

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

POLONA KOSER

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

POLONA KOSER

**POVEZANOST AKTIVNOSTI ANTIOKSIDANTNIH ENCIMOV
SUPEROKSID-DISMUTAZE IN GLUTATION-PEROKSIDAZE Z
RAZLIČNIMI ZNAČILNOSTMI NOSEČNICE IN OTROKA**

RELATIONSHIP OF ANTIOXIDANT ENZYMES SUPEROXIDE
DISMUTASE AND GLUTATHIONE PEROXIDASE ACTIVITY WITH
DIFFERENT CHARACTERISTICS OF PREGNANT WOMAN AND HER
CHILD

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorjema prof. dr. Borutu Božiču in prof. dr. Jošku Osredkarju za koristne nasvete in pomoč pri pisanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se gospe Barbari Rejc, mag. farm. iz Ginekološke klinike v Ljubljani, ki je dala pobudo za našo raziskavo in ki mi je med nastajanjem diplome nekajkrat pomagala z nasveti in z odgovori na moja vprašanja.

Zahvaljujem se gospema iz laboratorija Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo, ki sta mi pomagali pri izvedbi eksperimentalnega dela.

Zahvaljujem se tudi gospodu Borutu Gombaču, knjižničarju v Univerzitetni knjižnici Maribor, ki mi je priskrbel ogromno strokovnih člankov, s katerimi sem si pomagala pri nastajanju diplome.

Najbolj pa se zahvaljujem svoji družini, ki mi je med študijem in med nastajanjem te diplome ves čas stala ob strani. Za konec se zahvaljujem še malemu bitjecu, ki je na poti, in me spodbuja z brcami v trebušček.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja.

Polona Koser

Ljubljana, oktober 2013

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin
Članica diplomske komisije: doc. dr. Mojca Lunder

KAZALO VSEBINE

I. UVOD	1
I.1. OKSIDATIVNI STRES IN ANTIOKSIDANTI	1
I.1.1. ENCIMSKI ANTIOKSIDANTI	2
I.1.1.1. SUPEROKSID-DISMUTAZA (SOD).....	2
I.1.1.2. KATALAZA (CAT)	3
I.1.1.3. GLUTATION-PEROKSIDAZA (GPx).....	5
I.1.2. NEENCIMSKI ANTIOKSIDANTI ALI NIZKOMOLEKULARNI ANTIOKSIDANTI (LMWA)	6
I.2. OKSIDATIVNI STRES V NOSEČNOSTI.....	8
I.2.1. OBRAMBNI MEHANIZMI V NOSEČNOSTI	9
I.2.1.1. ENCIMSKI ANTIOKSIDANTI V NOSEČNOSTI (SOD, CAT, GPx).....	10
I.2.2. OKSIDATIVNI STRES IN ZAPLETI V NOSEČNOSTI.....	11
I.2.2.1. OKSIDATIVNI STRES IN PREEKLAMPSIJA	11
I.2.2.2. OKSIDATIVNI STRES IN SPONTANI SPLAV	11
I.2.2.3. OKSIDATIVNI STRES IN ZASTOJ RASTI PLODA	12
I.3. OCENA OKSIDATIVNEGA STRESA	12
I.3.1. Določanje poškodovanih proteinov.....	12
I.3.2. Določanje lipidne peroksidacije	13
I.3.3. Določanje oksidacije DNA.....	14
I.3.4. Določanje statusa antioksidantov	14
II. NAMEN DELA	16
III. MATERIALI IN METODE	17
III.1. BIOLOŠKI VZORCI.....	17
III.1.1. Zbiranje vzorcev	17
III.1.2. Metode za pridobivanje vzorcev.....	17
III.2. VKLJUČITVENI KRITERIJI IN KARAKTERISTIKE PREISKOVANK	17
III.3. METODE ZA DOLOČANJE ENCIMOV	21
III.3.1. Opis metod.....	21
III.3.1.1. Določanje superoksid-dismutaze (SOD)	21
III.3.1.2. Določanje glutation-peroksidaze (GPx)	21
III.3.2. Uporabljeni materiali in oprema.....	22

III.3.2.1. Uporabljeni materiali/reagenti	22
III.3.2.2. Uporabljena laboratorijska oprema	23
III.3.3. Potek dela	23
III.3.3.1. Potek določanja superoksid-dismutaze.....	23
III.3.3.2. Potek določanja glutation-peroksidaze.....	24
III.4. METODE ZA PRIDOBIVANJE PODATKOV.....	24
III.5. METODE ZA STATISTIČNO ANALIZO.....	26
IV. REZULTATI.....	27
IV.1. REZULTATI ANALIZ ENCIMOV	27
IV.2. PODATKI, IZPISANI IZ KARTOTEK NOSEČNIC	28
IV.3. REZULTATI STATISTIČNIH ANALIZ	32
IV.3.1. Korelacija med encimi.....	32
IV.3.2. Povezave med spolom otroka in ostalimi parametri	33
IV.3.3. Povezave med indeksom telesne mase ženske in ostalimi parametri.....	34
IV.3.4. Povezave med aktivnostjo superoksid-dismutaze (SOD) v plodovnici in ostalimi parametri	35
IV.3.5. Povezave med aktivnostjo superoksid-dismutaze (SOD) v krvi in ostalimi parametri.....	36
IV.3.6. Povezave med aktivnostjo glutation-peroksidaze (GPx) v plodovnici in ostalimi parametri.....	37
IV.3.7. Povezave med aktivnostjo glutation-peroksidaze (GPx) v krvi in ostalimi parametri.....	37
IV.3.8. Povezave med kajenjem nosečnice in aktivnostjo antioksidantnih encimov ..	39
IV.3.9. Povezava med dolžino gestacijske dobe in porodnimi merami	40
IV.3.10. Povezava med bolezenskimi stanji nosečnic in aktivnostjo antioksidantnih encimov	41
V. RAZPRAVA.....	42
V.1. Povezave med spolom otroka in ostalimi parametri.....	42
V.2. Povezave med indeksom telesne mase ženske in ostalimi parametri	43
V.3. Povezave med aktivnostjo antioksidantnih encimov in ostalimi parametri.....	44
V.4. Povezave med kajenjem nosečnice in aktivnostjo antioksidantnih encimov	46
V.5. Povezava med dolžino gestacijske dobe in porodnimi merami.....	47

V.6. Povezava med bolezenskimi stanji nosečnic in aktivnostjo antioksidantnih encimov	48
V.7. Uporabljene metode za statistično analizo	48
V.8. Splošen zaključek razprave.....	49
VI. SKLEP.....	51
VII. VIRI IN LITERATURA	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Glutation.....	6
-------------------------	---

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Razlog za amniocentezo.....	18
Graf 2: Starost ženske ob porodu	19
Graf 3: Število splavov, ki so jih preiskovanke doživele pred študijo	19
Graf 4: Število uspešnih porodov preiskovank pred študijo	20
Graf 5: Indeks telesne mase (BMI) ženske pred nosečnostjo.....	20
Graf 6: Povezava med spolom otroka in porodno dolžino otroka.....	33
Graf 7: Povezava med indeksom telesne mase in številom splavov	35
Graf 8: Povezava med aktivnostjo glutacion-peroksidaze v krvi in porodno težo otroka ...	38
Graf 9: Aktivnosti superoksid-dismutaze v krvi	39
Graf 10: Povezava med dolžino gestacijske dobe in porodno težo otroka.....	40
Graf 11: Povezava med dolžino gestacijske dobe in porodno dolžino otroka.....	40

KAZALO TABEL

Tabela 1: Aktivnosti superoksid-dismutaze in glutacion-peroksidaze v krvi in plodovnici	27
Tabela 2: Osnovni podatki o nosečnicah.....	28
Tabela 3: Dosedanji porodi in splavi, zapleti v nosečnosti in kronične bolezni	29
Tabela 4: Podatki o indeksu telesne mase, gestacijski dobi in starosti ženske ob porodu ..	30
Tabela 5: Podatki o odvzemu vzorcev in o parametrih določenih z ultrazvokom	31

