poškodb celice. Pri tem so še posebej občutljive membrane, proteini in DNA.

Radikali so nenadomestljivi spremljevalci celične presnove. Nekatere vrste levkocitov jih proizvajajo kot orožje za uničenje bakterij, kar zagotavlja pomemben obrambni mehanizem pred okužbami. Tvorba radikalov je prav tako vključena pri sintezi nekaterih hormonov (2).

Nastajanje večjih količin reaktivnih zvrsti povzročajo notranji ali zunanji dejavniki. Med notranje dejavnike prištevamo povečano stopnjo celične presnove, ki nastane pri posebnih fizioloških stanjih, kot je na primer nosečnost ali intenzivna telesna vadba, pri neprilagojenem obrambnem sistemu antioksidantov (3). Med zunanje dejavnike pa sodijo različne vrste sevanja (ionizirajoče, ultravijolično), močan ultrazvok (20–100 kHz), kemikalije, kot so pesticidi ali določena zdravila, tobačni dim, virusi in bakterije.

Bolezni in poškodb, ki nastanejo kot posledica oksidativnega stresa, je mnogo. Najpomembnejše med njimi so predvsem ateroskleroza, srčni infarkt, možganska kap, Alzheimerjeva bolezen, sladkorna bolezen, akutne in kronične jetrne bolezni, eritemi idr. Oksidativni stres je prav tako odgovoren za zgodnje staranje, spodbujanje maligne rasti in je vpleten v (skoraj) vse patofiziološke procese (3, 4). Pomembno je, da se ga zavedamo in

ga poskušamo nadzorovati, saj v nasprotju z omenjenimi boleznimi nima tipične klinične slike in ne kaže simptomov, s katerimi bi lahko opredelili njegovo prisotnost v organizmu.

Brez kisika ni aerobnega življenja. Pojav oksidativnega stresa je torej neizogibno povezan s prisotnostjo kisika v našem ozračju. Poteka oksidacijskih procesov ne opazimo neposredno, temveč prek različnih kisikovih presnovkov.

1.2 REAKTIVNE KISIKOVE ZVRSTI

Koža in nekatere sluznice so neprestano in neposredno v stiku s kisikom v zraku. Z dihanjem prehaja kisik v notranje okolje telesa, pri tem pa nastajajo mnoge reaktivne kisikove vrste. Izraz reaktivne kisikove spojine (ROS) vključuje kisikove radikale in njihove neradikalne intermediate, ki nastajajo pri številnih redoks in encimskih reakcijah, kjer prihaja do prenosa elektronov. Vzrok nastanka ROS predstavljajo tako endogeni viri (mitohondriji, citokrom P450, peroksisomi, endoplazemski retikulum, makrofagi, nevtrofilci, eozinofilci) kot eksogeni viri (ksenobiotiki, kovinski ioni, ionizirajoče sevanje) (5, 6). Glavni predstavniki ROS v bioloških sistemih so: superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}) in ozon (O_3) (3). Tarča reaktivnih kisikovih spojin je katerakoli organska molekula v organizmu, kot so maščobe, ogljikovi hidrati ali aminokisliline.

Molekula kisika je biradikal, kar pomeni, da sta na zunanji orbitali prisotna dva neparjena elektrona, ki imata enako usmerjena spina, kar kaže na tripletno osnovno stanje molekule. To stanje je v primeru kisika energetsko najnižje, pri večini ostalih spojin pa je osnovno stanje z najnižjo energijo singletno. Vse snovi, ki imajo neparjen elektron, imajo učinkoviti magnetni moment, zaradi česar nastane paramagnetnost (2). Tabela I prikazuje najpomembnejše reaktivne kisikove zvrsti.

Tabela I: Pomembne reaktivne kisikove zvrsti

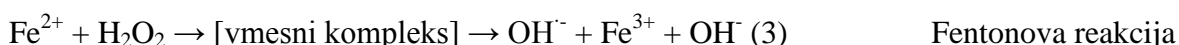
Neradikalne vrste	Radikalne vrste
Vodikov peroksid (H_2O_2)	Superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$)
Ozon (O_3)	Hidroksilni radikal (OH^{\cdot})
Tripletni kisik (3O_2)	Peroksilni radikal (ROO^{\cdot})
Singletni kisik (1O_2)	Alkoksilni radikal (RO^{\cdot})
Peroksidi ($ROOR^{\cdot}$)	Hidroperoksilni radikal ($HOOR^{\cdot}$)

1.2.1 Radikalske vrste kisika

Radikali so posamezni atomi, ioni in molekule ali njihovi deli, ki imajo na vsaj eni orbitali nesparjeni elektron (1, 3, 7). Radikali z lihimi številom elektronov so zelo reaktivni. Njihov razpolovni čas je pogosto med milijoninko in milijardinko sekunde ali pa še manjši. Zelo reaktivni so tudi radikali s sodnim številom nesparjenih elektronov, ki imajo nasprotno spino (1).

Superoksidni anion ($O_2^{\cdot -}$) je za en elektron reducirana molekula kisika (O_2). Ker je nabita molekula, težko prehaja celične membrane in je prekursor večine ROS (8). Največja količina $O_2^{\cdot -}$ nastaja v mitohondrijih, kjer določeno število elektronov uide iz transportne verige elektronov, predvsem z mesta kompleksa I in III. Ti ioni tvorijo s kisikom $O_2^{\cdot -}$ (5). Za tvorbo $O_2^{\cdot -}$ se v normalnih pogojih v mitohondrijih porabi 1–2 odstotka O_2 . Med vire $O_2^{\cdot -}$ spadajo tudi encim NADPH-oksidadza, ksantin-oksidadza, transportna veriga elektronov v endoplazemskem retikulumu, citokrom P-450 in ostale oksido-reduktaze (19).

Hidroksilni radikal (OH^{\cdot}) je zelo reaktiven, lahko reagira skoraj z vsako biološko molekulo, ima kratko razpolovno dobo in reagira blizu mesta nastanka. Nastaja kot produkt neposredne interakcije med $O_2^{\cdot -}$ in H_2O_2 (Haber-Weissova reakcija). Reakcijo katalizirajo kovinski ioni, najpogosteje železovi, lahko pa tudi baker. Z železovimi ioni katalizirano reakcijo superoksidnega aniona in vodikovega peroksida imenujemo Fentonova reakcija (2, 19).



Poleg kisikovih so biološko pomembni še ogljikovi, dušikovi in klorovi radikali (9).

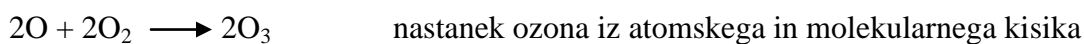
1.2.2 Neradikalske vrste kisika

Tripletni kisik (3O_2) se nahaja v našem ozračju. Je molekularni kisik, načeloma slabo reaktiven zaradi paralelnih spinov obeh nesparjenih elektronov, zato mora v oksidacijskih procesih postopoma pridobiti manjkajoča elektrona. Proces pospešijo reaktivne molekule, radikali ali prehodni elementi, kar lahko sproži verižne reakcije, ki vodijo do nastanka

novih radikalov. Lahko se spremeni tudi smer enega od nesparjenih elektronov, zato se reaktivnost molekule kisika poveča, nastane singletni kisik (1, 9).

Singletni kisik ($^1\text{O}_2$) obstaja v osnovnem in vzbujenem stanju. Kisikov singlet v osnovnem stanju je zelo reaktiven. Nastane iz tripletne oblike, pri čemer se nesparjeni elektron pomakne v orbitalo višje energije, s tem pa se tvori elektronski par z nasprotno usmerjenima spinoma. Na preostalo prsto orbitalo nato z lahkoto sprejme nov elektron ali kar elektronski par (9). Kisikov singlet nastaja pri številnih fotodermatozah, na primer pri porfiriji, prav tako pa pri osvetlitvah riboflavina in bilirubina, pri čemer se patološke spremembe pojavijo na osvetljenih delih kože (4).

Ozon (O_3) je molekula, sestavljena iz treh atomov kisika. Po strukturi ni radikal, je pa močan oksidant, boljši od kisika. Nastaja prek fotodisociacije molekularnega kisika, kjer najprej nastane atomski kisik, ki nadalje reagira z molekularnim kisikom, pri tem pa nastane ozon (1).



V organizmu lahko sproži nastanek radikalov bodisi prek avtooksidacije lipidov ali reakcij s poli-nenasičenimi maščobnimi kislinami. V vodnih raztopinah lahko sproži tvorbo hidroksilnega radikala (1).

1.2.3 Nastanek radikalov

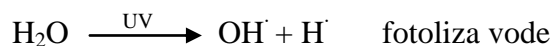
Za radikale je značilno, da v naravi nastajajo po različnih mehanizmih. Nato lahko tvorijo nove radikale ali pa pride do njihove inaktivacije.

Homolitska cepitev kovalentne vezi

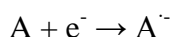
Pri kovalentni vezi si atoma "delita" skupni elektronski par. Za cepitev kovalentne vezi tarčne molekule je potrebna določena količina energije, pri tem pa nastaneta dve različni

vrsti radikalov, od katerih ima vsak po en nesparjen elektron. Vir energije je lahko svetloba, pri čemer se proces imenuje fotoliza, v primeru toplote pa piroliza (10).

Primer homolitske reakcije v organizmu predstavlja razpad molekule vode s pomočjo UV-žarkov (fotoliza). Pri tem nastaneta radikal vodika in hidroksilni radikal.



Enoelektronska redoks reakcija

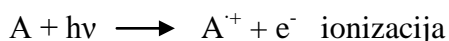


Primer enoelektronske reakcije v organizmu je nastanek superoksidnega aniona (SA).



Ionizacija

Pri tej reakciji ionizirajoči žarki neposredno izbijejo elektron iz molekule (1, 10).



Reakcije z ioni prehodnih kovin

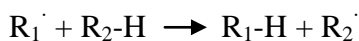
Prehodne kovine (predvsem bakrovi in železovi ioni) lahko sprejmejo ali oddajo posamezen elektron zaradi specifične razporeditve elektronov v d-orbitali, ki vsebuje nesparjene elektrone (1).

Primer reakcije z ioni prehodnih kovin v organizmu je Fentonova reakcija (1).

1.2.4 Reakcije radikalov

Radikali najpogosteje reagirajo na tri načine:

- odvzem vodikovega atoma



- adicija na dvojno vez

$$R_1\cdot + CH_2=CH-R_2 \rightarrow R_1-CH_2-\dot{C}H-R_2$$
- reakcija dveh radikalov

$$R_1\cdot + R_2\cdot \rightarrow R_1-R_2 \quad \text{kovalentna vez}$$

Pomembne so predvsem reakcije med radikali in neradikali, saj pri tem vedno nastane nov radikal (7).

V telesu je večina molekul neradikalnih, zato lahko že en sam radikal sproži obsežno verižno reakcijo (11).

POTEK VERIŽNE REAKCIJE

a) INICIACIJA

Je prva stopnja verižne reakcije, do katere najpogosteje pride prek homolitske cepitve, interakcij z ioni prehodnih kovin in cepitve vodikovega peroksida (1, 4).

b) PROPAGACIJA

Je razširitev verižne reakcije, kjer nastali radikal odvzame elektron novi tarčni molekuli (najpogosteje v obliki vodikovega atoma), ki tako postane radikal. Po tej poti se torej radikalna oblika verižno razširi na nove molekule (7).

c) TERMINACIJA

Vključuje povezavo dveh radikalov in nastanek stabilnega produkta.

1.2.5 Nastanek ROS v fizioloških procesih

Nastajanje ROS je del normalne presnovne aktivnosti celic, na kar lahko vplivajo tudi zunanji dejavniki. Reaktivne kisikove spojine imajo v nadzorovanih, homeostaznih koncentracijah fiziološko vlogo pri regulaciji delovanja nekaterih encimov, v signalnih poteh pri celičnem razvoju, diferenciaciji in programirani celični smrti ter pri genski ekspresiji, občutljivi na redoks potencial (5,6).

V fizioloških pogojih so glavni vir ROS v celicah:

- mitohondriji, ki tvorijo superoksidni anion in vodikov peroksid (kot posledica normalnega dihanja),
- aktivirani fagociti, ki tvorijo dušikov oksid, hipokloro kislino in superoksidni anion v procesih fagocitoze,
- peroksisomi, ki razgrajujejo maščobne kisline in druge substance, pri čemer nastaja vodikov peroksid,
- citokrom P-450, ki je odgovoren za oksidacijo številnih endogenih in eksogenih spojin (5, 6).

1.2.6 Učinki ROS v patoloških procesih

Presežek ROS in porušenje antioksidantnega ravnotežja lahko povzroči vrsto poškodb v celici, ki so lahko epigenetične (poškodbe strukturnih in funkcijskih molekul celice) ali genotoksične (posredne ali neposredne poškodbe dedne snovi) (4). Radikali lahko po eni strani povzročijo akutno poškodbo celice ali celo celično smrt, po drugi strani pa s počasnimi spremembami vodijo v degeneracijo in staranje.

a) Oksidacija proteinov

Pri oksidaciji proteinov nastanejo spremembe v strukturi molekule, kar lahko vodi do izgube katalitične funkcije. Pri tem se poveča tudi občutljivost takih proteinov na proteolizo in denaturacijo (6).

Vodikov peroksid inaktivira encime z oksidacijo pomembnih tiolnih skupin metioninskih in cisteinskih ostankov. Pri tem se tvorijo disulfidi v proteinih ali med njimi. To je reverzibilna poškodba, saj se lahko ostanki regenerirajo z redukcijo z glutationom ali tioredoksinom. Superoksidni radikal lahko kljub nizki reaktivnosti povzroči inhibicijo nekaterih antioksidantnih encimov (glutation-peroksidaze, katalaze, mitohondrijske ATP-aze). Hidroksilni radikal zaradi visoke reaktivnosti povzroča hude poškodbe in nastanek karbonilov. Nastanek teh je ireverzibilna okvara proteinov in vodi v njihovo razgradnjo ali združevanje v skupke, kar je tudi vzrok za nekatera obolenja (5, 19).

b) Oksidacija DNA

Pri oksidaciji DNA pride do loma DNA-verige, spremembe purinov, pirimidinov ali sladkornega dela, izgubo baz in njihove navzkrižne povezave. Posledice teh poškodb so spremembe transkripcije, spremembe signalnih poti, kar je tudi vzrok za nastanek rakavih obolenj, različnih degenerativnih bolezni in staranja. Na oksidacijo je še posebej občutljiva mitohondrijska DNA, saj ne vsebuje histonov in popravljalnih mehanizmov kot jedrna DNA (5, 19).

c) Oksidacija lipidov

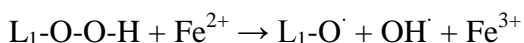
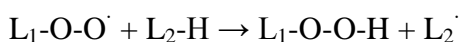
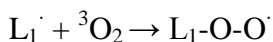
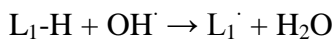
Tarča ROS so najpogosteje lipoproteini ali polinenasičene maščobne kisline fosfolipidov v membranah celice. Pri tem nastajajo hidroperoksidi, epoksidi, aldehidi in alkani. Nekateri od njih so zelo reaktivni in še dodatno sodelujejo pri nastajanju radikalov in poškodb makromolekul. Najpomembnejši posledici peroksidacije lipidov sta slabša integriteta membrane in povečanje membranske fluidnosti (19). Pride tudi do izpada funkcije membranskih encimov, motenj prenosa signalov prek transmembranskih receptorskih sistemov in nazadnje do propada celične membrane.

Lipidna peroksidacija poteka po splošni poti radikalske verižne reakcije, kjer poljubni radikal reagira z nenasičeno maščobno kislino. Na radikalske reakcije so najbolj občutljive tiste maščobne kisline, ki so v svoji strukturi čim bolj nenasičene. Prisotnost dvojnih vezi v molekuli namreč zmanjša energijo vodikove vezi na ogljiku, zato se vodik lažje odcepi. V primerih, ko so prisotni sledovi ionov železa, lahko poteče reakcija, pri kateri nastanejo novi hidroksilni radikali, kar še prispeva k širitvi lipidne peroksidacije. Že en sam hidroksilni radikal lahko sproži reakcijo, pri kateri se peroksidira več tisoč verig maščobnih kislin (2).

Reakcija se prične tako, da na primer hidroksilni radikal odvzame atom vodika fosfolipidni molekuli L_1-H (metilenska skupina med dvema dvojnima vezema v nenasičenem fosfolipidu). Pri tem nastane voda in nekoliko bolj stabilen C-radikal na fosfolipidni molekuli ($L_1\cdot$). V membrani je velika vsebnost tripletne oblike kisika (3O_2), zato ta z lahkoto reagira z novonastalim radikalom, kar vodi do nastanka novega radikala (L_1-O-O). Ta pritegne vodikov atom iz sosednje alkilne verige fosfolipidne molekule, in tako nastaneta nov C-radikal (L_2) ter hidroperoksid. Nadalje se lahko radikalska reakcija širi še

na nove molekule, pri tem pa nastajajo vedno novi hidroperoksidi ($L_1-O-O-H$), ki imajo bolj polarno naravo, kar vodi do rušitve membranske strukture (1, 9).

Nekatere reakcije lipidne peroksidacije:



1.3 REAKTIVNE DUŠIKOVE ZVRSTI

Pomembna reaktivna dušikova zvrst je dušikov oksid (NO). Je radikalska molekula, ki se obnaša kot neurotransmitter, parakrina substanca ali hormon. NO nastane iz L-arginina pod vplivom NO-sintaze, ki se nahaja v treh izoformah: možganska, endotelijska in inducibilna. Prvi dve sodelujeta pri nastajanju NO v fizioloških procesih in zagotavljata njegovo bazalno sproščanje, medtem ko inducibilna NO-sintaza spodbuja nastajanje NO kot odgovor na prisotnost vnetnih citokinov in lipopolisaharidov (36).

Interakcija NO in superoksidnega radikala vodi do inaktivacije slednjega in do nastanka peroksinitrita ($ONOO^\cdot$), ki je močan oksidant. Aktivnost NO se podaljša v prisotnosti SOD, ki odstranjuje superoksidni anion. Ko se povečata koncentraciji NO in superoksidnega aniona, NO tekmuje z le-tem za SOD, pri tem pa nastajajo vedno večje količine peroksinitrita (36).

