

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA CVETAN

**KLINIČNI POMEN DOLOČANJA DITIROZINA,
PROPANOILLIZINA IN HEKSANOILLIZINA V URINU IN
AMNIJSKI TEKOČINI IN CELOTNE ANTIOKSIDANTNE
AKTIVNOSTI PRI NOSEČNICAH**

**CLINICAL SIGNIFICANCE OF DETERMINATION OF
DITYROSINE, PROPANOYL-LYSINE AND HEXANOYL-LYSINE IN
URINE AND AMNIOTIC FLUID AND THE OVERALL
ANTIOXIDANT ACTIVITY IN PREGNANT WOMEN**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm in prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm.

Določitev celokupne antioksidantne kapacitete in koncentracije ditirozina smo izvedli na inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v UKC Ljubljana.

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm. in prof. dr. Borutu Božiču, mag. farm., za mentorstvo in nasvete pri pisanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi svojim staršem in Nejcju, da so mi stali ob strani in me moralno podpirali tekom celotnega študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof.dr. Joška Osredkarja, mag. farm in prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm.

Ljubljana, julij 2013

Urška Cvetan

1	UVOD.....	8
1.1	RADIKALI, AKTIVNE KISIKOVE SPOJINE IN OKSIDATIVNI STRES. 8	
1.1.1	Radikali in njihov nastanek.....	9
1.1.2	Mehanizmi oksidativnih poškodb celic	11
1.1.2.1	Lipidna peroksidacija	11
1.1.2.2	Oksidacija DNA	12
1.1.2.3	Oksidacija proteinov	14
1.2	OBRAMBNI MEHANIZEM PRED OKSIDATIVNIM STRESOM.....	14
1.2.1	Odstranjevanje superoksidnega aniona: SOD.....	15
1.2.2	Odstranjevanje vodikovega peroksida: CAT, GPX in GR	16
1.2.3	Neencimski antioksidanti.....	16
1.3	OKSIDATIVNI STRES V NOSEČNOSTI	18
1.3.1	Učinki oksidativnega stresa na ženski reproduktivni sistem	18
1.3.2	Vloga oksidativnega stresa pri zapletih v nosečnosti	19
1.3.2.1	Preeklampsija	20
1.3.2.2	Splav.....	20
1.3.2.3	Nosečniški diabetes	21
1.3.2.4	Zastoj plodove rasti	21
1.3.2.5	Downov sindrom	22
1.3.2.6	Ostale motnje v nosečnosti.....	22
1.4	DOLOČANJE OKSIDATIVNEGA STRESA	22
1.4.1	Določanje TAC z analiznim kompletom PAO	26
1.4.2	Določevanje ditirozina z metodo ELISA.....	26
1.5	ULTRAZVOČNE PREISKAVE V NOSEČNOSTI.....	27
2	NAMEN DELA	28
3	MATERIALI IN METODE.....	29
3.1	BIOLOŠKI VZORCI NOSEČNIC	29
3.2	PODATKI O RASTI PLODU	29
3.3	MATERIALI, REAGENTI IN OPREMA	30
3.3.1	Reagenčni komplet PAO	30

3.3.2	Reagenčni komplet ELISA	31
3.3.3	Ostali pripomočki	32
3.4	LABORATORIJSKE METODE	32
3.4.1	Postopek določanja totalne antioksidantne kapacitete (TAC)	32
3.4.2	Postopek določanja ditirozina (DT)	33
3.5	STATISTIČNE IN MATEMATIČNE METODE	35
3.5.1	Izračun parametrov ploda	35
3.5.2	Statistična obravnava podatkov	35
4	REZULTATI	36
4.1	STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV	36
5	RAZPRAVA	54
6	SKLEP	60
7	LITERATURA	62

POVZETEK

Obseg oksidativnega stresa je odvisen od tvorbe reaktivnih kisikovih spojin in od učinkovitosti antioksidantnega sistema. Določanje označevalcev oksidativnih poškodb in učinkovitosti antioksidantov nam tako omogoča ovrednotenje oksidativnega stresa, njihova primerjava s kazalci rasti in razvoja ploda pa njegov povezanost z zapleti v nosečnosti. Če sta oksidativni stres in zapleti v nosečnosti povezana, bi lahko določanje označevalcev oksidativnega stresa v prihodnje pomenilo pomemben indikator tveganja za nekatere zaplete v nosečnosti.

Zato smo z našo raziskavo nameravali ugotoviti, v kolikšni meri je oksidativni stres prisoten pri nosečnicah in kako so kazalci oksidativnih poškodb povezani s parametri ultrazvočnih preiskav rasti in razvoja ploda. V našo preiskavo je bilo vključenih 125 vzorcev urina in amnijske tekočine preiskovanih nosečnic. Osredotočili smo se predvsem na določanje povezave med koncentracijo označevalcev lipidne peroksidacije in oksidacije proteinov (propanoillizin, heksanoillizin, ditirozin), celokupne koncentracije antioksidantov ter kazalci rasti in razvoja plodu - biparietalni premer, dolžina stegenice, obseg trebuha ter ocenjena teža plodu. Koncentracijo ditirozina smo določali z metodo ELISA, celokupno antioksidantno kapaciteto pa s pomočjo reagenčnega kompleta PAO. Meritve za koncentracije označevalcev heksanoillizina in propanoillizina smo pridobili z inštituta JaICA, Japonska.

Ugotovili smo, da obstaja med posameznimi označevalci oksidativnega stresa pozitivna, statistično značilna korelacija (Spearmanov korelacijski koeficient znaša od 0,500 do 0,843, $p < 0,01$). Korelacije med označevalci oksidativnih poškodb in ultrazvočnih parametrov rasti plodu pa so bile večinoma šibke in statistično neznačilne (Spearmanov koeficient znaša od -0,069 do 0,134, $p < 0,01$).

Preučevali smo tudi razlike v obsegu oksidativnega stresa med skupino nosečnic, ki so rodile otroke brez anomalij in tiste, ki so sem jim rodili otroci z Downovim, Edwardsovim sindromom ali avtizmom. Ugotovili smo, da so bile koncentracije posameznih označevalcev oksidativnega stresa višje pri skupini nosečnic, ki so rodile normalne otroke, kar ni bilo v skladu z našimi pričakovanji, da bo obseg oksidativnega stresa višji pri nosečnicah, ki so rodile otroke z anomalijami. Izkazalo pa se je, da so bile vrednosti parametrov biparietalni premer in dolžina stegenice plodu pri nosečnostih, ki so se končale normalno, višje od tistih, ki so se končale z anomalijami, kar je bilo v skladu z našimi predvidevanji.

ABSTRACT

In this thesis we aimed to examine the effect of oxidative stress on pregnancy and the parameters of growth and development of the fetus.

The extent of oxidative stress depends on the formation of reactive oxygen species and the effectiveness of the antioxidant system. Determination of markers of oxidative damage and antioxidant efficiency allows us to evaluate oxidative stress, and their comparison with the indicators of growth and development of the fetus allows us to evaluate its relation to pregnancy complications. If the oxidative stress and pregnancy-related complications are associated, the determination of the markers of oxidative stress could be a significant indicator of the risk for certain complications during pregnancy in the future.

Therefore, our study sought to determine the extent to which oxidative stress is present in pregnant women and how the indicators of oxidative damage are associated with the parameters of the ultrasound of fetal growth and development. We focused on determining the relationship between the serum markers of lipid peroxidation and protein oxidation (propanoyl-lysine, hexanoyl-lysine, dityrosine), the total antioxidant capacity and the indicators of fetal growth and development - biparietal diameter, femur length, abdominal circumference and estimated fetal weight. Dityrosine concentration was determined by ELISA and the overall antioxidant capacity using the PAO assay kit. Measurements of concentrations of other markers were obtained from the Institute JaICA, Japan.

We found that there is a positive, significant correlation between the various markers of oxidative stress. Correlations between markers of oxidative injury and ultrasound parameters were generally weak and statistically insignificant.

We also studied the differences in the extent of oxidative stress among a group of pregnant women, who gave birth to children without anomalies, and those who delivered children born with Down's, Edwards syndrome or autism. We discovered that the concentrations of the individual markers of oxidative stress were higher in the group of pregnant women who gave birth to normal children, which was not in line with our expectations. It turned out, however, that the values of the parameters biparietal diameter and length of the femur were higher in pregnancies which ended normally.

SEZNAM OKRAJŠAV

8-OH-dG	8-hidroksi-deoksigvanozin
AC	obseg trebuha plodu
BIP	biparietalni premer plodu
CAT	katalaza
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DT	ditirozin
FL	dolžina stegenice plodu
FW	(ocenjena) teža plodu
GPX	glutation - peroksidaza
GR	glutation - reduktaza
GSH	glutation
GSSG	glutation- disulfid
HEL	heksanoillizin
MAO	monoaminska oksidaza
MDA	malondialdehid
OS	oksidativni stres
p	vrednosti signifikance
PAO	reagenčni komplet za določanje TAC
PRL	propanoillizin
ROS	reaktivne kisikove spojine
SOD	superoksidna dismutaza
SPJ	sindrom policističnih jajčnikov
TAC	celokupna antioksidantna kapaciteta

1 UVOD

Povezava med oksidativnim stresom in boleznimi sodobnega časa je že dolgo poznana. Škodljivega vpliva radikalov, katerih presežek predstavlja glavni razlog za oksidativni stres, se danes že dobro zavedamo. Reaktivne kisikove spojine (ROS) nastanejo ob izpostavitvi ionizirajočemu sevanju, drogam in strupenim kemikalijam – to so eksogeni dejavniki; povzročitelji ROS pa so tudi endogeni dejavniki, kot so apoptoza, presnova kisika ter vnetni odziv. Oksidativni stres je definiran kot stanje, v katerem oksidacija preseže sposobnost antioksidativnih sistemov za obrambo pred škodljivimi učinki oksidativnih procesov. Posledica oksidativnega stresa so poškodbe celic zaradi reaktivnih kisikovih spojin (ROS). Če se ti v organizmu nahajajo v višji koncentraciji, obstaja večja možnost poškodbe celice ali njenih komponent, saj se poruši homeostatsko ravnotežje. Oksidativni stres v organizmu povzroča nevarne zaplete, kot sta lipidna peroksidacija in oksidativne poškodbe DNK ter motnje celičnega signaliziranja. V nosečnosti pride zaradi povečane metabolične aktivnosti in zmanjšane moči antioksidantov v organizmu do stanja povišanega oksidativnega stresa (1).

1.1 RADIKALI, AKTIVNE KISIKOVE SPOJINE IN OKSIDATIVNI STRES

Nastajanje radikalov ali oksidantov je normalen fiziološki proces v aerobnih celicah, vendar je v celici ves čas aktiven tudi antioksidativni obrambni sistem, ki skrbi za ravnovesje med nastajanjem in odstranjevanjem teh reaktivnih molekul. Za aerobne organizme je mehanizem, ki odstranjuje te visoko reaktivne kisikove spojine, nujen za življenje, zato so se skozi evolucijo razvili številni antioksidativni obrambni mehanizmi (1, 2).

Z biološkega vidika so radikali pomembni, ker se te spojine v telesu tvorijo med procesom izkoriščanja kisika. Ker je telo opremljeno z mehanizmi za odstranjevanje aktivnih kisikovih zvrsti in radikalov, ti stranski produkti presnove kisika pod fiziološkimi pogoji ne predstavljajo grožnje organizmu. Vendar, če se aktivne kisikove spojine in radikali tvorijo prekomerno ali na abnormalnih mestih, se poruši ravnovesje med nastajanjem in odstranjevanjem, kar se odraža kot oksidativni stres. Posledično lahko ROS in radikali napadejo molekule v bioloških membranah in tkivih in tako povzročajo različne bolezni

(3). Z drugimi besedami, oksidativni stres je škodljivo stanje v organizmu, ki nastane, ko oksidativne reakcije presežejo antioksidativne reakcije, ker se poruši ravnovesje med njimi. Oksidativni stres je kljub temu v določenih primerih koristen. Dober primer tega je indukcija apoptoze pri pripravi materničnega kanala za rojstvo. Zaradi oksidativnega stresa se okrepijo tudi bioloških obrambni mehanizmi med primerno fizično vadbo in ishemijo (1).

Neravnovesje med oksidanti in antioksidanti (t.j. oksidativni stres) in posledična škoda celičnim molekulam so osnova za vrsto patofizioloških stanj kot so rak, mutageneza, kardiovaskularne bolezni in staranje (4).

1.1.1 Radikali in njihov nastanek

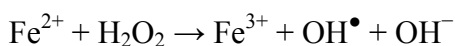
Radikal je atom, ion ali molekula, ki ima enega ali več nesparjenih elektronov, ki sami zasedajo atomsko ali molekulsko orbitalo. Molekula kisika (O_2) je torej že sam po sebi biradikal, saj vsebuje dva nesparjena elektrona. Radikali so ponavadi visoko reaktivni, ker imajo nesparjeni elektroni tendenco, da tvorijo pare z drugimi elektroni. Molekula kisika je med procesom metabolizma *in vivo* podvržena redukciji. Pri številnih redoks in encimskih reakcijah se zaradi vzbujanja elektronov kot posledica dodatka energije ali prenosa elektronov tvorijo kisikovi radikali (4). Izraz reaktivne kisikove spojine (ROS) vključuje tako kisikove radikale kot tudi njihove neradikalne intermediate. Najbolj pomembni predstavniki ROS v bioloških sistemih so superoksidni anion ($O_2^{\bullet-}$), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal (OH^{\bullet}) in singletni kisik (5).

Daleč največ radikalov se tvori med procesom celičnega lastnega metabolizma. Naše celice porabljajo kisik, ki ga privzamejo naša pljuča in ga uporabijo za pridobivanje energije (izgorevanje glukoze, maščob in beljakovin). V celicah so zato glavni vir ROS mitohondriji. Mitohondriji porabljajo kisik s procesom oksidativne fosforilacije. V normalnih pogojih se 95-97% kisika reducira do vode; majhen odstotek (3-5%) kisika se reducira do superoksidnega aniona ($O_2^{\bullet-}$) (5).

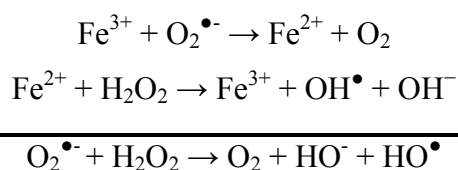
Vodikov peroksid (H_2O_2) se v celici tvori pri dveh različnih procesih – pri neradikalni (encimski) tvorbi in radikalni tvorbi (disproporcionacija superoksidnega aniona).

Superoksidni anion, ki se tvori med procesom avtooksidacije ubisemikinona, se sprošča v medmembranski prostor in v mitohondrijski matriks. V tem predelu se $O_2^{\bullet-}$ pretvori v H_2O_2 . H_2O_2 lahko nato prosto prehaja membrane. Tako se v mitohondrijih H_2O_2 tvori na dva načina: s disproporcionacijo superoksidnega aniona v mitohondrijski membrani in z oksidativno deaminacijo biogenih aminov v zunanji mitohondrijski membrani s pomočjo encima monoaminska oksidaza (MAO) (6).

Večino hidroksilnega radikala (HO^{\bullet}) se tvori *in vivo* pri razpadu vodikovega peroksida (H_2O_2) preko Fentonove reakcije (7). Pri Fentonovi reakciji gre za redukcijo vodikovega peroksida (H_2O_2) do hidroksilnega radikala (HO^{\bullet}). Prehodne kovine kot so baker (Cu), železo (Fe) in kobalt (Co) v svoji reducirani obliki katalizirajo naslednjo reakcijo:



Kot že omenjeno zgoraj, so za Fentonovo reakcijo potrebne prehodne kovine v reducirani obliki. Redukcija prehodne kovine se lahko doseže s pomočjo superoksidnega aniona kot v sledečem primeru s Fe^{3+} . Celotna reakcija, vključno z redukcijo železa s superoksidnim anionom in oksidacijo železa z vodikovim peroksidom je torej:



Zadnja reakcija ($O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + HO^{-} + HO^{\bullet}$), kjer iz superoksidnega aniona in vodikovega peroksida dobimo molekularni kisik, hidroksilni anion in hidorksilni radikal, je znana kot *Haber - Weissova reakcija*. Ta reakcija poteka zelo počasi (7, 8).

Singletni kisik je reaktivna kisikova molekula, ki se tvori ne samo z prenosom energije, ampak tudi med reakcijami s prenosom elektronov. Singletni kisik (1O_2) reagira z molekulami kot so vitamin E, vitamin C, DNK, holesterol, karotenoidi, polinenasičene maščobne kisline in membrane ter z določenimi aminokislinami (8).

1.1.2 Mehanizmi oksidativnih poškodb celic

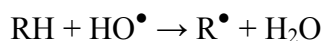
Glede na širok spekter oksidantov, ki se tvorijo v celicah in v mikrocirkulaciji, je jasno, da nobena molekula v celici ali izven nje ni popolnoma nedovzetna za radikalski napad. Reaktivne kisikove spojine so pri visokih koncentracijah izjemno škodljive za organizem. Ko ravni teh radikalov presežejo sposobnost telesnih obrambnih sistemov za njihovo odstranjevanje, je celica v stanju oksidativnega stresa. Povečana tvorba reaktivnih kisikovih zvrsti med celičnim metabolizmom, izpostavljenostjo sevanju, toksičnim kemikalijam ter zdravlilom lahko s povzročanjem lipidne peroksidacije, oksidacije proteinov, poškodbe nukleinskih kislin, inhibicije encimov in aktivacije programirane celične smrti predstavlja grožnjo organizmu (9).