Tabela 6: Podatki o porodu.....	32
Tabela 7: Rezultati povezav med spolom otroka in ostalimi parametri	33
Tabela 8: Rezultati povezav med indeksom telesne mase ženske in ostalimi parametri	34
Tabela 9: Rezultati povezav med aktivnostjo SOD v plodovnici in ostalimi parametri	36
Tabela 10: Rezultati povezav med aktivnostjo SOD v krvi in ostalimi parametri	36
Tabela 11: Rezultati povezav med aktivnostjo GPx v plodovnici in ostalimi parametri	37
Tabela 12: Rezultati povezav med GPx v krvi in ostalimi parametri.....	38
Tabela 13: Rezultati povezav med kajenjem nosečnice in aktivnostjo antioksidantnih encimov	39
Tabela 14: Rezultati povezav med kroničnim vnetjem ščitnice in aktivnostjo antioksidantnih encimov.....	41

POVZETEK

Nosečnost je stanje, v katerem je organizem bolj občutljiv na oksidativni stres, ker zaradi mnogih telesnih sprememb v tem obdobju pride do porušanja ravnotežja med oksidanti in antioksidanti. Namen naloge je bil ugotoviti, če so aktivnosti antioksidantnih encimov in zapleti v nosečnosti povezani, ker bi v tem primeru lahko določanje teh encimov predstavljalo indikator tveganja za nekatere zaplete v nosečnosti. Vrednotili smo povezave med aktivnostjo antioksidantnih encimov (superoksid-dismutaze in glutacion-peroksidaze v krvi in v plodovnici) in nekaterimi drugimi parametri v nosečnosti (gestacijska doba, porodna teža in dolžina otroka, kajenje nosečnice, indeks telesne mase nosečnice, število preteklih splavov pri nosečnici, parametri za oceno rasti ploda, spol otroka) ter ugotavljali korelacijo med antioksidantnimi encimi v plodovnici in krvi.

Podatki za raziskavo so bili zbrani med junijem 2010 in februarjem 2011. Zbrali smo vzorce krvi in plodovnice 32 nosečnic v drugem trimesečju nosečnosti. Plodovnica je bila pridobljena s postopkom amniocenteze. Aktivnost antioksidantnih encimov superoksid-dismutaze in glutacion-peroksidaze smo določali spektrofotometrično z avtomatskim biokemijskim analizatorjem Hitachi 917. Za določanje superoksid-dismutaze smo uporabili komercialno dostopni analizni komplet RANSOD (Randox, Velika Britanija), za določanje glutacion-peroksidaze pa RANSEL (Randox, Velika Britanija).

Pridobljene podatke sem statistično obdelala s pomočjo programov Microsoft Office Excel 2003 in SPSS. Korelacija med aktivnostjo superoksid-dismutaze in glutacion-peroksidaze je bila v tej študiji neznačilna, prav tako so bile neznačilne korelacije med encimi v plodovnici in krvi. Pokazale so se naslednje statistično značilne povezave: glutacion-peroksidaza je pri višjih aktivnostih v krvi povezana z nižjo porodno težo otroka; pri nižjem indeksu telesne mase se pojavlja več splavov; daljša gestacijska doba je povezana z večjo porodno težo in večjo porodno dolžino otroka; kronično vnetje ščitnice je povezano z nižjo aktivnostjo glutacion-peroksidaze v krvi. Nobena od nosečnic ni imela zapletov v nosečnosti, zato nisem mogla oceniti morebitnega vpliva antioksidantnih encimov na te zaplete. Prav tako naši rezultati niso pokazali pomembne vloge antioksidantnih encimov v povezavi z ostalimi parametri v nosečnosti. Vsekakor bi bile potrebne še dodatne raziskave, v katere bi zajeli več nosečnic in vključili več parametrov.

Ključne besede: nosečnost, oksidativni stres, superoksid-dismutaza, glutacion-peroksidaza

ABSTRACT

Pregnancy is a state of increased susceptibility to oxidative stress because it brings many physical changes that may cause disturbance in the prooxidant-antioxidant balance. The aim of our study was to determine if the activities of antioxidant enzymes are related to pregnancy complications, because in this case, the determination of these enzymes could be an indicator of risk for certain complications during pregnancy. We evaluated the relationship between the activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the blood and in the amniotic fluid), and some other parameters during pregnancy (gestational age, child's birth weight and length, smoking during pregnancy, mother's body mass index, number of previous miscarriages, fetal growth parameters, sex of the baby) and correlation between antioxidant enzymes in amniotic fluid and blood.

Data for the study were obtained between June 2010 and February 2011. Blood samples and amniotic fluid samples were collected from 32 pregnant women in the second trimester of pregnancy. Amniotic fluid was obtained by amniocentesis procedure. The activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and glutathione peroxidase was determined spectrophotometrically with an automatic biochemical analyzer Hitachi 917. Commercially available kit RANSOD (Randox, Great Britain) was used to determine the activity of superoxide dismutase and commercially available kit RANSEL (Randox, Great Britain) to determine the activity of glutathione peroxidase.

Data were statistically analyzed using Microsoft Office Excel 2003 and SPSS. There was no correlation between the superoxide dismutase and glutathione peroxidase found in this study. Correlation between the enzymes in amniotic fluid and blood was also insignificant. The following statistically significant relationships were found: higher blood levels of glutathione peroxidase were associated with lower birth weight; there were more miscarriages at lower body mass index; longer gestational period is associated with higher birth weight and greater birth length; thyroiditis is associated with a low activity of glutathione peroxidase in the blood. None of the pregnant women had complications during pregnancy, so I was not able to evaluate the potential impact of antioxidant enzymes on these complications. Also, our results didn't show any important role of antioxidant enzymes in association with other parameters of pregnancy. Additional researches should be made including more pregnant women and more parameters.

Key words: pregnancy, oxidative stress, superoxide dismutase, glutathione peroxidase

SEZNAM OKRAJŠAV

8-OHdG - 8-hidroksideoksigvanozin

BIP – prečni presek čez glavico ploda (biparietal diameter)

CAT – katalaza

DNA – deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)

DNFH - 2,4-dinitrofenilhidrazin

ELISA – encimsko imunski test

FL – dolžina stegenice ploda (femur length)

FRAP – metoda za določanje celokupnega antioksidantnega statusa (ang. ferric reducing ability of plasma)

GPx – glutation-peroksidaza

GSH – glutation

Hb – hemoglobin

HRP - horseradish peroxidase

ITM – indeks telesne mase (ang. BMI – body mass index)

LMWA – low molecular weight antioxidants

MDA - malondialdehid

NO – dušikov oksid

ROS – reaktivne kisikove zvrsti

rpm - obrati na minuto (ang. revolutions per minute)

RS – reaktivne zvrsti

SOD – superoksid-dismutaza

TAC – celokupni antioksidantni status (ang. total antioxidant capacity)

TBA - barvni kompleks MDA-tiobarbiturna kislina

TBARS - s TBA reagirajoče snovi (ang. thiobarbituric acid reactive substances)

TMB substrat - 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

I. UVOD

I.1. OKSIDATIVNI STRES IN ANTIOKSIDANTI

Oksidativni stres je porušeno ravnotežje med tvorbo reaktivnih zvrsti in antioksidantno obrambo, kar lahko vodi do poškodb celice. Oksidativni stres je lahko posledica znižanega nivoja antioksidantov ali povečane tvorbe reaktivnih zvrsti (1).

Antioksidant je vsaka snov, ki upočasni, prepreči ali odstrani oksidativno poškodbo tarčne molekule. Antioksidanti se uporabljajo kot pomožne snovi za zaščito oksidativno občutljivih spojin.

V normalnih pogojih antioksidanti pretvarjajo reaktivne kisikove zvrsti v vodo, da zmanjšujejo njihovo koncentracijo. Največjo aktivnost imajo encimski antioksidanti (npr. superoksid-dismutaza, katalaza), sledijo jim tako imenovani »blažilci šoka« (sem spadajo npr. albumin, transferin, urat), še bolj šibko aktivnost imajo esencialne spojine (npr. vitamin C in E, aminokisljine, koencim Q10, lipojska kislina), najmanjšo aktivnost pa imajo npr. karotenoidi, flavonoidi itd. (1).

Antioksidantni obrambni sistem zajema encimske in neencimske antioksidante. Encimski antioksidanti nevtralizirajo presežne reaktivne kisikove spojine in jim s tem preprečijo, da bi poškodovale celične strukture.