1.4 DEJAVNIKI POVEČANJA OKSIDATIVNEGA STRESA

Stanje oksidativnega stresa najpogosteje nastopi v neustreznem življenjskem okolju, kot je na primer povečano sevanje in onesnaženost. Neprimeren način življenja, kot je slabo prehranjevanje, pitje alkohola, kajenje ali neustrezna telesna dejavnost, prav tako vodi do nastanka oksidativnega stresa. K temu dodatno prispevajo tudi psihološki dejavniki (psihološki stres), prisotnost bolezni (okužbe, poškodbe, krvo-žilne bolezni, maligne bolezni), pri katerih pride do spremenjenega metabolizma, in iatrogeni dejavniki (zdravila, rentgenski, UV-žarki, radioterapija) (2).

a) Kemijski dejavniki

Sevanje in ozon imata neposredni učinek na nastajanje radikalov, saj prek delovanja na fenolove derivate neposredno tvorita peroksilne radikale. Nekatere kemikalije, kot so na primer aromatski policiklični ogljikovodiki in nekatere učinkovine, ki stimulirajo citokrom P450, delujejo posredno na nastanek radikalov (2).

b) Fizikalni dejavniki

Najpomembnejša fizikalna dejavnika sta ionizirajoče sevanje in UV-sevanje, ki povzročita cepitev molekul vode. Posledica je nastanek hidroksilnega in vodikovega radikala. Glede na to, da je človeški organizem večinoma sestavljen iz vode, ta pojav tvorbe ROS ni zanemarljiv. Prav tako je pomemben podatek, da smo ves čas bolj ali manj izpostavljeni določeni količini sevanja (2).

c) Biološki dejavniki

Bakterije in ostali povzročitelji okužb znatno povečajo tvorbo ROS prek fizioloških obrambnih mehanizmov pred okužbami in prek protiteles v imunološkem odgovoru. Pri tem gre za neposredno delovanje zrelih nevtrofilcev. Ti namreč vsebujejo številne encimske sisteme, ki so neposredno povezani s tvorbo in delno tudi z deaktiviranjem ROS. Do povečane tvorbe radikalov pride tudi v določenih fizioloških stanjih, kot je na primer nosečnost, intenzivni mišični napor ali mnoge bolezni (2).

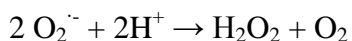
1.5 ANTIOKSIDANTNI SISTEM

Antioksidant je vsaka snov, ki upočasni, prepreči ali odstrani oksidativno poškodbo tarčne molekule (44). V primeru oksidativnega stresa to pomeni, da mora biti antioksidant ob pravem času na pravem mestu in v zadostni koncentraciji.

1.5.1 Encimski antioksidantni sistem

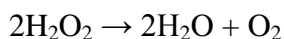
V encimski sistem antioksidantov, ki sodeluje pri razgradnji in odstranjevanju reaktivnih zvrsti, sodijo superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutationski in tioredoksinški encimski sistem (glutation-peroksidaza – GPx, glutation-reduktaza – GR, tioredoksin-peroksidaza – TrxP, tioredoksin-reduktaza – TrxR) (13).

Superoksid-dismutaza je prvi encim antioksidativne obrambe. Katalizira dismutacijo $O_2^{\cdot -}$ v H_2O_2 in O_2 :



Obstaja več oblik encima SOD, ki imajo v aktivnem mestu različne elemente. Baker (Cu) in cink (Zn) vsebujoča superoksid-dismutaza (Cu-, Zn-SOD, SOD1) je dimerni protein, ki se nahaja v citoplazmi, medtem ko je mangan vsebujoča dismutaza (Mn-SOD, SOD2) homotetramerni protein, ki je prisoten predvsem v mitohondrijih. Superoksid-dismutazo lahko najdemo tudi izvencelično, in sicer SOD3, ki vsebuje Cu in Zn (13).

Katalaza odstranjuje nastali H_2O_2 :



Nahaja se intracelularno predvsem v peroksisomih, manj v mitohondrijih. Encim je sestavljen iz štirih podenot, od katerih vsaka vsebuje hemska skupino, vezano na aktivno mesto (14).

Glutation-peroksidaza odstranjuje H_2O_2 in ROOH ter varuje pred lipidno peroksidacijo. V aktivnem mestu encima je selenocistein, zato je za normalno delovanje encima potrebna zadostna preskrbljenost s selenom. Aktivnost GPx je odvisna od prisotnosti reduciranega glutationa (GSH), ki je donor vodika. Glutation-peroksidaza katalizira reakcijo med reduciranim glutationom in vodikovim peroksidom. Pri tem nastajata voda in glutation disulfid (GSSG) (15).

1.5.2 Neencimski antioksidantni sistem

Neencimski antioksidanti so spojine endogenega izvora ali pa jih vnašamo v telo kot vitamine s prehrano in s prehranskimi dopolnili. Kot esencialne snovi so pomembni tudi nekateri elementi v sledovih, ki sodelujejo pri tvorbi aktivnega mesta ali so sodejavniki opisanih antioksidantnih encimov (19).

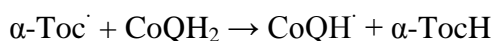
Glutation je tiolni tripeptid in je glavni celični neencimski antioksidant. Je reducent, ki lahko neposredno reagira z radikali ali pa vstopa v encimsko katalizirane redukcije.

Njegova sinteza poteka v citosolu iz L-glutamata, L-cisteina ter glicina. Sodeluje pri detoksikaciji številnih snovi in se s pomočjo glutathion-reduktaze in v prisotnosti nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) regenerira nazaj do reducirane oblike (15).

Vitamin E je maščobotopen antioksidant iz družine tokoferolov. Najbolj aktivna oblika vitamina E je α -tokoferol, ki zagotavlja predvsem zaščito celičnih membran pred oksidacijo ROS in lipidnimi radikali (5).

Koencim Q nastopa v dihalni verigi v mitohondrijih. *In vitro* lahko ubikinol (CoQH₂) odstranjuje peroksilne radikale (ROO[•]) in inhibira lipidno peroksidacijo.

Lahko regenerira tokoferil radikal:



Vitamin C, znan kot askorbinska kislina, je vodotopen antioksidant. Neposredno preprečuje razširitev verižne reakcije v oksidativnih procesih, sodeluje pa tudi pri regeneraciji oksidiranega vitamina E in glutathiona, kar pomeni, da ima z omenjenima antioksidantoma sinergistično delovanje (16).

Sečna kislina je močan antioksidant, saj učinkovito odstranjuje O₃ in NO₂, prav tako pa kelira kovinske ione železa in bakra. Urat radikal pa po drugi strani lahko izkazuje prooksidativne lastnosti – reducirajo ga številni flavonoidi in O₂^{•-}.

1.6 NOSEČNOST IN OKSIDATIVNI STRES

Nosečnost (tudi gestacija ali gravidnost) je obdobje nosečnice od oploditve jajčeca do poroda in traja devet mesecev. Običajno se v maternici razvija en plod, kadar pa je plodov več, govorimo o večplodni nosečnosti.

Nosečnost delimo na tri trimesečja, ki pomenijo tri glavne stopnje plodovega razvoja. V prvem trimesečju obstaja največja nevarnost spontanega splava, med drugim trimesečjem lahko razvoj plodu že dobro spremljamo in diagnosticiramo morebitne motnje v razvoju.

Za tretje trimesečje pa velja, da se plod začne pripravljati na preživetje izven materinega telesa.

1.6.1 Vloga reaktivnih kisikovih zvrsti v nosečnosti

Nosečnost je zaradi povečane metabolične aktivnosti in zmanjšane moči antioksidantov stanje povišanega oksidativnega stresa. Reaktivne kisikove spojine sodelujejo v signalnih poteh ženskega reproduktivnega cikla. Pojavljajo se v procesu folikulogeneze, zorenju oocita, pri delovanju rumenega telesca ter miometriju, kot tudi v procesu embriogeneze, implantacije zarodka in tudi pri fetoplacentnem razvoju. Metabolična aktivnost se poveča predvsem v mitohondrijih posteljice (16, 17, 19). Posteljica ima ključno vlogo pri tvorbi oksidativnega stresa med nosečnostjo, saj je pomemben vmesnik med materinim in fetalnim krvnim obtokom, ker prenaša kisik in številne metabolične substrate (18). V zgodnji nosečnosti pride do implantacije zarodka. Posteljica in zarodek sta v tem obdobju v pretežno hipoksičnem okolju. Prične se organogeneza in takrat je zarodek posebno občutljiv na oksidativni stres. Fiziološki porast ROS se pojavi že v prvem trimesečju nosečnosti, okrog 10. tedna, kar je posledica vzpostavitve pretoka krvi v medresični prostor. Ob invaziji trofoblastov v maternično sluznico pride do zvišanja parcialnega tlaka med resicami, to pa vodi v povečan pretok v uterinih spiralnih arterijah. Pri tem je posteljica izpostavljena hipoksiji in reoksigenaciji, kar povzroči porast ROS in oksidativno poškodbo tkiva (19). Porast ROS ima za posledico povečano izražanje antioksidantnih encimov v posteljici. Obseg oksidativnega stresa posteljice je torej odvisen od velikosti oksidativne poškodbe in učinkovitosti antioksidantnega sistema posteljice, na kar imajo velik vpliv prehranjevalne navade matere, aktivnost, življenjski slog, genetski dejavniki in dejavniki okolja (20).

1.6.2 Zapleti v nosečnosti in oksidativni stres

Biokemično okolje matere je zelo pomembno za razvoj ploda. Oksidativni stres matere med nosečnostjo vpliva na razvoj ploda in je vpleten v patološke izide nosečnosti, kar so pokazale tudi mnoge raziskave (21).

1.6.2.1 Zastoj v rasti ploda

O zastoj plodove rasti govorimo, če plod ne doseže svojega genetsko določenega ravnega potenciala in je njegova ocenjena teža pod 10. percentilov razporeditve porodnih tež za določeno gestacijsko starost. Ugotavljamo ga glede na krivulje rasti ploda za individualno populacijo (22). Rezultati raziskav so pokazali, da oksidativni stres matere med nosečnostjo nakazuje na zastoj rasti ploda in nizko porodno težo. Vzrok za zastoj rasti so lahko neugodni vplivi na intrauterino okolje (alkohol, kajenje), materina bolezen (kronična ledvična bolezen, hipertenzija, anemije) ali pa so vzroki plodovi (prirojene razvojne nepravilnosti, kromosomopatije, kot je Downov sindrom, večplodna nosečnost). V 50 odstotkih primerov še vedno ostaja etiologija neznana (23).

Otroci in kasneje odrasli, ki so se rodili z manjšo porodno težo, kot je običajno določena za posamezno gestacijsko starost, imajo večje tveganje za razvoj hipertenzije, diabetesa, astme in srčno-žilnih bolezni (24).

1.6.2.2 Preeklampsija

To bolezen povzroča okvara endotelija žil. Pri materi se kaže s hipertenzijo, edemi in proteinurijo. Vzrok je nenormalna placentacija oz. napačen odziv matere na nosečnost. Etiologija preeklampsije sicer še ni dokončno pojasnjena. Znano pa je, da pride do povečane tvorbe ROS, kar je posledica motene invazivnosti trofoblastov, pri kateri pride do zmanjšanja uteroplacentarne perfuzije, ishemije in hipoksije posteljice. Iz posteljice se začnejo sproščati različni vnetni, protrombotični, vazokonstriktorni in antiangiogeni dejavniki. ROS, ki pri tem nastajajo, še dodatno lahko vodijo do endotelne in vaskularne oksidativne poškodbe (19, 25). Pri preeklampsiji je zelo pogosta sprememba zastoj plodove rasti.

1.6.2.3 Downov sindrom

Downov sindrom ali trisomija kromosoma 21 je kromosomska motnja, ki jo povzroči dodaten 21. kromosom. Ta genetska motnja povzroči več različnih oblik klinične slike, kot so nenormalna oblika glave, majhni možgani, pospešeno staranje, kognitivne motnje idr.

Pride do povečanega izražanja SOD, ki superoksidni anion pretvarja v molekulo kisika in vodikov peroksid, pri tem pa pride do zmanjšane izražanja katalaze in glutation-peroksidaze, ki odstranjujeta nastali vodikov peroksid, zato se ta kopiči in povzroča škodljive učinke (37).

1.6.2.4 Edwardsov sindrom

Edwardsov sindrom ali trisomija kromosoma 18 je genetska motnja, za katero je značilno, da je namesto običajnega para 18. kromosoma prisotna še tretja kopija genskega zapisa. Zanja so značilni simptomi, kot so v pest stisnjene dlani, prekrižane noge, nizka porodna teža, nizka ušesna rast, duševna zaostalost, mikrocefalija (majhna glavica), mikrognatija (majhna čeljust), nerazviti nohtki in nespuščena moda. Z leti verjetnost, da bo nosečnica rodila otroka s to boleznijo, narašča (39). Kot vemo, z leti narašča tudi oksidativni stres v našem organizmu. Zanimivo bi bilo primerjati kazalce oksidativnega stresa v nosečnosti med nosečnicami, ki so rodile otroke z Edwardsovim sindromom, in nosečnicami, katerih nosečnost se je zaključila normalno.

1.6.2.5 Avtizem

Avtizem je kompleksna nevrološka motnja, za katero je značilna šibka socialna interakcija, omejena verbalna in neverbalna komunikacija ter ponavljajoči se tipični vedenjski vzorci. V raziskavah otrok z avtizmom se je izkazalo, da imajo ti v možganih znižan nivo antioksidantov, predvsem glutationa, in povišane koncentracije nitrotirozina, ki je kazalec poškodbe proteinov (38). Zanimivo bi bilo raziskati pojavljanje oksidativnega stresa, njegovih kazalcev in koncentracije antioksidantov že v nosečnosti ter ugotavljati njihov vpliv na pojav avtizma pri otrocih.

1.6.2.6 Ostali zapleti v nosečnosti

Oksidativni stres matere med nosečnostjo je lahko vzrok za spontani splav, prezgodnji porod, hipertenzijo in inzulinsko rezistenco pri potomcu. Prisotnost metaboličnih nepravilnosti pri materi (npr. diabetesa) ima vpliv na večjo tvorbo ROS, ki ob zmanjšanem delovanju antioksidantnih sistemov (npr. polimorfizmov) in nezadostnem vnosu

mikronutrientov (npr. Se) vodijo do nastanka oksidativnega stresa in z njim povezanih posledic (19).

1.6.3 Ocena oksidativnega stresa v nosečnosti

Kisikove zvrsti in radikali so dokaj kratkoživi, zato je neposredno merjenje oksidativnega stresa pri človeku zelo težavno. Največkrat se uporablja merjenje produktov ROS z biološkimi makromolekulami. Ponavadi merimo več bioloških označevalcev naenkrat, saj pri oksidativni poškodbi različnih organov oziroma pri različnih boleznih nastaja različno razmerje oksidativnih produktov (19).

1.6.3.1 Določanje lipidne peroksidacije

Lipidno peroksidacijo lahko ocenimo z določanjem konjugiranih dienov, produktov preureditve kemijskih vezi po interakciji nenasičenih maščobnih kislin z radikali. Določamo lahko tako primarne produkte peroksidacije (lipidne hidroperoksidge) kot tudi različne sekundarne produkte (malondialdehid, 4-hidroksinonenal, heksanoillizin) (27).

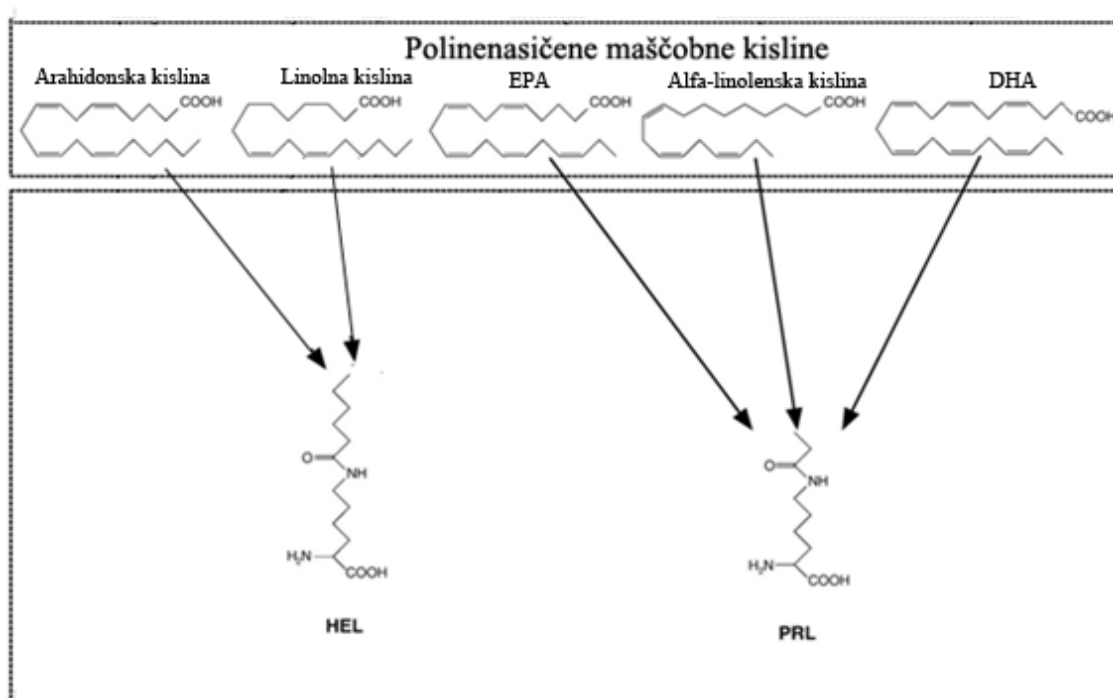
HEKSANOILLIZIN (HEL)

Pomemben kazalec lipidne peroksidacije je sekundarni produkt te reakcije – heksanoillizin (HEL), ki v zadnjem času dobiva vse večji pomen. Njegov nastanek je povezan z zgodnjimi oksidativnimi spremembami omega-6-nenasičenih kislin, kot je na primer linolna kislina, in arahidonske kisline (slika 1). Hidroperoksid linolne kisline se kovalentno veže na proteine oz. na njihove aminokislinske ostanke, v tem primeru na lizin, pri čemer nastane heksanoillizin. Na samo aminokislino lizin se hidroperoksid linolne kisline ne veže (40).

HEL se največkrat določa z encimsko-imunskim testom (ELISA), lahko pa tudi s kombinacijo tekočinske kromatografije s tandemsko masno spektroskopijo (LC-MS/MS). Najdemo ga v aterosklerotičnih lezah, oksidativno spremenjenem LDL, serumu in v urinu (40).

PROPANOILLIZIN (PRL)

Znano je, da omega-3-maščobne kisline, kot sta dokozaheksaenojska (DHA) in eikozapentaenojska kislina (EPA), *in vitro* hitro oksidirajo. Propanoillizin nastane v reakciji med oksidiranimi produkti omega-3-maščobnih kislin in lizinom (slika 1). Uspešno ga določamo s kombinacijo tekočinske kromatografije s tandemsko masno spektroskopijo (LC-MS/MS) (41).



Slika 1: Nastanek HEL in PRL

1.6.3.2 Določanje statusa antioksidantov

Za zagotavljanje homeostaze mora biti stalno vzpostavljeno natančno ravnotežje med funkcijo ROS in antioksidanti. Motnje omenjenega oksidativnega ravnotežja lahko vodijo do motenj, ki vplivajo na razvoj zarodnih celic, zarodka in pozneje ploda, in imajo lahko dolgoročne posledice za kasnejše življenje, odvisno od tega, v katerem obdobju znotrajmaterničnega razvoja se pojavijo (19).

- superoksid-dismutaza (SOD)

Med normalno nosečnostjo je aktivnost SOD v plazmi in eritrocitih višja kot pri nenosečih ženskah in narašča s tedni nosečnosti. Povečano nastajanje vseh treh oblik encima se izraža v tkivu posteljice, kar je lahko vzrok za naraslo aktivnost v materinem krvnem obtoku (13).

- katalaza

Rezultati raziskave pri nosečnicah brez zapletov v primerjavi z zdravimi nenosečimi ženskami so pokazali porast aktivnosti CAT v polni krvi med nosečnostjo (29).