1.1.2.1 Lipidna peroksidacija

Biomembrane in celični organeli so zaradi prisotnosti polinenasičenih maščobnih kislin v njihovih membranskih fosfolipidih zelo občutljivi na oksidativni napad. Najbolj pogosta škoda, nastala zaradi radikalov, vključuje oksidacijo lipidov. Gre za proces, ki onemogoča funkcionalnost membran in homeostazo organizma (10). Lipidna peroksidacija poteče, ko radikal napade nenasičeno maščobno kislino (npr. v membrani). Poteka po splošni poti radikalske verižne reakcije. Najbolj pogosto poteka na nenasičenih maščobnih kislinah, ker imajo več dvojnih vezi, med katerimi ležijo metilenski mostovi (-CH₂-), ki vsebujejo še posebno reaktivne vodike (11, 10). Kot vsaka radikalska reakcija poteka lipidna peroksidacija v treh korakih:

- Inicijacija (začetek reakcije oz. nastanek radikalov)

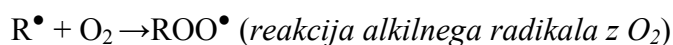
Lipidna peroksidacija biomembran se lahko začne z interakcijo dovolj reaktivnega oksidanta, kot je npr. hidroksilni radikal (HO[•]) z maščobno kislino (RH). Pri tem nastane lipidni alkilni radikal:



- Propagacija (širitev reakcije oz. verižna reakcija)

Lipidni alkilni radikal (R[•]) zelo hitro reagira z molekularnim kisikom, pri tem pa se tvori lipidni peroksilni radikal (ROO[•]). Ta spojina ima zadosten oksidativni potencial, da

napade sosednjo nenasičeno maščobno kislino (RH) v membrani, pri tem pa nastanejo hidroperoksidi in nov lipidni alkilni radikal (R^\bullet).



Na ta način se začne avtokatalitični krog ali verižna reakcija.

- Terminacija (zaključek oz. prekinitev reakcije)

Zgoraj omenjena avtokatalitična veriga se konča s spojitvijo dveh radikalov, ki tvorita neradikal. Prispevek spodnjih reakcij je odvisen od znotrajcelične koncentracije kisika.



Oksidativna oslabitev membran lipoproteinov lahko začne zapleteno kaskado dogodkov, ki vodijo v tvorbo reaktivnih, nestabilnih oksidantov, dolgodelujočih toksičnih stranskih produktov ali biološko aktivnih vnetnih mediatorjev, ki imajo potencial, da dodatno širijo povzročeno škodo (4). Napad radikalov nenasičenih maščobnih kislin v membranah in lipoproteinih je seveda povezana z pomembnimi funkcionalnimi spremembami, ki se lahko končajo z disfunkcijo celice ali celično smrtjo (10).

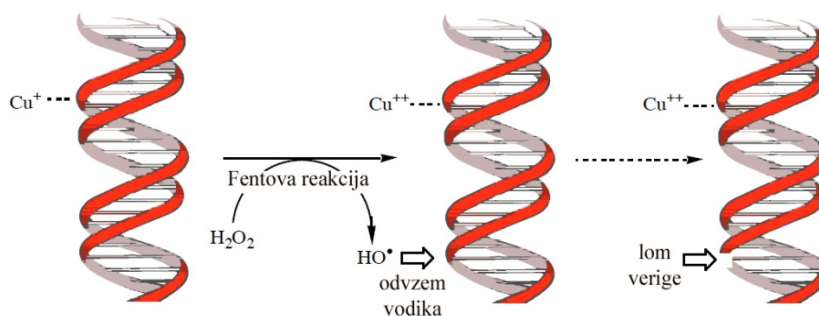
1.1.2.2 Oksidacija DNA

Spremembe na molekuli DNA vodijo do mutacij. Nukleinske baze npr. se lahko poškodujejo ob stiku z radikali ali okoljskimi kemikalijami. Škoda, ki jo povzroči hidroksilni radikal na sladkorjih (deoksiriboza) je del mehanizma, ki vodi do prekinitve DNA verige (12). Oksidativne poškodbe baz ponavadi vodijo do navzkrižnih povezav ali izgube dela baz, prekinitve DNA verige in spremembe purinov, pirimidinov ali sladkornega dela (13).

Hidroksilni radikal (HO^\bullet) ima edinstvene značilnosti: zaradi kombinacije visoke elektrofilnosti, visoke termokemične reaktivnosti, tvorbe, ki se lahko zgodi v bližini DNA,

lahko odvzame atom vodika iz sladkorja v vijačnici DNA (Slika 1-2) ali ga doda DNA bazam, kar vodi do poškodbe verig DNA in oksidacije nukleinskih baz (2, 12).

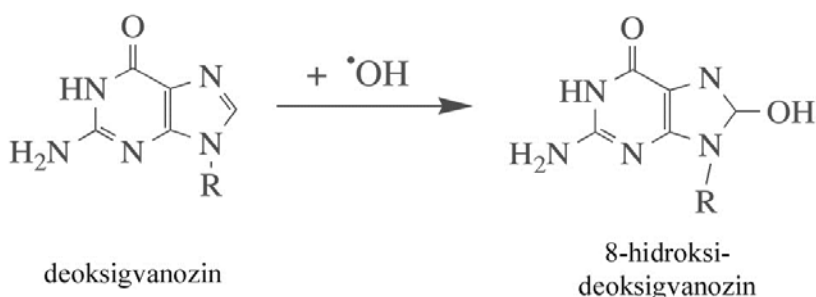
- Odvzem vodika – prekinitev verige DNA



Slika 1-1: Reakcija odvzema kisika, ki vodi v prekinitev verige DNA

- Adicija – oksidacija nukleinske baze

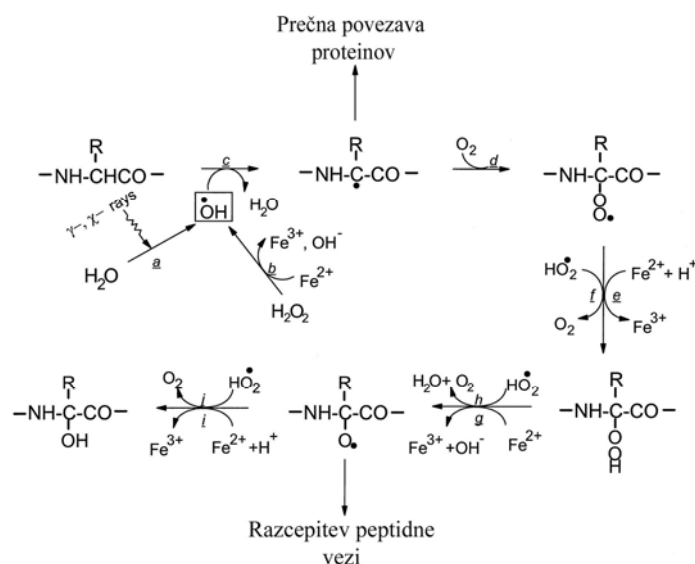
Reakcija hidroksilnega radikala (HO^\bullet) z bazami, kot je gvanin, poteka zelo hitro. Reakcija vodi do nastanka 8-hidroksi-deoksigvanozina (8-OH-dG) in je prikazana na Sliki 1-2. 8-OH-dG se je na začetku uporabljal kot biološki označevalec oksidativne poškodbe nukleinskih baz, nato pa so to molekulo odkrili tudi pri drugih boleznih kot so azbestoza, zastrupitve z arzenom, arterioskleroza, sladkorna bolezen in pri povečani možnosti za nastanek raka (14). Molekula pa ni prisotna v človeku le patološko, saj smo dnevno izpostavljeni dejavnikom oksidativnega stresa.



Slika 1-2: Reakcija hidroksilnega radikala z nukleinsko bazo deoksigvanozinom (R = deoksiriboza)

1.1.2.3 Oksidacija proteinov

Oksidacija proteinov je proces, ki lahko povzroči izgubo določenih funkcij proteinov (npr. katalitično) in spremembo strukture samega proteina. Taki proteini so zato bolj dovzetni za proteolizo in denaturacijo (2). Spremembe proteinov se v večini primerov zgodijo zaradi delovanja hidroksilnega radikala. Kljub temu je potek oksidacijskega procesa nadzorovan z razpoložljivostjo O_2 in $O_2^{\bullet-}$. Skupaj lahko ti spojini vodita do oksidacije stranskih verig aminokislin, tvorbe navzkrižnih povezav protein-protein in oksidacijo proteinske osnovne strukture (Slika 1-3), kar vodi v razgradnjo proteina. V zadnjem času se je izkazalo, da lahko ti produkti nastanejo tudi kot posledica interakcije z drugimi oblikami ROS (4). Vodikov peroksid oksidira tiolne skupine metioninskih in cisteinskih ostankov in s tem inaktivira encime. Superoksidni radikal pa lahko povzroči inhibicijo nekaterih antioksidantnih encimov (katalaza, glutation- peroksidaza, mitohondrijska ATP-aza) (2,4).



Slika 1-3: Reakcije poškodbe proteinskih molekul

Največje poškodbe, pri katerih nastajajo karbonylni derivati, povzročata hidroksilni radikal (2). Nastanek le-teh vodi v ireverzibilno okvaro proteinov in v njihovo razgradnjo ali združevanje v skupke, kar je tudi vzrok za nekatera obolenja.

1.2 OBRAMBNI MEHANIZEM PRED OKSIDATIVNIM STRESOM

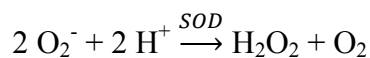
Zdrave celice so opremljene s kompleksnimi obrambnimi mehanizmi, ki so se razvili v

celicah in preprečujejo, omejujejo in popravljajo oksidativno škodljivo delovanje. Po definiciji so antioksidanti snovi, ki že v zelo nizki koncentraciji zmanjšajo oksidacijo drugih snovi v celici največkrat tako, da deaktivirajo že nastale radikale. Pojavljanje antioksidantov je bila nujna prilagoditev organizma na prisotnost kisika v zemeljski atmosferi (13).

Antioksidante lahko razdelimo na tri skupine. Celica vsebuje določene obrambne molekule proti radikalskemu napadu, ki jih lahko smatramo kot preventivne antioksidante. Ti nase vežejo prehodne kovine in s tem preprečujejo njihovo interakcijo z vodikovim peroksidom in superoksidnim radikalom, ki sta prekursorja nevarnega hidroksilnega radikala. V to skupino prištevamo transferin, ceruloplazmin in albumin (14). V drugo skupino antioksidantov spadajo encimski antioksidanti: superoksidna dismutaza (SOD), glutation peroksidaza ter katalaza. S pomočjo teh encimov se radikali pretvorijo v manj reaktivne produkte. Tretjo skupino sestavljajo donorji elektronov, ki reagirajo z radikali in se tako sami oksidirajo v nereaktiven radikal, ki se regenerira ali izloči iz organizma. Taki antioksidanti so: vitamin E, vitamin Q10, vitamin C, bilirubin, tiolne spojine, organske kisline, betakaroteni itd. (13).

1.2.1 Odstranjevanje superoksidnega aniona: SOD

Superoksidni anion se tvori pod vplivom različnih neencimskih in encimskih reakcij v celici. Superoksidne dismutaze (SOD) katalizirajo hitro dismutacijo superoksidnega radikala v vodikov peroksid in kisik (3). Kinetično gledano je takšna reakcija ena najhitrejših v naravi.

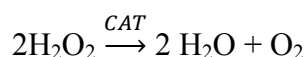


Vse superoksidne dismutaze so metaloproteini, ki vsebujejo Fe, Cu, Zn ali Mn. Pri človeku poznamo tri tipe superoksidnih dismutaz glede na prisoten ion kovine prehoda. V stanju normalne nosečnosti je aktivnost SOD v plazmi in eritrocitih večja kot pri nenosečih ženskah (15).

1.2.2 Odstranjevanje vodikovega peroksida: CAT, GPX in GR

Produkt s SOD katalizirane reakcije, opisane zgoraj, je vodikov peroksid. Čeprav je ta manj reaktiven kot superoksidni anion, je še vseeno močan oksidant in prekursor hidroksilnega radikala. V celici se vodikov peroksid reducira do vode. Encima, ki katalizirata ta proces, sta katalaza in glutation peroksidaza.

Katalaza: Ta encim se nahaja v peroksisomih in katalizira sledečo reakcijo:



Glutation peroksidaza in glutation reduktaza: Glutation redoksní sistem sestavljata encima glutation peroksidaza (GPX) in glutation reduktaza (GR) ter njun substrat, glutation (GSH). Encima se nahajata v citosolu in mitohondrijskem matriksu. Za svoje delovanje potrebujeta glutation, tripeptid, ki je v večini celic prisoten v visokih koncentracijah. Med reakcijo katalizirano z glutation peroksidazo se vodikov peroksid reducira do vode, glutation (GSH) pa se oksidira do glutation disulfida (GSSG) (16). Zaradi visoke koncentracije in ključne vloge pri vzdrževanju celičnega redoks stanja, je glutation eden najpomembnejših celičnih antioksidantov.

Iz raziskav je znano, da je med nosečnostjo v primerjavi z zdravimi nenosečimi ženskami aktivnost katalaze povišana (14). Rezultati raziskav aktivnosti glutation peroksidaze so precej nasprotujoči. Nekatere študije kažejo, da so vrednosti encima GPX pri zdravih nosečnicah povišane (20). Nekatere druge raziskave pa so pokazale enake koncentracije proteina pri zdravih nosečnicah in zdravih nenosečih ženskah (16).

1.2.3 Neencimski antioksidanti

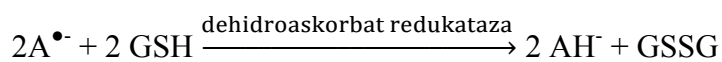
Glavna naloga celičnih obrambnih sistemov je, da omeji ali popravi škodo, ki jo povzročijo visoko reaktivni oksidanti kot je npr. hidroksilni radikal. V pomoč so jim tudi t.i. neencimski antioksidanti, ki so večinoma vitamini, ki jih v telo vnašamo s prehrano in prehranskimi dopolnili (2). Primeri takih molekul so vitamin E, vitamin C, ubikinon ali koencim Q10, karotenoidi in sečna kislina. Nekatere od teh snovi preprečujejo verižne reakcije, ki jih povzročajo radikali. Pomembni neencimski antioksidanti so tudi elementi v sledovih, ki so kofaktorji encimskih antioksidantov (npr. selen) (2).

VITAMIN E

Vitamin E v maščobah topen vitamin iz družine tokoferolov, ki se večinoma koncentrira v notranjosti membran in krvnih proteinov. Najbolj aktivna oblika vitamina E je α - tokoferol. Je glavni v maščobah topni antioksidant v človeški krvni plazmi. Reagira z mnogimi vrstami radikalov, predvsem pa z lipidnimi peroksilnimi radikali, ki se tvorijo med lipidno peroksidacijo. Med to reakcijo se tako kot pri drugih antioksidativnih reakcijah, tvori radikal vitamina E – tokoferilni radikal (17).

VITAMIN C

Vitamin C ali askorbinska kislina je vodotopen vitamin, ki reagira z različnimi radikali. Pri tem se tvori bolj stabilna semidehidroaskorbinska kislina ali askorbilni radikal. Reakcijo redukcije askorbilnega radikala nazaj v askorbinsko kislino katalizirata dva encima – dehidroaskorbatna reduktaza in NADH-semidehidroaskorbatna reduktaza. Zadnji encim reducira askorbilni radikal nazaj do askorbinske kisline in medtem oksidira glutation do glutation disulfida:



Encim NADH-semihidroaskorbatna reduktaza reducira askorbilni radikal nazaj v askorbat in medtem oksidira NADH v NAD^+ (3).

UBIKINON ALI KOENCIM Q10

Koencim Q10 ali ubikinon je antioksidant, ki je prisoten v membranah vseh celic. Zelo pomembno vlogo igra v notranjih mitohondrijskih membranah, kjer je nujno potreben za produkcijo ATP. V procesu dihalne verige prenaša elektrone s flavoproteinov (NADH ali sukcinat) do citokromov preko citokroma b5 (10, 18). Prisotnost visokih koncentracij kinola (reducirana oblika kinona) v vseh membranah predstavlja osnovo za antioksidativno delovanje preko direktne reakcije z radikali ali preko regeneracije tokoferola in askorbata (18).

SEČNA KISLINA

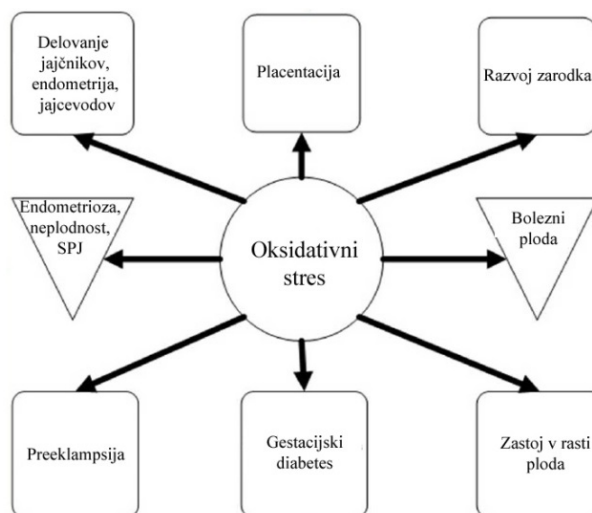
Sečna kislina ima od vseh antioksidantov najvišjo koncentracijo v krvi in je močan antioksidant. Antioksidantno delovanje sečne kisline je precej zapleteno, saj ne reagira z vsemi oksidanti kot je npr. superoksid, reagira pa z peroksidi in hipokloro kislino (14).

1.3 OKSIDATIVNI STRES V NOSEČNOSTI

Med nosečnostjo je maternica dovzetna za različne biokemijske in molekulske signale, ki jih daje zarodek v razvoju, kot tudi za specifične interakcije med endometrijem maternice in zunajembrionalnimi membranami. Zato je za zadostno oskrbo zarodka s hranili in kisikom predpogoj razvoj posteljice in njene funkcije. Oksidativni stres se pogosto omenja kot povzročitelj ženske neplodnosti, ponavljajočih splavov in več z nosečnostjo povezanih bolezni kot so preeklampsija, zastajanje ploda v rasti ter gestacijski diabetes. Igra pomembno vlogo med nosečnostjo in porodom, kaže pa tudi, da je povezava med zmanjšano plodnostjo z naraščujočo starostjo posledica oksidativnega stresa (19).