• **Encimski antioksidanti:**

- Superoksid-dismutaza (SOD)
- Katalaza (CAT)
- Glutation-peroksidaza (GPx)

Neencimski antioksidanti ali **nizkomolekularni antioksidanti** (low molecular weight antioxidants – LMWA) so snovi, ki jih zaužijemo s hrano ali pa nastajajo endogeno. Antioksidanti, ki jih zaužijemo s hrano so vitamini (vitamin C in vitamin E), poleg tega s hrano zaužijemo tudi nekatere elemente v sledovih (npr. selen in cink), ki sicer niso antioksidanti, so pa kofaktorji antioksidantnih encimov. Nekatere od teh snovi so lahko tudi sintetične in se uporabljajo kot prehranska dopolnila (2).

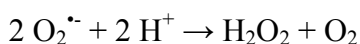
Endogene neencimske antioksidante pa sintetizira telo samo. To so npr. glutation, bilirubin, koencim Q10... (1)

I.1.1. ENCIMSKI ANTIOKSIDANTI

I.1.1.1. SUPEROKSID-DISMUTAZA (SOD)

Glavna naloga tega encima je, da odstranjuje superoksidni anion ($O_2^{\bullet-}$) in sicer tako, da katalizira njegov razpad na vodikov peroksid in kisik. Je edini poznani encim, ki reagira z $O_2^{\bullet-}$ in prvi encim antioksidantne obrambe (1). Ima pomembno antioksidantno vlogo v skoraj vseh celicah, ki so izpostavljene kisiku. Varuje pred poškodbami DNA, škodljivimi učinki ionizirajočega sevanja ter poškodbami lipidov in beljakovin. Superoksid-dismutaza potrebuje za delovanje kot kofaktor kovinski ion. Obstajajo tri oblike tega encima (baker in cink vsebujoča superoksid-dismutaza - Cu, Zn-SOD ali SOD1 se nahaja v citoplazmi; mangan vsebujoča superoksid-dismutaza - Mn-SOD ali SOD2 se nahaja predvsem v mitohondrijih; SOD3 pa se nahaja zunaj celic).

Reakcija, ki jo katalizira superoksid-dismutaza:



SOD katalizira pretvorbo superoksida in s tem preprečuje njegove škodljive reakcije in ščiti celico. Večinoma superoksid reagira z drugim superoksidom (dismutacija) ali pa z drugim biološkim radikalom, kot je npr. dušikov oksid (NO). Superoksidni radikal ($O_2^{\bullet-}$) se spontano pretvori v kisk (O_2) in vodikov peroksid (H_2O_2). SOD je potreben, ker superoksid reagira z občutljivimi in kritičnimi deli celice (3).

Superoksid je ena glavnih reaktivnih kisikovih spojin (ROS) v celici. Zato ima SOD kot antioksidant ključno vlogo. Delali so poskuse na miškah, z genskih inženiringom so jim povzročili pomanjkanje teh encimov in prišlo je do hudih patologij. Miške s pomanjkanjem SOD2 so umrle nekaj dni po skotitvi (4). Miške s pomanjkanjem SOD1 so razvile širok spekter bolezni, vključno s karcinomom jetrnih celic (5), pospešeno izgubljanje mišične mase (6), zgodnejši pojav očesne mrežnice in krajšo življenjsko dobo. Miške s pomanjkanjem SOD3 niso kazale nobenih očitnih napak in so imele normalno življenjsko dobo, so pa bile bolj občutljive na hiperoksične poškodbe. Vse te miške so bile bolj občutljive na snovi, ki zvišujejo raven superoksida, kot npr. herbicida parakvat in dikvat (7).

SOD ima antioksidantno in protivnetno vlogo v telesu. Nivo SOD-a s starostjo upada, nivo radikalov pa narašča, zato raziskujejo SOD za uporabo pri zaviranju procesov staranja

(anti-aging). Lahko bi pomagal pri zmanjševanju gub in brazgotin, pri celjenju ran in opeklin, pri posvetlitvi hiperpigmentacije in starostnih peg ter pri zaščiti pred škodljivimi UV žarki (8, 9). Dodajajo ga v mnoge kozmetične kreme, ki naj bi upočasnjevale staranje kože.

SOD ima močno protivnetno aktivnost. Zelo učinkovit je npr. pri zdravljenju vnetja črevesja. Zdravljenje s SOD zmanjša nastajanje reaktivnih kisikovih spojin in oksidativni stres, zato bi SOD lahko postal pomemben del terapije pri vnetni bolezni črevesja (10). Pokazalo se je, da je prečiščen SOD iz govejih jeter (znan pod imenom Orgotein) učinkovit pri zdravljenju vnetnih bolezni sečil pri moških (apliciran preko katetra v mehur). Orgotein je učinkovit tudi za zdravljenje skleroderme in osteoartritisa (11). Mimetik SOD-a, ki se imenuje TEMPOL (4-hidroksi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksil) je trenutno v kliničnih preizkušanjih za uporabo kot radioprotektiv, da bi preprečil izgubo las, do katere pogosto pride pri obsevanju rakavih bolnikov (12).

Bolezen amiotrofična lateralna skleroza (ALS), ki je povezana z nizkim nivojem ali pa gensko mutacijo tega encima, kaže na pomembnost SOD v telesu. Zaradi pomanjkanja SOD naj bi bile živčne celice bolj dovzetne in ranljive za napad radikalov, kar sčasoma vodi v simptome ALS. Preiskujejo, če dodajanje visokih odmerkov SOD ali pa dodajanje drugih antioksidantov lahko pomaga upočasniti napredovanje ALS (13).

V vseh do sedaj preučevanih tumorjih so ugotovili zmanjšane aktivnosti Mn-SOD. V mnogih tumorjih pa so ugotovili tudi zmanjšane aktivnosti Cu-Zn-SOD. Poleg tega tumorji proizvajajo superoksidne radikale. Zmanjšana encimska aktivnost in povečana radikalska produkcija vodita v določene spremenjene lastnosti rakastih celic. Razliko med SOD aktivnostjo pri normalnih in pri rakastih celicah bi lahko izkoristili pri terapiji raka (14).

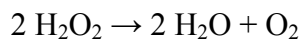
I.1.1.2. KATALAZA (CAT)

Katalaza je encim, ki se nahaja v skoraj vseh živih organizmih, ki so izpostavljeni kisiku. Njegova vloga je, da odstranjuje vodikov peroksid (H_2O_2) in to tako, da katalizira njegovo razgradnjo do vode in kisika. S tem ščiti celico pred zanjo toksičnim vodikovim peroksidom (15). Uvrščamo ga v razred encimov oksidoreduktaz. Ena molekula katalaze

lahko v sekundi pretvori milijone molekul vodikovega peroksida v vodo in kisik. Je zelo pomemben encim pri reprodukcijskih reakcijah. Vodikov peroksid je namreč pri nizkih koncentracijah toksičen za semensko tekočino, katalaza pa ga odstranjuje. Vodikov peroksid otežuje tudi prodiranje semenčice v jajčece. Ugotovili so, da se aktivnost katalaze v jajcevodu povečuje tekom cikla in doseže maksimum tik pred ovulacijo (16).

Katalaza je tetramer, sestavljena je iz štirih polipeptidnih verig, vsaka od njih ima več kot 500 aminokislin (17). Vse štiri podenote imajo v aktivnih mestih Fe^{3+} hem. Optimalen pH za človeško katalazo je približno 7 in ima precej širok razpon, saj se hitrost reakcije ne spremeni bistveno pri pH med 6,8 in 7,5. Optimalna temperatura za človeško katalazo je 37°C , kar je približno temperatura človeškega telesa (18). Katalaza se nahaja intracelularno predvsem v peroksisomih, manj pa v mitohondrijih (19). Delovanje tega encima se močno zmanjša po izpostavitvi kože UV žarkom, kar je verjetno posledica nepovratne oksidativne poškodbe encima (20).

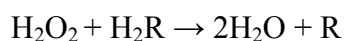
Celokupna reakcija, ki jo katalizira katalaza je:



Prisotnost katalaze v mikrobiološkem vzorcu ali vzorcu tkiva se lahko preveri z dodatkom vodikovega peroksida. Poteče namreč reakcija, pri kateri lahko vidimo nastanek mehurčkov kisika.

Katalaza lahko preko vodikovega peroksida katalizira tudi oksidacijo različnih metabolitov in toksinov, npr. formaldehida, mravljinčne kisline, fenolov, acetaldehida in alkoholov.