- glutation-peroksidaza (GPx)

Izkazalo se je, da so si rezultati raziskav ekspresije in aktivnosti GPx v nosečnosti nasprotujoči. Pri preiskavi nosečnic brez zapletov v nosečnosti v primerjavi z nenosečimi preiskovankami se je pokazala nespremenjena ali celo znižana aktivnost v plazmi in eritrocitih proti koncu nosečnosti (30, 31). Nekatere študije so pokazale visoko raven GPx v posteljici in porast GPx v plazmi zdravih nosečnic v primerjavi z nenosečimi ženskami (13). V novejših raziskavah so pri nosečnicah z normalnim potekom nosečnosti ugotovili večjo aktivnost GPx v eritrocitih le v tretjem trimesečju v primerjavi s kontrolnimi nenosečimi ženskami v rodni dobi (30, 34).

- neencimski antioksidanti

Raziskave neencimskih antioksidantov so pokazale znižano koncentracijo glutaciona (GSH) v plazmi ter povišano koncentracijo v eritrocitih (13). Povečana je bila tudi koncentracija sečne kisline v plazmi nosečnic s pojavom preeklampsije (32).

- celokupna antioksidantna kapaciteta (TAC)

Poleg posameznih antioksidantov lahko merimo tudi celokupno antioksidantno kapaciteto (angl. TAC). S tem pristopom izmerimo aktivnost vseh prisotnih antioksidantov v biološkem vzorcu.

Še posebej zanimiv je podatek o celokupni antioksidantni kapaciteti, ki ga pridobimo iz amnijske tekočine s posebnim invazivnim postopkom, imenovanim amniocenteza. Amnijska tekočina (plodovnica) je najbolj intimno in plodu najbližje okolje. To je bistra tekočina, ki obdaja plod in se nahaja znotraj plodnika. Sprva onemogoči zrast zarodka s plodnikom, kasneje pa plodu omogoča gibanje v vse smeri, ne da bi ga pri tem ovirala stena maternice. Gibanje ploda je zaradi vzgona olajšano. Hkrati blaži tudi prenos sile na plod (na primer pri udarcu v trebuh). Ima tudi antibakterijski učinek in s tem varuje plod pred okužbami. Deluje kot zbiralnik, ki zagotavlja kratkoročen vir tekočine in hranilnih snovi za plod. Pomembna je tudi za razvoj skeletno-mišičnega sistema, prebavil in pljuč, pri porodu pa zaradi hidrostatske sile pospeši potek poroda (28). Prav zaradi svojih številnih vlog pri razvoju ploda je zanimiva za raziskovanje predvsem v povezavi z oksidativnim stresom. Raziskave so pokazale, da celokupna antioksidantna kapaciteta narašča od drugega do tretjega trimesečja (od 347–776 μM) (43).

Amniocentezo naredijo zaradi različnih razlogov:

- če nosečnica pred rojstvom otroka dopolni 37 let, obstaja večja verjetnost, da bi otrok lahko imel Downov sindrom,
- nosečnica ali njen partner imata genetsko obolenje, ki se lahko prenese na otroka,
- v družini nosečnice ali njenega partnerja je genetsko obolenje in zato obstaja tveganje, da se obolenje prenese na otroka,
- nosečnica že ima otroka, ki ima genetsko obolenje (33).

1.6.3.3 Določanje poškodovanih proteinov

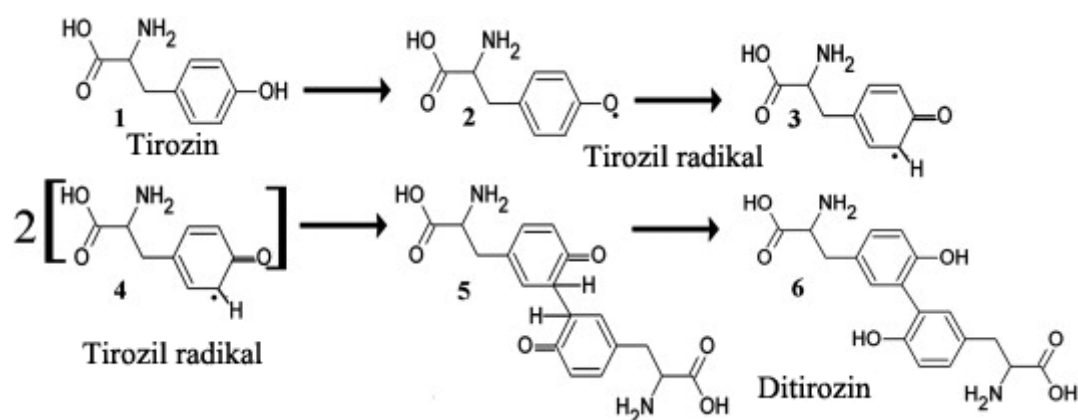
Proteini imajo edinstveno biološko funkcijo in temu primerno se pokažejo tudi rezultati njihove oksidacije, ki so bolj natančno določljivi kot v primeru oksidacije DNA ali lipidne peroksidacije. Produkti oksidacije proteinov so dokaj stabilni in med seboj različni, zato jih lahko določamo z raznimi občutljivimi metodami, ki dajejo zanesljive rezultate (34).

Poškodovane proteine lahko določamo na dva načina. Pri prvem merimo karbnilne produkte, ne moremo pa določiti, kateri aminokislinski ostanek se je oksidiral in kateri protein je bil oksidiran. Pri neposredni oksidaciji aminokislinskih ostankov, predvsem arginina, lizina, prolina, histidina, nastanejo proteini s karbnilnimi skupinami, ki so kemično stabilni in v krvi dalj časa prisotni označevalci oksidativnega stresa kot drugi oksidirani produkti. Metode za določanje proteinov s karbnilnimi skupinami največkrat vključujejo derivatizacijo karbnilne skupine z dinitrofenilhidrazinom (DNFH), pri čemer nastane stabilen produkt 2,4-dinitrofenilhidrazon. Slednjega lahko zaznamo na različne načine. Dinitrofenilna skupina absorbira ultravijolično svetlobo pri valovni dolžini 370 nm, kar lahko določimo spektrofotometrično. Spektrofotometrično metodo DNFH lahko združimo s proteinsko frakcionacijo z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC), da zagotovimo boljšo občutljivost in specifičnost. DNPH lahko določamo tudi z encimsko-immunskim testom (ELISO), imuno-histokemijsko, z eno- ali dvo-dimenzionalno elektroforezo in prenosom Western (34).

Pri drugem načinu pa uporabljamo metode, ki zaznavajo specifične spremembe posameznih aminokislin, predvsem tirozina, ki je ena glavnih tarč oksidacije proteinov. Odvisno od tipa radikala nastajajo različni derivati: **nitrotirozin**, **ditirozin**.

DITIROZIN

Ditirozin lahko nastane pod vplivom različnih reaktivnih kisikovih spojin, kot je peroksinitrit (ONOO⁻), kovinsko kataliziranih reakcij in UV-sevanja. Ditirozin je eden od prečnih povezovalcev proteinov in bi lahko služil kot univerzalni marker oksidacije proteinov (42). Njegov nastanek prikazuje slika 2.



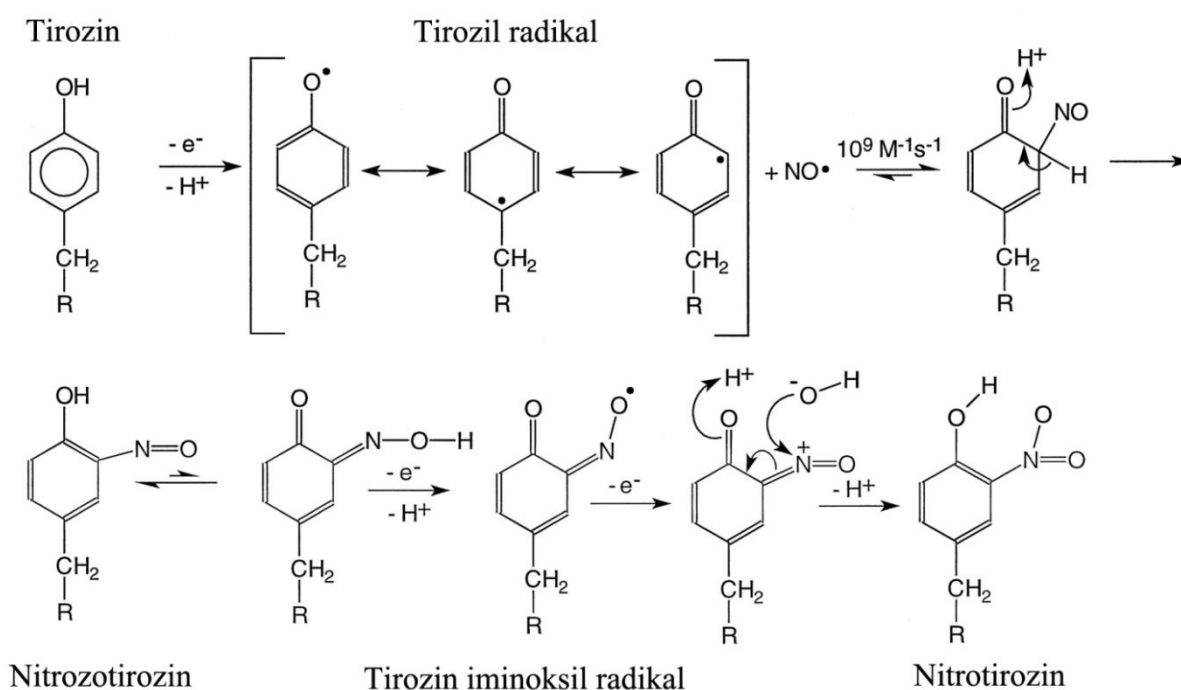
Slika 2: Nastanek ditirozina

NITROTIROZIN

Nitrotirozin je kazalec dušikovih reaktivnih spojin, kot sta peroksinitrit in NO_2^- , ki izvirata iz presežnega dušikovega oksida (NO). Dušikov oksid sicer nastaja s pomočjo NO-sintaze, ki je še posebej aktivna pri aktiviranih makrofagih (36).

NO je pomembno vključen v regulacijo vazodilatacije med sistemskim krvnim obtokom matere ter fetoplacentnim krvnim obtokom. Vzdržuje vazodilatacijo in zmanjšuje učinek vazokonstriktorjev v fetoplacentnem krvnem obtoku. Porušena proizvodnja NO lahko vodi do zmanjšane prehajanja krvi med maternico, placento in plodom, kar se kaže s pojavom preeklampsije in zastojem rasti ploda (36).

Peroksinitrit, eden od reaktivnih dušikovih zvrsti, lahko sproži lipidno peroksidacijo, spodbudi delovanje endotelijskih celic, inhibira mitohondrijski sistem transporta elektronov, oksidira sulfhidrilne skupine proteinov in s tem spremeni njihovo aktivnost oz. prekini poti prenosa signalov. Prav tako nitrira proteine, predvsem tirozin, pri čemer nastane nitrotirozin (slika 3). Povišane koncentracije nitrotirozina so dokazali v primerih preeklampsije in diabetesa v nosečnosti (36).



Slika 3: Nastanek nitrotirozina

Ditirozin in nitrotirozin največkrat določamo encimsko-immunsko (test ELISA). Nitrotirozin v biološkem materialu ali humani plazmi lahko uspešno določamo tudi s kombinacijo tekočinske kromatografije s tandemsko masno spektroskopijo (LC-MS/MS) ali plinske kromatografije s tandemsko masno spektroskopijo (GC-MS/MS). S to metodo dobljene bazalne vrednosti služijo kot referenčne vrednosti za nitrotirozin. Zaradi razlik, izmerjenih vrednosti za nitrotirozin med posameznimi študijami, predvidevajo, da nastaja nitrotirozin tudi *ex-vivo* med pripravo vzorca in njegovo analizo. Ditirozin ima to prednost, da se nemetaboliziran izloča v urin, kjer ga določamo kot neinvazivni marker proteinske oksidacije z LC-MS/MS (19).

1.6.3.4 Določanje oksidacije DNA

Reakcije med ROS in DNA vodijo do različnih sprememb te makromolekule. Kažejo se predvsem v nastanku 8-hidroksidegvanozina (8-OHdG), kar je posledica velike dovzetnosti gvanina za oksidacijo. Pri oksidativnem napadu OH[·] se največkrat na 8. mesto gvaninske molekule doda hidroksilna skupina, ki povzroči nastanek tega produkta. 8-hidroksidegvanozin je biomarker, ki omogoča ovrednotenje oksidativne okvare DNA. Lahko ga določamo v vseh bioloških tekočinah (urinu, plazmi, semenski tekočini, amnijski tekočini, serumu, peritonealni tekočini, mleku), razen v slini. Najbolj in najhitreje se njegova koncentracija poveča v urinu, saj so oksidirane nukleinske baze dokaj topne v vodi in se brez predhodnega metabolizma izločijo v urin. Za kvantifikacijo se največkrat uporablja tandem kromatografske tehnike z masno spektrometrijo ali pa kompetitivna metoda ELISA (19, 26).

Povišano količino 8-OHdG najdemo tako v urinu zdravih nosečnic kot v urinu nosečnic, ki so kasneje imele prezgodnji porod ali so rodile otroka z nizko porodno težo oz. pri intrauterinem zastoju plodove rasti (26).

Pomemben vzorec za preiskavo prisotnosti povišanih količin 8-OHdG je tudi amnijska tekočina. Ta vključuje tudi tekočino, ki jo izloča zarodek, in kot taka je lahko dober pokazatelj izpostavljenosti zarodka škodljivim snovem za DNA (26).

2 NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge bomo primerjali prisotnost kazalcev oksidativnega stresa v urinu in amnijski tekočini. Ker je amniocenteza invaziven postopek določanja oksidativnih markerjev, ki je predvsem neprijeten za nosečnico, bomo poskušali najti povezavo med pojavljanjem določenih markerjev oksidativnega stresa s primerjanjem rezultatov v urinu (pridobimo ga hitreje, bolj enostavno in predvsem neinvazivno) in amnijski tekočini. Rezultate bomo poskušali razširiti na celotno populacijo. Osredotočili se bomo predvsem na kazalce oksidacije lipidov (heksanoillizina, propanoillizina) in proteinov (ditirozina, nitrotirozina).

V nadaljevanju bomo poskušali ugotoviti, kako telesna masa in starost nosečnice vplivata na pojavljanje določenih kazalcev oksidativnega stresa. Predpostavljamo, da povečana telesna masa in večja starost nosečnice vplivata na večjo stopnjo pojavljanja določenih kazalcev oksidativnega stresa in manjšo antioksidantno kapaciteto. Našo populacijo nosečnic bomo razdelili na dve skupini, in sicer v skupino z indeksom telesne mase (BMI), ki je manjši ali enak 25 kg/m^2 , kar velja za normalno telesno maso, in v skupino z indeksom telesne mase več kot 25 kg/m^2 , kar predstavlja povišano oz. prekomerno telesno maso, in primerjali pojavljanje določenih kazalcev oksidativnega stresa glede na to spremenljivko. Enako bomo naredili s starostjo nosečnic, ki jih bomo razdelili v skupino do 37 let in nad 37 let, in spet naredili enake primerjave kot pri BMI. Mejo 37 let smo vzeli zato, ker postopek amniocenteze po priporočilih izvajamo pri nosečnicah, ki pred rojstvom otroka dopolnijo 37 let.

Osredotočili se bomo tudi na medsebojno odvisnost pojavljanja markerjev oksidativnega stresa v istem vzorcu, torej posebej v urinu in posebej v amnijski tekočini.

V urinu bomo določali heksanoillizin z ELISO in naše rezultate primerjali s tistimi, ki so jih pridobili s tekočinsko kromatografijo s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS), ki so jo izvedli Y. Kato in sodelavci na inštitutu JaICA (Japan Institute for the Control of Aging). Zanima nas moč povezave določanja istega analita z dvema različnima metodama.

V amnijski tekočini bomo z reagenčnim kompletom določali celokupno antioksidantno kapaciteto (TAC). Ugotoviti bomo poskušali korelacijo med TAC in ostalimi kazalci oksidativnega stresa (HEL, DYI, PRL, NITROTIROZIN), bodisi v urinu bodisi v amnijski tekočini, katerih koncentracije so prav tako izmerili na inštitutu JaICA.

Glede na to, da so se štiri nosečnosti zaključile z rojstvom otrok z Downovim sindromom (dva), Edwardsovim sindromom in avtizmom, nas zanima, če ta vzorec po pojavljanju kazalcev oksidativnega stresa kakorkoli izstopa v primerjavi z vzorcem brez anomalij.

3 SKUPINA PREISKOVANK

V našo raziskavo smo vključili 129 nosečnic, starih od 22 do 44 let (povprečna starost je bila 36,8 let). Čas trajanja nosečnosti preiskovank je bil pri večini od 16 do 19 tednov, pri petih nosečnicah pa od 20 do vključno 27 tednov oz. povprečno 16,84 tedna. Indeks telesne mase (BMI) preiskovank je bil od 17,99 kg/m² do 39,78 kg/m² (povprečno 24,01 kg/m²).

Preiskovankam smo odvzeli prvi jutranji urin in pri vseh opravili amniocentezo. Razlogi za opravljanje amniocenteze so bili različni. 88 preiskovankam smo jo opravili zaradi starosti (eni pri starosti 34 let in ostalim od starosti 36 let naprej), trem preiskovankam zaradi kombinacije starosti in genetskih obolenj, 7 preiskovankam zaradi kombinacije starosti in tveganja za Downov sindrom pri otroku, trem preiskovankam zaradi genetskih obolenj, 7 preiskovankam zaradi kombinacije tveganja za Downov sindrom pri otroku in dvojnega hormonskega testa, 13 preiskovankam zaradi tveganja za Downov sindrom pri otroku, eni preiskovanki zaradi kombinacije tveganja za Downov sindrom pri otroku in četvernega hormonskega testa, dvema preiskovankama zaradi ultrazvočnih abnormalnosti in petim preiskovankam zaradi njihove lastne želje.

Vse nosečnosti, razen štirih, so se zaključile normalno. Pri dveh sta se rodila otroka z Downovim sindromom, pri eni otrok z Edwardsovim sindromom in pri zadnji otrok z avtizmom. Tri nosečnice so bile poslane na amniocentezo zaradi starosti, ena pa zaradi tveganja za Downov sindrom pri otroku. Pri slednji se je rodil otrok z omenjeno boleznijo.

Vzorci smo pridobili v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana.

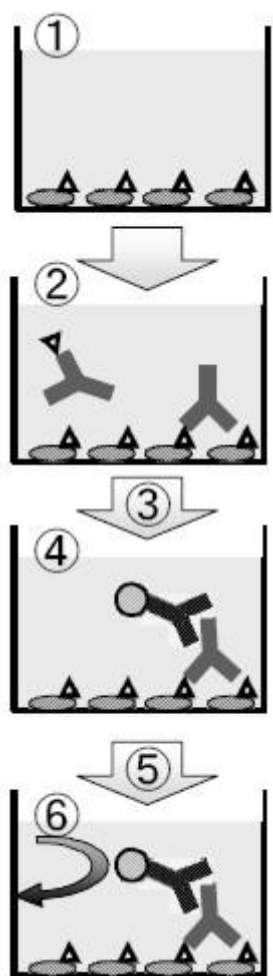
4 MATERIALI IN METODE

V okviru diplomske naloge smo se poslužili dveh metod, encimsko-immunske (ELISA) za določevanje HEL in reagenčnega kompleta za določanje TAC (celokupne antioksidantne kapacitete).