1.3.1 Učinki oksidativnega stresa na ženski reproduktivni sistem

Ženski reproduktivni sistem je kompleksen multiorganski sistem, ki za delovanje potrebuje optimalno biološko okolje. Za homeostazo tega sistema je potreben aerobni metabolizem, ki izkorišča kisik. Vendar je aerobni metabolizem povezan s tvorbo prooksidantov (ROS), ki vključujejo hidroksilni radikal, superoksidni anion, vodikov peroksid in dušikov oksid. Ko se poruši ravnovesje med prooksidanti in antioksidanti, je organizem podvržen oksidativnemu stresu. Radikali so ključne signalne molekule, ki vplivajo na reproduktivno funkcijo, na endometrij in jajcevode, zorenje oocitov, spermijev, vgnezditev zarodka in zgodnji razvoj zarodka. Vpliv oksidativnega stresa na celoten ženski reproduktivni sistem je povzet na Sliki 1-4. Ker se ravnovesje med koristnostjo in škodljivostjo ROS vzdržuje ravno s pomočjo antioksidantov, so s pomočjo merjenja antioksidantov poskušali raziskati vpliv oksidativnega stresa na nosečnost (14, 16, 20).



Slika 1-4: Vpliv oksidativnega stresa na ženski reproduktivni sistem

Smatra se, da povišane ravni ROS in zmanjšanje količine antioksidantov pomemben razlog za patofiziološke pojave v nosečnosti (20). Pojavlja se čedalje več literature, ki proučuje vpliv oksidativnega stresa na nosečnost z vpletenostjo v preeklampsijo, zastoj rasti ploda, hipertenzijo in inzulinsko rezistenco pri plodu in druge zaplete kot je npr. spontani splav (21, 22, 23, 24).

1.3.2 Vloga oksidativnega stresa pri zapletih v nosečnosti

Za razvoj ploda je zelo pomembno biokemično okolje matere, v katerem se razvija. Oksidativni stres igra pomembno vlogo pri razvoju zarodka, implantaciji, razvoju in delovanju posteljice ter porodu. Kljub temu so z raziskavami so ugotovili, da so patološke nosečnosti povezane z povečanim oksidativnim stresom pri materi, ki pomembno vpliva na potek nosečnosti in tako povzroči zaplete v nosečnosti. Povečan oksidativni stres v uteroplacentarnem okolju je povezan predvsem z motnjami placentacije. Nosečnost sama je stanje povečane dovzetnosti za oksidativni stres, kar vodi do potencialnih poškodb tkiv. Med normalno nosečnostjo brez zapletov se produkcija prooksidantov in reaktivnih kisikovih spojin proti koncu nosečnosti poveča, čemur se organizem prilagodi tako, da sintetizira večje količine antioksidantov kot so superoksidna dismutaza, karotenoidi, tokoferoli in askorbinska kislina. Tako se vzdržuje normalno stanje. To ravnovesje se pri zapletih v nosečnosti poruši, saj posteljica prične izločati večje količine ROS, ravni antioksidantov pa se znižajo. Glavni vlogo pri povečanem nastajanju ROS igra posteljica, radikali pa nastajajo tudi v materničnem endoteliju in levkocitih (23, 25, 26).

1.3.2.1 Preeklampsija

Preeklampsija je zaplet v nosečnosti, za katerega so značilni hipertenzija, edemi in proteinurija. Bolezen prizadane okoli 5-8 % nosečnic in ostaja glavni razlog za smrt nosečnic in je povezana s povečano stopnjo smrti ob porodu. S testi zaenkrat še ni mogoče napovedati nastopa bolezni. V klinični praksi se preeklampsija ravno zaradi tega pogosto odkrije precej pozno. Ponavadi jo diagnosticirajo na podlagi kliničnih znakov - nastopa hipertenzije in proteinurije po 20. tednu nosečnosti (20). Etiologija bolezni sicer ni popolnoma raziskana, vendar se kot možen vzrok za bolezen v literaturi pogosto omenja povečan oksidativni stres (26). Pri preeklampsiji je motena invazivnost trofoblastov, posledica česar je zmanjšana uteroplacentarna perfuzija, hipoksija posteljice in ishemija. To povzroči povečano tvorbo ROS, kar vodi v endotelne in vaskularne oksidativne poškodbe. Aktivnost glavnega odstranjevalca superoksidnega aniona iz posteljice, Cu/Zn-SOD, se pri nosečnicah s preeklampsijo v primerjavi z nosečnicami brez zapletov zmanjša za 30% (27). Obenem imajo nosečnice s preeklampsijo značilno zmanjšane tudi koncentracije drugih antioksidantov, kot so vitamin E, beta karoten, serumski koencim Q10, glutation (GSH) in askorbinska kislina, ter povečane koncentracije prooksidantov kot so lipidni peroksidi in malonaldehid (MDA). Ravni kazalcev oksidativnega stresa se pri teh materah vrnejo v normalno stanje po 3-4 mesecih po porodu, medtem ko klinični in drugi biokemični znaki preeklampsije izginejo že v roku enega meseca po porodu (20).

Nekatere študije so preiskovale vpliv jemanja antioksidantov vitamina C in vitamina E na razvoj preeklampsije pri nosečnicah. Jemanje teh dveh vitaminov v zgodnji fazi nosečnosti je pomembno vplivalo na zmanjšanje pojava preeklampsije pri nosečnicah, ki so jemale ti dve prehranski dopolnili. Obetavni rezultati so spodbudili raziskovalce, ki so vpliv jemanja vitamina C in vitamina E preizkusili še pri nosečnicah z že razvito preeklampsijo. Pri tej skupini jemanje antioksidantov ni zmanjšalo kliničnih znakov preeklampsije in ni spremenilo poteka bolezni. Nekatere nedavne študije niso pokazale učinkovitosti jemanja vitamina C in vitamina E pri pojavu preeklampsije (28, 29).

1.3.2.2 Splav

Nenormalna placentacija vodi do oksidativnega stresa, ki bi lahko bil vključen v etiopatogenezo splava. 15-20% kliničnih nosečnosti se konča s spontanim splavom. Nekatere študije nakazujejo povezavo med sistemskim in placentarnim oksidativnim

stresom v patofiziologiji splava. Spremembe fosfolipidov, ki so posledica oksidativnega stresa so povezane z nastankom antifosfolipidnih protiteles. Temu pojavu pravimo antifosfolipidni sindrom in je eden od možnih razlogov za splav. Nenormalna placentacija vodi v oksidativni stres, kar ima škodljive posledice na trofoblast. Ta potek je tudi najbolj možen mehanizem za pojav splava v nosečnosti. Da igra oksidativni stres pomembno vlogo pri pojavu splava nakazuje tudi dejstvo, da biokemični kazalci oksidativnega stresa tik pred splavom dosežejo zelo visoke vrednosti (30).

1.3.2.3 Nosečniški diabetes

Nosečniški (gestacijski) diabetes je tip sladkorne bolezni, kjer je povišana raven sladkorja v krvi povezana z zanositvijo oziroma nosečnostjo. Gestacijski diabetes se pojavi pri okoli 5% vseh nosečnic. Ta tip diabetesa vpliva na zdravje mame in otroka, povzroča pa lahko tudi težave pri samem porodu ter poveča tveganje za kasnejši pojav diabetesa tipa 2 pri ženskah. Točna patofiziologija nosečniškega diabetesa ostaja zaenkrat nepoznana. Za noseče ženske s tem tipom sladkorne bolezni je značilna znižana občutljivost na inzulin, hiperglikemija in hiperlipidemija. Vpletenost oksidativnega stresa v razvoj bolezni je posledica neravnovesja med porastom nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti in pomanjkanjem antioksidativnega obrambnega sistema (31). V posteljici diabetičnih nosečnic so ravni nekaterih antioksidantov povečane. Nekatere raziskave kažejo, da sladkorna bolezen pri materi sproži oksidativni stres pri plodu, ki vodi tudi v biokemične motnje pri plodu. Glede na to, da posteljica predstavlja glavni stik med materjo in plodom, lahko le-ta igra pomembno vlogo pri preprečitvi neugodnih učinkov materinega diabetičnega okolja na plod (32).

1.3.2.4 Zastoj plodove rasti

Rast zarodka je odvisna od genetskih dejavnikov in vpliva materinega okolja, v katerem se zarodek razvija. V širšem pomenu pomeni govorimo o zastoju plodove rasti, kadar plod ne doseže svojega genetsko določenega ravnega potenciala. Večina literature govori o zastoju v rasti ploda takrat, kadar je ocenjena teža ploda pod 10% porodne teže za določeno gestacijsko starost. Ta zaplet ugotavljamo s pomočjo krivulje rasti ploda za posamezno populacijo. Plodovi z zastojem v rasti so bolj ogroženi kot primerno rastoči vrstniki. Pri njih so pogostejši zapleti, kot so znotrajmaternična smrt, hipoglikemija, hipotermija,

hipokalcemija in ostale anomalije. Tudi po rojstvu imajo lahko ti otroci počasnejšo rast, večjo možnost za kardiovaskularne motnje, hipertenzijo in bolezni ledvic v odrasli dobi ter več nevroloških motenj. V nosečnosti se zaenkrat odkrije premalo zastojev v rasti ploda, ker smo nanje premalo pozorni (33). Raziskave nakazujejo, da je oksidativni stres pri materi med nosečnostjo dejavnik tveganja za zastoj rasti ploda in nizko porodno težo. Posteljice pri nosečnicah z zastojem v rasti ploda izkazujejo očitne znake oksidativnega stresa z zmanjšano translacijo beljakovin in spremembo delovanja signalnih beljakovin (34). Razjasnitev mehanizma učinkovanja oksidativnega stresa na nosečnosti z zastojem v rasti ploda bi lahko vodila do novih tehnik zdravljenja te motnje v nosečnosti.

1.3.2.5 Downov sindrom

Downov sindrom ali Trisomija 21 je kromosomska motnja, ki jo povzroči dodaten 21. kromosom. Pri Downovem sindromu so pogoste dihalne, imunske in encimske motnje ter srčna obolenja. Pri tej bolezni pride do povečanega izražanja SOD, ki pretvarja superoksidni anion v molekulo kisika in vodikov peroksid. Posledično pride do zmanjšane izražanja katalaze in glutation peroksidaze, ki odstranjujeta vodikov peroksid, zato se ta prične kopičiti in povzroča škodljive učinke (35).

1.3.2.6 Ostale motnje v nosečnosti

Oksidativni stres matere med nosečnostjo povečuje tveganje tudi za zaplete kot so prezgodnji porod, avtizem, Edwardsov sindrom ter hipertenzijo. Zaenkrat vpliv patološkega oksidativnega stresa v nosečnostih z omenjenimi zapleti še ni znana. Polimorfizmi v antioksidantnih encimih in nezadosten vnos mikronutrientov (predvsem selena) sta pomembna razloga za nagnjenost k oksidativnemu stresu in zapletom v nosečnosti.

1.4 DOLOČANJE OKSIDATIVNEGA STRESA

Dejansko stanje oksidativnega stresa v telesu je težko določljivo. Vzrok za to je v izjemno kratki življenjski dobi radikalov in njihova velika reaktivnost. Pogosto zato ne moremo določiti neposredne količine nastalih radikalov, ampak le bolj stabilne vmesne produkte.

Pri tem igra pomembno vlogo tudi antioksidantni obrambni sistem, ki nadzira prekomerno nastajanje radikalov. Zavedati se je potrebno, da je organizem živ sistem, ki se neprestano spreminja, zato je določitev oksidativnega stresa v vsakem primeru le približna ocena trenutnega stanja. Kljub temu nam tudi približne ocene lahko veliko pomagajo pri določitvi obsega oksidativnega stresa, sploh ob upoštevanju morebitne škode, ki jo lahko oksidativni stres povzroči. Zato je določanje parametrov, ki opredeljujejo oksidativno stanje v organizmu vsekakor dobrodošlo in koristno.

V splošnem prisotnost oksidativnega stresa določamo na tri različne načine:

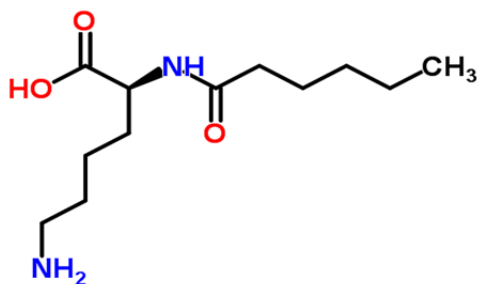
- neposredno merjenje ROS
- merjenje poškodb biomolekul, povzročenih z ROS
- določanje ravni antioksidantov

Neposredno merjenje ROS bi se zdelo na prvi pogled najbolj primerna metoda, vendar se zaradi izjemne nestabilnosti kisikovih radikalov te metode redkeje uporabljajo. Zaradi tega se večina raziskovalcev poslužuje merjenja škode, ki jo radikali povzročijo na proteinih, DNA, RNA, lipidih in drugih biomolekulah. Pri tem gre večinoma za merjenje količine končnih produktov, ki nastajajo pri reakcijah ROS z biološkimi molekulami. Kljub temu, da gre v tem primeru za indirektn pristop, je veliko končnih produktov oksidativnih poškodb zelo stabilnih in zato je ta metoda zelo zanesljiva za merjenje oksidativnega stresa (36, 37). Razvitih je bilo že mnogo analitičnih metod za merjenje kazalcev OS, vendar niso vse metode tudi klinično uporabne. Na trgu obstajajo različni testi, ki merijo aktivnost specifičnih antioksidantnih encimov kot sta npr. katalaza ali SOD in testi, ki merijo totalno antioksidantno kapaciteto (TAC). Proces izbire primerne testa za merjenje oksidativnega stresa se začne z izbiro vzorca, v katerem bomo določali oksidativni stres. Obstaja namreč veliko kazalcev oksidativnega stresa, vendar so določeni lažje določljivi v določenem tipu vzorca (celice, tkiva, urin, kri itd.). Najbolj pogosto se pregleduje vzorce krvi, urina, izdihanega zraka ter amnijske tekočine pri nosečnicah.

Na voljo je kar nekaj metod za določanje kazalcev oksidativnega stresa, pri tem pa ima vsaka metoda svoje prednosti in slabosti. Najbolj pogoste metode za merjenje t.i. prooksidantnega statusa so: d-ROMs test, ESR (elektronska spinska resonanca), merjenje lipidnih peroksidov, malondialdehida, 4-hidroksinonenala, heksanoillizina (HEL) ter

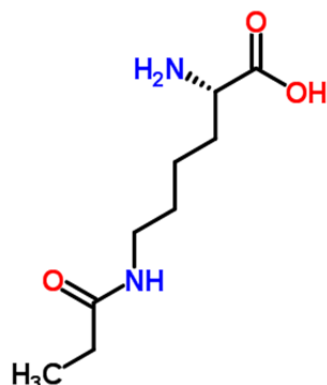
propanoillizina (PRL) kot označevalcev oksidativne poškodbe lipidov. Te snovi so najbolj pogosto merjeni biooznačevalci oksidativnega stresa v kliničnih študijah in raziskavah, ker je lipidna peroksidacija zelo pomemben mehanizem uničenja celične membrane. Nadaljne metode za ocenjevanje oksidativnega stresa obsegajo določanje izoprostanov kot produktov oksidacije radikalov arahidonske kisline, določanje vsebnosti 8-hidroksideoksigvanozina kot pokazatelja oksidativnih poškodb DNK v urinu in merjenje vsebnosti različnih produktov oksidacije proteinov in aminokislin, vključno s hidroskilevcinom, hidrovalinom, ditirozinom in nitrotirozinom ter kemiluminescenca, ki je uveljavljena pri merjenju sproščanja radikalov iz nevtrofilcev. V krvi določamo antioksidativne encime: katalazo (CAT), superoksid dismutazo (SOD), glutation peroksidaze, glutation reduktazo, izoencime glutation-S-transferaze. Poleg posameznih encimov lahko merimo tudi celokupno antioksidantno kapaciteto (TAC) (1, 3).

Obseg oksidacije lipidov lahko ocenimo z merjenjem koncentracije lipidnih peroksidov, konjugiranih dienov in različnih sekundarnih produktov (malondialdehid, 4-hidroksinonenal, heksanoillizin, propanoillizin) (1). Heksanoillizin (HEL) (Slika 1-5) je sekundarni produkt lipidne peroksidacije. Nastane pri zgodnjih oksidativnih spremembah omega-6-nenasičenih kislin kot sta linolna in arahidonska kislina. Na aminokislinske ostanke proteinov, v tem primeru na lizin, se kovalentno veže hidroperoksid linolne kisline.



Slika 1-5: Molekula heksanoillizina (HEL)

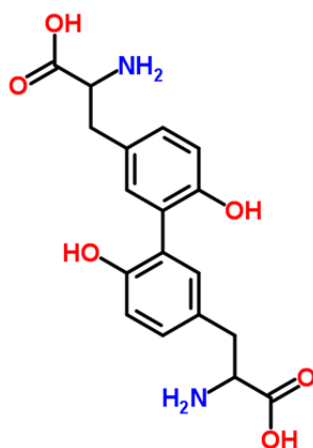
Propanoillizin (PRL) (Slika 1-6) nastane pri reakciji med oksidiranimi produkti omega-3-maščobnih kislin in lizinom. Pogosto ga določamo s kombinacijo tekočinske kromatografije s tandemsko masno spektroskopijo.



Slika 1-6: Molekula propanoillizina (PRL)

Večina raziskav kaže na to, da je koncentracija produktov lipidne peroksidacije v nosečnosti povečana (14, 25). Oksidativni produkti lipidne peroksidacije nastajajo predvsem v posteljici. Od tam se nato razširijo v celoten materin krvni obtok. Do obdobja drugega trimesečja naraste koncentracija teh produktov že za 10-50 % (38).