Reakcija, ki poteče:



Natančen mehanizem te reakcije ni znan.

Vsak ion težkih kovin (npr. bakrovi kationi) lahko deluje kot nekompetitiven inhibitor katalaze. Strup cianid pa je kompetitiven inhibitor katalaze, ker se močno veže na hem v katalazi in s tem preprečuje aktivnost encima (21).

Vodikov peroksid je škodljiv stranski produkt pri številnih normalnih metaboličnih procesih. Da ne pride do poškodbe celic in tkiv, se mora hitro pretvoriti v druge, manj

nevarne snovi. Celice uporabljajo katalazo, da hitro katalizira reakcijo, pri kateri iz vodikovega peroksida nastaneta kisik in voda (22).

Pri raziskavah se je pokazalo, da so bile miške, pri katerih so povzročili pomanjkanje katalaze, fenotipsko normalne, je pa pomanjkanje katalaze v določenih pogojih povečalo verjetnost za razvoj sladkorne bolezni tipa 2 (23). Katalaza pomaga tudi pri metabolizmu etanola, čeprav metabolizira le majhno količino etanola v telesu (24).

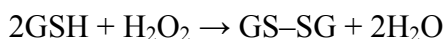
Raziskave kažejo, da ima nizka raven katalaze vlogo pri sivenju las. Vodikov peroksid nastaja v telesu, katalaza pa ga pretvarja v vodo in kisik. Če je raven katalaze zmanjšana, je pretvorba vodikovega peroksida zmanjšana in ga je zato več, kar omogoča beljenje las od znotraj navzven. Morda bodo nekoč to ugotovitev uporabljali za preprečevanje sivenja las (25).

I.1.1.3. GLUTATION-PEROKSIDAZA (GPx)

Gre za družino encimov s peroksidazno aktivnostjo. Funkcija glutacion-peroksidaze je, da odstranjuje H_2O_2 in ROOH in s tem varuje pred lipidno peroksidacijo (1). Katalizira reakcijo med reduciranim glutationom in vodikovim peroksidom. Pri tem nastajata voda in glutacion disulfid (26). V aktivnem mestu encima je selenocistein, zato je za normalno delovanje encima potrebna zadostna preskrbljenost organizma s selenom (priporočen dnevni vnos = 50 μ g/dan). Obstaja več izoform tega encima (1).

Izoforme so kodirane z različnimi geni, razlikujejo se glede na lokacijo v celici in glede na specifičnost substrata. Do sedaj so opredelili osem različnih izoform glutacion-peroksidaze pri ljudeh. Glutacion-peroksidaza 1 (GPx1) je najbolj razširjena oblika, nahaja se v citoplazmi skoraj vseh sesalskih tkiv, njen substrat pa je predvsem vodikov peroksid. Glutacion-peroksidaza 4 (GPx4) ima za substrat predvsem lipidne hidroperokside, izražena je v skoraj vseh celicah sesalcev, ampak v manjših količinah. Glutacion-peroksidaza 2 (GPx2) je črevesni in ekstracelularni encim. Glutacion-peroksidaza 3 (GPx3) pa je razširjena predvsem v plazmi. Glutacion-peroksidaza 5 (GPx5) je izražena predvsem v tkivih moškega reproduktivnega trakta (27).

Glavna reakcija, ki jo katalizira glutation-peroksidaza je:



GSH predstavlja reduciran monomerni glutation, GS-SG pa predstavlja glutation disulfid.

Glutation-reduktaza potem reducira oksidiran glutation in s tem konča cikel:



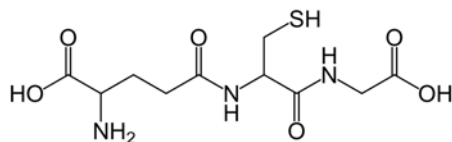
Celovitost celičnih membran je odvisna od glutation-peroksidaze. Miši, ki so jim z genskim inženiringom povzročili pomanjkanje glutation-peroksidaze 1, so bile fenotipsko normalne in so imele normalno življenjsko dobo, kar kaže na to, da ta encim ni nujno potreben za življenje. Je pa pri teh miškah prišlo že zgodaj do pojava sive mreže in do napak pri proliferaciji nekaterih mišičnih celic. Miške s pomanjkanjem glutation-peroksidaze 4 pa so umrle med zgodnjim embrionalnim razvojem (27).

Glutation-peroksidaza je najpomembnejši obrambni mehanizem pred UV poškodbami v koži. Za njegovo delovanje je nujen selen in dokazano je, da pomanjkanje selena poveča peroksidacijo lipidov v kulturah fibroblastov in verjetnost kožnega raka pri miših (20).

1.1.2. NEENCIMSKI ANTIOKSIDANTI ALI NIZKOMOLEKULARNI ANTIOKSIDANTI (LMWA)

Delimo jih na spojine endogenega izvora in na spojine vnešene s hrano. **Endogenega izvora** so:

- Glutation - je tiolni tripeptid in je glavni celični neencimski antioksidant. Sintetizira se iz treh aminokislin: glutaminske kisline, cisteina in glicina (26). Je reducent, ki lahko neposredno reagira z radikali ali pa vstopa v encimsko katalizirane redukcije (1).



Slika 1: Glutation

- Bilirubin - sestavljen je iz verige štirih pirolovih obročev (tetrapirolo) in je razgradni produkt krvnega barvila hema (bilirubin je rumene barve). Nastaja v vranici, v makrofagnem sistemu, iz odmirajočih eritrocitov (približno 80%) in v jetrnih celicah iz

hemoproteinov (citokromi, katalaza, peroksidaza). Veže se na albumin, ki ga transportira v jetra. Albumin varuje pred reaktivnimi kisikovimi in dušikovimi spojinami (1).

- Koencim Q - je provitamin, ki nastaja v telesu in ima vlogo v maščobah topnega elektronskega prenašalca v mitohondrijski dihalni verigi. Številka ob imenu označuje, koliko kemičnih podenot ima molekula v svoji sestavi (število izoprenskih podenot). Pri ljudeh ubikinon vsebuje deset izoprenskih enot, torej se mu reče koencim Q10 (1).
- Lipojska kislina – je močan reducent (1).
- Sečna kislina – je močan antioksidant, deluje pa tudi kot kelator - kelira kovinske ione Fe in Cu (1). Pri ljudeh in višje razvitih primatih je sečna kislina končni produkt oksidacije (razgradnje) purinov (preko hipoksantina in ksantina) in se izloča s sečem.
- Ženski spolni hormoni - in vitro lahko inhibirajo lipidno peroksidacijo zaradi fenolne -OH skupine (potrebne so μM koncentracije). Sintetični estrogen dietilstilbestrol je učinkovit zaviralec lipidne peroksidacije v μM območju in vitro, a je žal kancerogen (1).
- Melatonin - je biogen amin, ki spada med hormone. Pri vretenčarjih se sintetizira primarno v epifizi (češariki), in sicer iz triptofana preko serotonina. V telesu deluje kot antioksidant, uravnava cirkadiani cikel, spanje, počutje, staranje in imunski odziv. Bolj kot neposreden antioksidant je pomemben, ker vpliva na povišan nivo encimov - antioksidantov in zavira sintezo citokinov ter izražanje inducibilne NO-sintaze (iNOS) (1).

Nizkomolekulski antioksidanti, ki jih **pridobimo s hrano** pa so:

- Askorbinska kislina (vitamin C) – je vodotopen antioksidant. Nastopa kot kofaktor vsaj 8 encimov: pri sintezi kolagena, pri sintezi noradrenalina iz dopamina, pri sintezi karnitina, pri metabolizmu tirozina... Posredno lahko deluje kot prooksidant saj reducira Fe^{3+} v Fe^{2+} (1). Sodeluje pri regeneraciji oksidirane vitamina E in glutationa (GSH), zato deluje skupaj z njima sinergistično.
- Tokoferol (vitamin E) - je maščobotopen antioksidant iz družine tokoferolov. Njegova najbolj aktivna oblika je α -tokoferol, ki ščiti celične membrane pred oksidacijo z reaktivnimi kisikovimi zvrstmi in lipidnimi radikali (28). Ob kopičenju α -tokoferil radikala lahko pride do prooksidativnih učinkov. α -tokoferol lahko reducira ione kovin Fe^{3+} in Cu^{2+} do Fe^{2+} in Cu^+ (1).
- Karotenoidi - karotenoidi so barvila rastlinskega izvora, obstaja jih preko 700 - npr. β -karoten, α -karoten, lutein, likopen... V telesu jih najdemo v adipoznem tkivu (80 %),

jetrih (10 %), v corpus luteum in testisih. Njihova absorpcija je nepopolna in odvisna od vrste hrane (1).