4.1 ELISA za določevanje HEL (heksanoillizina)

4.1.1 Princip metode

S to metodo določamo heksanoillizin (HEL), ki je kazalec oksidativne poškodbe lipidov. HEL ELISA komplet je encimsko-immunski test, s katerim kvantitativno določamo HEL. Temelji na mišjih monoklonskih protitelesih klona 5H4, ki so specifična za HEL. Določamo ga lahko v urinu, serumu in drugih bioloških vzorcih.



Slika 4 prikazuje princip metode ELISA. Vdolbinice mikrotitrne plošče so predhodno prekrivane s heksanoillizinom, vezanim na goveji serumski albumin (BSA) (1). Vzorce in standarde pipetiramo v vdolbinice. HEL v vzorcu oz. standardu tekmuje s HEL, vezanim na površino vdolbinic za vezavo na monoklonska protitelesa (2). Višja koncentracija HEL v vzorcu povzroči manjšo vezavo protiteles na HEL, vezan na površini vdolbinic. Komplekse antigen (HEL v vzorcu oz. standardu)-protitelo speremo, pri tem pa na mikrotitrski plošči v vdolbinicah ostanejo protitelesa, vezana na prvotno dodan HEL (3). Dodamo s peroksidazo konjugirano sekundarno protitelo (4), nato nevezanega speremo (5). Po dodatku kromogena pride do obarvanja glede na količino vezanih protiteles na HEL (6). Reakcijo prekinemo s stop raztopino, nato pa merimo absorbanco pri 450 nm. Glede na umeritveno krivuljo standarda lahko izračunamo koncentracijo HEL v vzorcu.

Slika 4: Princip metode ELISA

4.1.2 Priprava vzorca

Aseptično zbiramo prvi jutranji urin (srednji curek) v sterilno embalažo. Shranimo pri temperaturi -80°C . Pred analizo jih odmrzujemo na sobni temperaturi tri ure, nato centrifugiramo na 10000 rpm 10 minut (s tem odstranimo netopne delce), odlijemo supernatant in ga redčimo s tremi volumni s fosfatom pufrane fiziološke raztopine.

4.1.3 Reagenti in oprema

Reagenti so del reagenčnega kompleta HEL ELISA (Jaica, Fukuroi, Japan, kataloška številka KHL-700E; slika 5):

- HEL mikrotitrna plošča, prekrita s HEL vezanim na goveji serumski albumin (BSA) – 8 x12 vdolbinic,
- primarna protitelesa: specifična monoklonska protitelesa za HEL (1 viala –7 mL),
- sekundarna protitelesa: s peroksidazo konjugirana protitelesa proti mišjim IgG (1 viala),
- pufer za sekundarna protitelesa: s fosfatom pufrana fiziološka raztopina (1 viala – 12 mL),
- kromogen: 3-,3',5-,5'-tetrametilbenzidin (1 viala – 250 μL),
- pufer za kromogen: vodikov peroksid/citrat-fosfatni pufer (1 viala – 12 mL),
- pufer za spiranje: koncentrirana s fosfatom pufrana fiziološka raztopina (2 viali – 25 mL x 2),
- stop raztopina: 1 M fosforna kislina (1 viala – 12 mL),
- standard A-F: Bz-Gly-Hexanoyl-Lys (vsak 1 viala – 500 μL) (A: 2,6; B:7,7; C:22,7; D:69,7; E:207; F:624 nM),
- adhezivni trak: za preprečevanje izparevanja.



Slika 5: Sestava reagenčnega kompleta za metodo ELISA

Pogoji shranjevanja reagenčnega kompleta: pri temperaturi 2–8 °C. Ne sme zmrzniti.

Rok uporabe: dve leti. Po odprtju vial je komplet treba uporabiti v enem tednu.

Območje merjenja: 2–700 nM.

4.1.4 Aparature in ostali pripomočki

Pri delu smo uporabljali naslednje aparature in pripomočke:

- spektrofotometrični čitalec mikrotitrskih plošč za merjenje absorbance pri valovni dolžini 450 nm (MPR A4i, Tosoh Corporation, Tokyo, Japan),
- pipete (50–200 µL) z nastavki,
- destilirana voda (za pripravo raztopine za spiranje),
- hladilnik,
- centrifuga,
- papirnate brisače.

4.1.5 Postopek kvantitativnega določanja HEL

Pri delu smo se poslužili naslednjega postopka:

- delamo na sobni temperaturi,
- iz kompleta vzamemo mikrotitrsko ploščo,
- pripravimo raztopino za spiranje: vsebino ene vialice pufru za spiranje zmešamo s 100 mL destilirane vode,

- v vsako vdolbinico mikrotitrne plošče dodamo 50 μL standarda (A-F) oz. vzorca (za slepo raztopino uporabimo 100 μL raztopine za spiranje),
- v vse vdolbinice mikrotitrne plošče (razen v slepo raztopino) dodamo 50 μL raztopine primarnih protiteles,
- z adhezivnim trakom pokrijemo mikrotitrsko ploščo in jo rahlo pretresemo v vodoravni smeri, nato jo prek noči hranimo v hladilniku na 4–7 $^{\circ}\text{C}$,
- pripravimo raztopino sekundarnih protiteles: eno vialo sekundarnih protiteles zmešamo z 12 mL pufra za sekundarna protitelesa, ki je stabilna en teden pri 4 $^{\circ}\text{C}$,
- mikrotitrsko ploščo odkrijemo, jo obrnemo okrog in z nje odlijemo vsebino. Osušimo jo s papirnato brisačo, nato pa speremo z raztopino za izpiranje (ponovimo dvakrat),
- v vdolbinice dodamo 100 μL raztopine sekundarnih protiteles in ploščo pokrijemo z adhezivnim trakom ter rahlo premešamo vsebino z nežnim pretresanjem plošče v vodoravni smeri,
- inkubiramo na sobni temperaturi (20–24 $^{\circ}\text{C}$) eno uro,
- pripravimo raztopino kromogena: 120 μL kromogena dodamo eno vialo pufra za kromogen (pripravimo tik pred uporabo),
- odkrijemo mikrotitrsko ploščo, jo trikrat speremo z raztopino za spiranje in osušimo s papirnato brisačo,
- dodamo 100 μL raztopine kromogena v vse vdolbinice, nato 15 minut inkubiramo na sobni temperaturi zaščiteno pred svetlobo,
- dodamo 100 μL stop raztopine, rahlo premešamo, nato po treh minutah merimo absorbanco pri 450 nm,
- glede na umeritveno krivuljo standarda izračunamo koncentracijo HEL v vzorcu.

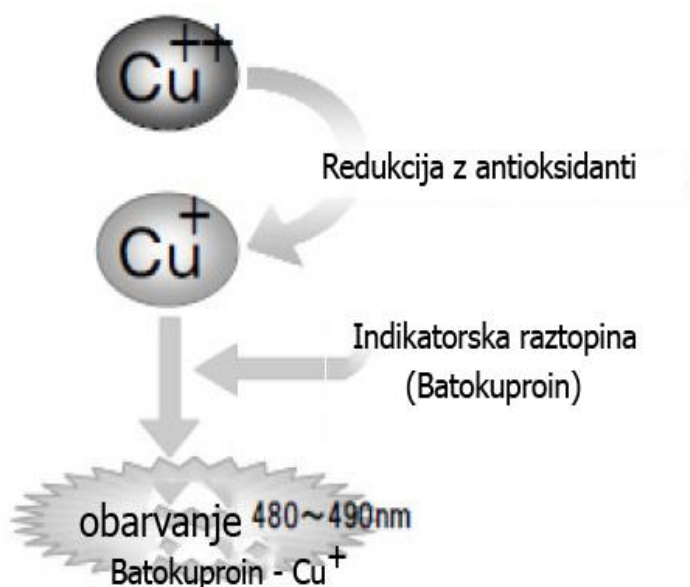
Umeritveno krivuljo pripravimo tako, da na os y nanašamo podatke o absorbanci, na os x pa logaritme koncentracij standarda HEL.

4.2 Reagenčni komplet za določevanje TAC (celokupne antioksidantne kapacitete)

4.2.1 Princip metode

Enostaven in praktičen način za merjenje antioksidantne kapacitete je reagenčni komplet TAC. Temelji na merjenju redukcije bakrovih ionov ($\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$). Rezultate dobimo že v petih minutah. Vzorce zmešamo z raztopino Cu^{2+} . Antioksidanti iz vzorcev reducirajo Cu^{2+} v Cu^+ , ti pa nadalje reagirajo z indikatorsko raztopino (batokuproinom). Nastale komplekse lahko detektiramo z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 480–490 nm. Antioksidantno kapaciteto izračunamo iz količine nastalih Cu^+ ionov. Princip metode prikazuje slika 6.

TAC reagenčni komplet lahko poleg hidrofilnih antioksidantov, kot sta vitamin C in glutation, določa tudi hidrofobne antioksidante, kot je vitamin E. Z njim lahko določamo antioksidantno kapaciteto biološkim vzorcem (serumu, amnijski tekočini), hrani in pijači.



Slika 6: Princip metode za določevanje TAC

4.2.2 Priprava vzorca

V našem primeru smo za vzorec uporabili amnijsko tekočino, ki smo jo pridobili z amniocentezo. Pri amniocentezi se odvzame majhna količina plodovnice, ki obdaja otroka v maternici. Najprej z ultrazvočnim pregledom ugotovimo lego otroka in posteljice. Kožo trebuha nad področjem maternice očistimo z antiseptično tekočino. Nato potisnemo tanko iglo prek trebušne stene v maternico in z brizgo odvezamemo vzorec (približno 20 ml ali 4 čajne žličke) plodovnice. Priporočljivo je, da vzorec takoj po odvzemu zamrznemo zaradi nestabilnosti nekaterih antioksidantov, kot so sečna kislina, vitamin C in koencim Q 10.

4.2.3 Reagenti in oprema

Reagenti so del reagenčnega kompleta TAC (Jaica, Fukuroi, Japan, kataloška številka KPA-050; slika 7):

- standard (sečna kislina v prahu): 1 viala (za pripravo 2 mM raztopine),
- topilo za vzorce: 1 steklenička (60mL),
- raztopina Cu^{2+} : 1 steklenička (5mL),
- indikatorska raztopina (batokuproin): 1 steklenička (5mL)
- stop raztopina: 1 steklenička (5mL),
- mikrotirska plošča.



Slika 7: Sestava reagenčnega kompleta za določevanje TAC

Pogoji shranjevanja reagenčnega kompleta: sobna temperatura (10–25 °C).

Rok uporabe: 3 leta.

Območje merjenja: 21,9–4378 μM .

4.2.4 Aparature in ostali pripomočki

Pri delu smo uporabljali naslednje aparature in pripomočke:

- spektrofotometrični čitalec mikrotitrskih plošč za merjenje absorbance pri valovni dolžini 490 nm,
- pipete z nastavki,
- plastične epruvete,
- destilirana voda.

Priprava standardne raztopine sečne kisline (2 mM) iz sečne kisline v prahu: vzamemo vialo s standardom, jo z destilirano vodo dopolnimo do oznake in pustimo 3–4 ure na sobni temperaturi.

Priprava različnih koncentracij standardnih raztopin: 2 mM standardno raztopino sečne kisline 2-, 4-, 8-, 16-, 32-krat redčimo z destilirano vodo, da dobimo naslednje koncentracije standardne raztopine – 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM, 0,063 mM.

4.2.5 Postopek določanja celokupne antioksidantne kapacitete

Pri delu smo se poslužili naslednjega postopka:

- pripravimo pet plastičnih epruvet za standardne raztopine in eno za vzorec,
- v vsako epruveto vlijemo 390 μL topila, nato dodamo v prvih pet po 10 μL standardne raztopine naraščajočih koncentracij, v zadnjo pa 10 μL vzorca,
- po 200 μL raztopine iz vsake epruvete vlijemo v vdolbinice mikrotitrške plošče, za slepo raztopino pa uporabimo topilo,
- izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 490 nm (absorbanca 1),
- v vsako vdolbinico dodamo 50 μL raztopine Cu^{2+} , rahlo premešamo in inkubiramo na sobni temperaturi 3 minute,
- v vsako vdolbinico dodamo 50 μL indikatorske raztopine, rahlo premešamo in inkubiramo na sobni temperaturi 3 minute,
- v vsako vdolbinico dodamo 50 μL stop raztopine, rahlo premešamo in izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 490 nm (absorbanca 2),

- glede na umeritveno krivuljo standarda izračunamo celokupno antioksidantno kapaciteto vzorca.

Umeritveno krivuljo pripravimo tako, da na os y nanašamo razlike med absorbanco 2 in absorbanco 1 (abs.2–abs.1), na os x pa naraščajoče koncentracije standarda sečne kisline. Pri tem upoštevamo, da je 1 mM sečna kislina ekvivalentna 2189 μ M antioksidantov za redukcijo bakra.

4.3 Statistične metode

Zbrane podatke smo statistično obdelali s programom SPSS (Statistical Package for Social Science). Vsem izmerjenim in izračunanim vrednostim smo izračunali aritmetično sredino, standardni odklon in standardno napako aritmetične sredine. Prav tako smo za interpretacijo rezultatov uporabili korelacijo in t-test za neodvisne vzorce.

4.3.1 Korelacija

Korelacija je statistična metoda, ki proučuje moč povezave in medsebojno odvisnost dveh ali več spremenljivk. Če sta spremenljivki porazdeljeni normalno, uporabimo Pearsonov koeficient korelacije, če pa ena od spremenljivk ni normalno porazdeljena, prikažemo Spearmanov koeficient korelacije.

4.3.2 T-test za neodvisna vzorca

S pomočjo t-testa preverjamo domneve o enakosti dveh povprečij. To storimo tako, da izberemo neko (neodvisno) spremenljivko, ki vzorec razdeli na dva dela (dve skupini), nato pa za vsak del izračunamo povprečje izbrane spremenljivke, povprečji pa med seboj primerjamo. Hkrati tudi določimo stopnjo tveganja, na podlagi katere določimo kritično območje. Na vzorčnih podatkih izračunamo eksperimentalno vrednost statistike, in če le-ta pade v kritično območje, ničelno domnevo zavrnilo in sprejmemo alternativno domnevo ob že prej določeni stopnji tveganja, sicer pa rečemo, da vzorčni podatki kažejo na statistično neznačilne razlike med parametrom in vzorčno oceno.

S pomočjo *Levenovega testa enakosti varianc* smo ugotovili ali sta varianci v obeh skupinah enaki ($p \geq 0,05$) ali ne ($p < 0,05$) in to tudi upoštevali pri analizi.

5 REZULTATI

Vse rezultate smo statistično obdelali s pomočjo programa SPSS (Statistical Package for Social Science) pri 0,05 in 0,01 stopnji tveganja. Rezultati obdelave so podani v obliki statistične značilnosti –signifikance – in predstavljajo izračunano verjetnost dane korelacije pri 0,05 in 0,01 stopnji tveganja. Vrednost signifikance (p), ki je manjša od stopnje tveganja 0,05 oz. 0,01, vodi k sprejetju alternativne hipoteze, vrednost, večja od 0,05 oz. 0,01, pa k ohranitvi ničelne hipoteze. Sprejetje alternativne hipoteze pomeni, da povezava med določenima spremenljivkama obstaja.

Podatki, s katerimi bomo operirali v nadaljevanju, so prve orientacijske vrednosti določenih kazalcev v urinu in amnijski tekočini. V literaturi nismo zasledili znanih referenčnih povprečnih vrednosti (razen za TAC), s katerimi bi lahko primerjali rezultate naših meritev, zato smo jih primerjali med seboj, kar je bil tudi namen naše diplomske naloge.

Hipoteza H1: Obstaja korelacija med ELISA-HEL (nM) in LC-MS/MS-HEL, nM (oboje v urinu).

Koeficiente korelacije uporabljamo, kadar proučujemo povezanost med dvema intervalnima ali razmernostnima spremenljivkama. Če sta obe spremenljivki normalno porazdeljeni, prikažemo Pearsonov koeficient korelacije, če pa ena spremenljivka ni normalno porazdeljena, prikažemo Spearmanov koeficient korelacije. Pearsonov koeficient korelacije je mera linearne povezanosti med dvema numeričnima normalno porazdeljenima spremenljivkama (35).

Pri preverjanju hipoteze smo uporabili sledeči spremenljivki:

- ELISA-HEL (nM),
- LC-MS/MS-HEL, nM (oboje v urinu).

Najprej smo preverili predpostavko o normalni porazdeljenosti spremenljivk, ki jo preverimo tako, da izračunamo koeficient asimetričnosti (angl. Skewness) in koeficient sploščenosti (angl. Kurtosis). Koeficient asimetričnosti pove, kako so proučevane enote

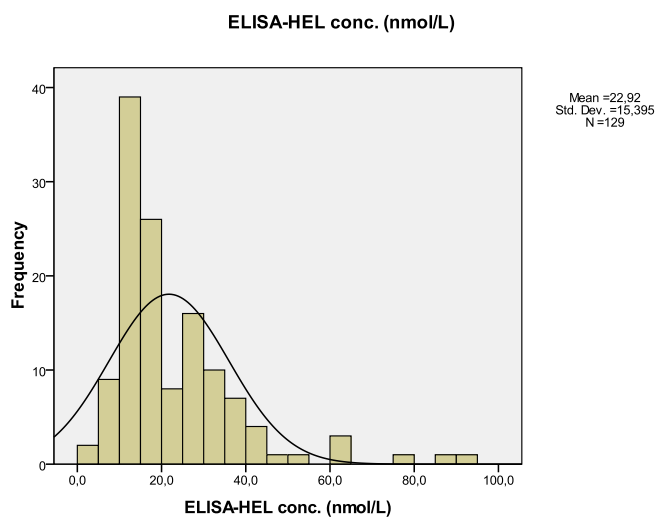
porazdeljene glede na vrednost spremenljivke. Spremenljivka je asimetrična v desno, če je koeficient asimetrije pozitiven in večji od 1 in obratno. Koeficient sploščenosti pove, kako so proučevane enote porazdeljene glede na vrednost spremenljivke. Kadar je porazdelitev spremenljivke bolj sploščena, je koeficient sploščenosti negativen, in kadar je koničasta, je koeficient pozitiven. Normalna porazdelitev spremenljivke pa je takrat, kadar je koeficient okrog 0 in maksimalno + ali -1. Koeficienta asimetrije in sploščenosti vedno gledamo skupaj. Če sta vrednosti za oba koeficienta med -1 in 1, rečemo, da je spremenljivka normalno porazdeljena.

Tabela II nam prikazuje, da sta vrednosti koeficientov sploščenosti krepko čez, in tako lahko rečemo, da obe spremenljivki nista normalno porazdeljeni.