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. Pogosto pri oksidaciji nastajajo specifične spremembe posameznih aminokislin, predvsem tirozina, ki je ena glavnih tarč oksidacije proteinov. Odvisno od tipa radikala nastanejo različni derivati: ditirozin, nitrotirozin. Ditirozin (DT) (Slika 1-7) lahko nastane pod vplivom različnih reaktivnih kisikovih spojin, kovinsko kataliziranih reakcij in UV sevanja. Je eden od prečnih povezovalcev proteinov in bi lahko služil kot univerzalni marker oksidacije proteinov (3).



Slika 1-7: Molekula ditirozina (DT)

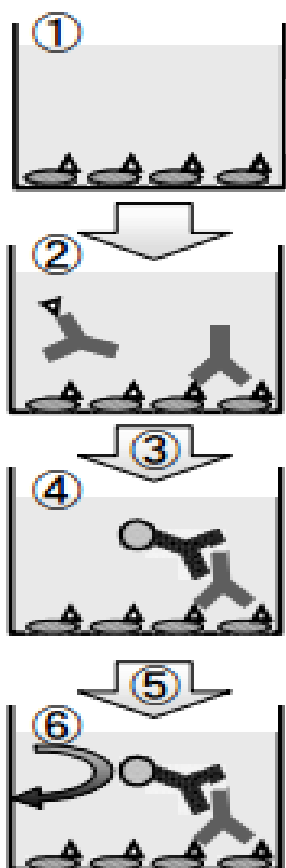
1.4.1 Določanje TAC z analiznim kompletom PAO

Princip reagenčnega kompleta PAO temelji na določanju antioksidantne kapacitete z izkoriščanjem redukcije bakrovega iona iz oblike Cu^{2+} v obliko Cu^+ . Vzorce najprej zmešamo z raztopino Cu^{2+} ionov. Antioksidanti v vzorcu reducirajo Cu^{2+} v Cu^+ . Reducirana oblika bakrovih ionov nato reagira s kromatsko raztopino batokuproinom, njihovo absorbanco pa lahko zmerimo pri valovni dolžini 480 do 490 nm. Antioksidantno kapaciteto nato izračunamo iz količine nastalih Cu^+ ionov.

1.4.2 Določevanje ditirozina z metodo ELISA

Za določanje koncentracije označevalca ditirozina se pogosto uporablja metoda ELISA.

Princip določanja ditirozina z kompetitivno metodo ELISA je sledeč (Slika 1-8):



Mikrotitrne plošče so predhodno prekrivane s ditirozinom (DT). V vdolbinice mikrotitrne plošče se doda standard ali vzorec, zatem pa še primarno protitelo. Ditirozin iz standarda/vzorca tekmuje z DT, vezanim na površino vdolbinic za DT protitelo. Višja koncentracija DT v vzorcu tako vodi v nižjo vezavo protiteles na površino vdolbinic. Protitelesa, vezana na DT v vzorcu, se odstranijo iz vdolbinic s spiranjem. Protitelesa, vezana na predhodno z DT prekrivno površino vdolbinic, ostanejo na površini vdolbinic. V vdolbinice se doda s peroksidazo konjugirano sekundarno protitelo, ki se veže na primarno protitelo, že vezano na površino vdolbinic. Nevezano sekundarno protitelo se odstrani s spiranjem. Po dodatku kromatskega reagenta se razvije obarvanje, ki je premo sorazmerno s količino protiteles, vezanih na vdolbinice. Na koncu lahko izračunamo, koliko ditirozina je v vzorcu, rezultat pa je obratno sorazmeren z vrednostjo absorbance.

Slika 1-8: Princip metode ELISA

1.5 ULTRAZVOČNE PREISKAVE V NOSEČNOSTI

V nosečnosti, ki poteka brez posebnih zapletov, pripadata nosečnici v Sloveniji na račun zavarovalnice dve ultrazvočni preiskavi, to sta ultrazvok v zgodnji nosečnosti (6-10 tednov) in morfologija v 20. - 22. tednu (iskanje razvojnih napak). Večina ginekologov je mnenja, da je to kljub normalnemu poteku nosečnosti premalo, zato v nosečnosti toplo priporočajo še najmanj dve ultrazvočni preiskavi, to sta meritev nuhalne svetline s preverjanjem zgodnjega razvoja ploda (1.- 13- teden) ter kontrolo rasti (28.-32. teden nosečnosti). Kontrola rasti ploda je ultrazvočna preiskava, s katero se oceni plodova rast. Ultrazvok je namreč od vseh metod za ugotavljanje odstopanj v rasti ploda od pričakovane najbolj natančen, ni pa absoluten (nezmotljiv) in tudi ne edini. Napake v merjenju ploda so namreč odvisne od mnogih pogojev: od prevodnosti tkiv nosečnice za zvok, njene temperature in sestave tkiv, ki ločujejo plod od zunanjega sveta, od količine plodovnice, usposobljenosti izvajalca UZ preiskave, od UZ opreme in še česa. Pravočasno odkritje zastoja rasti ali prehitre rasti ploda namreč pripomore k boljšemu izidu ogrožene nosečnosti. Preiskava ni rutinska, zato jo priporočajo kot samoplačniško ali pa jo naredijo indicirano, če z drugimi metodami ugotovijo, da je potrebna.

2 NAMEN DELA

Namen tega dela je določiti stopnje oksidativnega stresa pri nosečnicah in raziskati klinični vpliv oksidativnega stresa na potek nosečnosti in morebitne zaplete. Želeli bi ugotoviti, ali obstaja povezava med povišanim oksidativnim stresom matere in parametri ultrazvočnih preiskav, ki so lahko dobri kazalci rasti in razvoja ploda (BIP – biparietalni premer, FL - dolžina stegenice, AC – obseg trebuha, razmerje BIP/FL, FW – ocenjena teža ploda), pokažejo pa lahko tudi določene abnormalnosti oz. patološke izide v nosečnosti.

Osredotočili se bomo predvsem na določanje povezave med koncentracijo označevalcev lipidne peroksidacije in oksidacije proteinov (propanoilizin, heksanoilizin, ditrirozin) in celokupne koncentracije antioksidantov ter poskušali ugotoviti njihovo morebitno povezavo z ultrazvočnimi parametri, ki so kazalci rasti ploda. Če so oksidativni stres in zapleti nosečnosti povezani, bi lahko določanje označevalcev oksidativnega stresa v prihodnje pomenilo pomemben indikator tveganja za nekatere zaplete v nosečnosti.

Najprej bomo preverili, v kakšni korelaciji so koncentracije različnih označevalcev oksidativnega stresa ter tako določili, ali obstaja kakšna povezava med različnimi biooznačevalci oksidativnega stresa. V nadaljevanju bomo preverili tudi, kako so med seboj povezani parametri rasti plodu (BIP, FL, AC). Nato bomo raziskavo razširili na preučevanje medsebojnih korelacij med kazalci oksidativnega stresa in kazalci rasti plodu. Predpostavljamo, da bo povečan oksidativni stres obratno sorazmeren s kazalci rasti in razvoja ploda.

Nazadnje bomo preverili, ali se ravni oksidativnega stresa pri nosečnostih, kjer so se rodili otroci z Downovim, Edwardsovim sindromom ali avtizmom, razlikujejo od tistih, ki so se končale normalno. Pričakujemo, da bodo koncentracije bioloških označevalcev oksidativnega stresa pri patoloških nosečnostih povišane, vrednost totalne antioksidantne kapacitete (TAC) pa zmanjšana.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 BIOLOŠKI VZORCI NOSEČNIC

Vzorci urina in amnijske tekočine nosečnic smo pridobili v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana. Udeleženkam je bil odvzet prvi jutranji urin, pri vseh pa je bila opravljena tudi ultrazvočna preiskava (kontrola rasti ploda) in amniocenteza, oboje diagnostično indicirano. Nosečnice zaradi študije niso bile dodatno obremenjene ali izpostavljene tveganjem. Vzorci amnijske tekočine so bili po odvzemu plodovnice takoj zamrznjeni in shranjeni pri -20°C do analize.

Zamrznjen prvi jutranji urin, ki je bil odvzet preiskovankam, smo pred izvedenim postopkom določevanja koncentracije ditirozina tri ure odmrzovali pri sobni temperaturi. Netopne delce smo odstranili s centrifugiranjem (10 min) pri 10000 rpm. Supernatant smo nato redčili s 3-kratnim volumnom 0,9% raztopine NaCl v destilirani vodi.

3.2 PODATKI O RASTI PLODU

V raziskavi je sodelovalo 125 nosečnic. Starost udeleženk je bila različna, in je znašala od 22 do 44 let s povprečno starostjo 36,9 let. Nosečnice so imele ob času preiskave od 44 do 107 kg, v povprečju pa so tehtale 66,0 kg. Njihov ITM je znašal od 17,9 do 39,8, s povprečjem 24,1. Ta ITM se smatra glede na veljavne lestvice indeksa telesne mase kot normalna teža. Nosečnice so bile ob preiskavi v 17. do 27. tednu nosečnosti. Pri tem je bilo 120 preiskovank v 17. do 20. tednu, razen petih nosečnic, ki so bile v 20. do 27. tednu. V povprečju so bile udeleženske raziskave noseče 16,8 tedna.

Pri vseh preiskovankah je bila na ginekološki kliniki opravljena diagnostična amniocenteza (punkcija plodne vode). To je invazivna diagnostična metoda, s katero se navadno med 16. in 18. tednom nosečnosti testirajo morebitne bolezni ploda. Metoda poteka tako, da se skozi trebušno steno pridobi vzorec plodovnice (amnijske tekočine). Vzorec plodovnice (plodove vode) se molekularno genetsko pregleda in določi tudi število kromosomov. Amniocenteza je bila pri udeleženkah raziskave opravljena zaradi različnih razlogov. Pri 88 preiskovankah je bila opravljena zaradi starosti (več od 36 let),

pri treh je bila opravljena zaradi kombinacije starosti in genetskih obolenj, pri treh samo zaradi genetskih obolenj, pri sedmih zaradi kombinacije dvojnega hormonskega testa ter tveganja za pojav Downovega sindroma pri otroku, pri eni zaradi kombinacije četvernega hormonskega testa in tveganja za pojav Downovega sindroma pri otroku, pri dveh zaradi abnormalnosti pri ultrazvočni preiskavi ter pri petih nosečnicah zaradi njihove lastne želje.

Vse nosečnice, katerih vzorce smo preiskovali, so opravile tudi ultrazvočno kontrolo rasti ploda. S kontrolo rasti ploda se pogosto namreč preverja potek razvoja ploda in tudi morebiten zastoj v rasti. Med to preiskavo je bil plodu izmerjen BIP - biparietalni premer, to je premer glave v višini senc, AC - obseg trebuha, FL - dolžino stegenice, določena mu je bila trenutna teža, preverjen razvoj (morfologija), kakovost posteljice in količina plodovnice.

Podatke za koncentracije kazalcev oksidativnega stresa HEL in PRL smo pridobili z inštituta JaICA, Japonska.

3.3 MATERIALI, REAGENTI IN OPREMA

3.3.1 Reagenčni komplet PAO

Reagenčni komplet PAO assay kit (JaICA, Japonska) za določevanje TAC vsebuje sledeče reagente (Slika 2-1):

1. mikrotitrna plošča s 96 vdolbinicami
2. standard (prah sečne kisline): 1 viala
3. topilo za vzorce: 1 steklenička (60 ml)
4. raztopina Cu^{2+} : 1 steklenička (5ml)
5. stop raztopina: 1 steklenička (5ml)

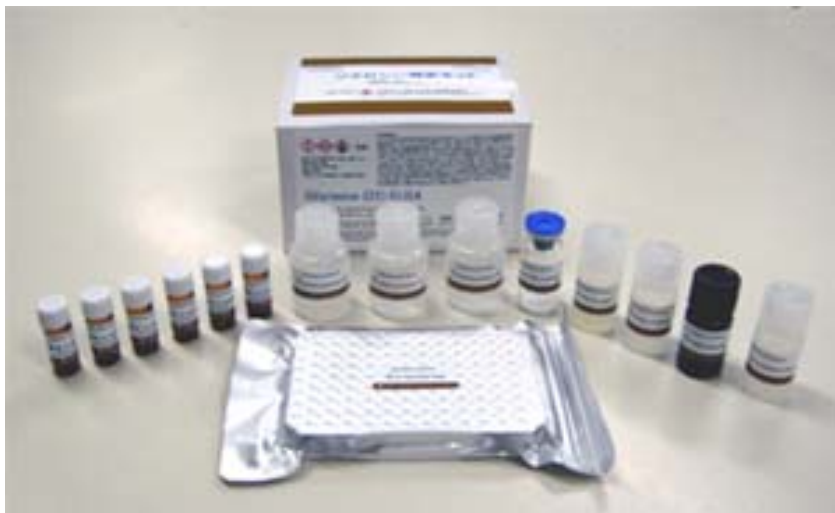


Slika 3-1: Reagenčni komplet za določanje totalne antioksidantne kapacitete (TAC)

3.3.2 Reagenčni komplet ELISA

Reagenčni komplet ELISA za določanje ditirozina vsebuje naslednje reagente (Slika 2-2):

1. Mikrotitrna plošča, prekrita z DT z 8x12 vdolbnicami (skupno 96)
2. Primarno monoklonsko protitelo (anti-DT protitelo): 1 viala (7 ml)
3. Sekundarno s hrenovo peroksidazo konjugirano protitelo proti mišjim IgG: 1 viala
4. Raztopina za sekundarna protitelesa – s fosfatom pufrana fiziološka raztopina: 1 viala (12 ml)
5. TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) substrat (kromogen) : 1 viala (12 ml)
6. Stop raztopina – 1,96% žveplova kislina: 1 viala (12 ml)
7. Raztopina za spiranje – koncentriran pufer za spiranje: 3 viala (3x25ml)
8. DT standardi (pripravljeni za uporabo, koncentracije 0,05; 0,2; 0,5; 2; 5;12 $\mu\text{mol/L}$) 6 vial (6 x 0,5 ml)
9. Tesnilna folija za mikrotitrsko ploščo



Slika 3-2: Reagenčni komplet (metoda ELISA) za določanje koncentracije ditirozina v urinu

3.3.3 Ostali pripomočki

Za izvedbo analize smo potrebovali še sledeče aparature in pripomočke, ki niso bili priloženi:

1. spektrofotometrični čitalec mikrotitrskih plošč
2. destilirana voda
3. 0,9% raztopina NaCl v destilirani vodi
4. hladilnik
5. pipete in pipetni nastavki
6. plastične epruvete

3.4 LABORATORIJSKE METODE

3.4.1 Postopek določanja totalne antioksidantne kapacitete (TAC)

Za določanje TAC smo uporabili reagenčni komplet PAO assay test kit proizvajalca JaICA, Japonska. Ta reagenčni komplet vsebuje mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami in lahko izmeri celokupne koncentracije antioksidantov v razponu od 21,9 - 4378 $\mu\text{mol/L}$. S tem kompletom lahko določamo antioksidantno kapaciteto več tipom vzorcev – serumu, amnijski tekočini, hrani, pijači. V našem primeru smo merili TAC v amnijski tekočini

nosečnic, pridobljeni pri amniocentezi. Poleg koncentracije hidrofilnih antioksidantov, kot sta vitamin C in glutation, lahko s tem kompletom merimo tudi koncentracije hidrofobnih antioksidantov, kot je vitamin E.

1. Priprava raztopine sečne kisline. Viali s prahom sečne kisline smo dodali destilirano vodo do oznake. Nato smo standard pustili na sobni temperaturi 3 - 4 ure.
2. Priprava standardov. Raztopino sečne kisline (2mM) smo redčili 2-krat, 4-krat, 8-krat, 16-krat in 32-krat z destilirano vodo, s čimer smo dobili 1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM ter 0,063 mM raztopine.
3. Priprava vzorcev. Zaradi nestabilnosti nekaterih antioksidantov kot so vitamin C in koencim Q10 smo uporabili predhodno zamrznjene vzorce.
4. Pripravili smo 6 plastičnih epruvet za standarde in eno za vsak vzorec. V vsako smo dodali 390 μ L topila in 10 μ L standardov oz. vzorca.
5. 200 μ L mešanice smo prenesli v vsako od vdolbinic mikrotiterske plošče, za slepo raztopino pa smo uporabili 200 μ L topila.
6. Pri 490 nm smo izmerili absorbanco.
7. Vsaki vdolbinici smo dodali 50 μ L raztopine Cu^{2+} , rahlo premešali ter pri sobni temperaturi inkubirali 3 minute.
8. Vsaki vdolbinici smo dodali 50 μ L stop raztopine, pomešali in izmerili absorbanco pri 490 nm.
9. S pomočjo umeritvene krivulje (horizontalna os – koncentracije standarda, vertikalna os – razlike med izmerjenimi absorbancami) smo za vzorce izračunali pripadajoče koncentracije sečne kisline. Za oceno celokupne antioksidantne kapacitete smo pripadajočo koncentracijo sečne kisline v mM v vzorcih pomnožili s 2189.

3.4.2 Postopek določanja ditirozina (DT)

Za določanje ditirozina (DT) smo uporabili metodo ELISA. Gre za imunološko metodo, ki se pogosto uporablja v diagnostične namene. Ta metoda se odlikuje po hitrosti ter visoki občutljivosti (detektiramo lahko zelo majhne koncentracije antigena, celo pod 1 ng). Za določanje ditiorzina (DT) smo uporabili ELISA reagenčni komplet proizvajalca JaICA, Japonska.