- Polifenoli rastlinskega izvora - zanje je značilna prisotnost več fenolnih strukturnih enot. Fenolne OH skupine so donorji H⁺. Med polifenole spadajo npr. kvercetin, katehin, epikatehin... Polifenoli niso endogeni, ampak se nahajajo v različnih živilih (citrusi, rdeče vino, zeleni čaj...).

1.2. OKSIDATIVNI STRES V NOSEČNOSTI

Za normalen razvoj ploda je materino biokemično okolje zelo pomembno (29). Nosečnost je že sama po sebi stanje povišanega oksidativnega stresa, ker je posteljica zelo bogata z mitohondriji, le-ti pa so metabolično zelo aktivni. Prehodne kovine, posebej železo, ki ga je veliko v posteljici, so pomemben dejavnik pri nastanku radikalov. Zaščitni mehanizmi pred radikali se med nosečnostjo povečajo in ščitijo zarodek, ki pa je vseeno izpostavljen določeni stopnji oksidativnega stresa (30).

V nosečnosti lahko pride do porušanja ravnotežja med oksidanti in antioksidanti, ker v tem obdobju pride do mnogih telesnih sprememb, zaradi katerih se poveča bazalna poraba kisika in pride do sprememb v porabi energije različnih organov. Že v zgodnji nosečnosti posteljica vpliva na homeostazo v telesu matere. Bogata je z mitohondriji in ko je popolnoma razvita, predstavlja približno 1% bazalnega metabolizma nosečnice (30).

Posteljica je vmesnik med materinim in fetalnim krvnim obtokom, preko nje se prenašajo plini, hranila in metabolni produkti. Sprva je posteljica v hipoksičnem okolju, ko pa zori, se ji razvija ožilje in njeno okolje postane bogato s kisikom, velika masa mitohondrijev pa spodbuja nastajanje reaktivnih kisikovih spojin (ROS), kar poveča raven prostega železa (30).

Posteljica lokalno spodbuja nastajanje dušikovega oksida (NO), ki skupaj z drugimi reaktivnimi dušikovi spojinami prispeva k večjemu oksidativnemu stresu, posebej v prisotnosti prehodnih kovin. Posteljica je bogata tudi z makrofagi, ki spodbujajo lokalno nastajanje radikalov. Imunski sistem je med nosečnostjo zmanjšan, kar je morda posledica visoke ravni estrogena (30).

V nosečnosti lahko pride do raznih zapletov, kot so na primer preeklampsija, inzulinska rezistenca, hipertenzija, spontani splav, zastoj v rasti ploda in prezgodnji porod. Ti zapleti bi bili lahko posledica oksidativnega stresa, lahko pa tudi da so njegov vzrok (31).

Natančen razlog za pojav patološkega oksidativnega stresa pri nosečnicah z omenjenimi zapleti še ni znan. Pri nagnjenosti k oksidativnemu stresu in zapletom pri nosečnosti imajo pomembno vlogo polimorfizmi v antioksidantnih encimih in nezadostni vnos mikrohranil, predvsem selena. Na večjo tvorbo ROS vplivajo tudi metabolične nepravilnosti pri materi, kot na primer diabetes (29, 32).

I.2.1. OBRAMBNI MEHANIZMI V NOSEČNOSTI

Reaktivne kisikove spojine imajo tako pozitivno kot negativno vlogo – so ključne signalne molekule pri fizioloških procesih in pri signalnih poteh ženskega reproduktivnega cikla, imajo pa tudi vlogo pri patoloških procesih, vključno s tistimi, ki potekajo na rodilih. Pomembne so pri zorenju oocita, v procesu folikulogeneze, pri delovanju rumenega telesca, v procesu embriogeneze, implantacije zarodka in pri fetoplacentnem razvoju (33).

Obrambni mehanizmi pred poškodbami radikalov se povečujejo z napredovanjem nosečnosti. Postopno se povečujejo koncentracije lovilcev radikalov, kot so bilirubin, glutation, pa tudi specifične aktivnosti superoksid-dismutaze, katalaze in glutation-peroksidaze in reduktaze (30). Koncentracija vitamina C je odvisna od tega, koliko je nosečnica zaužije, na splošno pa je pri normalni nosečnosti nižja, resno pa se zniža pri preeklampsiji (34).

Vloga vitamina C in vitamina E pri preprečevanju poškodb, povzročenih z radikali, je zelo pomembna. Pomanjkanje vitamina C vpliva na strukturo posteljice in olajšuje okužbo posteljice, kar povečuje tveganje za prezgodnje pretrganje ovojnice posteljice in s tem tveganje za prezgodnji porod (35). Kadar je plazemska koncentracija vitamina C pri materi nizka, jo bo posteljica absorbirala preko aktivne difuzije, pri višjih koncentracijah pa bo prišel vitamin C v posteljico preko pasivne difuzije.

Ker je v nosečnosti ravnotežje med oksidanti in antioksidanti zlahka porušeno, pride takrat do večje nagnjenosti h gestacijski hipertenziji in inzulinski rezistenci, kar v nekaterih primerih vodi tudi do gestacijskega diabetesa. Gestacijska hipertenzija in diabetes sta pogosto povezana (30).

Nekateri podatki kažejo, da je zarodek nekoliko zaščiten pred ROS, ki nastajajo v posteljici, predvsem v zadnjih tednih nosečnosti. Vseeno pa je problematično, če pride do pogojev, ki spodbujajo nastajanje ROS v fazi organogeneze. Zarodki in otroci mater z diabetesom imajo visok delež anomalij, ki jih pripisujejo oksidativnemu stresu, s

hiperglikemijo povzročeni ROS, mitohondrijski oksidaciji in neencimski glikozilaciji skupaj s pomanjkanjem esencialnih maščobnih kislin, do katerega pride zaradi peroksidacije, sprememb prostaglandina in morda še zaradi kakšnih drugih, za zdaj še nepojasnjenih mehanizmov (36). V raziskavi so ugotovili, da so pri terapiji z inzulinom učinki diabetesa na mišje zarodke preprečeni (37), prav tako pa deformacije, ki so povzročene z diabetesom, zmanjšujeta vitamin C in E (38, 39).

I.2.1.1. ENCIMSKI ANTIOKSIDANTI V NOSEČNOSTI (SOD, CAT, GPx)

Superoksid-dismutaza (SOD) - aktivnost superoksid-dismutaze v plazmi in eritrocitih je med normalno nosečnostjo višja kot pri zdravih nenosečih ženskah in narašča s tedni nosečnosti. V tkivu posteljice se nahajajo vse tri oblike encima (40).

Pri preeklampsiji so ugotovili znižan nivo superoksid-dismutaze (41). Prav tako je nivo superoksid-dismutaze nižji pri nosečnicah z diabetesom (32).

Katalaza (CAT) - raziskava je pokazala porast aktivnosti katalaze v polni krvi med normalno nosečnostjo v primerjavi z zdravimi nenosečimi ženskami (42). Pri nosečnicah z gestacijsko hipertenzijo pa so opazili, da je nivo katalaze pogosto znižan (43).

Glutation-peroksidaza (GPx) - rezultati raziskav glede aktivnosti in ekspresije glutacion-peroksidaze v nosečnosti se razlikujejo. Nekatere študije so pokazale visoko raven glutacion-peroksidaze v posteljici in njen porast v plazmi zdravih nosečnic v primerjavi z zdravimi nenosečimi ženskami (44). Starejša raziskava pri zdravih nosečnicah pa je pokazala nespremenjeno aktivnost v plazmi ali celo znižano aktivnost v plazmi in eritrocitih proti koncu nosečnosti (45). V neki raziskavi so ugotovili, da se nivo glutacion-peroksidaze pri nosečnicah s preeklampsijo ne razlikuje od nivoja pri zdravih nosečnicah (40). Ugotovljeno je bilo tudi, da je aktivnost glutacion-peroksidaze značilno povečana pri ženskah s spontanim prezgodnjim porodom (46).