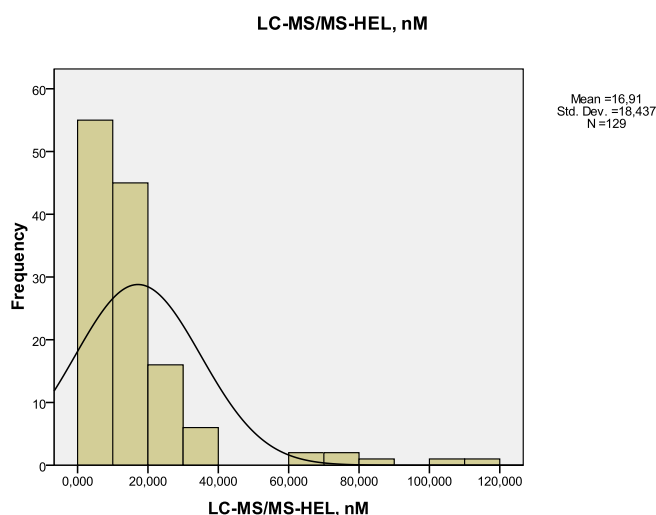
Tabela II: Opisne statistike za metodi ELISA in LC-MS/MS

	ELISA-HEL nM	LC-MS/MS-HEL, nM
N Število vzorcev	129	129
Manjkajoči	0	0
Povprečna vrednost	22,920	16,90826
Standardni odklon	15,3948	18,437230
Skewness	2,127	3,132
Standardni odklon za Skewness	,213	,213
Kurtosis	5,923	11,532
Standardni odklon za Kurtosis	,423	,423
Minimalna vrednost	4,5	,000
Maksimalna vrednost	93,4	117,000

Grafična ponazoritev normalne porazdeljenosti uporabljenih spremenljivk:



Graf 1: Histogram frekvenčne porazdelitve ELISA-HEL



Graf 2: Histogram frekvenčne porazdelitve LC-MS/MS-HEL

Iz tabele II ter grafov 1 in 2 izhaja, da obe spremenljivki nista normalno porazdeljeni, tako da za izračun povezanosti med spremenljivkama uporabimo Spearmanov koeficient korelacije.

Tabela III nam prikazuje izračun Spearmanovega koeficienta korelacije.

Tabela III: Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije za metodi ELISA in LC-MS/MS in enačba regresijske premice

	ELISA-HEL in LC-MS/MS-HEL
Spearmanov koeficient	,462**
Sig.	,000
Enačba premice	$y = 0,180x + 19,86$

** . $\alpha = 0,01$

Iz tabele III izhaja, da korelacijski koeficient med proučevanima spremenljivkama znaša 0,462, kar pomeni, obstaja srednje močna pozitivna povezanost. Korelacijski koeficient je statistično značilen ($p < 0,05$), kar pomeni da med proučevanima spremenljivkama ELISA-HEL (nM) in LC-MS/MS-HEL, nM obstaja statistično značilna povezanost.

Hipotezo H1 smo tako na podlagi izračuna Spearmanovega koeficienta korelacije potrdili, saj obstaja srednje močna pozitivna povezanost med ELISA-HEL (nM) in LC-MS/MS-HEL, nM.

Hipoteza H2: Obstaja povezava med BMI in U-ELISA-HEL (nmol/mmol kreatinin), U-LC-MS/MS-HEL (nmol/mmol kreatinin), U-PRL (nmol/mmol kreatinin), U-DYI (nmol/mmol kreatinin) (URIN) ter vsemi kazalci, ki spadajo pod AMNIJSKO TEKOČINO (TAC (μM), PRL (nM), DYI (nM), Nitrotirozin (nM)).

Pri preverjanju hipoteze H2 smo uporabili koeficiente korelacije, bodisi Pearsonov bodisi Spearmanov, glede na to, ali sta bila para spremenljivk normalno porazdeljena ali pa nista bila.

Pri preverjanju hipoteze smo tako uporabili sledeče pare spremenljivk:

- BMI in U-ELISA-HEL (nmol/mmol kreatinin),
- BMI in U-LC-MS/MS-HEL (nmol/mmol kreatinin),
- BMI in U-PRL (nmol/mmol kreatinin),
- BMI in U-DYI (nmol/mmol kreatinin) (URIN),
- BMI in TAC (μM),

- BMI in PRL (nM),
- BMI in DYI (nM),
- BMI in Nitrotirozin (nM) (AMNIJSKA TEKOČINA).

Najprej smo preverili normalno porazdeljenost spremenljivk BMI za URIN.

Tabela IV: Opisne statistike BMI za URIN

		Statistics				
		BMI	U-ELISA- HEL(nmol/mm olkreatinin)	U-LC-MS/MS- HEL(nmol/mm olkreatinin)	U- PRL(nmol/mm olkreatinin)	U- DYI(nmol/mmo lkreatinin)
N	Število vzorcev	127	127	127	127	128
	Manjkajoči	2	2	2	2	1
	Povprečna vrednost	24,0130	7,2083	4,1056	27,6865	9,2343
	Standardni odklon	4,05594	6,47502	2,53890	9,67068	2,05290
	Skewness	1,040	4,644	1,622	1,116	-,158
	Standardni odklon za Skewness	,215	,215	,215	,215	,214
	Kurtosis	1,204	32,523	3,681	2,934	3,286
	Standardni odklon za Kurtosis	,427	,427	,427	,427	,425
	Minimalna vrednost	17,99	1,39	,00	6,66	,00
	Maksimalna vrednost	39,78	59,05	15,71	71,46	15,85

Iz tabele IV izhajajo, da ni normalno porazdeljena nobena spremenljivka, zato bomo pri vseh parih spremenljivk za izračun uporabili Spearmanov koeficient korelacije (tabela V).

Tabela V: Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije med BMI in spremenljivkami s področja URIN

	BMI	U-ELISA-HEL	U-LC-MS/MS-HEL	U-PRL	U-DYI
Spearmanov koeficient	1,000	0,133	-0,203*	-0,201*	-0,191*
Sig.	.	0,140	0,023	0,024	0,032
N	127	125	125	125	126

*. $\alpha = 0,05$

Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije nam prikazuje, da so pri treh parih spremenljivk povezave negativne in šibke (povezave označene v tabeli z zeleno barvo). Pri enem paru spremenljivk BMI in U-ELISA-HEL pa je povezanost pozitivna in šibka. Med tremi pari spremenljivk od skupno štirih je povezanost statistično značilna ($p < 0,05$) (v tabeli označeno z modro) in je moč povezanost posplošiti na celotno populacijo. Povezanost med BMI in U-ELISA-HEL ni statistično značilna ($p > 0,05$) in je ne moremo posplošiti na celotno populacijo.

Nato smo se lotili izračuna normalne porazdeljenosti za pare spremenljivk BMI in področja AMNIJSKE TEKOČINE.

Tabela VI nam prikazuje, da so spremenljivke TAC, PRL in Nitrotirozin normalno porazdeljene, medtem ko spremenljivki BMI in DYI nista normalno porazdeljeni.

Če sta obe spremenljivki v paru normalno porazdeljeni, lahko uporabimo za izračun korelacije Pearsonov koeficient korelacije, če pa ena spremenljivka v paru ni normalno porazdeljena, uporabimo Spearmanov koeficient korelacije, ki smo ga tudi uporabili.

Tabela VI: Opisne statistike BMI in AMNIJSKA TEKOČINA

	BMI	TAC μ M	PRL, nM	DYI, nM	Nitrotirozin, nM
N Število vzorcev	127	128	128	128	128
Manjkajoči	2	1	1	1	1
Povprečna vrednost		579,48	3,8683	3,58809	1,47169
Standardni odklon		84,416	,85292	1,076090	,506219
Skewness		,291	,049	2,839	,314
Standardni odklon za Skewness		,214	,214	,214	,214
Kurtosis		-,112	,369	20,237	,203
Standardni odklon za Kurtosis		,425	,425	,425	,425
Minimalna vrednost		383	1,50	1,155	,266
Maksimalna vrednost		818	6,45	11,300	2,970

Nato smo izvedli izračun Spearmanovega koeficienta korelacije parov spremenljivk s področja AMNIJSKE TEKOČINE v povezavi s spremenljivko BMI (tabela VII).

Tabela VII: Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije med BMI in spremenljivkami s področja AMNIJSKE TEKOČINE

	BMI	TAC μ M	PRL, nM	DYI, nM	Nitrotirozin, nM
Spearmanov koeficient	1,000	,190*	,059	,008	-,042
Sig.	.	,033	,513	,926	,639
N	127	126	126	126	126

*. $\alpha = 0,05$

Tabela VII nam prikazuje, da je korelacija med BMI in TAC, PRL in DYI pozitivna in šibka (v tabeli VII označeno z zeleno). Korelacija med BMI in Nitrotirozinom znaša – 0,042 in je negativna ter šibka. Korelacija med spremenljivkama BMI in TAC je statistično značilna ($p < 0,05$), medtem ko korelacije med ostalimi spremenljivkami niso statistično značilne (v tabeli VII označeno z modro).

Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije za obe skupini spremenljivk je podal odgovor, da korelacije med vsemi pari spremenljivk niso statistično značilne. Tako smo hipotezo H2 zavrnili.

Hipoteza H3: Obstajajo statistično značilne razlike glede na to, ali je BMI do 25 ali nad 25 pri U-ELISA-HEL (nmol/mmol kreatinin), U-LC-MS/MS-HEL (nmol/mmol kreatinin), U-PRL (nmol/mmol kreatinin), U-DYI (nmol/mmol kreatinin) (URIN) in pri vseh kazalcih, ki spadajo pod AMNIJSKO TEKOČINO (TAC (μ M), PRL (nM), DYI (nM), Nitrotirozin (nM)).

Pri preverjanju hipoteze H3 smo se posluževali t-testa neodvisnih spremenljivk. Pri tem testu preverjamo, ali je povprečna vrednost iste spremenljivke v eni skupini enot različna (oziroma ali večja ali manjša) od povprečne vrednosti v drugi skupini enot.

Pri preverjanju hipoteze H3 smo uporabili sledeče pare spremenljivk:

- BMI in U-ELISA-HEL (nmol/mmol kreatinin),

- BMI in U-LC-MS/MS-HEL (nmol/mmol kreatinin),
- BMI in U-PRL (nmol/mmol kreatinin),
- BMI in U-DYI (nmol/mmol kreatinin) (URIN),
- BMI in TAC (μM),
- BMI in PRL (nM),
- BMI in DYI (nM),
- BMI in Nitrotirozin (nM) (AMNIJSKA TEKOČINA).

Najprej smo se lotili izračuna t-testa za sklop URIN. Tabela VIII nam prikazuje izračune aritmetične sredine, standardnega odklona in standardne napake aritmetične sredine.

Tabela VIII nam nadalje prikazuje, da pri vseh parih obstajajo razlike v povprečnih vrednostih glede na to, če se gleda BMI do 25 kg/m^2 in BMI nad 25 kg/m^2 .

Sedaj bomo preverili, če razlike v povprečjih veljajo tudi za celotno populacijo.

Tabela VIII: Osnovne opisne statistike sklopa URIN glede na to, ali je BMI do 25 kg/m^2 ali pa nad 25 kg/m^2

	BMI do 25 kg/m^2 in nad 25 kg/m^2	N	Povprečna vrednost	Standardni odklon	Standardna napaka aritmetične sredine
U-ELISA-HEL	do 25	84	7,1852	7,13072	,77803
	nad 25	41	7,4142	5,08938	,79483
U-LC-MS/MS-HEL	do 25	84	4,3909	2,81640	,30729
	nad 25	41	3,4843	1,76908	,27628
U-PRL	do 25	84	28,1077	9,86451	1,07631
	nad 25	41	26,4214	9,10567	1,42207
U-DYI	do 25	84	9,5673	1,91139	,20855
	nad 25	42	8,6007	2,23548	,34494

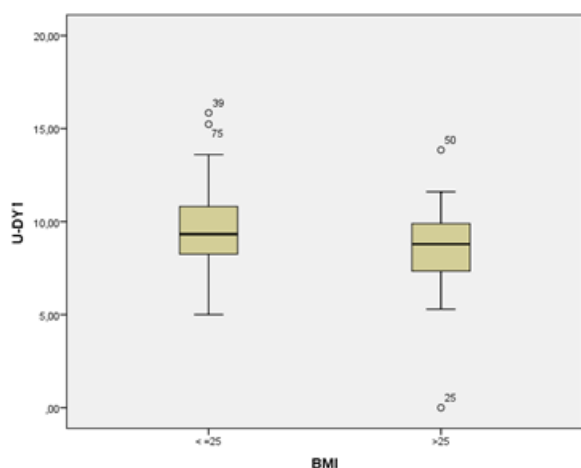
Tabela IX: T-test sklopa URIN glede na to, ali je BMI do 25 kg/m² ali nad 25 kg/m²

		Levenov test za enakost varianc		t-test za enakost povprečnih vrednosti		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
U-ELISA-HEL	Predpostavka o enakih variancah	,017	,896	-,184	123	,854
	Predpostavka o neenakih variancah			-,206	106,331	,837
U-LC-MS/MS-HEL	Predpostavka o enakih variancah	6,445	,012	1,885	123	,062
	Predpostavka o neenakih variancah			2,194	115,210	,030
U-PRL	Predpostavka o enakih variancah	,044	,834	,920	123	,360
	Predpostavka o neenakih variancah			,945	85,441	,347
U-DYI	Predpostavka o enakih variancah	,293	,589	2,527	124	,013
	Predpostavka o neenakih variancah			2,398	71,718	,019

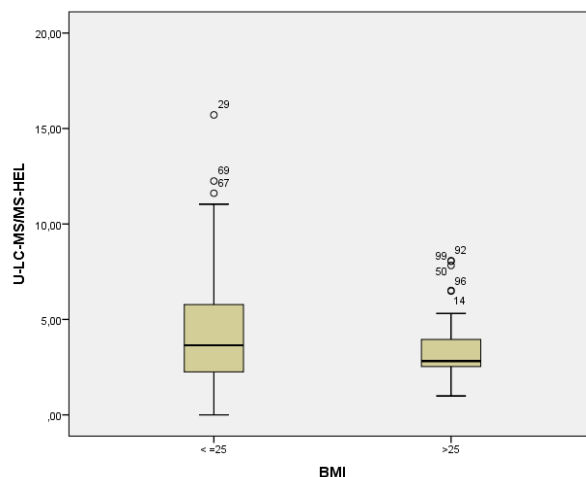
Tabela IX je razdeljena na dva dela. V prvem delu (Levenejev test za enakost varianc) preverimo, ali sta varianci v obeh skupinah enaki. Na podlagi tega sklepamo, katera vrstica je ustrezna za preverjanje domneve o enakosti povprečij v drugem delu tabele (t-test za enakost povprečnih vrednosti).

V prvem delu tabele vidimo, da je signifikanca manjša od 0,05 (natančneje znaša 0,012) pri U-LC-MS/MS-HEL, kar pomeni, da ničelno domnevo lahko zavrnemo in sklenemo, da sta varianci v skupinah različni. To pomeni, da v drugem delu tabele gledamo drugo vrstico (Predpostavka o neenakih variancah). Pri interpretaciji nas predvsem zanima stopnja statistične značilnosti. Vidimo, da signifikanca znaša 0,030 ($p < 0,05$), kar pomeni, da pri U-LC-MS/MS-HEL obstajajo statistično značilne razlike med tem, ali je BMI pod 25 ali nad 25 tudi na celotni populaciji (graf 4).

Tudi pri spremenljivki U-DYI je v drugem delu tabele vidno, da je signifikanca manjša od 0,05, vendar ker je v prvem delu tabele višja kot 0,05, gledamo vrstico (Predpostavka o enakih variancah), kjer je pri tej spremenljivki vrednost signifikance (obojestranske) 0,013. Tako lahko tudi za spremenljivko U-DYI rečemo, da velja za celotno populacijo, da obstajajo razlike v vrednosti U-DYI glede na to, ali je BMI pod 25 kg/m² ali pa nad 25 kg/m² (graf 3).



Graf 4: Kvantilni diagram s prikazom porazdelitve meritev U-DYI (nmol/mmol kreatinin) pri BMI ≤ 25 kg/m² oz. BMI > 25 kg/m²



Graf 3: Kvantilni diagram s prikazom porazdelitve meritev U-LC-MS/MS (nmol/mmol kreatinin) pri BMI ≤ 25 kg/m² oz. BMI > 25 kg/m²

Pri preostalih dveh spremenljivkah (U-ELISA-HEL in U-PRL) ne obstajajo statistično značilne razlike v vrednostih glede na to, ali je BMI do 25 kg/m² ali nad 25 kg/m².

Nato smo izvedli statistično analizo t-test še za sklop AMNIJSKA TEKOČINA. Tabela X nam prikazuje osnovne opisne statistike področja AMNIJSKA TEKOČINA.

Tabela X: Osnovne opisne statistike področja AMNIJSKA TEKOČINA glede na to, ali je BMI do 25 kg/m² ali pa nad 25 kg/m²

	BMI do 25 kg/m ² in nad 25 kg/m ²	N	Povprečna vrednost	Standardni odklon	Standardna napaka aritmetične sredine
TAC, μM	do 25	84	572,60	80,779	8,814
	nad 25	42	592,26	91,444	14,110
PRL, nM	do 25	84	3,8507	,91403	,09973
	nad 25	42	3,9182	,71706	,11064
DYI, nM	do 25	84	3,64274	1,203952	,131362
	nad 25	42	3,48000	,795962	,122820
Nitrotirozin, nM	do 25	84	1,46396	,534943	,058367
	nad 25	42	1,47864	,457514	,070596

Izračun aritmetične sredine po skupinah nam prikazuje, da so pri vseh spremenljivkah s področja AMNIJSKA TEKOČINA opazne razlike v povprečnih vrednostih glede na to, ali je BMI manjši ali pa večji od 25 kg/m² (tabela X).

Nato smo s pomočjo t-testa neodvisnih spremenljivk preverili, ali navedeno velja tudi za celotno populacijo.

Tabela XI: T-test sklopa AMNIJSKA TEKOČINA glede na to, ali je BMI do 25 kg/m² ali nad 25 kg/m²

		Levenov test za enakost varianc		t-test za enakost povprečnih vrednosti		
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)
TAC, µM	Predpostavka o enakih variancah	2,048	,155	-1,232	124	,220
	Predpostavka o neenakih variancah			-1,182	73,694	,241
PRL, nM	Predpostavka o enakih variancah	2,954	,088	-,419	124	,676
	Predpostavka o neenakih variancah			-,454	101,566	,651
DYI, nM	Predpostavka o enakih variancah	,627	,430	,793	124	,429
	Predpostavka o neenakih variancah			,905	114,464	,367
Nitrotirozin, nM	Predpostavka o enakih variancah	,370	,544	-,152	124	,879
	Predpostavka o neenakih variancah			-,160	94,417	,873

Na podlagi izračuna t-testa neodvisnih spremenljivk za področje AMNIJSKA TEKOČINA je razvidno, da prav pri nobeni spremenljivki ne moremo posplošiti razlike v povprečnih ocenah na populacijo glede na to, ali je BMI večji ali manjši od 25 kg/m² (tabela XI).