1. Vse reagente, vzorce in mikrotitrsko ploščo smo pustili 2 uri na sobni temperaturi.
2. Pripravili smo raztopino za spiranje: 1 vialo koncentriranega pufra za spiranje zmešamo z 100 ml destilirane vode.
3. Z mikrotitrskе ploščе smo odstranili zaščitno folijo.
4. V vdolbinice smo dodali 250 μ l raztopine za spiranje, pustili 3 minute na sobni temperaturi, nato pa smo raztopino odstranili iz vdolbinic. Raztopino, ki ostane v vdolbinicah smo odstranili z rahlim udarjanjem ploščе nad čisto papirnato brisačo. Spiranje smo ponovili še dvakrat.
5. Dodali smo 50 μ l standarda ali vzorca. V vdolbinico za slepo raztopino smo dodali 100 μ l destilirane vode.
6. V vse vdolbinice razen v slepo raztopino smo dodali 50 μ l primarnih protiteles. S tesnilno folijo smo pokrili mikrotitrsko ploščo. Nato smo vsebino vdolbinic rahlo zmešali s stresanjem ploščе v horizontalni smeri. Nato smo ploščo inkubirali čez noč (13 – 14 ur) pri 4 °C. Tudi ostale reagente smo shranili pri tej temperaturi.
7. Vse reagente smo pustili stati na sobni temperaturi 2 uri.
8. Pripravili smo raztopino za spiranje. 1 vialo koncentriranega pufra za spiranje smo zmešali z 100 ml destilirane vode.
9. Pripravili smo sekundarna protitelesa. 1 vialo raztopine za sekundarna protitelesa smo dodali viali s sekundarnimi protitelesi, rahlo premešali in pustili 5 min na sobni temperaturi.
10. Odstranili smo tesnilno folijo na mikrotitrski plošči in odlili vsebino v vdolbinicah tako, da smo prevrnili ploščo. Preostalo tekočino smo odstranili tako, da smo rahlo potresali ploščo ob papirnato brisačo. Vsem vdolbinicam smo dodali 250 μ l raztopine za spiranje, rahlo potresli v vodoravni smeri in zavrgli tekočino. Postopek spiranja smo ponovili še dvakrat in odstranili preostalo tekočino.
11. V vse vdolbinice smo dodali 100 μ l sekundarnih protiteles. Mikrotitrsko ploščo smo zatesnili s tesnilno folijo. Vsebino smo pomešali s stresanjem v vodoravni smeri. Mikrotitrsko ploščo smo nato inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi.
12. Odstranili smo zaščitno folijo in trikrat sprali ploščo kot v koraku 11. Nato smo odstranili odvečno tekočino iz vdolbinic.

13. V vdolbinice smo dodali 100 μ l TMB substrata (kromogen), ploščo pokrili z aluminijevo folijo in inkubirali pri sobni temperaturi 15 minut. TMB substrat je namreč občutljiv na svetlobo.
14. V vdolbinice smo dodali 100 μ l stop raztopine, rahlo premešali, počakali 3 minute in izmerili absorbanco pri 450nm.
15. S pomočjo umeritvene krivulje smo izračunali koncentracijo DT v vzorcih.

3.5 STATISTIČNE IN MATEMATIČNE METODE

3.5.1 Izračun parametrov ploda

S pomočjo parametrov BIP, FL in AC smo izračunali še razmerje med parametroma BIP in FL (BIP/FL) in pa po Hadlockovi formuli še parameter FW (fetal weight), ki naj bi razmeroma natančno predvidel težo ploda. (32)

$$\log_{10} FW = 1.335 - 0.0034*(AC)*(FL) + 0.0316*(BIP) + 0.0457*(AC) + 0.1623*(FL)$$

3.5.2 Statistična obravnava podatkov

Zbrane rezultate smo statistično obdelali s pomočjo računalniškega programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences). Za interpretacijo rezultatov smo uporabili Kolmogorov – Smirnov test, korelacijo in Mann-Whitneyev test za neodvisne vzorce. Pri osnovni korelacijski analizi smo preizkušali, kako močno sta dve statistični spremenljivki povezani (uskajeni) ali korelirani. S pomočjo Mann-Whitneyevega testa smo preverjali domneve o enakosti dveh povprečij. To smo storili tako, da smo vzorec razdelili na dva dela (dve skupini), nato pa za vsak del izračunali povprečje izbrane spremenljivke, povprečji pa med seboj primerjali. Hkrati smo določili tudi stopnjo značilnosti, na podlagi katere smo določili kritično območje. Rezultati obdelave v programu SPSS so podani v obliki statistične značilnosti – signifikance in predstavljajo izračunano verjetnost dane korelacije pri 0,05 oz. 0,01 stopnji tveganja. Vrednost signifikance (p), ki je manjša od stopnje tveganja 0,05 oz. 0,01, vodi k sprejetju osnovne domneve, vrednost večja od 0,05 oz. 0,01 pa k potrditvi ničelne domneve.

4 REZULTATI

4.1 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

Pri statistični analizi smo uporabili podatke, ki smo jih pridobili in izračunali med eksperimentalnim delom z vzorci urina in amnijske tekočine, odvzetimi preiskovanim nosečnicam. Podatke za označevalca heksanoillizin in propanoillizin smo pridobili z inštituta JaICA. Spremenljivke BIP, FL in AC so bile pridobljene med ultrazvočnimi preiskavami, ki so jih nosečnice opravile v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana. Parametra BIP/FL in FW smo sami izračunali s pomočjo parametrov BIP, FL in AC.

OSNOVNE OPISNE STATISTIKE VZORCA

V programu SPSS smo najprej izračunali osnovne značilnosti vzorca (aritmetično sredino, standardni odklon). SD je mera razpršenosti, kar pomeni, da nam da podatek informacijo o tem kako razpršeni so podatki oz. kakšen je razpon med minimalno in maksimalno vrednostjo. V Preglednici I so navedene osnove opisne statistike, iz katerih so razvidne osnove informacije o nosečnicah in vrednosti posameznih parametrov oksidativnih poškodb in rasti in razvoja zarodka (HEL – koncentracija heksanoillizina, PRL – koncentracija propanoillizina, DT – koncentracija ditirozina, TAC – celokupna antioksidantna kapaciteta, BIP – biparietalni premer plodu, FL – dolžina stegenice plodu, AC – obseg trebuha plodu).

Preglednica I: Osnovne opisne statistike vzorca

	N	M	SD
Trajanje nosečnosti (dni)	125	116,47	4,20
BIP (mm)	123	36,41	4,38
FL (mm)	123	21,06	3,07
HEL (nmol/L)	125	22,90	15,50
PRL (nM)	125	109,86	81,08
DT (nM)	125	36,73	23,93
TAC (μmol/L)	124	578,29	83,03
Starost (let)	125	36,86	3,48
Teža matere (kg)	124	66,04	14,14
ITM	123	24,10	4,08
AC (mm)	58	116,33	16,83

Nato smo osnovali 8 hipotez, s katerimi bi radi preverili, ali obstaja povezava med pojavljanjem določenih bioloških označevalcev oksidativnega stresa pri preiskovankah in parametri, izmerjenimi pri plodu med ultrazvočno preiskavo. Z zadnjima dvema hipotezama smo želeli statistično ovrednotiti še razlike med nosečnostmi z normalnim izidom in tistimi, ki so se končale z motnjo v razvoju plodu.

Hipoteza 1: Obstaja povezava (korelacija) med koncentracijo označevalcev HEL (nM), PRL (nM), DT (nM) v urinu ter celokupno antioksidantno kapaciteto (TAC) (mol/L) v amnijski tekočini.

Z računanjem koeficienta korelacije smo želeli preveriti povezanost med posameznimi označevalci oksidativnega stresa in celokupno antioksidantno kapaciteto. Pred začetkom računanja korelacije moramo najprej preveriti normalnost distribucije, saj lahko le na podlagi te informacije izberemo metodo, po kateri bomo računali korelacijo. Če je porazdelitev normalna, računamo Pearsonov koeficient (normalna porazdelitev je pogoj za računanje tega koeficienta), v nasprotnem primeru pa računamo Spearmanov koeficient korelacije.

V našem primeru je pri eni nosečnici manjkal podatek o bioloških označevalcih, zato smo kot vzorec za računanje korelacije vzeli podatke o vrednostih pri 124ih nosečnicah.

Preglednica II: Osnovni opis vzorca

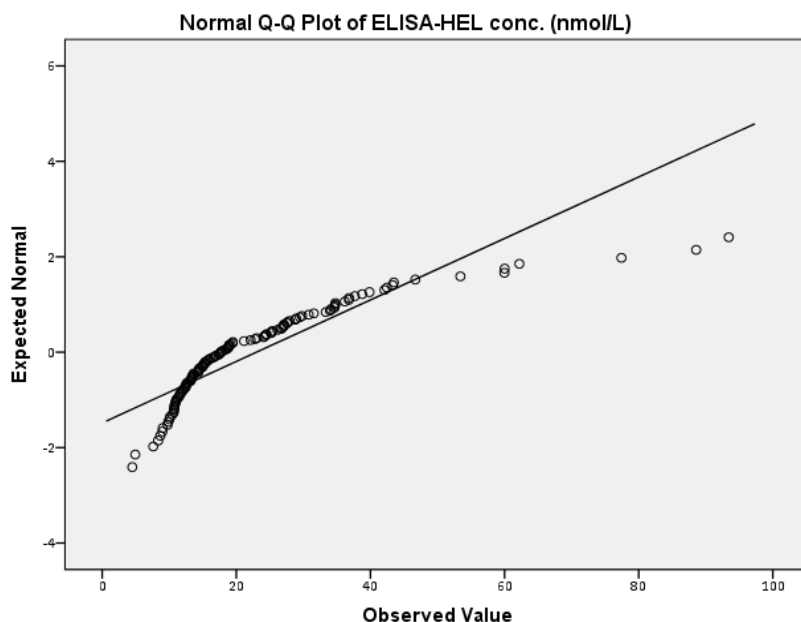
	Udeleženske					
	Veljavnih		Manjkajočih		Skupaj	
	N	Delež[%]	N	Delež[%]	N	Delež[%]
HEL (nM)	124	99,2%	1	0,8%	125	100,0%
PRL (nM)	124	99,2%	1	0,8%	125	100,0%
DT (nM)	124	99,2%	1	0,8%	125	100,0%
TAC (μmol/L)	124	99,2%	1	0,8%	125	100,0%

Normalnost distribucije smo preverili z Kolmogorov-Smirnovim testom (z Lillieforsovim popravkom). Ta test nam pove, ali obstajajo med našo in normalno distribucijo statistično pomembne razlike. Če je signifikanca nad 0,05, potem lahko s 5% tveganjem trdimo, da je distribucija normalna, če pa je pod to vrednostjo, pa smatramo, da distribucija ni normalna.

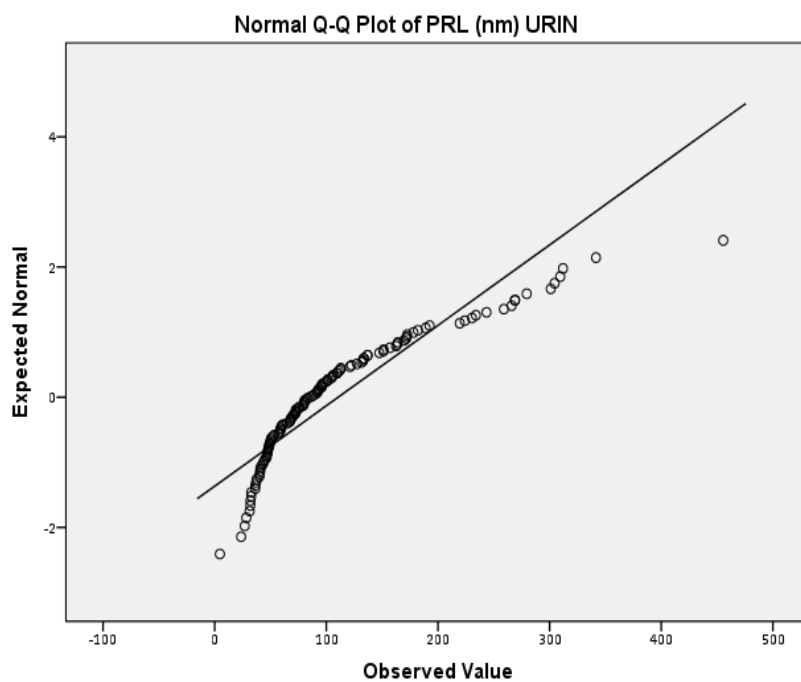
Preglednica III prikazuje rezultate Kolmogorov-Smirnovega testa za preučevane spremenljivke. V našem primeru znaša signifikanca pri spremenljivkah HEL, PRL in DT 0,001, iz česar zaključimo, da porazdelitev ni normalna. Signifikanca pri spremenljivki TAC pa znaša 0,200, kar nam pove, da je v tem primeru porazdelitev podatkov normalna. Tudi iz grafov 4-1 do 4-4 je razvidno, da spremenljivke HEL, PRL in DT v urinu niso normalno porazdeljene, ker graf ni linearen. Grafi prikazujejo, kako se vrednosti posamezne spremenljivke razporejajo okoli normalne distribucije. Kljub normalni porazdelitvi spremenljivke TAC v tem primeru korelacije ne moremo računati s Pearsonovim koeficientom, ker porazdelitev pri drugih parametrih ni normalna. Korelacijo med parametri bomo torej računali s Spearmanovim koeficientom.

Preglednica III: Kolmogorov-Smirnov test za spremenljivke HEL, PRL, DT in TAC

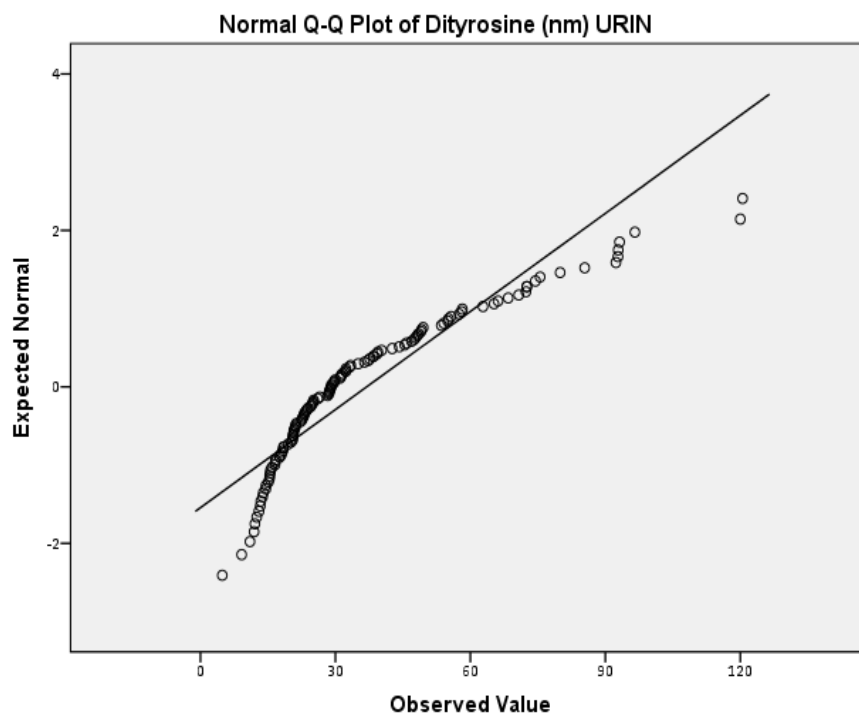
	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistika	df	Sig.
HEL (nmol/L)	0,179	124	0,001
PRL (nM)	0,166	124	0,001
DT (nM)	0,172	124	0,001
TAC (μmol/L)	0,051	124	0,200*



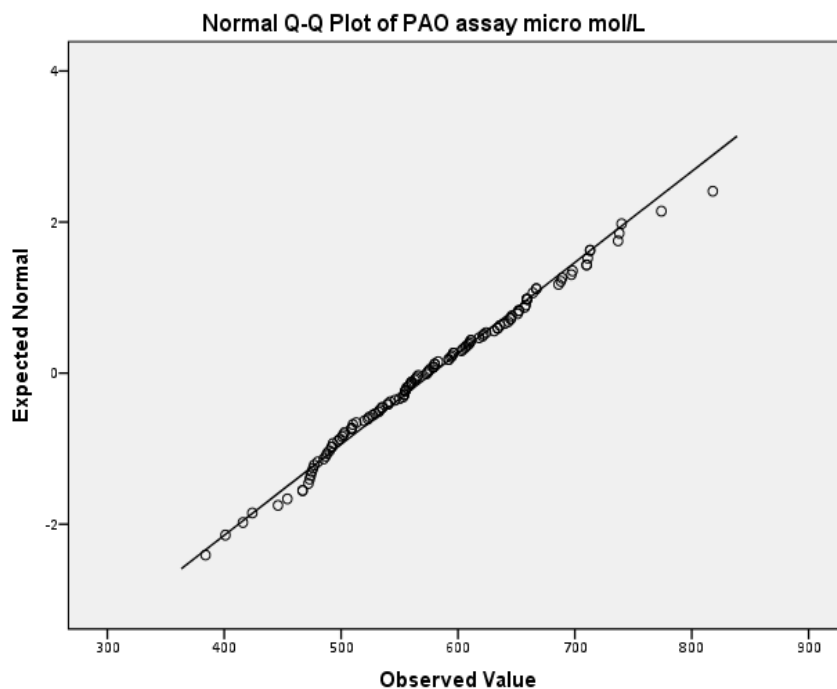
Graf 4-1: Graf normalnosti porazdelitve za spremenljivko HEL



Graf 4-2: Graf normalnosti porazdelitve za spremenljivko PRL



Graf 4-3: Graf normalnosti porazdelitve za spremenljivko DT



Graf 4-4: Graf normalnosti porazdelitve za spremenljivko TAC

Izračun Spearmanovih korelacijskih koeficientov (Preglednica IV) za oceno povezave med posameznimi spremenljivkami pokaže, da med njimi obstajajo statistično značilne korelacije. Spearmanov korelacijski koeficient med parametroma HEL in PRL znaša 0,389 in je statistično značilen že pri 1% tveganju. Še višji je korelacijski koeficient med parametroma HEL in DT, ki znaša 0,500 in je prav tako statistično značilen že pri 1% stopnji tveganja. Še višja je korelacija med parametroma PRL in DT, kjer Spearmanov koeficient znaša kar 0,843, kar kaže na izjemno visoko povezavo med koncentracijami teh dveh označevalcev pri preiskovankah.