I.2.2. OKSIDATIVNI STRES IN ZAPLETI V NOSEČNOSTI

I.2.2.1. OKSIDATIVNI STRES IN PREEKLAMPSIJA

Preeklampsija je bolezen, ki se pojavi v nosečnosti, njeni znaki pa so hipertenzija, edemi in proteinurija matere. Preeklampsijo povzroči okvara endotelija žil, vzrok za to je nenormalna placentacija, ni pa še dokončno pojasnjeno, zakaj sploh pride do tega. Preeklampsija je bistveno težja bolezen od povišanega krvnega tlaka (46).

Motena je invazivnost trofoblastov, zato pride do zmanjšanja uteroplacentarne perfuzije, ishemije in hipoksije posteljice. Zaradi teh stanj pa pride do povečane tvorbe ROS, ki lahko vodijo v dodatne endotelne in vaskularne oksidativne poškodbe (29).

V raziskavah so ugotovili, da so označevalci lipidne peroksidacije v plazmi žensk s preeklampsijo povečani. Antioksidanti, kot karotenoidi, tokoferoli in vitamin C, pa so zaradi svoje vloge »čistilcev radikalov« pri ženskah s preeklampsijo znižani (47).

Hipertenzivne motnje so na splošno najbolj pogosta klinična težava v nosečnosti, pojavljajo se pri 5 - 10% nosečih žensk (47). Ponavadi se pojavijo po 20. tednu nosečnosti.

Preeklampsija je pomembno povezana z obolevnostjo in umrljivostjo matere in ploda (2).

Zaenkrat še niso odkrili metode za preprečitev preeklampsije. V neki raziskavi so preučevali vpliv antioksidantov vitamina C in vitamina E na preventivo preeklampsije. Pri zgodnjem ukrepanju in dodajanju vitamina C in E v obdobju med 16. in 22. tednom nosečnosti, so opazili manjšo pojavnost preeklampsije. Pri ženskah z diagnosticirano preeklampsijo, pa ni bilo nobene izboljšave (48). V zadnji raziskavi niso ugotovili pozitivnih učinkov vitamina C in E pri preventivi preeklampsije (49).

I.2.2.2. OKSIDATIVNI STRES IN SPONTANI SPLAV

Nenormalna placentacija (nastajanje posteljice) povzroči oksidativni stres, ki ima škodljive vplive na trofoblast (prekurzorske celice humane posteljice) - ta mehanizem naj bi bil vpleten v etiopatogenezo spontanega splava. Pri pacientkah, ki so imele ponavljajoče spontane splave, so preučevali vpliv glutaciona in družine encimov glutation-transferaz. Izkazalo se je, da je nivo glutaciona povečan pri ženskah, ki so kasneje doživele spontani splav v primerjavi z ženskami, ki so uspešno donosile otroka. Glutacion in glutation-peroksidaza sta antioksidanta, ki nevtralizirata radikale in lipidno peroksidacijo in tako

ohranjata intracelularno homeostazo in redoks ravnotežje. Etiologija ponavljajočih splavov je multifaktorska, vključuje genetske in okolijske dejavnike (2).

I.2.2.3. OKSIDATIVNI STRES IN ZASTOJ RASTI PLODA

Oksidativni stres matere med nosečnostjo je dejavnik tveganja za zastoj rasti ploda (fetal growth restriction – FGR) in nizko porodno težo (31). Zastoj plodove rasti pomeni, da plod ne doseže svojega genetsko določenega ravnega potenciala in je njegova ocenjena teža pod 10. percentilo razporeditve porodnih tež za določeno gestacijsko starost. To ugotavljajo glede na krivulje rasti ploda za določeno populacijo (50). Do zastoja rasti lahko pride zaradi materine bolezni (npr. kronična ledvična bolezen, hipertenzija, anemija, prirojene srčne napake), zaradi neugodnih vplivov na intrauterino okolje (npr. kajenje, alkohol) ali pa zaradi ploda samega (lahko ima prirojene razvojne nepravilnosti, kromosomopatije, lahko gre za večplodno nosečnost...). V več kot polovici primerov pa ostajajo razlogi za zastoj rasti ploda neznani (51).

I.3. OCENA OKSIDATIVNEGA STRESA

Neposredno merjenje oksidativnega stresa je zelo težavno, ker imajo reaktivne kisikove zvrsti in radikali precej kratko življenjsko dobo. Zato se uporablja predvsem merjenje produktov interakcij ROS z biološkimi makromolekulami. Potrebno je meriti več bioloških označevalcev, ker pri oksidativnih poškodbah različnih organov in pri različnih boleznih nastajajo različni oksidativni produkti in tudi razmerje med njimi je različno. Poznamo več načinov za določanje oksidativnega stresa: določanje poškodovanih proteinov, določanje lipidne peroksidacije, določanje oksidacije DNA in določanje statusa antioksidantov (52).

I.3.1. Določanje poškodovanih proteinov

Poznamo dva načina določanja poškodovanih proteinov. Pri prvem načinu merimo karbonilne produkte. Pri oksidaciji aminokislinskih ostankov, predvsem lizina, arginina, histidina in prolina, nastanejo proteini s karbonilnimi skupinami. Proteini s karbonilno skupino so kemično stabilni označevalci oksidativnega stresa. Za določanje teh proteinov se uporablja spektrofotometrična analizna metoda z 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNFH). Karbonilno skupino derivatiziramo z DNFH, pri čemer nastane stabilni 2,4-

dinitrofenilhidrazon, ki ga lahko zaznamo na več načinov. Lahko ga določimo spektrofotometrično pri valovni dolžini 370 nm, ker dinitrofenilhidrazon absorbira ultravijolično svetlobo. Ta način določanja poškodovanih proteinov ne omogoča določitve, kateri aminokislinski ostanek se je oksidiral in kateri protein je bil modificiran (53).

Drugi način je ugotavljanje specifičnih sprememb posameznih aminokislin. Zelo velikokrat oksidira aminokislina tirozin. Določamo lahko njene različne derivate, npr. ditirozin in nitrotirozin. Za analizo teh označevalcev oksidativnega stresa v bioloških tekočinah in tkivih se najpogosteje uporablja encimsko imunski test (ELISA) (53).

I.3.2. Določanje lipidne peroksidacije

Lipidno peroksidacijo lahko ocenimo z določanjem konjugiranih dienov (nastanejo po interakciji nenasičenih maščobnih kislin z radikali), z določanjem primarnih produktov peroksidacije ali z določanjem različnih sekundarnih produktov (heksanoil lizin, malondialdehid). Malondialdehid (MDA) tvori komplekse z bazami nukleinskih kislin (je mutagen). Določamo ga z nastankom barvnega kompleksa MDA-tiobarbiturna kislina (TBA), ki nastane pri povišani temperaturi v kislem mediju. Količino obarvanega produkta določamo spektrofotometrično pri valovni dolžini 532 nm. Metoda je nespecifična, pri lipidni peroksidaciji namreč nastajajo tudi drugi aldehidi, ki reagirajo s TBA in absorbirajo pri podobni valovni dolžini. Zato se uporablja izraz »s TBA reagirajoče snovi« (TBARS) (54). Problem te metode je, da se lipidni hidroperoksidi in aldehidi lahko absorbirajo v telo tudi iz prehrane, zato bi bilo potrebno ob določanju teh snovi nadzorovati prehrano (52).

Boljši označevalci lipidne peroksidacije so izoprostani. Nastanejo z radikali katalizirano, neencimsko peroksidacijo fosfolipidov ali arahidonske kisline. Nastanejo izomeri s prostanskim obročem. Najprej so izoprostani esterificirani na fosfolipidih, po delovanju fosfolipaz pa se sprostijo kot prosta oblika. Referenčna metoda za merjenje izoprostanov je plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS), ki pa je dokaj draga in zamudna (55). Za kvantifikacijo se uporablja tudi ELISA (56).