Hipotezo H3 smo tako zavrnili, saj pri vseh spremenljivkah na podlagi izračunov t-testa neodvisnih spremenljivk ne moremo reči, da obstajajo statistično značilne razlike v povprečnih vrednostih glede na to, ali je BMI večji ali manjši od 25. Na področju URIN sta dve od štirih spremenljivk taki, da je izračun prikazal statistične razlike, na področju AMNIJSKA TEKOČINA pa ni nobene spremenljivke, kjer bi bile razlike v povprečjih statistično značilne.

Hipoteza H4: Obstaja povezava med STAROSTJO NOSEČNICE in U-ELISA-HEL, U-LC-MS/MS-HEL, U-PRL, U-DYI ter vsemi kazalci, ki spadajo pod AMNIJSKO TEKOČINO (TAC (μ M), PRL (nM), DYI (nM), Nitrotirozin (nM)).

Pri preverjanju hipoteze H4 smo uporabili sledeče pare spremenljivk:

- STAROST in U-ELISA-HEL (nmol/mmol kreatinin),
- STAROST in U-LC-MS/MS-HEL (nmol/mmol kreatinin),
- STAROST in U-PRL (nmol/mmol kreatinin),
- STAROST in U-DYI (nmol/mmol kreatinin) (URIN),
- STAROST in TAC (μ M),
- STAROST in PRL (nM),
- STAROST in DYI (nM),
- STAROST in Nitrotirozin (nM) (AMNIJSKA TEKOČINA).

Pri preverjanju hipoteze H4 smo se posluževali koeficientov korelacije. Najprej smo preverili normalno porazdeljenost spremenljivk s področja URIN.

Tabela XII nam prikazuje, da so vrednosti koeficientov asimetričnosti (angl. Skewness) in sploščenosti (angl. kurtosis) večje od -1 in 1 , tako da lahko rečemo, da nobena spremenljivka ni normalno porazdeljena. Na podlagi tega smo nato pri preverjanju povezanosti pri vseh parih spremenljivk uporabili Spearmanov koeficient korelacije, ki se uporablja v tovrstnih primerih.

Tabela XII: Opisne statistike STAROST za področje URIN

	STAROST	U-ELISA-HEL	U-LC-MS/MS-HEL	U-PRL	U-DYI
N Število vzorcev	129	127	127	127	128
Manjkajoči	0	2	2	2	1
Povprečna vrednost	36,81	7,2083	4,1056	27,6865	9,2343
Standardni odklon	3,559	6,47502	2,53890	9,67068	2,05290
Skewness	-1,303	4,644	1,622	1,116	-,158
Standardni odklon za Skewness	,213	,215	,215	,215	,214
Kurtosis	3,202	32,523	3,681	2,934	3,286
Standardni odklon za Kurtosis	,423	,427	,427	,427	,425
Minimalna vrednost	22	1,39	,00	6,66	,00
Maksimalna vrednost	44	59,05	15,71	71,46	15,85

Iz tabele XII izhaja, da ni normalno porazdeljena nobena spremenljivka, zato bomo pri vseh parih spremenljivk za izračun uporabili Spearmanov koeficient korelacije.

Tabela XIII: Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije med STAROSTJO in spremenljivkami s področja URIN

	STAROST	U-ELISA-HEL	U-LC-MS/MS-HEL	U-PRL	U-DYI
Spearmanov koeficient	1,000	-,090	-,075	-,175*	-,087
Sig.	.	,316	,404	,049	,329
N	129	127	127	127	128

*. $\alpha = 0,05$

Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije med STAROSTJO in spremenljivkami s področja URIN (tabela XIII) je pokazal, da so povezave povsod negativne in šibke. Statistično značilna je le korelacija med STAROSTJO in U-PRL ($p < 0,05$).

Nato smo se lotili preverjanja povezanosti med STAROSTJO in spremenljivkami skupine AMNIJSKA TEKOČINA.

Najprej smo preverili normalno porazdeljenost uporabljenih spremenljivk. Tabela XIV nam prikazuje, da spremenljivka STAROST ni normalno porazdeljena, tako da v parih z

ostalimi spremenljivkami nikoli nista obe normalno porazdeljeni. Tako smo za izračun povezanosti pri vseh parih spremenljivk uporabili Spearmanov koeficient korelacije.

Tabela XIV: Opisne statistike STAROST in skupine AMNIJSKA TEKOČINA

	starost	TAC μ M	PRL, nM	DYI, nM	Nitrotirozin, nM
N Število vzorcev	129	128	128	128	128
Manjkajoči	0	1	1	1	1
Povprečna vrednost	36,81	579,48	3,8683	3,58809	1,47169
Standardni odklon	3,559	84,416	,85292	1,076090	,506219
Skewness	-1,303	,291	,049	2,839	,314
Standardni odklon za Skewness	,213	,214	,214	,214	,214
Kurtosis	3,202	-,112	,369	20,237	,203
Standardni odklon za Kurtosis	,423	,425	,425	,425	,425
Minimalna vrednost	22	383	1,50	1,155	,266
Maksimalna vrednost	44	818	6,45	11,300	2,970

Naslednja tabela XV nam prikazuje izračun Spearmanovega koeficienta korelacije med STAROSTJO in spremenljivkami s področja AMNIJSKA TEKOČINA.

Tabela XV: Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije med STAROSTJO in skupino AMNIJSKA TEKOČINA

	STAROST	TAC	PRL	DYI	Nitrotirozin
Spearmanov koeficient	1,000	-,091	-,266**	,070	-,018
Sig.	.	,307	,002	,435	,843
N	129	128	128	128	128

*. $\alpha = 0,05$

Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije med proučevanimi pari je pokazal, da je povezanost statistično značilna ($p < 0,05$) le med STAROSTJO in PRL. Korelacijski koeficient znaša $-0,266$, kar pomeni, da je povezanost šibka in negativna.

Hipotezo H4 smo zavrnili, saj povezanosti med vsemi pari spremenljivk niso statistično značilne.

Hipoteza H5: Obstajajo statistično značilne razlike glede na to, ali je starost do 37 ali nad 37 pri vrednostih U-ELISA-HEL, U-LC-MS/MS-HEL, U-PRL, U-DYI (URIN) in pri vseh kazalcih, ki spadajo pod AMNIJSKO TEKOČINO (TAC (μM), PRL (nM), DYI (nM), Nitrotirozin (nM)).

Hipotezo H5 smo preverjali na podlagi t-testa neodvisnih spremenljivk. Pri tem smo uporabili sledeče pare spremenljivk:

- STAROST in U-ELISA-HEL (nmol/mmol kreatinin),
- STAROST in U-LC-MS/MS-HEL (nmol/mmol kreatinin),
- STAROST in U-PRL (nmol/mmol kreatinin),
- STAROST in U-DYI (nmol/mmol kreatinin) (URIN),
- STAROST in TAC (μM),
- STAROST in PRL (nM),
- STAROST in DYI (nM),
- STAROST in Nitrotirozin (nM) (AMNIJSKA TEKOČINA).

Kot pri predhodnih analizah smo se tudi pri testiranju hipoteze H5 najprej lotili izračuna t-testa za URIN. Tabela XVI nam prikazuje izračune aritmetične sredine, standardnega odklona in standardne napake aritmetične sredine.

Tabela nam nadalje prikazuje, da pri vseh parih obstajajo razlike v povprečnih vrednostih glede na to, če je STAROST do 37 let ali nad 37 let.

Nato smo na podlagi izračuna t-testa preverili, če navedeno velja tudi za celotno populacijo (tabela XVII).

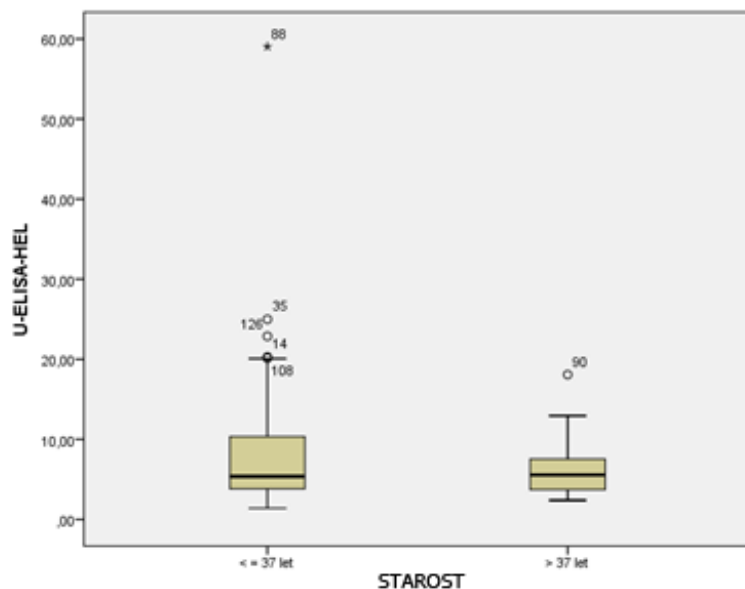
Tabela XVI: Osnovne opisne statistike področja URIN glede na to, ali je STAROST do 37 ali pa nad 37 let

	STAROST do 37 ali nad37	N	Povprečna vrednost	Standardni odklon	Standardna napaka aritmetične sredine
U-ELISA-HEL	do 37 let	72	8,1921	8,09137	,95358
	nad 37 let	55	5,9204	2,96074	,39923
U-LC-MS/MS-HEL	do 37 let	72	4,4038	2,69969	,31816
	nad 37 let	55	3,7152	2,27686	,30701
U-PRL	do 37 let	72	28,4984	9,42818	1,11112
	nad 37 let	55	26,6236	9,96563	1,34376
U-DYI	do 37 let	73	9,4403	2,12791	,24905
	nad 37 let	55	8,9609	1,93411	,26080

Tabela XVII: T-test sklopa URIN glede na to, ali je STAROST do 37 ali nad 37 let

		Levenov test za enakost varianc		t-test za enakost povprečnih vrednosti		
		F	Sig.	T	Df	Sig. (2-tailed)
U-ELISA-HEL	Predpostavka o enakih variancah	10,492	,002	1,982	125	,050
	Predpostavka o neenakih variancah			2,198	94,263	,030
U-LC-MS/MS-HEL	Predpostavka o enakih variancah	,890	,347	1,522	125	,130
	Predpostavka o neenakih variancah			1,557	123,731	,122
U-PRL	Predpostavka o enakih variancah	,079	,779	1,083	125	,281
	Predpostavka o neenakih variancah			1,075	112,933	,285
U-DYI	Predpostavka o enakih variancah	,003	,959	1,312	126	,192
	Predpostavka o neenakih variancah			1,329	121,572	,186

Izračun t-testa sklopa URIN glede na to, ali je STAROST do 37 ali nad 37 let, je pokazal, da so razlike glede na starost statistično značilne le pri U-ELISA-HEL (signifikanca znaša 0,030), kar je razvidno tudi iz grafa 5.



Graf 5: Kvantilni diagram s prikazom porazdelitve meritev U-ELISA-HEL (nmol/mmol kreatinin) pri starosti <= 37 let oz. > 37 let

Nato smo nadaljevali z izračunom osnovnih opisnih statistik za skupino AMNIJSKA TEKOČINA glede na to, ali je STAROST do 37 ali pa nad 37 (tabela XVIII).

Tabela XVIII: Osnovne opisne statistike področja AMNIJSKA TEKOČINA glede na to, ali je STAROST do 37 ali pa nad 37 let

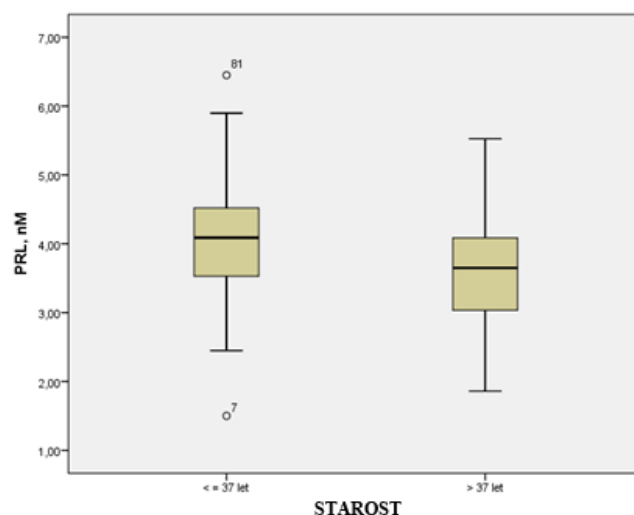
	STAROST do 37 in nad 37	N	Povprečna vrednost	Standardni odklon	Standardna napaka aritmetične sredine
TAC, μM	do 37 let	73	582,33	84,559	9,897
	nad 37 let	55	575,71	84,855	11,442
PRL, nM	do 37 let	73	4,0506	,83213	,09739
	nad 37 let	55	3,6264	,82650	,11145
DYI, nM	do 37 let	73	3,49363	,816776	,095596
	nad 37 let	55	3,71345	1,343803	,181198
Nitrotirozin, nM	do 37 let	73	1,48829	,545976	,063902
	nad 37 let	55	1,44965	,452062	,060956

Tabela XVIII nam prikazuje razlike v povprečnih vrednostih spremenljivk glede na to, ali je STAROST do 37 ali pa nad 37 let. Sedaj bomo preverili, če so razlike signifikantne in če veljajo tudi za celotno populacijo z izračunom t-testa neodvisnih spremenljivk (tabela XIX).

Tabela XIX: T-test sklopa AMNIJSKE TEKOČINE glede na to, ali je STAROST do 37 ali pa nad 37 let

		Levenov test za enakost varianc		t-test za enakost povprečnih vrednosti		
		F	Sig.	T	Df	Sig. (2-tailed)
TAC	Predpostavka o enakih variancah	,542	,463	,438	126	,662
	Predpostavka o neenakih variancah			,438	116,233	,663
PRL	Predpostavka o enakih variancah	,025	,874	2,864	126	,005
	Predpostavka o neenakih variancah			2,866	116,859	,005
DYI	Predpostavka o enakih variancah	2,333	,129	-1,146	126	,254
	Predpostavka o neenakih variancah			-1,073	83,398	,286
Nitrotirozin	Predpostavka o enakih variancah	2,368	,126	,426	126	,671
	Predpostavka o neenakih variancah			,437	124,833	,663

Na podlagi izračuna t-testa neodvisnih spremenljivk smo ugotovili, da pri spremenljivki PRL s področja AMNIJSKE TEKOČINE obstaja statistično značilna razlika v povprečnih vrednostih glede na to, ali je STAROST do 37 ali pa nad 37 let (graf 6).



Graf 6: Kvantilni diagram s prikazom porazdelitve meritve PRL (nM) pri starosti <= 37 let oz. > 37 let

Hipotezo H5 smo tako na podlagi izračuna t-testa neodvisnih spremenljivk za skupini URIN in skupini AMNIJSKE TEKOČINE zavrnili, saj pri vseh spremenljivkah ni veljalo, da so razlike v vrednosti glede na STAROST do 37 ali pa nad 37 let statistično značilne. V skupini URIN je bila ta razlika statistično značilna le pri spremenljivki U-ELISA-HEL, pri skupini AMNIJSKA TEKOČINA pa pri spremenljivki PRL.

Hipoteza H6: Obstaja korelacija med vsaj enim parom spremenljivk pri medsebojni korelaciji U-ELISA-HEL, U-LC-MS/MS-HEL, U-PRL, U-DYI (URIN) in vsemi kazalci, ki spadajo pod AMNIJSKO TEKOČINO (TAC, PRL, DYI, Nitrotirozin).

Pri preverjanju hipoteze smo uporabili sledeče spremenljivke:

- U-ELISA-HEL (nmol/mmol kreatinin),
- U-LC-MS/MS-HEL (nmol/mmol kreatinin),
- U-PRL (nmol/mmol kreatinin),
- U-DYI (nmol/mmol kreatinin),
- TAC (μM),
- PRL (nM),
- DYI (nM),
- Nitrotirozin (nM).

Pri izračunu hipoteze smo nato izračunavali vse medsebojne povezave med spremenljivkami.

Najprej smo se lotili preverjanja normalne porazdeljenosti spremenljivk.

Tabela XX: Opisne statistike spremenljivk, uporabljenih pri testiranju hipoteze H6

		Statistics							
		U-ELISA- HEL	U-LC- MS/MS- HEL	U-PRL	U-DYI	TAC	PRL	DYI	Nitrotiro- zin
N	Število vzorcev	127	127	127	128	128	128	128	128
	Manjkajoči	2	2	2	1	1	1	1	1
	Povprečna vrednost	7,2083	4,1056	27,6865	9,2343	579,48	3,8683	3,58809	1,47169
	Standardni odklon	6,47502	2,53890	9,67068	2,05290	84,416	,85292	1,076090	,506219
	Skewness	4,644	1,622	1,116	-,158	,291	,049	2,839	,314
	Standardni odklon za Skewness	,215	,215	,215	,214	,214	,214	,214	,214
	Kurtosis	32,523	3,681	2,934	3,286	-,112	,369	20,237	,203
	Standardni odklon za Kurtosis	,427	,427	,427	,425	,425	,425	,425	,425
	Minimalna vrednost	1,39	,00	6,66	,00	383	1,50	1,155	,266
	Maksimalna vrednost	59,05	15,71	71,46	15,85	818	6,45	11,300	2,970

Iz tabele XX izhaja, da so normalno porazdeljene spremenljivke TAC, PRL in Nitrotirozin, saj je pri teh spremenljivkah vrednost koeficienta sploščenosti in asimetričnosti absolutno manjša od 1. Pri izračunu povezanosti teh spremenljivk bomo tako uporabili Pearsonov koeficient korelacije, pri vseh ostalih izračunih pa Spearmanov koeficient korelacije (tabela XXI).

Tabela XXI: Izračun Spearmanovega ali Pearsonovega koeficienta korelacije med spremenljivkami, uporabljenimi pri testiranju hipoteze H6

Spearmanov/Pearsonov koeficient		U-ELISA-HEL	U-PRL	U-LC-MS/MS-HEL	U-DYI	TAC	PRL	DYI	Nitrotirozin
U-ELISA-HEL	Koeficient korelacije	1,000	-,130	,116	,278**	-,054	,106	-,239**	,056
	Sig.	.	,146	,196	,002	,550	,237	,007	,534
	N	127	127	127	127	126	126	126	126
U-PRL	Koeficient korelacije	-,130	1,000	,301**	,072	-,010	,327**	-,132	-,110
	Sig.	,146	.	,001	,424	,914	,000	,140	,220
	N	127	127	127	127	126	126	126	126
U-LC-MS/MS-HEL	Koeficient korelacije	,116	,301**	1,000	,261**	-,114	,017	-,140	,148
	Sig.	,196	,001	.	,003	,202	,846	,118	,099
	N	127	127	127	127	126	126	126	126
U-DYI	Koeficient korelacije	,278**	,072	,261**	1,000	-,157	,073	-,270**	,285**
	Sig.	,002	,424	,003	.	,078	,413	,002	,001
	N	127	127	127	128	127	127	127	127
TAC	Koeficient korelacije	-,054	-,010	-,114	-,157	1,000	,097	,074	-,116
	Sig.	,550	,914	,202	,078	.	,278	,405	,194
	N	126	126	126	127	128	128	128	128
PRL	Koeficient korelacije	,106	,327**	,017	,073	,097	1,000	,085	,153
	Sig.	,237	,000	,846	,413	,278	.	,338	,084
	N	126	126	126	127	128	128	128	128
DYI	Koeficient korelacije	-,239**	-,132	-,140	-,270**	,074	,085	1,000	-,004
	Sig.	,007	,140	,118	,002	,405	,338	.	,965
	N	126	126	126	127	128	128	128	128
Nitrotirozin	Koeficient korelacije	,056	-,110	,148	,285**	-,116	,153	-,004	1,000
	Sig.	,534	,220	,099	,001	,194	,084	,965	.
	N	126	126	126	127	128	128	128	128

** . $\alpha = 0,01$

Pri razlagi korelacij bomo najprej začeli s spremenljivko U-ELISA-HEL. Spremenljivka je statistično značilno povezana s spremenljivkama U-DYI (koeficient korelacije znaša

0,278) in spremenljivko DYI (koeficient korelacije znaša $-0,239$). Pri prvi povezavi je povezanost pozitivna, pri drugi pa negativna in v obeh primerih je povezanost šibka.