Tudi izračuni korelacije med ostalimi parametri pokažejo, da med njimi obstaja povezava, vendar ta ni statistično značilna. Koeficienti korelacije med TAC in ostalimi parametri znašajo med 0,107 do 0,130, kar kaže na neznatno povezavo, statistična analiza pa je pokazala tudi, da ta povezava ni statistično značilna.

Iz statistične obdelave lahko zaključimo, da obstaja statistično pomembna povezava med koncentracijami določenih kazalcev oksidativnega stresa (HEL-PRL, PRL-DT, HEL-DT).

Preglednica IV: Izračun Spearmanovega koeficienta

		HEL (nmol/L)	PRL (nM)	DT (nM)	TAC (μ mol/L)
HEL (nmol/L)	Spearmanov korelacijski koeficient	1,000	0,389**	0,500**	0,130
	Sig. (dvostransko)		0,000	0,000	0,151
	N	125	125	125	124
PRL (nM)	Spearmanov korelacijski koeficient	0,389**	1,000	0,843**	0,115
	Sig. (dvostransko)	0,000		0,000	,205
	N	125	125	125	124
DT (nM)	Spearmanov korelacijski koeficient	,500**	,843**	1,000	0,107
	Sig. (dvostransko)	0,000	0,000		0,238
	N	125	125	125	124
TAC (μ mol/L)	Spearmanov korelacijski koeficient	0,130	0,115	0,107	1,000
	Sig. (dvostransko)	0,151	0,205	0,238	
	N	124	124	124	124

Hipoteza 2: Obstaja povezava med ultrazvočnimi spremenljivkami BIP, FL ter AC.

Pri ultrazvočnih preiskavah določene spremenljivke niso bile določene pri vseh preiskovankah. Zato je bil naš vzorec v tem primeru ustrezno manjši. Osnovni opis vzorca je razviden v Preglednici V.

Tako kot v prejšnjem primeru smo tudi tokrat najprej preverili predpostavko o normalnosti porazdelitve spremenljivk. Preglednica VI nam prikazuje vrednosti izračunanega Kolmogorov-Smirnovega koeficienta za spremenljivke BIP, FL, AC.

Preglednica V: Osnovni opis vzorca

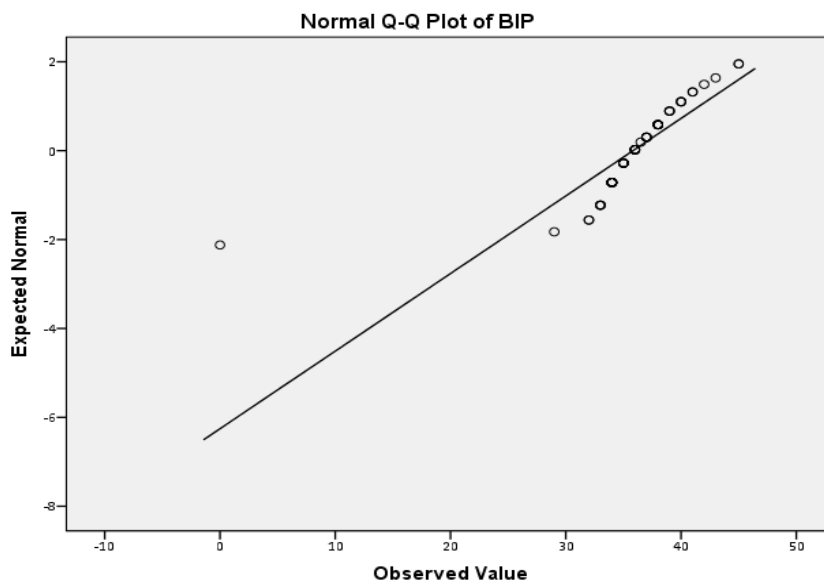
	Udeleženci					
	Veljavnih		Manjkajočih		Skupaj	
	N	Delež [%]	N	Delež [%]	N	Delež [%]
BIP	58	46,4%	67	53,6%	125	100,0%
FL	58	46,4%	67	53,6%	125	100,0%
AC	57	45,6%	68	54,4%	125	100,0%

Preglednica VI: Izračun normalnosti porazdelitve z Kolmogorov-Smirnovim testom

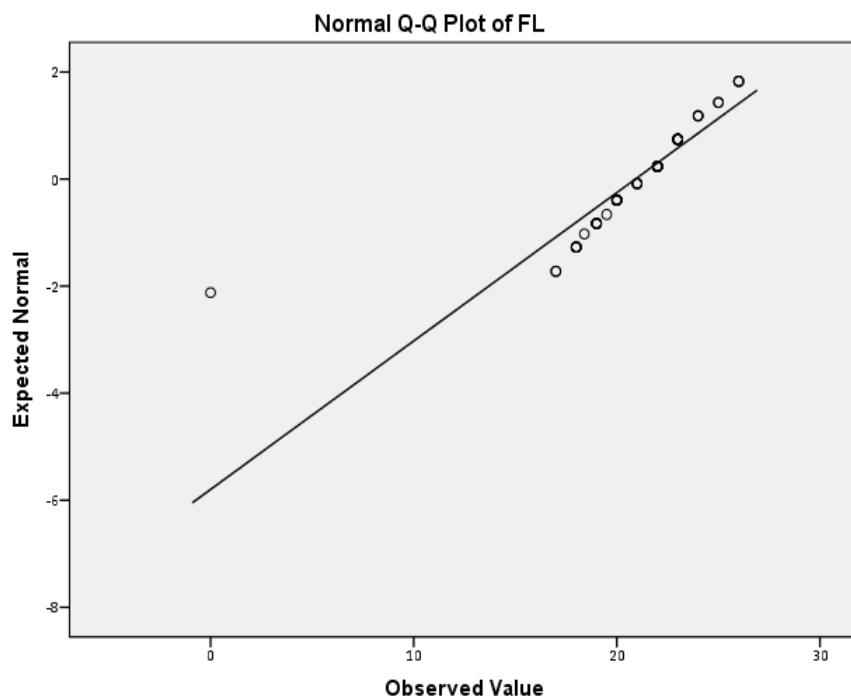
	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Rezultat	Df	Sig.
BIP	0,241	58	0,001
FL	0,158	58	0,001
AC	0,195	57	0,001

a. Lillieforsov popravek

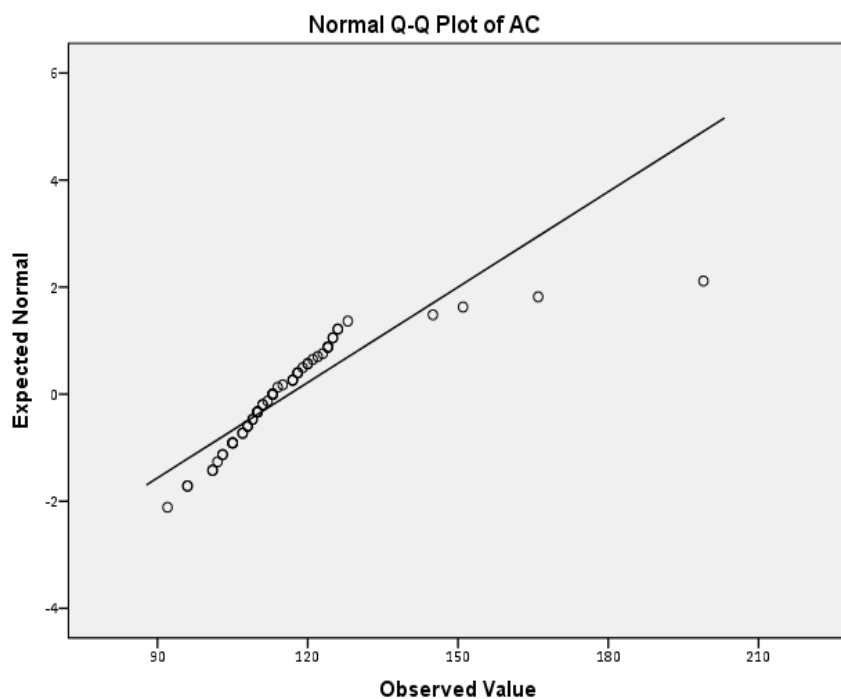
Grafi 4-5 do 4-7 prikazujejo porazdelitve spremenljivk BIP, FL in AC in potrjujejo, da porazdelitev izbranih spremenljivk ni normalna, saj vrednosti v grafu niso porazdeljene linearno, torej odstopajo od normalne porazdelitve.



Graf 4-5: Graf normalnosti porazdelitve za spremenljivko BIP



Graf 4-6: Graf normalnosti porazdelitve za spremenljivko FL



Graf 4-7: Graf normalnosti porazdelitve za spremenljivko AC

Iz grafov in izračunanih koeficientov lahko zaključimo, da porazdelitev pri nobeni od spremenljivk ni normalna, zato bomo za računanje korelacije uporabili Spearmanov koeficient. Iz Preglednice VII izhaja, da so korelacijski koeficienti med posameznimi

spremenljivkami zmerno visoki (od 0,503 do 0,602) in da so korelacije statistično pomembne že pri 1% tveganju, torej jih lahko posplošimo na celotno populacijo.

Preglednica VII: Izračun Spearmanovega koeficienta za spremenljivke BIP, FL in AC

		BIP	FL	AC
BIP	Spearmanov korelacijski koeficient	1,000	0,578**	0,602**
	Sig. (dvostransko)		0,001	0,001
	N	123	123	57
FL	Spearmanov korelacijski koeficient	0,578**	1,000	0,503**
	Sig. (dvostransko)	0,001		0,001
	N	123	123	57
AC	Spearmanov korelacijski koeficient	0,602**	0,503**	1,000
	Sig. (dvostransko)	0,001	0,001	
	N	57	57	57

Hipoteza 3: Obstaja negativna korelacija med FL ter HEL (nmol/L), PRL (nm), DT (nm) v urinu ter TAC (mol/L) v amnijski tekočini.

Pri preverjanju hipoteze 3 smo uporabili naslednje pare spremenljivk:

- FL ter HEL (nmol/L)
- FL ter PRL (nM)
- FL ter DT (nM)
- FL ter TAC (μ mol/L)

Kot v prejšnjih primerih smo najprej preverili normalnost porazdelitve spremenljivk. Iz izračuna Kolmogorov-Smirnovega testa v Preglednici VII izhaja, da vse spremenljivke,

razen TAC, niso normalno porazdeljene, zato bomo pri vseh parih za izračun korelacije uporabili Spearmanov koeficient.

Preglednica VIII: Izračun normalnosti porazdelitve z Kolmogorov-Smirnovim testom

	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Rezultat	Df	Sig.
FL (mm)	0,129	122	0,001
HEL (nmol/L)	0,180	122	0,001
PRL (nM)	0,169	122	0,001
DT (nM)	0,175	122	0,001
TAC (μmol/L)	0,048	122	0,200*

a. Lillieforsov popravek

Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije v Preglednici IX nam prikazuje, da je korelacija med FL in HEL, PRL, DT in TAC negativna in neznatna (od -0,069 do -0,155). To pomeni, da ob naraščanju spremenljivk HEL, PRL, DT in TAC spremenljivka FL upada. Korelacije med statističnimi spremenljivkami pa so razmeroma nizke in niso statistično značilne ($p < 0,05$). Kljub temu, da smo pravilno ocenili, da je korelacija negativna pa hipoteze ne moremo potrditi, saj korelacija ni statistično značilna.

Preglednica IX: Izračun Spearmanovega koeficienta

		FL (mm)	HEL (nmol/L)	PRL (nM)	DT (nM)	TAC (μmol/L)
FL	Spearmanov korelacijski koeficient	1,000	-0,155	-0,114	-0,090	-0,069
	Sig. (dvostransko)		0,088	0,208	0,320	0,451
	N	123	123	123	123	122

Hipoteza 4: Obstaja negativna korelacija med spremenljivko BIP ter HEL (nmol/L), PRL (nM), DT (nM) v urinu ter TAC ($\mu\text{mol/L}$) v amnijski tekočini.

S hipotezo 4 smo želeli preveriti povezavo med naslednjimi pari spremenljivk:

- BIP ter HEL (nmol/L)
- BIP ter PRL (nM)
- BIP ter DT (nM)
- BIP ter TAC ($\mu\text{mol/L}$)

Najprej preverimo normalnost distribucije z izračunom Kolmogorov-Smirnovega koeficienta. V Preglednici X so predstavljeni rezultati Kolmogorov-Smirnovega testa.

Preglednica X: Izračun normalnosti porazdelitve z Kolmogorov-Smirnovim testom

	Kolmogorov-Smirnov		
	Rezultat	df	Sig.
BIP	0,169	122	0,001
HEL (nmol/L)	0,180	122	0,001
PRL (nM)	0,169	122	0,001
DT (nM)	0,175	122	0,001
TAC ($\mu\text{mol/L}$)	0,048	122	0,200*

Tudi tokrat vse spremenljivke, razen TAC, niso normalno porazdeljene, zato za izračun korelacije uporabimo Spearmanov koeficient.

Iz rezultatov izračunov Spearmanovega koeficienta (Preglednica XI) je razvidno, da obstaja med BIP ter posameznimi kazalcev oksidativnega stresa neznatna negativna korelacija. Najvišja korelacija obstaja med spremenljivkama BIP ter ditirozin (-0,134). Kljub temu, da med spremenljivkami BIP-PRL, BIP-HEL in BIP-TAC obstaja korelacija, ta ni statistično značilna ($p < 0,05$). Hipoteze 4 torej kljub pravilni domnevi, da je korelacija negativna, ne moremo posplošiti na celotno populacijo.

Preglednica XI: Izračun Spearmanovega koeficienta za spremenljivke BIP, HEL, PRL, DT in TAC

		BIP (mm)	HEL (nmol/L)	PRL (nM)	DT (nM)	TAC (μmol/L)
BIP (mm)	Spearmanov korelacijski koeficient	1,000	-0,046	-0,104	-0,134	-0,093
	Sig. (dvostransko)		0,615	0,254	0,141	0,309
	N	123	123	123	123	122

Hipoteza 5: Obstaja negativna korelacija med spremenljivko AC in HEL (nmol/L), PRL (nM), DT (nM) v urinu ter TAC (μ mol/L) v amnijski tekočini.

Pri predhodnih hipotezah smo z računanjem Kolmogorov-Smirnovega testa že izračunali normalnost distribucije za vse spremenljivke, ki nastopajo v hipotezi 5. Ker porazdelitev v vseh, razen TAC, ni normalna, smo za izračun korelacije uporabili Spearmanov koeficient. Iz Preglednice XII je razvidno, da med spremenljivkami AC, HEL, PRL in DT obstaja le zelo šibka, neznatna korelacija. V dveh primerih (AC-HEL, AC-PRL) je korelacija pozitivna, v ostalih dveh primerih pa negativna. Izračun Spearmanovega koeficienta je pokazal, da nobena od korelacij med vsemi pari spremenljivk ni statistično značilna, prav tako pa ne moremo potrditi negativne korelacije med spremenljivkami, torej moramo hipotezo 5 zavrniti.

Preglednica XII: Izračun Spearmanovega koeficienta

		HEL (nmol/L)	PRL (nM)	DT (nM)	TAC (μmol/L)	AC (mm)
AC (mm)	Spearmanov korelacijski koeficient	0,050	0,066	-0,038	-0,007	1,000
	Sig. (dvostransko)	0,714	0,624	0,782	0,956	
	N	57	57	57	57	57

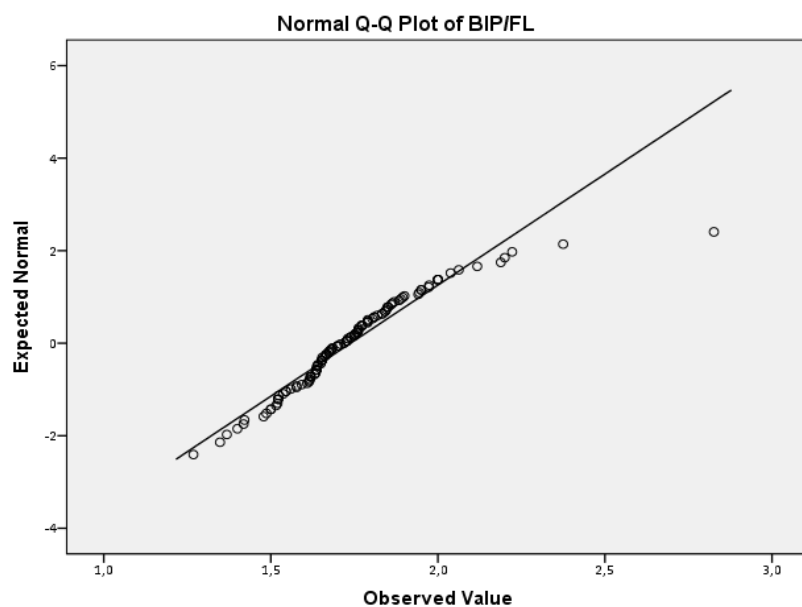
Hipoteza 6: Obstaja negativna korelacija med spremenljivkami BIP/FL in FW, HEL (nmol/L), PRL (nM), DT (nM) v urinu ter TAC (μ mol/L) v amnijski tekočini.