I.3.3. Določanje oksidacije DNA

Izmed purinskih in pirimidinskih baz je gvanin najbolj dovzeten za oksidacijo. Pri oksidativnem napadu $\text{OH}\cdot$ največkrat nastane 8-hidroksideoksigvanozin (8-OHdG), s katerim vrednotimo oksidativno okvaro DNA. Oksidirane nukleinske baze so topne v vodi in se brez predhodnega metabolizma izločijo v urin (57). 8-OHdG pa lahko določamo tudi v serumu in tkivu. Kvantitativno se ga največkrat določa z metodo ELISA (55), ki poteka tako, da vzorec dodamo na ploščico, ki ima vezana protitelesa specifična za 8-OHdG. Nato dodamo z biotinom označeno protitelo specifično za 8-OHdG ter avidin označen s hrenovo peroksidazo (horseradish peroxidase - HRP). Ko dodamo TMB substrat (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) se obarvajo vdolbinice, ki vsebujejo 8-OHdG. Reakcijo končamo z dodatkom žveplove kisline in spektrofotometrično izmerimo spremembo barve. Koncentracijo 8-OHdG določimo tako, da rezultat primerjamo z umeritveno krivuljo (58).

I.3.4. Določanje statusa antioksidantov

S statusom posameznih antioksidantov merimo sposobnost obrambe telesa pred ROS. Lahko določamo tudi celokupno vsoto vseh antioksidantnih snovi. Največkrat določamo aktivnost encima, lahko pa spremljamo tudi izražanje encimov v določenem tkivu z analizo ekspresije genov, ki kodirajo za izbrani encim. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) merimo na podlagi merjenja inhibicije reakcije med 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazol kloridom in superoksidnim radikalom, ki nadzorovano nastaja iz ksantina s ksantin-oksidadno katalizo. Superoksid-dismutaza inhibira nastanek formazanskega barvila, kateremu merimo absorbanco pri 505 nm (59).

Metoda za merjenje glutation-peroksidaze (GPx) temelji na katalizi oksidacije glutationa s kumen peroksidom. V prisotnosti glutation-reduktaze in NADPH se oksidirani glutation takoj pretvori v reducirano obliko s sočasno oksidacijo NADPH v NADP^+ , ki povzroči padec absorbance pri 340 nm (60). Glutation-peroksidazo določamo največkrat v polni krvi, ki ji dodamo heparin. Če delamo s človeško krvjo, je za redčenje priporočljivo uporabiti Hemoglobin reagent (vsebuje kalijev fericianid, kalijev cianid ter nekaj pomožnih snovi) zaradi prisotnosti peroksidaz v človeški krvi, ki bi lahko dale lažno višje rezultate, dodatek cianida pa preprečuje to interferenco. Še pred dodatkom Hemoglobin

reagenta pa je potrebno pretvoriti glutation v reducirano obliko, pri oksidirani obliki bi namreč cianid hitro povzročil inaktivacijo (61).

Za merjenje aktivnosti katalaze se uporablja preprosta spektrofotometrična metoda, ki meri padec absorbance, oziroma koncentracije vodikovega peroksida ob prisotnosti katalaze pri 240 nm (18).

Lahko pa merimo tudi celokupni antioksidantni status (ang. total antioxidant capacity – TAC). Pri tem izmerimo aktivnost vseh prisotnih antioksidantov v biološkem vzorcu. Za določanje TAC se najpogosteje uporablja metoda FRAP (ang. ferric reducing ability of plasma), pri kateri merimo redukcijo železa ob prisotnosti antioksidantov (62).

II. NAMEN DELA

Kadar v nosečnosti pride do različnih zapletov (splava, prezgodnjega poroda itd.) se pogosto ne pozna vzrokov, zakaj je prišlo do tega. Na osnovi študij različnih označevalcev oksidativnega stresa obstaja možnost, da bi pri tem imele vlogo vrednosti antioksidantnih encimov pri nosečnici. Če bi se izkazalo, da je tako, bi lahko lažje napovedovali zaplete in bolj spremljali nosečnice, ki so v tvegani skupini. Hkrati bi se odprle možnosti za interventne študije možnih terapij npr. dodajanja antioksidantnih encimov. Če bi se poleg tega izkazalo, da je korelacija med antioksidantnimi encimi v plodovnici in krvi dobra, bi lahko razvili manj invazivne metode za spremljanje oksidativnega stresa v nosečnosti (amniocenteza je namreč invaziven in neprijeten poseg za nosečnico, ki ga spremlja tudi 1% tveganje, da pride do splava). V Sloveniji do sedaj še niso določali statusa antioksidantnih encimov v nosečnosti, poleg tega je naša raziskava ena prvih z določanjem antioksidantnih encimov v plodovnici, do sedaj so jih v plodovnici določali le v povezavi z Downovim sindromom v redkih tujih študijah.

V diplomskem delu bomo obravnavali možno povezavo med antioksidantnim statusom nosečnice in nekaterimi fiziološkimi parametri plodu. Ovrednotiti nameravamo povezavo med aktivnostjo antioksidantnih encimov superoksid-dismutaze (SOD) in glutation-peroksidaze (GPx) v krvi in v plodovnici ter značilnostmi otroka (gestacijska doba, porodna teža in dolžina otroka, parametri za oceno rasti ploda (BIP - biparietal diameter, FL - femur length) in spolom otroka) in matere (kajenje nosečnice, indeks telesne mase, število preteklih splavov). Preverjali bomo tudi korelacijo med antioksidantnimi encimi v plodovnici in v krvi nosečnice.

Osredotočili se bomo predvsem na povezave, ki bi bile lahko klinično pomembne, in na katere bi se lahko dalo vplivati s terapijo (npr. s parenteralnim dodajanjem antioksidantnih encimov) ali s spremembami življenjskega stila (npr. kajenja). Naš namen bo tudi, da ugotovimo, če rezultati antioksidantnih encimov v krvi korelirajo z rezultati iz plodovnice.

III. MATERIALI IN METODE

III.1. BIOLOŠKI VZORCI

III.1.1. Zbiranje vzorcev

V naši raziskavi smo kot biološke vzorce uporabili vensko kri in amnijsko tekočino (plodovnico). Vzorci so bili zbrani od 32 nosečnic v drugem trimesečju nosečnosti (prvi odvzem vzorcev je bil med 111 in 135 dnev gestacije, povprečna gestacija ob odvzemu je bila 117 dni). Vzorci so se zbirali na ginekološki kliniki v Ljubljani med 14.6.2010 in 30.8.2010. Natančne podatke o datumih odvzema prikazuje **tabela 5** v poglavju Rezultati.

III.1.2. Metode za pridobivanje vzorcev

Kri je bila preiskovankam odvzeta na klasičen način iz vene na roki. Plodovnica je bila pridobljena s postopkom amniocenteze - gre za preiskavo, pri kateri s tanko iglo preko trebušne stene odvzamejo iz amnijske votline vzorec plodovnice za genetske preiskave. Plodovnica, ki obdaja otroka, vsebuje otrokove celice kože. Te celice se v laboratoriju uporabijo za analizo otrokovih kromosomov ali genov za specifična genetska obolenja. Preiskava se izvede pri nosečnicah, pri katerih je večja verjetnost, da bo imel otrok kakšne genetske ali kromosomske napake – če je nosečnica stara 37 let ali več (večja verjetnost, da bo imel otrok Downov sindrom), če ima nosečnica, njen partner ali pa kdo v njihovi družini genetsko obolenje, ki se lahko prenese na otroka ali pa če rezultati preiskav v nosečnosti (npr. ultrazvok, merjenje nuhalne svetline, četverni hormonski test) pokažejo povečano tveganje, da ima plod genetsko obolenje (63).