Spremenljivka U-PRL je statistično značilno povezana s U-LC-MS/MS-HEL in PRL. Koeficient korelacije s spremenljivko U-LC-MS/MS-HEL znaša $0,301$. Povezanost je pozitivna in srednje močna. Povezanost s spremenljivko PRL je prav tako srednje močna in pozitivna (koeficient korelacije znaša $0,327$).

Spremenljivka U-LC-MS/MS-HEL je statistično značilno povezana s spremenljivko U-PRL (koeficient korelacije znaša $0,301$) in spremenljivko U-DYI (koeficient korelacije znaša $0,261$). V obeh primerih je povezanost pozitivna, v prvem primeru srednje močna, v drugem primeru pa šibka.

Za spremenljivko U-DYI je značilno, da je med vsemi spremenljivkami, uporabljenimi pri testiranju hipoteze H_6 , največkrat statistično značilno povezana z ostalimi spremenljivkami. Srednje močno pozitivno je povezana s spremenljivko U-ELISA-HEL (korelacija koeficienta znaša $0,278$), pozitivno in šibko s U-LC-MS/MS-HEL (korelacija koeficienta znaša $0,261$), negativno in šibko z DYI (korelacija koeficienta znaša $-0,270$) ter pozitivno in šibko z Nitrotirozinom (korelacija koeficienta znaša $0,285$).

Pri spremenljivki TAC na podlagi izračuna Spearmanovega in Pearsonovega koeficienta korelacije (Pearsonov koeficient je izračunan povsod, kjer je označeno z rumeno) vidimo, da TAC ni statistično značilno povezan z nobeno od proučevanih spremenljivk.

Spremenljivka PRL je statistično značilno povezana le z U-ELISA-HEL. Povezava je negativna in šibka (korelacijski koeficient znaša $-0,239$).

Spremenljivka DYI je statistično značilno negativno in šibko povezana z U-ELISA-HEL ($-0,239$) in U-DYI ($-0,270$).

Spremenljivka Nitrotirozin je statistično značilno pozitivno in šibko povezana s U-DYI ($0,285$).

Hipotezo H6 smo potrdili, saj obstaja korelacija med vsaj enim parom spremenljivk pri medsebojni korelaciji U-ELISA-HEL, U-LC-MS/MS-HEL, U-PRL, U-DYI (URIN) in vsemi kazalci, ki spadajo pod AMNIJSKO TEKOČINO (TAC, PRL, DYI, Nitrotirozin).

Hipoteza H7: Obstajajo statistično značilne razlike glede na to, ali je vzorec brez anomalij ali vzorec, ki se sestoji samo iz anomalij, pri U-ELISA-HEL (nmol/mmol kreatinin), U-LC-MS/MS-HEL (nmol/mmol kreatinin), U-PRL (nmol/mmol kreatinin), U-DYI (nmol/mmol kreatinin) (URIN) in pri vseh kazalcih, ki spadajo pod AMNIJSKO TEKOČINO (TAC, PRL, DYI, Nitrotirozin).

Pri preverjanju hipoteze H7 smo se posluževali t-testa neodvisnih spremenljivk. Pri tem testu preverjamo, ali je povprečna vrednost iste spremenljivke v eni skupini enot različna (oziroma ali večja ali manjša) od povprečne vrednosti v drugi skupini enot.

Pri preverjanju hipoteze H7 smo uporabili sledeče spremenljivke:

- vzorec z anomalijami in brez anomalij ter U-ELISA-HEL (nmol/mmol kreatinin),
- vzorec z anomalijami in brez anomalij ter U-LC-MS/MS-HEL (nmol/mmol kreatinin),
- vzorec z anomalijami in brez anomalij ter U-PRL (nmol/mmol kreatinin),
- vzorec z anomalijami in brez anomalij ter U-DYI (nmol/mmol kreatinin),
- vzorec z anomalijami in brez anomalij ter TAC (μM),
- vzorec z anomalijami in brez anomalij ter PRL (nM),
- vzorec z anomalijami in brez anomalij ter DYI (nM),
- vzorec z anomalijami in brez anomalij ter nitrotirozin (nM).

Najprej smo se lotili izračuna t-testa za sklop URIN. Tabela XXII nam prikazuje izračune aritmetične sredine, standardnega odklona in standardne napake aritmetične sredine za vse pare spremenljivk s področja URIN.

Tabela XXII: Osnovne opisne statistike sklopa URIN glede na to, ali je vzorec brez anomalij ali vzorec sestoji samo iz anomalij

	Vzorec z anomalijami in brez anomalij	N	Povprečna vrednost	Standardni odklon	Standardna napaka aritmetične sredine
U-ELISA-HEL	Vzorec brez anomalij	123	7,2307	6,55028	,59062
	Vzorec samo anomalije	4	6,5194	3,92221	1,96110
U-LC-MS/MS-HEL	Vzorec brez anomalij	123	4,0887	2,55022	,22995
	Vzorec samo anomalije	4	4,6242	2,42544	1,21272
U-PRL	Vzorec brez anomalij	123	27,6699	9,70635	,87519
	Vzorec samo anomalije	4	28,1972	9,80987	4,90494
U-DYI	Vzorec brez anomalij	124	9,2706	2,06739	,18566
	Vzorec samo anomalije	4	8,1087	1,19482	,59741

Tabela XXII nam nadalje prikazuje, da pri vseh parih obstajajo razlike v povprečnih vrednostih glede na to, če je vzorec brez anomalij ali vzorec samo z anomalijami. Obstajajo tudi razlike v vrednostih standardnega odklona. Največja absolutna razlika v povprečni vrednosti med skupinama je pri U-DYI (kjer znaša 1,1619 enot), najmanjša razlika pa je pri U-PRL (kjer znaša 0,5273 enot).

Standardni odklon kaže na razpršenost vrednosti spremenljivk. Razlika v vrednostih standardnega odklona med vzorcem brez anomalij in vzorcem samo iz anomalij je največja pri U-ELISA-HEL in znaša 2,62807 enot, najmanjša pa pri U-PRL (0,10352 enot).

Pričakovano obstajajo največje razlike med vzorcem brez anomalij in vzorcem, ki je vseboval samo anomalije pri standardni napaki aritmetične sredine, saj nam ta pove, kako blizu so povprečne vrednosti vzorca resničnemu povprečju celotne populacije. Tabela XXII nam prikazuje, da so vrednosti standardne napake aritmetične sredine višje prav povsod, ko gre za vzorec, ki sestoji samo iz anomalij.

Sedaj bomo preverili, če so razlike v povprečnih ocenah med skupinama, ki ju predstavljata vzorec brez anomalij in vzorec, ki sestoji samo iz anomalij, statistično značilne.

Tabela XXIII: T-test neodvisnih spremenljivk skupine URIN

		Levenov test za enakost varianc		t-test za enakost povprečnih vrednosti		
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)
U-ELISA-HEL	Predpostavka o enakih variancah	,047	,829	,215	125	,830
	Predpostavka o neenakih variancah			,347	3,568	,748
U-LC-MS/MS-HEL	Predpostavka o enakih variancah	,030	,863	-,414	125	,680
	Predpostavka o neenakih variancah			-,434	3,219	,692
U-PRL	Predpostavka o enakih variancah	,022	,881	-,107	125	,915
	Predpostavka o neenakih variancah			-,106	3,194	,922
U-DYI	Predpostavka o enakih variancah	1,082	,300	1,115	126	,267
	Predpostavka o neenakih variancah			1,857	3,607	,145

Na podlagi izračuna t-testa neodvisnih spremenljivk za področje URIN je razvidno, da prav pri nobeni spremenljivki razlike v povprečnih ocenah ne moremo posplošiti na populacijo glede na to, ali je vzorec brez anomalij ali vzorec sestoji samo iz anomalij (tabela XXIII).

Nato smo izvedli statistično analizo t-test še za sklop AMNIJSKA TEKOČINA. Tabela XXIV nam prikazuje osnovne opisne statistike področja AMNIJSKA TEKOČINA.

Tabela XXIV: Osnovne opisne statistike sklopa AMNIJSKA TEKOČINA glede na to, ali je vzorec brez anomalij ali vzorec sestoji samo iz anomalij

	Vzorec z anomalijami in brez anomalij	N	Povprečna vrednost	Standardni odklon	Standardna napaka aritmetične sredine
TAC (µM)	Vzorec brez anomalij	124	580,62	84,554	7,593
	Vzorec samo anomalije	4	544,25	82,686	41,343
PRL(nM)	Vzorec brez anomalij	124	3,8629	,86528	,07770
	Vzorec samo anomalije	4	4,0363	,24517	,12258
DYI(nM)	Vzorec brez anomalij	124	3,60141	1,088255	,097728
	Vzorec samo anomalije	4	3,17500	,479183	,239592
Nitrotirozin(nM)	Vzorec brez anomalij	124	1,47010	,507932	,045614
	Vzorec samo anomalije	4	1,52075	,516880	,258440

Iz raziskave izhaja, da pri vseh spremenljivkah obstajajo razlike v povprečnih vrednostih glede na to, ali je to vzorec brez anomalij ali pa je to vzorec, ki vsebuje samo anomalije.

Tudi pri ocenah standardnega odklona obstajajo razlike v vrednostih glede na to, ali je vzorec z anomalijami in brez anomalij, in prav tako tudi pri vrednosti standardne napake aritmetičnih sredin. Tudi pri spremenljivkah sklopa AMNIJSKA TEKOČINA je moč zaznati, da so vrednosti standardnih napak aritmetičnih sredin povsod dokaj višje pri skupini, ki sestoji samo iz vzorca z anomalijami.

Sedaj bomo preverili, če so razlike v aritmetičnih sredinah tudi statistično značilne in če jih je tako moč posplošiti na celotno populacijo. Izvedli smo t-test neodvisnih spremenljivk.

Tabela XXV: T-test neodvisnih spremenljivk skupine AMNIJSKA TEKOČINA

		Levenov test za enakost varianc		t-test za enakost povprečnih vrednosti		
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)
TAC (μM)	Predpostavka o enakih variancah	,073	,787	,847	126	,398
	Predpostavka o neenakih variancah			,865	3,206	,447
PRL (Nm)	Predpostavka o enakih variancah	3,873	,051	-,399	126	,691
	Predpostavka o neenakih variancah			-1,194	5,872	,278
DYI(nM)	Predpostavka o enakih variancah	,639	,426	,779	126	,438
	Predpostavka o neenakih variancah			1,648	4,079	,173
Nitrotirozin(nM)	Predpostavka o enakih variancah	,056	,814	-,196	126	,845
	Predpostavka o neenakih variancah			-,193	3,190	,859

Na podlagi izračuna t-testa neodvisnih spremenljivk za skupino spremenljivk AMNIJSKA TEKOČINA je razvidno, da prav pri nobeni spremenljivki razlike v povprečnih ocenah ne moremo posplošiti na populacijogledu na to, ali je vzorec brez anomalij ali vzorec sestoji samo iz anomalij, saj vrednosti signifikance presegajo 5-odstotni interval zaupanja ($p < 0,05$) pri vseh spremenljivkah (tabela XXV).

Na podlagi teh ugotovitev lahko rečemo, da tako za skupino URIN kot skupino AMNIJSKA TEKOČINA velja, da razlike v povprečnih ocenah glede na to, ali je vzorec brez anomalij ali vzorec sestoji samo iz anomalij, veljajo samo za našo raziskavo in razlike niso statistično značilne.

Tako smo zavrnili hipotezo 7: obstajajo statistično značilne razlike glede na to, ali je vzorec brez anomalij ali vzorec, ki sestoji samo iz anomalij, pri U-ELISA-HEL (nmol/mmol kreatinin), U-LC-MS/MS-HEL (nmol/mmol kreatinin), U-PRL (nmol/mmol kreatinin), U-DYI (nmol/mmol kreatinin) (URIN) in pri vseh kazalcih, ki spadajo pod AMNIJSKO TEKOČINO (TAC, PRL, DYI, Nitrotirozin).

6 RAZPRAVA

Oksidativni stres je neizogibno povezan z našim življenjem. Tako v fizioloških kot patoloških razmerah igrajo reaktivne kisikove zvrsti pomembno vlogo. Dokler je sistem oksidantov (v tem primeru ROS) in antioksidantov v ravnotežju, potekajo procesi v našem organizmu normalno in so pod nadzorom. Ko pa se to ravnotežje poruši, pride do različnih patoloških izidov. Problem se pokaže v tem, da oksidativnega stresa ne moremo meriti, lahko zaznamo le njegove posledice. Radikali so namreč dokaj kratkoživi, zato lahko merimo le produkte ROS z biološkimi molekulami. Ponavadi merimo več bioloških označevalcev naenkrat, saj pri oksidativni poškodbi različnih organov oziroma pri različnih boleznih nastaja različno razmerje oksidativnih produktov.

Nosečnost je sama po sebi fiziološko stanje povečanega oksidativnega stresa zaradi povečane metabolične aktivnosti. Od nastanka do vgnezdenja zarodka in vseh njegovih faz do razvoja otroka in poroda se dogaja mnogo procesov, zaradi katerih lahko govorimo tudi o oksidativnem stresu. Biokemično okolje matere je zelo pomembno za razvoj ploda. Oksidativni stres matere med nosečnostjo vpliva na razvoj ploda in je vpleten v patološke izide nosečnosti.

Namen naše raziskave je bil večplasten. Primerjali smo več kazalcev oksidativnega stresa v urinu in amnijski tekočini ter iskali njihovo medsebojno povezanost predvsem z namenom, ali je dovolj preiskava teh kazalcev v urinu, ne da izvedemo amniocentezo. Kazalce smo določevali z različnimi metodami in pri nekaterih poskušali ugotoviti moč povezav.

Najprej smo poskušali ugotoviti korelacijo med metodama ELISA in LC-MS/MS za določitev koncentracije HEL v urinu. Metodo ELISA smo izvedli mi, rezultate LC-MS/MS pa smo pridobili z inštituta JaICA. Metoda ELISA je enostavna, hitra in poceni v primerjavi z LC-MS/MS. Za naš vzorec 129 nosečnic smo izvedli test ELISA in nato preverjali moč povezave z metodo LC-MS/MS za isti vzorec. Prišli smo do ugotovitev, da obstaja korelacija med metodama. Korelacijski koeficient je statistično značilen ($p < 0,05$), znaša 0,462, kar pomeni, da obstaja srednje močna pozitivna povezanost med obema metodama.

Nadalje smo se lotili iskanja povezav med BMI in pojavljanjem kazalcev v urinu ter amnijski tekočini. Debelost v nosečnosti je vzrok za povišanje oksidativnega stresa. Povzroči mnogo problemov, ki se prek matere lahko prenesejo tudi na otroka. Vpliva na pojav gestacijskega diabetesa, preeklampsije, infekcij, tromboze, podaljšane nosečnosti čez predviden rok poroda, splava, poveča možnost za carski rez ipd. Vse to lahko prepreči normalen razvoj ploda in povzroči tako možganske okvare kot pojav debelosti pri otroku.

Prišli smo do ugotovitev, da za kazalce PRL, DYI in HEL (določen z metodo LC-MS/MS) obstajajo šibke negativne korelacije z BMI ($-0,203$, $-0,201$, $-0,191$; $p < 0,05$), kar je presenetljivo, saj bi pričakovali, da višji BMI nosečnice vpliva tudi na večje pojavljanje teh kazalcev.

Enako smo naredili tudi s kazalci iz amnijske tekočine. Izkazalo se je, da je statistično značilna le korelacija BMI s TAC ($0,190$; $p < 0,05$), kar je tudi v nasprotju s pričakovanji, saj smo sklepali, da višji BMI vpliva na zmanjšanje TAC, saj povečana telesna teža in debelost najverjetneje vplivata na večje izražanje oksidativnega stresa v organizmu.

Nato smo naš vzorec razdelili na dva dela. V prvem delu smo zajeli nosečnice z BMI, ki je manjši ali enak 25 kg/m^2 , v drugem delu pa nosečnice z BMI, večjim od 25 kg/m^2 , kar loči populacijo na normalno telesno težo in na povečano oz. čezmerno telesno težo. Pričakovali smo, da se bo pri nosečnicah z normalnim BMI pojavljalo manj kazalcev oksidativnega stresa. Pri spremenljivkah HEL (določen z metodo LC-MS/MS) in DYI se je izkazalo, da obstajajo statistično značilne razlike ($p < 0,05$) glede na to, ali je BMI manjši oz. večji od 25 kg/m^2 . Ugotovili smo, da smo zopet dobili rezultate v nasprotju z našimi pričakovanji. Povprečne koncentracije tako HEL kot DYI so manjše pri skupini nosečnic z BMI, večjim od 25 kg/m^2 .

Spet enako smo naredili s kazalci amnijske tekočine. V tem primeru se je izkazalo, da za noben kazalec ne velja statistično značilna razlika glede na to, ali je BMI manjši oz. večji od 25 kg/m^2 . Zanimiv pa je podatek, ki sicer velja le za naš vzorec, da je povprečna vrednost TAC večja pri skupini nosečnic z BMI, večjim od 25 kg/m^2 ($592,26 \mu\text{M}$), kot pri skupini z BMI, manjšim od 25 kg/m^2 ($572,60 \mu\text{M}$), torej spet v nasprotju z našimi pričakovanji.

Glede na naše rezultate ne moremo zaključiti, da povišan BMI in s tem telesna masa nosečnice vplivata na povišanje kazalcev oksidativnega stresa tako v urinu kot v amnijski tekočini. Potrebne bi bile dodatne raziskave v tej smeri, v analizo bi morali vključiti več faktorjev, ki lahko vplivajo na tak rezultat. Način življenja nosečnice, okolje, v katerem živi, kajenje, psihični in fizični stres, genetski dejavniki, nenazadnje tudi število nosečnosti so tisto, kar skupno vpliva na pojav oksidativnega stresa pri nosečnici. Naše primerjave korelacij so bile le preprost način dokazovanja, da debelost sama po sebi ne more biti edini krivec za pojavljanje kazalcev oksidativnega stresa v nosečnosti.