Pri preverjanju hipoteze 6 smo se zopet najprej poslužili določanja normalnosti porazdelitve spremenljivk s Kolmogorov-Smirnovim testom. Za spremenljivke HEL, PRL,

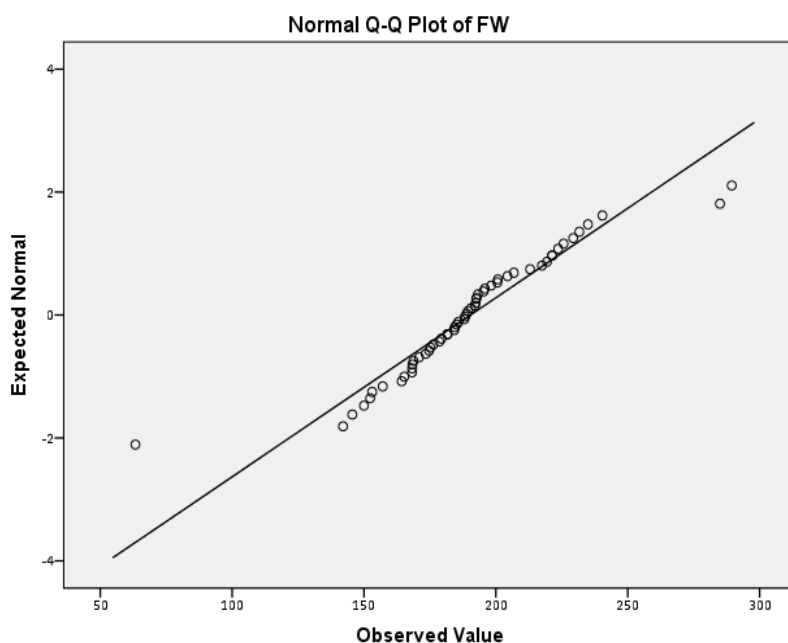
DT in TAC smo ta koeficient izračunali že pri predhodnih hipotezah, zato smo že predvidevali, da bomo korelacijo pri teh spremenljivkah računali z Spearmanovim koeficientom. Izračun v programu SPSS (Preglednica XIII) je pokazal, da so tokrat kar tri spremenljivke porazdeljene normalno (BIP/FL, FW ter TAC). Med temi spremenljivkami lahko torej računamo korelacijo s Pearsonovim koeficientom, pri ostalih pa bomo korelacijo računali z Spearmanovim koeficientom.

Preglednica XIII: Izračun normalnosti porazdelitve z Kolmogorov-Smirnovim testom

	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Rezultat	df	Sig.
BIP/FL	0,106	56	0,179
HEL (nmol/L)	0,164	56	0,001
PRL (nM)	0,173	56	0,001
DT (nM)	0,149	56	0,004
TAC (μmol/L)	0,062	56	0,200
FW (g)	0,115	56	0,061



Graf 4-8: Graf normalnosti porazdelitve za spremenljivko BIP/FL



Graf 4-9: Graf normalnosti porazdelitve za spremenljivko FW

Izračun koeficienta korelacije (Preglednica XIV) jasno prikazuje, da sta parametra BIP/FL in FW zmerno povezana (korelacija je negativna in sicer -0.391). Ta korelacija je tudi statistično pomembna pri 1% stopnji tveganja. Parameter BIP/FL je zmerno povezan tudi s HEL, korelacijski faktor znaša tu 0,215, ta korelacija pa je tudi statistično značilna pri 5% stopnji tveganja. Povezave spremenljivke BIP/FL z ostalimi spremenljivkami (PRL, DT) so neznatne in statistično neznačilne. Neznatne in statistično neznačilne so tudi povezave med parametrom FW in HEL, PRL in DT.

Preglednica XIV: Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije

		BIP/FL	FW (g)	HEL (nmol/L)	PRL (nM)	DT (nM)
BIP/FL	Spearmanov korelacijski koeficient	1,000	-0,391**	0,215*	-0,005	0,030
	Sig. (dvostransko)		0,003	0,018	0,953	0,747
	N	122	56	122	122	122
FW (g)	Spearmanov korelacijski koeficient	-0,391**	1,000	0,028	-0,064	-0,059
	Sig. (dvostransko)	0,003		0,832	0,631	0,662
	N	56	58	58	58	58

Iz izračunov Pearsonovega koeficienta med kazalci TAC, BIP/FL ter FW (Preglednica XV), ki so normalno porazdeljeni, je razvidno, da lahko med temi spremenljivkami opazimo kar nekaj statistično značilnih korelacij. Kazalec BIP/FL je zmerno povezan z koncentracijo TAC in FW, korelacija pa je tudi statistično značilna pri $p < 0,05$. Povezava med parametroma FW in TAC je sicer pozitivna, vendar je značilna samo za naš vzorec ($p < 0,05$).

Preglednica XV: Izračun Pearsonovega koeficienta za spremenljivke TAC, BIP/FL in FW

		TAC ($\mu\text{mol/L}$)	BIP/FL	FW (g)
TAC ($\mu\text{mol/L}$)	Pearsonov korelacijski koeficient	1	0,202*	0,027
	Sig. (dvostransko)		0,027	0,841
	N	124	121	58
BIP/FL	Pearsonov korelacijski koeficient	0,202*	1	- 0,353**
	Sig. (dvostransko)	0,027		0,008
	N	121	122	56
FW (g)	Pearsonov korelacijski koeficient	0,027	-0,353**	1
	Sig. (dvostransko)	0,841	0,008	
	N	58	56	58

Hipoteza 7: Obstaja statistično značilna razlika med nosečnostmi z normalnim izidom (vzorec: 125 nosečnic) ter nosečnostjo, ki se je končala z anomalijami pri HEL (nmol/L), PRL (nM), DT (nM) ter TAC ($\mu\text{mol/L}$).

Pri preučevanju hipoteze 7 smo skupni vzorec preiskovank razdelili na dva dela – na nosečnice, ki so rodile zdrave otroke in tiste, katerim so se rodili otroci z motnjami v razvoju. Želeli smo preveriti, ali obstajajo statistično pomembne razlike v koncentracijah posameznih bioloških označevalcev pri teh dveh skupinah.

Za preverjanje hipoteze smo se tokrat poslužili Mann-Whitneyevega neparametričnega testa. Najprej smo seveda ponovno preverili normalnost porazdelitve, saj na podlagi tega izbiramo nadaljnje teste za preverjanje hipotez. Že iz prejšnjih izračunov vemo, da vse spremenljivke, ki nastopajo v tej hipotezi, razen TAC, niso normalno porazdeljene. Pri skupini patološke nosečnosti normalnosti nismo mogli preveriti, saj je vzorec premajhen. Ker nismo mogli dokazati normalnosti porazdelitve, smo za preverjanje hipoteze uporabili Mann-Whitneyev neparametrični test. Ta test uporabljamo za testiranje ničelne hipoteze o enakosti aritmetičnih sredin dveh populacij, ne da bi predpostavljali, da sta populaciji normalni. Nadomešča nam parni t-test, ki ga uporabljamo, kadar ni izpolnjen pogoj normalnosti primerjanih populacij.

Iz izračuna razlike povprečij (Preglednica XVI) med skupinama je razvidno, da pri vseh parih obstajajo manjše razlike v povprečnih vrednostih glede na to, ali se je nosečnost končala normalno ali patološko.

Preglednica XVI: Izračun razlike povprečij med skupinama normalna in patološka nosečnost

Nosečnost		HEL (nmol/L)	PRL (nM)	DT (nM)	TAC (μ mol/L)
Normalna nosečnost	N	121	121	121	120
	M	22,99	109,00	36,87	579,40
	SD	15,66	79,70	23,99	83,15
Patološka nosečnost	N	4	4	4	4
	M	19,98	135,63	32,36	545,00
	SD	10,37	129,31	24,98	82,89
Skupaj	N	125	125	125	124
	M	22,90	109,86	36,73	578,29
	SD	15,50	81,08	23,93	83,03

Sedaj bomo preverili, ali razlike veljajo tudi za celotno populacijo.

Preglednica XVII prikazuje, da so vse izračunane signifikance višje od 0,05, kar nakazuje, da razlik iz prejšnje tabele ne moremo posplošiti na celotno populacijo. Iz tega izhaja, da tudi hipoteze ne moremo potrditi, čeprav obstajajo manjše, statistično neznačilne razlike med skupinama nosečnic glede na to, kako se je nosečnost končala.

Preglednica XVII: Mann - Whitneyev test med skupinama normalna in patološka nosečnost

	Ničelna domneva	Test	Sig.	Odločitev
1	Porazdelitev HEL (nmol/L) je enaka po vseh kategorijah Patološka nosečnost	Neodvisnost vzorca Mann-Whitneyev test	0,911	Obdržimo ničelno domnevo
2	Porazdelitev PRL (nM) je enaka po vseh kategorijah Patološka nosečnost	Neodvisnost vzorca Mann-Whitneyev test	0,933	Obdržimo ničelno domnevo
3	Porazdelitev DT (nM) je enaka po vseh kategorijah Patološka nosečnost	Neodvisnost vzorca Mann-Whitneyev test	0,584	Obdržimo ničelno domnevo
4	Porazdelitev TAC ($\mu\text{mol/L}$) je enaka po vsej kategoriji Patološka nosečnost	Neodvisnost vzorca Mann-Whitneyev test	0,365	Obdržimo ničelno domnevo

Hipoteza 8: Obstaja statistično značilna razlika med nosečnostmi z normalnim izidom (vzorec: 125 nosečnic) ter patološko nosečnostjo pri parametrih BIP, FL in FW.

Z zadnjo hipotezo smo želeli preveriti, ali obstajajo razlike v izmerjenih ultrazvočnih parametrih BIP, FL in FW pri dveh skupinah nosečnic – pri tistih, ki so rodile zdrave otroke in pri tistih, ki so se jim rodili otroci z Downovim ali Edwardsovim sindromom in avtizmom.

Z izračunom Kolmogorov-Smirnovega koeficienta smo najprej preverili normalnost porazdelitve. Porazdelitev spremenljivk v tem primeru ni bila normalna. Zato smo se za preučevanje hipoteze poslužili Mann-Whitneyevega neparametričnega testa.

Iz Preglednice XVIII izhaja, da obstajajo komaj opazne razlike v aritmetični sredini in standardnem odklonu med obema skupinama nosečnic. S Mann-Whitneyevim testom (Preglednica XIX) smo preverili, ali so tudi statistično značilne.

Preglednica XVIII: Izračun razlike povprečij med skupinama normalna in patološka nosečnost

Nosečnost		BIP (mm)	FL (mm)	FW (g)
Normalna nosečnost	N	119	119	56
	M	36,45	21,10	184,77
	SD	4,45	3,09	45,48
Patološka nosečnost	N	4	4	2
	M	35,43	20,00	186,31
	SD	1,18	2,20	25,60
Skupaj	N	123	123	58
	M	36,41	21,06	184,83
	SD	4,38	3,07	44,80

Preglednica XIX: Mann-Whitneyev test med skupinama normalna in patološka nosečnost

	Ničelna domneva	Test	Sig.	Odločitev
1	Porazdelitev BIP je enaka po vseh kategorijah Patološka nosečnost	Neodvisnost vzorca Mann-Whitneyev test	0,286	Obdržimo ničelno domnevo
2	Porazdelitev FL je enaka po vseh kategorijah Patološka nosečnost	Neodvisnost vzorca Mann-Whitneyev test	0,299	Obdržimo ničelno domnevo
3	Porazdelitev FW je enaka po vseh kategorijah Patološka nosečnost	Neodvisnost vzorca Mann-Whitneyev test	0,915	Obdržimo ničelno domnevo

Tudi pri tej hipotezi je izračun pokazal, da razlike med skupinama sicer obstajajo, vendar je signifikanca višja od 0,05, iz česar lahko sklepamo, da razlike niso statistično značilne in jih torej ne moremo posplošiti na celotno populacijo.

5 RAZPRAVA

Živimo v okolju, kjer je človeški organizem nenehoma izpostavljen vplivu oksidativnega stresa, ki usmerja, pospešuje ali zavira delovanje človeškega telesa. Dandanes pa smo na žalost preveč in prepogosto izpostavljeni čezmernemu stresu, kar ima zagotovo škodljive posledice.

Nosečnost je zaradi povišane metabolične aktivnosti in zmanjšane moči antioksidantov stanje povišanega oksidativnega stresa. Reaktivne kisikove spojine se pojavljajo v procesu zorenja oocita, pri delovanju rumenega telesca ter miometrija, v procesu embriogeneze, folikulogeneze, implantacije zarodka in tudi pri fetoplacentarnemu razvoju. Metabolična aktivnost se poveča predvsem v posteljici. Ta ima tudi pomembno vlogo pri tvorbi oksidativnega stresa med nosečnostjo, saj je pomemben posrednik med materinim in fetalnim krvnim obtokom. Obseg oksidativnega stresa posteljice je odvisen od oksidativnih poškodb in antioksidantnega sistema posteljice, na kar imajo velik vpliv prehranjevalne navade matere, aktivnost, življenjski slog, genetski dejavniki in dejavniki okolja. Vsi ti dejavniki vplivajo na razvoj ploda in so vpleteni v patološke izide nosečnosti.

Z našo raziskavo smo želeli primerjati več kazalcev oksidativnega stresa v urinu in amnijski tekočini in poskušali ugotoviti, ali obstajajo povezave med koncentracijami posameznih kazalcev ter njihove vrednosti primerjati s kazalci rasti ploda, pridobljenimi med ultrazvočno preiskavo.

Najprej smo primerjali vrednosti označevalcev HEL, PRL, DT v urinu ter vrednosti TAC v amnijski tekočini. Tako smo želeli ugotoviti, ali so v primeru povišanega določenega kazalca oksidativnega stresa povišane ali znižane tudi vrednosti ostalih kazalcev. Naša predpostavka je bila, da so posamezni parametri med seboj povezani in da gre za pozitivno korelacijo, torej da se s povišanjem enega kazalca zviša tudi vrednost ostalih.

Določanje vrednosti ditirozina v urinu in totalne antioksidantne kapacitete v amnijski tekočini smo izvedli sami z metodo ELISA oz. s pomočjo reagenčnega kompleta za določanje TAC. Podatke o vrednostih ostalih dveh kazalcev v urinu za isti vzorec smo

pridobili z japonskega inštituta JaICA. Izračuni korelacijskih koeficientov so pokazali, da med določenimi kazalci oksidativnega stresa obstaja precej močna korelacija, ki je v nekaterih primerih tudi statistično značilna, torej jo lahko posplošimo na celotno populacijo. Spearmanov korelacijski koeficient med parametroma HEL in PRL je znašal 0,389 in je statistično značilen že pri 1% tveganju. Še višji je korelacijski koeficient med kazalcema HEL in DT, ki znaša 0,500 in je prav tako statistično značilen že pri 1% stopnji tveganja. Najvišjo korelacijo smo izračunali med parametroma PRL in DT, kjer je Spearmanov koeficient znašal kar 0,843, kar kaže na izjemno visoko povezavo med koncentracijami teh dveh označevalcev pri preiskovankah. Tudi izračuni korelacije med ostalimi parametri pokažejo, da med njimi obstaja povezava, vendar ne moremo reči, da je ta povezava statistično značilna. Koeficienti korelacije med TAC in ostalimi parametri znašajo med 0,107 do 0,130, kar kaže na neznatno pozitivno korelacijo. Rezultati statistične analize so v skladu z našimi predvidevanji, saj obstaja med različnimi kazalci oksidativnega stresa visoka korelacija, vse izračunane korelacije pa so pozitivne, kar kaže na to, da z naraščanjem enega označevalca narašča tudi vrednost ostalih.

Nadalje smo želeli preveriti, kako so med seboj povezane kazalci rasti ploda, ki so bili pri plodu izmerjeni med ultrazvočno preiskavo. Glede na to, da so BIP, FL in AC vsi kazalci rasti ploda smo predvidevali, da so med seboj tudi statistično povezani, kljub temu, da vsak od kazalcev odraža rast različnih delov telesa ploda. Izračun Spearmanovega koeficienta, ki je znašal od 0,503 do 0,602, je pokazal, da obstaja razmeroma visoka povezava med vsemi kazalci plodove rasti. Korelacija se je v vseh primerih izkazala tudi za statistično značilno že pri 1% tveganju, torej lahko povezavo med kazalci BIP, FL in AC posplošimo na celotno populacijo.

Nato smo želeli ugotovitve, ki smo jih pridobili s preizkušanjem prvih dveh hipotez, razširiti in preveriti, kako so povezani posamezni kazalci oksidativnega stresa pri nosečnicah in kazalci rasti ploda.

Najprej smo se lotili primerjave kazalca FL in posameznih bioloških označevalcev oksidativnega stresa. Naša predpostavka je bila, da bo med FL in posameznimi označevalci obstajala negativna korelacija, torej, da se bo z višanjem koncentracije označevalcev oksidativnega stresa zmanjševal kazalec FL, kar bi pomenilo manjšo rast plodu oz.

upočasnjeno rast, ki lahko kaže na določene patološke pojave v nosečnosti. Statistična analiza s programom SPSS je pokazala, da med kazalcem FL in posameznimi označevalci oksidativnega stresa obstaja neznatna negativna korelacija (od -0,069 do -0,155). Ta ugotovitev je bila v skladu z našimi napovedmi. Korelacije med statističnimi spremenljivkami pa so bile razmeroma nizke in niso bile statistično značilne ($p < 0,05$), torej so značilne samo za naš vzorec.

Podobno analizo kot v prejšnji hipotezi smo nato želeli narediti še s kazalcem BIP ter vsemi kazalci oksidativnega stresa. Rezultati izračuna Spearmanovega koeficienta so pokazali, da ponovno obstaja med BIP in kazalci OS negativna korelacija, ki pa je bila razmeroma šibka. Najvišja korelacija se je pokazala med spremenljivkama BIP in DT (-0,134). Raziskava je pokazala, da morda obstaja povezava med rastjo ploda in oksidativnim stresom, vendar le-ta ni statistično značilna ($p < 0,05$).

Nazadnje smo preverili še povezavo spremenljivke AC s spremenljivkami HEL, PRL, DT in TAC. Dobili smo podobne rezultate kot pri ostalih dveh kazalcih rasti ploda, le da sta bili v tem primeru dve korelaciji šibko pozitivni, dve pa šibko negativni. Iz tega izhaja, da ne moremo trditi, da so spremenljivke AC, HEL, PRL, DT in TAC povezane pri celotni populaciji in je zelo verjetno, da je korelacija le naključna.

Pri preverjanju povezave kazalcev rasti plodu in označevalcev oksidativnega stresa se je izkazalo, da so korelacije v resnici v večini negativne, kar je v skladu z predpostavko, da povišan oksidativni stres prispeva k motnjam v razvoju in rasti ploda. Kljub izračunanim korelacijam ne moremo trditi, da so le-te odraz le odvisnosti rasti in razvoja ploda od povišanega oksidativnega stresa. Na rast zarodka poleg oksidativnega stresa močno vplivajo tudi genetski dejavniki, obtok hranil med materjo in plodom preko posteljice ter nepravilno izločanje hormonov pri plodu ali materi. Zastoj v rasti ploda se lahko pojavi tudi zaradi raznih bolezni matere, kot na primer bolezni dihal, srčnih bolezni, povišanega krvnega tlaka, sladkorne bolezni, raznih avtoimunih obolenj itd. Naša raziskava je pokazala le, da povišani kazalci oksidativnega stresa v skupini naših preiskovank res negativno vplivajo na kazalce rasti ploda, ne moremo pa trditi, da lahko to domnevo razširimo na celotno populacijo. Za bolj natančno in zanesljivo povezanost bi morali raziskavo razširiti in jo zasnovati večplastno. Primerjali bi lahko večje število kazalcev

oksidativnega stresa ter povečali vzorec nosečnic. Na rezultate je namreč zagotovo vplivalo tudi dejstvo, da je bil vzorec preiskovank, katerim so bili določeni kazalniki rasti ploda, manjši od tistega, katerim smo določali označevalce oksidativnega stresa. Nenazadnje pa je potrebno upoštevati tudi dejstvo, da izračun korelacije s Spearmanovim koeficientom meri samo linearno korelacijo med spremenljivkami. Še vedno torej obstaja možnost, da med posameznimi kazalci obstaja korelacija, ki pa ni linearna.

Nadalje smo želeli preveriti, ali so bolj kompleksni kazalniki rasti ploda, kot je razmerje BIP/FL ter kazalnik FW, ki smo ga izračunali po Hadlockovi formuli (39), kažejo višjo ali nižjo korelacijo s kazalci oksidativnega stresa kot parametri BIP, FL in AC. Pravilno določanje parametra FW je predvsem pomembno pri visoko rizičnih nosečnostih, npr. tistih, kjer obstaja nevarnost prezgodnjega poroda, splava in kadar je plod premajhen ali prevelik za svojo gestacijsko starost. Statistična analiza je pokazala, da sta parametra BIP/FL in FW zmerno povezana (korelacija je negativna in sicer -0.391), kar smo tudi pričakovali. Ta korelacija je tudi statistično pomembna že pri 1% stopnji tveganja. Parameter BIP/FL je zmerno povezan tudi s koncentracijo HEL v urinu, korelacijski faktor znaša tu 0,215, ta korelacija pa je tudi statistično značilna pri 5% stopnji tveganja. Povezave spremenljivke BIP/FL z ostalimi spremenljivkami (PRL in DT) so razmeroma šibke in statistično neznačilne. Šibke in statistično neznačilne so bile tudi povezave med parametrom FW in HEL, PRL in DT. Iz izračunov Pearsonovega koeficienta med kazalci TAC, BIP/FL ter FW, ki so normalno porazdeljeni, je bilo razvidno, da lahko med temi spremenljivkami opazimo kar nekaj statistično značilnih korelacij. Kazalec BIP/FL je zmerno povezan z koncentracijo TAC in FW, korelacija pa je tudi statistično značilna pri $p < 0,05$. Povezava med parametroma FW in TAC je zelo nizka in pozitivna, vendar je značilna samo za naš vzorec ($p < 0,05$). Iz zbranih rezultatov lahko zaključimo, da so korelacije med kazalcem BIP/FL ter FW s spremenljivkami HEL, PRL, DT ter TAC v povprečju višje kot so bile povezave s osnovnimi kazalci rasti ploda kot so BIP, FL in AC. Glede na razpoložljivo literaturo je parameter FW po Hadlockovi formuli najboljši odraz dejanske teže zarodka in je lahko uporaben tudi v klinične namene, saj dokaj zanesljivo pokaže na motnje v rasti in razvoju ploda (39). Podatki, pridobljeni iz našega vzorca, niso pokazali visokih korelacij med parametrom FW in označevalci lipidne peroksidacije in oksidacije proteinov, torej ne moremo direktno sklepati, da povišani označevalci oksidativnega stresa vplivajo na rast in razvoj ploda. Da bi dobili bolj natančne podatke, bi

morali bolj podrobno spremljati potek celotne nosečnosti in spremljati različne vplive nanjo.

Nazadnje smo celoten vzorec preiskovank razdelili na dve skupini in sicer na nosečnosti, ki so se končale z normalnim izidom in na tiste nosečnice, ki so se jim rodili otroci z motnjami v razvoju (Downov, Edwardsov sindrom in avtizem). Z razdelitvijo vzorca na ti dve skupini smo želeli preveriti, ali med obema skupinama obstajajo razlike v koncentraciji označevalcev oksidativnega stresa in ali anomalije v nosečnosti vplivajo na kazalce rasti in razvoja zarodka. Pri primerjavi teh dveh skupin smo ugotovili, da obstajajo med njima le zelo majhne razlike v povprečnih vrednostih za koncentracije vseh kazalcev oksidativnega stresa, ki pa niso statistično pomembne. Zanimivo je bilo le dejstvo, da so bile koncentracije posameznih označevalcev oksidativnega stresa višje pri skupini nosečnic, ki so rodile normalne otroke. Ta ugotovitev ni bila v skladu z našimi pričakovanji, saj smo predvidevali, da bo obseg oksidativnega stresa pri nosečnicah, ki so rodile otroke z anomalijami, višji. Z našo predpostavko se ujema le ugotovitev, da je bila v povprečna vrednost totalne antioksidantne kapacitete pri patoloških nosečnostih nižja od tiste, ki smo jo izmerili pri nosečnicah, ki so rodile zdrave otroke. V literaturi smo namreč našli veliko podatkov o tem, da je v serumu nosečnic, ki so se jim rodili otroci z anomalijami, TAC značilno znižan (33, 40). Nadalje smo z Mann-Whitneyevim testom preverili še, ali lahko ugotovljene razlike posplošimo na celotno populacijo. Izkazalo se je, da naših rezultatov ne moremo posplošiti na celotno populacijo in da veljajo samo za našo raziskavo.

Pri primerjavi patoloških in normalnih nosečnosti in parametrov rasti ploda se je izkazalo, da med vzorcema obstajajo razlike v povprečnih vrednostih vseh parametrov (BIP, FL, FW). V skladu z našimi pričakovanji so bile vrednosti parametrov BIP in FL pri nosečnostih, ki so se končale normalno, višje od tistih, ki so se končale z anomalijami. Vrednost parametra FW pa je bila presenetljivo višja pri patoloških nosečnostih. Z Mann-Whitneyevim testom smo ugotovili, da naših ugotovitev ne moremo posplošiti na celotno populacijo in da niso statistično značilne. Zaključili smo, da je na dobljene rezultate precej vplivalo tudi dejstvo, da je bil vzorec nosečnic, ki so se jim rodili otroci z motnjami v razvoju, precej majhen v primerjavi z vzorcem nosečnic, ki so se jim rodili normalni otroci. Dodatno bi morali v raziskavi upoštevati še druge dejavnike, ki lahko vplivajo na

oksidativni stres in na zaplete v nosečnosti (npr. vpliv slabe prehrane in težkega dela nosečnice ter raznih drog kot so cigarete in alkohol).

Zaključimo lahko, da so se v naši raziskavi pokazale določene korelacije med kazalci oksidativnega stresa in kazalci rasti ploda, vendar so te v večini statistično neznačilne in veljajo samo za naš vzorec preiskovank. Da bi prišli do bolj zanesljivih zaključkov, bi morali povečati vzorec udeleženk raziskave ter raziskavo zasnovati večplastno s spremljanjem še ostalih dejavnikov, ki vplivajo na povišanje oksidativnega stresa v nosečnosti in pojav zapletov v rasti in razvoju ploda. Čeprav nismo mogli dokazati, da med obstaja med kazalci oksidativnih poškodb in anomalijami plodu statistično značilna povezava, pa tudi ne moremo zagotovo trditi, da ta povezava ne obstaja. Povsem mogoče je, da je vpliv oksidativnega stresa na zaplete v nosečnosti v naši raziskavi ostal prikrit zaradi drugih parametrov, ki še bolj močno vplivajo na kazalce rasti in razvoja plodu. Zato bi bile za bolj zanesljive rezultate potrebne dodatne raziskave.

6 SKLEP

V diplomski nalogi smo preiskovali, ali oksidativni stres vpliva na klinične kazalce rasti in razvoja ploda. V okviru diplomske naloge smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- med vrednostmi heksanoillizina, propanoillizina, ditirozina v urinu ter vrednostmi totalne antioksidantne kapacitete v amnijski tekočini obstaja visoka pozitivna korelacija, ki jo lahko posplošimo na celotno populacijo ($p < 0,01$),
- med kazalci rasti ploda biparietalni premer, dolžina stegenice in obseg trebuha plodu obstaja visoka pozitivna korelacija, ki je tudi statistično značilna ($p < 0,01$),
- med kazalcem rasti dolžina stegenice plodu in vrednostmi heksanoillizina, propanoillizina, ditirozina in totalne antioksidantne kapacitete obstaja zelo nizka (neznatna) negativna korelacija, ki pa je ne moremo posplošiti na celotno populacijo, ker ni statistično značilna ($p < 0,05$),
- obstaja negativna korelacija med spremenljivko biparietalni premer ter heksanoillizinom, propanoillizinom, ditirozinom in totalno antioksidantno kapaciteto, ki pa je razmeroma šibka. Korelacije med omenjenimi parametri niso statistično značilne ($p < 0,05$),
- korelacija med kazalcem obsega trebuha plodu ter heksanoillizinom, propanoillizinom, ditirozinom in totalno antioksidantno kapaciteto je neznatna in statistično neznačilna ($p < 0,05$), zato ne moremo sklepati na kakršnokoli povezavo med temi spremenljivkami,
- parametra BIP/FL in FW sta zmerno povezana, prav tako pa je parameter BIP/FL zmerno povezan tudi s koncentracijo heksanoillizina v urinu. Obe povezavi sta tudi statistično pomembni in ju lahko posplošimo na celotno populacijo,
- podatki, pridobljeni iz našega vzorca, niso pokazali visokih korelacij med parametroma FW ter BIP/FL in označevalci lipidne peroksidacije, oksidacije proteinov ter antioksidantne kapacitete, torej ne moremo sklepati, da povišani označevalci oksidativnega stresa direktno vplivajo na rast in razvoj ploda,
- koncentracije posameznih označevalcev oksidativnega stresa so bile višje pri skupini nosečnic, ki so rodile normalne otroke, kar ni v skladu z našimi

pričakovanji, da je obseg oksidativnega stresa višji pri nosečnicah, ki so rodile otroke z anomalijami,

- v skladu z našimi pričakovanji so bile vrednosti parametrov biparietalnega premera in dolžine stegenice pri nosečnostih, ki so se končale normalno, višje od tistih, ki so se končale z anomalijami. Vrednost parametra FW pa je bila presenetljivo višja pri patoloških nosečnostih. Te ugotovitve pa niso bile statistično značilne, tako da jih ne moremo posplošiti na celotno populacijo.

7 LITERATURA

1. Yoshikawa T., Naito Y. What in oxidative stress? *JMAJ*, 2002; 45-7: 271-276.
2. Rejc B., Osredkar J., Geršak K. Oksidacijski stres in nosečnost. Univerzitetni klinični center Ljubljana. *Farm Vestnik*, 2012; 63: 153-161.
3. Osredkar J. Oksidativni stres. Univerzitetni inštitut za klinično kemijo in biokemijo, *Zdrav vestnik*, 2012; 81:393-406.
4. Berlett S., Stadtman E. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress; *J. Biol. Chem*, 1997; 272: 20313-20316.
5. Okezie I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists Society* 1998; 75 (2): 199-212.
6. Šuput D., Kramarič L. Izvor in reakcije radikalov. Izbrana poglavja iz patološke fiziologije. 9th ed. Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2001; 15-24.
7. Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Institut für Physiologische Chemie I; Exp Physiol*, 1997; Mar 82 (2): 291-295.
8. Šuput D. Reaktivne kisikove spojine v patofizioloških procesih. 9th Ed Ljubljana: Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, 2001; 25-36.
9. Sharma P., Bhushan Jha A., Shanker Dubey A., Pessarakli M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012;1-26.
10. Stoyanovsky D., Osipov A., Quinn P., Kagan V. Ubiquinone-dependent recycling of vitamin E radicals by superoxide. *Arch Biochem Biophys*, 1995; 323(2):343-531.
11. Halliwell B., Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*, 1993; 57(5): 715S-724S.
12. Aust A., Eveleigh J. Mechanisms of DNA oxidation. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 1999 Dec; 222(3):246-252.
13. Pečar S., Perdih A. Katalitični antioksidanti kot nove zdravilne učinkovine. Slovensko farmacevtsko društvo, *Farmaceutski vestnik* 2006; 1:24-29.
14. Leal C., Schetinger M., Leal D. et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in pregnant women, *Hum. Reprod*, 1996; 1-53.
15. Sugino N., Shimamura K. et. al. Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Hum. Reprod* 1996; 11 (5):1073-1078.

16. Zachara B., Wardak C., Didkowski D. et al. Changes in blood selenium and glutathion concentrations and glutathion peroxidase activity in human pregnancy. *Gynecol. Obstet. Invest* 1993; 12-35.
17. Singh U., Devaraj S., Jialal I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annu Rev Nutr.* 2005;25:151-174.
18. Combs G. The vitamins; Fundamental aspects in nutrition and health. Academic Press 1998. Str. 446-448.
19. 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: 747-755.
20. Rani N., Dhingra R., Singh Arya D., Kalaivani M., Bhatla N., Kumar R. Role of oxidative stress markers and antioxidants in the placenta of preeclamptic patients. *JOGR*, 2010; 36(6): 1151-1266.
21. Dhananjaya B., Venkatesh G., Sendil Kumaran D. Study of correlation between oxidative stress parameters and severity of preeclampsia. *Int J Biol Med Res.* 2012; 3(1): 1260-1262.
22. Moretti M., Philips M., Abouzeid A., Cataneo R., Greenberg J. Increased breath markers of oxidative stress in normal pregnancy and in preeclampsia, *AJOG* 2004; 190: 1184-1190.
23. Mohanty S., Sahu P., Mandal M., Mohapatra P., Panda A. Evaluation of oxidative stress in pregnancy induced hypertension. *Indian J Clin Biochem* 2006; 21(1): 101-105.
24. Stein T., Scholl T., Schuler M. et al. Oxidative stress early in pregnancy and pregnancy outcome. *Free Radic Res* 2008; 42(10): 841-848.
25. Ernster L., Forsmark-Andrée P. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms. Department of Biochemistry; *Clin Investig.* 1993; 71(8 Suppl):S60-6S5.
26. Djordjevic A., Spasic S., Jovanovic-Galovic A. et al. Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity and lipid peroxidation products. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004; 16: 367-372.
27. Wang Y., Walsh S. Antioxidant activities and mRNA expression of superoxide dismutase, catalase, and glutathion peroxidase in normal and preeclamptic placentas. *J Soc Gynecol Investig* 1996; 3(4):179-184.
28. Chappell L., Seed P., Briley A., Kelly F., Lee R., Hunt B., Parmar K., Bewley S., Shennan A., Steer P., Poston L. Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *Lancet* 1999; 354(918): 810-860.
29. Beazley D., Ahokas R., Livingston J., Griggs M., Sibai B. Vitamin C and E supplementation in women at high risk for preeclampsia: a double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192(2): 520-530.

30. Sajal G., Ashok A., Jashoman B., Juan G.. The Role of Oxidative Stress in Spontaneous Abortion and Recurrent Pregnancy Loss. A Systematic Review Obstetrical and gynecological Suervey 2007.
31. Colomiere M., Permezel M., Riley C., Desoye G., Lappas M. Defective insulin signaling in placenta from pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2009; 160: 567- 578.
32. Lappas M., Hiden U., Desoye G., Froehlich J., Hauguel-de Mouzon S. Jawerbaum A. The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 2011;15(12): 3061-3100.
33. Geršak K., Hatije I., Kavšek G. Uspešnost prenatalnega odkrivanja zastoja plodove rasti. *Zdravniški vestnik* 2010; 79: 690-697.
34. Min J., Park B., Kim Y. et al. Effect of Oxidative Stress on Birth Size; Consideration of Window from Mid Pregnancy to Delivery. *Placenta* 2009; 30: 418-423.
35. Pagano G., Castello G. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Down syndrome. *Adv Exp Med Biol* 2012; 724: 291-299.
36. Slater T. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1984; 105:283-292.
37. Benedetto C., Bocci A., Dianzani M., Ghiringhelo B., Slater T., Tomasi A., Vannini V. Electron spin resonance studies on normal human uterus and cervix and in benign and malignant uterine tumors. *Cancer Res* 1981; 41: 2936-2942.
38. Little R., Gladen B. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod Toxicol* 1999; 13: 347–352.
39. Campbell Westerway S. Estimating fetal weight for best clinical outcome. *Northern Women's Imaging Hornsby New South Wales* 2007; 52-97.
40. Toy H., Camuzcuoglu H., Arioiz D. Serum prolidase activity and oxidative stress markers in pregnancies with intrauterine growth restricted infants. *J Obstet Gynaecol Res* 2009; 35: 1047-1053.