Nadaljevali smo s preverjanjem, kako starost nosečnice vpliva na to, v kakšnem razmerju najdemo kazalce oksidativnega stresa v urinu oz. amnijski tekočini. Oksidativni stres z leti narašča, mehanizmi za popravljanje poškodb pa so vse šibkejši. To nas je spodbudilo, da preverimo, če višja starost nosečnice vpliva na večje pojavljanje kazalcev oksidativnega stresa in na manjšo celokupno antioksidantno kapaciteto. Rezultati v urinu so pokazali šibke negativne korelacije, ki pa so bile razen v primeru U-PRL nesignifikantne. Pri spremljivki U-PRL je korelacijski koeficient znašal $-0,175$ ($p < 0,05$), kar spet vodi v nasprotja z našimi pričakovanji. V amnijski tekočini so rezultati pokazali zopet šibke negativne nesignifikantne korelacije med starostjo in TAC ter nitrotirozinom in signifikantno šibko negativno korelacijo s PRL ($-0,266$; $p < 0,05$).

Nato smo se lotili t-testa, pri katerem smo nosečnice razdelili na dve skupini. V prvi so bile preiskovanke s starostjo, manjšo ali enako 37 let, v drugi pa preiskovanke s starostjo nad 37 let. To mejo smo vzeli zato, ker se ponavadi pri nosečnicah, ki pred rojstvom otroka dopolnijo 37 let, odločajo za izvedbo amniocenteze. Zato nas je zanimalo, če med tema dvema skupinama preiskovank obstajajo kakšne statistično značilne razlike. Glede na povprečne vrednosti kazalcev v urinu opazimo razlike med skupinama, vendar spet v prid skupini starejših preiskovank, ki imajo povprečne vrednosti kazalcev U-ELISA-HEL, LC-MS/MS-HEL, PRL in DYI manjše v primerjavi z mlajšo skupino, vendar so razlike signifikantne le pri kazalcu HEL (izmerjen z metodo ELISA) ($p < 0,05$). Pri rezultatih iz amnijske tekočine obstaja signifikantna razlika pri kazalcu PRL ($p < 0,05$). Pri TAC smo opazili, da je opazna razlika med skupinama, kar sicer velja le za naš vzorec, $p > 0,05$), zato je ne moremo posplošiti na celotno populacijo. Pri skupini nosečnic do oz. enako 37

let znaša povprečna TAC 582,33 μM , pri skupini nad 37 let pa 575,71 μM , kar govori v prid našim pričakovanjem, saj je v skupini nosečnic, starejših od 37 let, TAC nižji.

Če povzamemo preizkus pojavljanja oksidativnega stresa v nosečnosti in njegovih kazalcev v urinu ter amnijski tekočini, ne moremo trditi, da starost nosečnice kakorkoli pomembno vpliva na to, koliko in v kakšnih koncentracijah se bodo ti kazalci pojavljali. Preizkus je bil očitno preveč enostaven, zato bi bilo treba celostno gledati na potek nosečnosti in spremljati vplive nanjo, podobno kot bi to storili v prejšnjem primeru, ko smo proučevali vpliv debelosti nosečnice na oksidativni stres.

V naslednjem delu diplomske naloge smo se lotili preverjanja medsebojnih korelacij med vsemi merjenimi kazalci oksidativnega stresa tako v urinu kot v amnijski tekočini. Naš namen je bil ugotoviti, če lahko na podlagi rezultatov iz urina sklepamo na podobne rezultate v amnijski tekočini, kar bi lahko prihranilo amniocentezo, ki je boleč in neprijeten poseg za nosečnico. Prav tako smo ugotavljali medsebojno odvisnost pojavljanja kazalcev oksidativnega stresa v istem vzorcu, tako v urinu kot amnijski tekočini.

Za kazalec U-ELISA-HEL (HEL v urinu, določen z metodo ELISA) se je izkazalo, da je spremenljivka statistično značilno povezana s spremenljivkama U-DYI (koeficient korelacije znaša 0,278) in spremenljivko DYI (koeficient korelacije znaša $-0,239$). Pri prvi povezavi je povezanost pozitivna, pri drugi pa negativna in v obeh primerih je povezanost šibka. Torej, ob naraščanju koncentracije HEL v urinu bo naraščala tudi koncentracija DYI v urinu, v amnijski tekočini pa bo koncentracija DYI padala.

Za U-PRL velja, da je statistično značilno povezan z U-LC-MS/MS-HEL in PRL. Koeficient korelacije s spremenljivko U-LC-MS/MS-HEL znaša 0,301. Povezanost je pozitivna in srednje močna. Povezanost s spremenljivko PRL je prav tako srednje močna in pozitivna (koeficient korelacije znaša 0,327). Pri naraščajoči koncentraciji PRL v urinu narašča tudi koncentracija HEL (v našem primeru je bil izmerjen z metodo LC-MS/MS) v urinu, prav tako bo naraščala koncentracija PRL v amnijski tekočini.

Spremenljivka U-LC-MS/MS-HEL je statistično značilno povezana s spremenljivko U-PRL (koeficient korelacije znaša 0,301) in spremenljivko U-DYI (koeficient korelacije

znaša (0,261). V obeh primerih je povezanost pozitivna, v prvem primeru srednje močna, v drugem primeru pa šibka. Ob naraščajoči koncentraciji HEL (izmerjen z metodo LC-MS/MS) v urinu naraščata tudi koncentraciji PRL in DYI v urinu.

Za spremenljivko U-DYI je značilno, da je med vsemi spremenljivkami, uporabljenimi pri testiranju hipotez H6, največkrat statistično značilno povezana z ostalimi spremenljivkami. Srednje močno pozitivno je povezana s spremenljivko U-ELISA-HEL (korelacijski koeficient znaša 0,278), pozitivno in šibko s U-LC-MS/MS-HEL (korelacijski koeficient znaša 0,261), negativno in šibko z DYI (korelacijski koeficient znaša -0,270) ter pozitivno in šibko z nitrotirozinom (korelacijski koeficient znaša 0,285). To nam pove, da ob naraščanju koncentracije DYI v urinu narašča tudi koncentracija HEL (izmerjen tako z metodo ELISA kot z LC-MS/MS) v urinu. V primerjavi z amnijsko tekočino vidimo, da bo koncentracija DYI padala, koncentracija nitrotirozina pa naraščala. Glede na to, da se kaže največ statistično značilnih korelacij DYI z ostalimi kazalci, bi DYI lahko služil kot nek univerzalni marker oksidativnega stresa oz., povedano drugače, če zaznamo DYI v urinu, je to že lahko alarm za povišan oksidativni stres v organizmu. Vendar pa moramo tudi upoštevati, da so bile povsod korelacije šibke.

Nadalje smo preverili še statistično značilnost povezav TAC z ostalimi markerji. Ugotovili smo, da ne obstaja prav nobena statistično značilna povezava. Ne moremo torej trditi, da pojavljanje naših kazalcev kakorkoli vpliva na TAC. Pomembno je vedeti, da celokupna antioksidantna kapaciteta pomeni aktivnost vseh prisotnih antioksidantov v bioloških vzorcih. Pojavljanje samo teh markejev, s katerimi smo se ukvarjali mi, ne more biti zadosten pogoj, da se bo TAC zaradi tega nižala. Namen določanja TAC je bil opisan že v primeru določanja korelacij z BMI in starostjo nosečnice, v nadaljevanju pa bo zanimiva primerjava nosečnic, ki so rodile otroke z anomalijami, s preiskovankami, katerih nosečnost se je zaključila normalno.

Pri primerjavi nosečnic, ki so rodile otroke z anomalijami, z nosečnicami, katerih nosečnost se je zaključila normalno, smo ugotovili, da obstajajo razlike v povprečnih vrednostih za koncentracije HEL (izmerjen z metodo LC-MS/MS) in PRL v urinu. Višje so bile v vzorcu z anomalijami. Za HEL smo izračunali, da je bila koncentracija pri vzorcu z anomalijami $4,62 \pm 2,43$ (nmol/mmol kreatinin), pri vzorcu brez anomalij pa $4,09 \pm 2,55$

(nmol/mmol kreatinin). Za PRL so bili rezultati naslednji: v vzorcu z anomalijami je bila koncentracija PRL $28,20 \pm 9,81$ (nmol/mmol kreatinin), v vzorcu brez anomalij pa $27,67 \pm 9,71$ (nmol/mmol kreatinin). S t-testom smo ugotovili, da tega ne moremo posplošiti na celotno populacijo, ampak veljajo rezultati le za našo raziskavo. Vzrok je verjetno v premajhnem vzorcu za primerjavo. Lahko edino rečemo, da so bile povprečne vrednosti za dva markerja višje v vzorcu nosečnic, ki so rodile otroke z anomalijami.

V amnijski tekočini se je izkazalo, da je povprečna vrednost TAC višja pri nosečnicah, katerih nosečnost se je zaključila normalno. Ta znaša $580,62 \pm 84,55$ μM in sovпада z literaturnimi vrednostmi, ki znašajo $347 - 776$ μM (43). Pri vzorcu z anomalijami pa znaša $544,25 \pm 82,69$ μM . Za kazalca PRL in nitrotirozin se je izkazalo, da sta njuni povprečni koncentraciji višji pri vzorcu z anomalijami. Koncentracija PRL v vzorcu brez anomalij znaša $3,86 \pm 0,87$ nM, v vzorcu z anomalijami pa $4,04 \pm 0,25$ nM. Koncentracija nitrotirozina v vzorcu brez anomalij znaša $1,47 \pm 0,51$ nM, v vzorcu z anomalijami pa $1,52 \pm 0,52$ nM. S t-testom smo tudi za ta sklop ugotovili, da razlike niso statistično značilne, zato lahko rečemo, da ti rezultati veljajo le za našo raziskavo.

Vseeno lahko zaključimo, da smo pričakovali nižjo celokupno antioksidantno kapaciteto v skupini nosečnic, ki so rodile otroke z anomalijami, kar se je tudi pokazalo. Te nosečnice so imele tudi višje koncentracije HEL in PRL v urinu ter višje koncentracije PRL in nitrotirozina v amnijski tekočini. Potrebne bi bile še dodatne preiskave, ki bi ugotovljale prisotnost in vpliv oksidativnega stresa na bolezni, ki bi se pojavile pri plodu med nosečnostjo.

7 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- med ELISO in LC-MS/MS obstaja pozitivna korelacija ($r = 0,462$, $p < 0,05$),
- obstaja šibka negativna korelacija med BMI in U-LC-MS/MS-HEL, U-PRL in U-DYI ter šibka pozitivna korelacija med BMI in PRL, DYI ter TAC (ta je statistično značilna, saj $p < 0,05$),
- obstajajo statistično značilne razlike glede na to, ali je BMI do 25 kg/m^2 ali nad 25 kg/m^2 pri U-LC-MS/MS-HEL in U-DYI ($p < 0,05$), medtem ko pri kazalcih, izmerjenih v amnijski tekočini, ne obstajajo nobene statistično značilne razlike glede na to, ali je BMI manjši ali večji od 25 kg/m^2 ,
- koncentracije U-LC-MS/MS-HEL in U-DYI so bile signifikantno višje v skupini nosečnic z BMI $\leq 25 \text{ kg/m}^2$,
- obstajajo statistično značilne razlike glede na to, ali je starost nosečnice do 37 ali nad 37 let pri U-ELISA-HEL ($p < 0,01$) in pri spremenljivki PRL iz področja AMNIJSKA TEKOČINA ($p < 0,01$),
- koncentracije U-ELISA-HEL in PRL so bile signifikantno nižje v skupini nosečnic, starejših od 37 let,
- pri preverjanju morebitnih korelacij med vsemi kazalci obstaja največ korelacij U-DYI z ostalimi kazalci, in sicer pozitivno z U-ELISA-HEL, U-LC-MS/MS-HEL, NITROTIROZINOM in negativno z DYI, kar nam lahko potrди, da bi ditirozin lahko bil univerzalni marker oksidativnega stresa v nosečnosti,
- spremenljivka TAC na podlagi izračuna Spearmanovega in Pearsonovega koeficienta korelacije ni statistično značilno povezana z nobeno od proučevanih spremenljivk, zato nam ne more služiti kot kazalec oksidativnega stresa za primerjavo z drugimi markerji,
- ne obstajajo statistično značilne razlike pri pojavljanju kazalcev oksidativnega stresa glede na to, ali so nosečnice rodile otroke z Downovim ali Edwardsovim sindromom oz. avtizmom ali pa se je njihova nosečnost zaključila normalno.

Na podlagi rezultatov naših meritev ne moremo enačiti vzorcev urina in amnijske tekočine zaradi ugotovljenih preveč razlik, prav tako smo ugotovili, da je pri nosečnicah z višjim

BMI in višjo starostjo prisotnih manj markerjev oksidativnega stresa, kar je ravno nasprotno, kot smo pričakovali, zato bi bile v tej smeri potrebne dodatne raziskave.

8 LITERATURA

1. Šuput D, Kramarič L. Izvor in reakcije radikalov. In: Ribarič S eds. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9th ed. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2001: 15–24.
2. Osredkar J. Oksidativni stres. Ljubljana, Univerzitetni inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Zdrav Vestn 2012; 81: 393–406.
3. Eugenio Luigi Iorio, MD, PhD.;FRAS4 and global assessment of oxidative stress; Presentation of FRAS4 system, Diacron international.s.a.s, Grosseto, Italy. 10. 11. 2003.
4. Šuput D. Reaktivne kisikove spojine v patofizioloških procesih. In: Ribarič S eds. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9th ed. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2001: 25–36.
5. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 2011; 25: 287–299.
6. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. Semin Fetal Neonatal Med 2010; 15: 186–190.
7. Pečar S. Antioksidanti. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani, Prehranska dopolnila – zdravila ali hrana, Podiplomsko strokovno izobraževanje 2001/2002: 97–104/97–104.
8. Burton GJ. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. J Anat 2009, 2015: 27–35.
9. Kreft S, Pečar S. Vloga radikalov pri obolenjih. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo Univerze v Ljubljani Farm Vestn 1998; 49: 469–481.
10. Zupan M, Zaletel M, Žvan B, Flis V. Perioperativna možganska kap in aterosklerotične spremembe na zunajlobanjskih možganskih arterijah. Zdrav Vestn 2010; 79: 651–8.
11. Janša K. Povečana debelina intime-medije karotidnih arterij in dejavniki srčno-žilne ogroženosti žensk, ki so imele nosečnostno sladkorno bolezen. Zdrav Vestn 2009; 78: 387–92.
12. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. Clin Chim Acta 2003; 329: 23–38.

13. Perkins AV. Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. *ANZJOG* 2006; 46: 77–83.
14. Jenkins C, Wilson R, Roberts J et al. Antioxidants: their role in pregnancy and miscarriage. *Antioxid Redox Signal* 2000; 2: 623–628.
15. Knapen M, Zusterzeel PL, Peters WH. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 82: 171–184.
16. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biol Endocrinol* 2005, 3: 28.
17. Potdar N, Singh R, Mistry V et al. First-trimester increase in oxidative stress and risk of small-for gestational-age fetus. *BJOg* 2009; 116: 637–642.
18. Myatt L, Cui X. Oxidative stress in placenta. *Histochem Cell Biol* 2004; 122: 369–382.
19. Geršak K, Osredkar J, Rejc B. Oksidacijski stres in nosečnost. Univerzitetni klinični center Ljubljana, *Farm Vestn* 2012; 63: 153–161.
20. Min J, Park B, Kim YJ et al. Effect of Oxidative Stress on Birth Size: Consideration of Window from Mid Pregnancy to Delivery. *Placenta* 2009; 30: 418–423.
21. Dennery PA. Oxidative stress in development: Nature or nurture? *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 1147–1151.
22. Geršak K, Ismaili H, Kavšek G. Uspešnost renatalnega odkrivanja zastoja plodove rasti. *Zdrav Vestn* 2010; 79: 690–697.
23. Gupta P, Narang M, Banerjee BD. Oxidative stress in term small for gestational age neonates born undernourished mothers: a case control study. *BMC Pediatr* 2004; 4: 14.
24. Franco M, Kawamoto E et al. Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Status in Children Born Small for Gestational Age: Evidence of Lipid Peroxidation. *Pediatric Research* 2007; 62: 204–208.
25. Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 747–155.
26. Lam P, Marczylo T, Mistry V. Rapid measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in human biological matrices using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Free Radic Biol Med* 2012; 52(10): 2057–2063.

27. Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy a review of the literature. *Reprod Toxicol* 1999; 13: 347–352.
28. Brace R. Physiology of amniotic fluid volume regulation. *Clin Obstet Gynecol* 1997; 40: 280–289.
29. Leal CA, Schetinger MR, Leal DB et al. Oxidative stress and antioxidant defences in pregnant women. *Redox Rep* 2011; 16: 230–236.
30. Carone D, Loverro, Gereco P, Capuano F. Lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in red blood cells during normal and diabetic pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Repro Biol* 1993; 51: 103–109.
31. Zachara BA, Wardak C, Didkowski W et al. Changes in blood selenium and glutathione concentrations and glutathione peroxidase activity in human pregnancy. *Gynecol Obstet Invest* 1993; 35: 12–17.
32. Pasaoglu H, Bulduk G, Tohoku J. Nitric Oxide, Lipid peroxides, and Uric Acid Levels in Pre-Eclampsia and Eclampsia. *Exp Med* 2004; 202: 87–92.
33. Simpson JL, Holzgreve W, Driscoll DA. Genetic counseling and genetic screening. In: Gabbe SG, Niebyl JR, Simpson JL, eds. *Obstetrics: Normal and Problem Pregnancies*. 6th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone, 2012: 10
34. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews* 2000; 32(3,4): 307–326.
35. Šuster Erjavec H. *Analiza podatkov s SPSS 16.0*. Celje: Visoka komercialna šola; 2008: 36.
36. El-Halabi D. Oxidative and nitrate stress biomarkers in amniotic fluid and their association with fetal growth and pregnancy outcomes. School of Dietetics and Human Nutrition, Macdonald campus, McGill University, Montreal, Quebec 2007; 28–37.
37. Perluigi M, Butterfield A. *Oxydative Stress and Down Syndrome: A Route toward Alzheimer-Like Dementia*. Hindawi Publishing Corporation, *Current Gerontology and Geriatrics Research*, Volume 2012, Article ID 724904; 1–2.
38. Rose S, Melnyk S, Pavliv O. Evidence of oxidative damage and inflammation associated with low glutathione redox status in the autism brain. *Translational Psychiatry* (2012) 2, e134; doi:10.1038/tp.2012.61.
39. Carey C J, Cereda A. The trisomy 18 syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2012, 7:81 doi:10.1186/1750–1172–7–81.

40. Kato Y, Yoshida A, Naito M et al. Identification and quantification of N(epsilon)-(Hexanoyl)lysine in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(11): 1864–1874.
41. Hisaka S, Kato Y et al. Chemical and immunochemical identification of propanyllysine derived from oxidized n-3 polyunsaturated fatty acid. *Free Radic Biol Med* 2009; 46: 1463–1471.
42. Kato Y, Dozaki N et al. Quantification of Modified Tyrosines in Healthy and Diabetic Human Urine using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2009; 44: 67–78.
43. Burlingame JM, Esfandiari N, Sharma RK et al. Total Antioxidant Capacity and Reactive Oxygen Species in Amniotic fluid. *Obstet Gynecol* 2003; 101 (4): 756–761.
44. Sen S, Chakraborty R. *The Role of Antioxidant in Human Health*. American Chemical Society: Washington, DC 2001: 1–37.