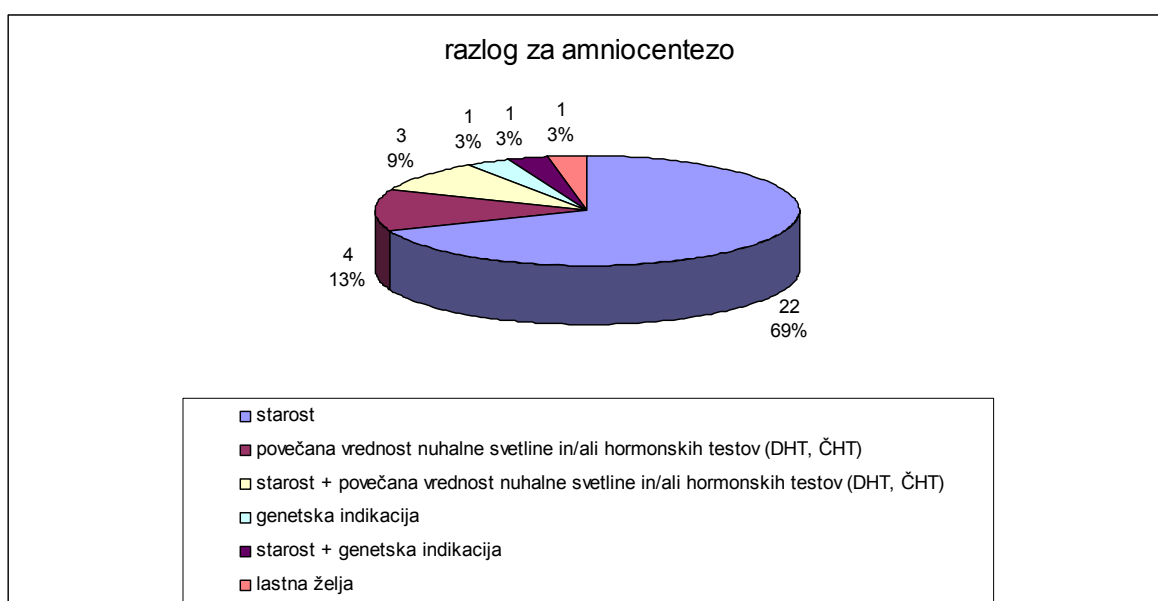
III.2. VKLJUČITVENI KRITERIJI IN KARAKTERISTIKE

PREISKOVANK

Kriterij za vključitev preiskovank v našo raziskavo je bil, da so preiskovanke imele amniocentezo v obdobju, ko so se zbirali vzorci za raziskavo (torej med junijem in avgustom 2010). Prvotno je bilo v raziskavo vključenih 36 preiskovank, pa so bile štiri kasneje izločene, tako da jih je ostalo 32. Nosečnice, ki so bile izločene iz raziskave, so bile izločene zaradi naslednjih razlogov: pri dveh ni bila odvzeta plodovnica, ena je rodila drugje, tako da nismo imeli njenih podatkov o poteku nosečnosti in porodu, pri eni pa so

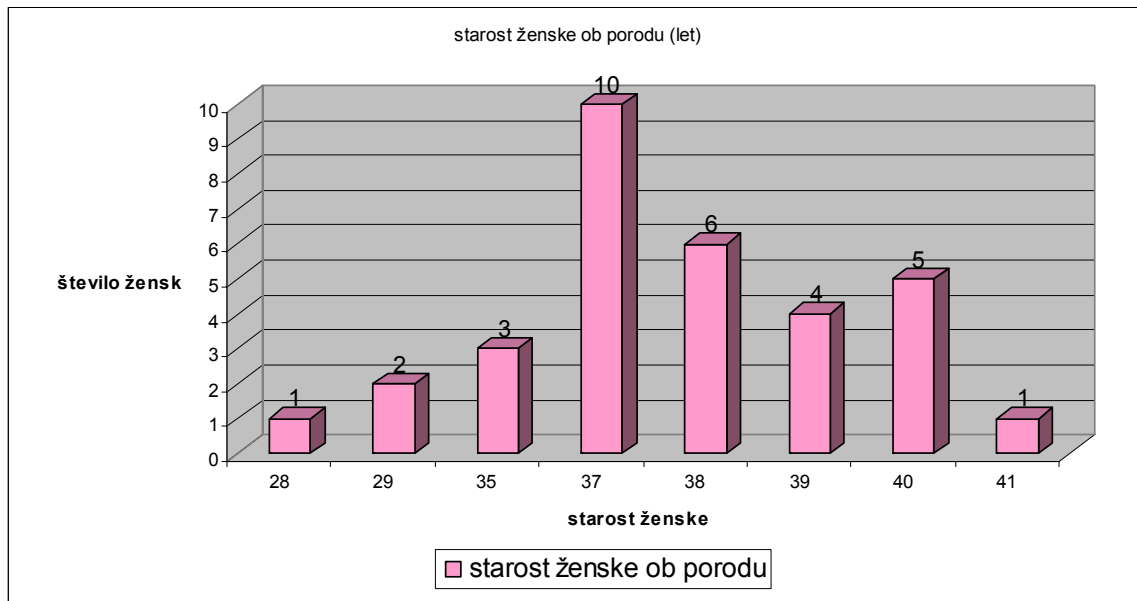
bili vzorci nepopolni (nečista plodovnica). Pri ostalih 32 nosečnicah (ki so ostale vključene v raziskavo) pa nam pri dveh ni uspelo uspešno določiti vrednosti encimov v krvi, zato tam manjkajo rezultati.

Pri naših preiskovankah je bil v večini primerov razlog za amniocentezo starost nad 37 let. Pri mlajših ženskah, ki so bile vključene v našo raziskavo, je bila amniocenteza izvedena predvsem zaradi genetskih indikacij ali pa zaradi povečanega tveganja za Downov sindrom (na katerega je nakazovala povečana vrednost nuhalne svetline in/ali hormonskih testov). Le pri eni preiskovanki je bila amniocenteza izvedena na njeno lastno željo, brez indikacij. Razloge za amniocentezo prikazuje **graf 1**.



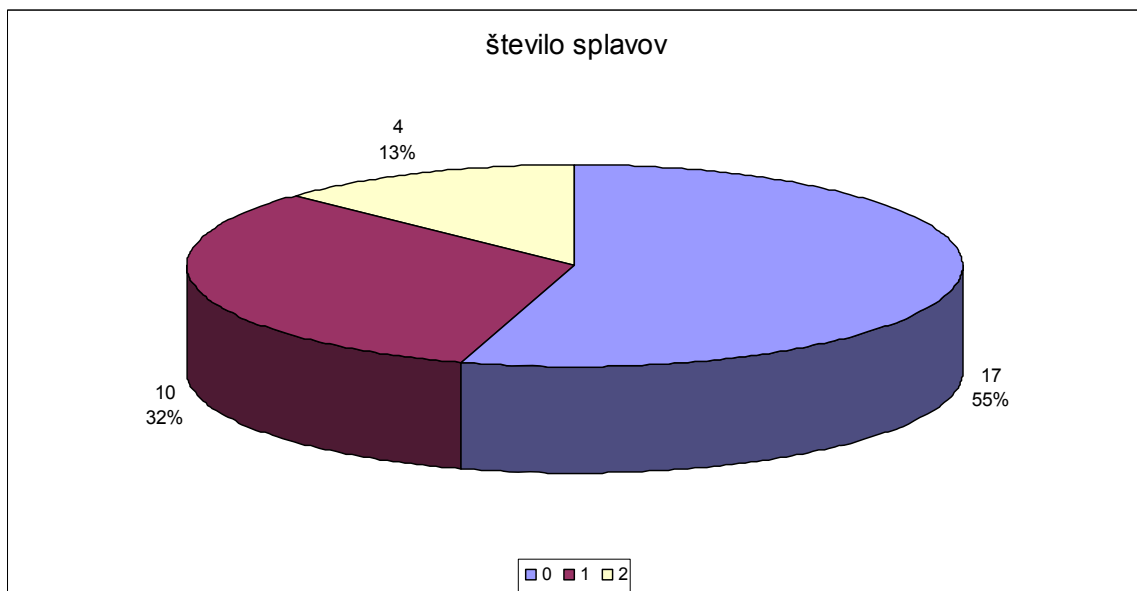
Graf 1: Razlog za amniocentezo

Starost preiskovank je bila od 28 do 41 let (starost ženske ob porodu prikazuje **graf 2**), v povprečju so bile stare $37,57 \pm 0,55$ let (aritmetična sredina \pm standardna napaka). Večina jih je bila nekadilk (94%, n=30). Njihov povprečen BMI je bil $23,86 \pm 0,75$ kg/m². Povprečna gestacijska doba je bila $275 \pm 1,6$ dni, povprečna porodna teža otroka je bila $3495,6 \pm 79,8$ g in povprečna porodna dolžina otroka $51,5 \pm 0,38$ cm. 53% (n=17) jih je rodilo fantka, 47% (n=15) pa punčko. Nobena od preiskovank v nosečnosti ni imela hipertenzije, diabetesa ali preeklampsije. Ena izmed njih je imela kronično vnetje ščitnice, ostale pa so bile zdrave. Vsi otroci so se rodili normalni in zdravi, niso imeli genetskih napak ali drugih malformacij. Podrobnosti o karakteristikah preiskovank prikazujejo **tabela 2**, **tabela 3** in **tabela 4** v poglavju Rezultati.

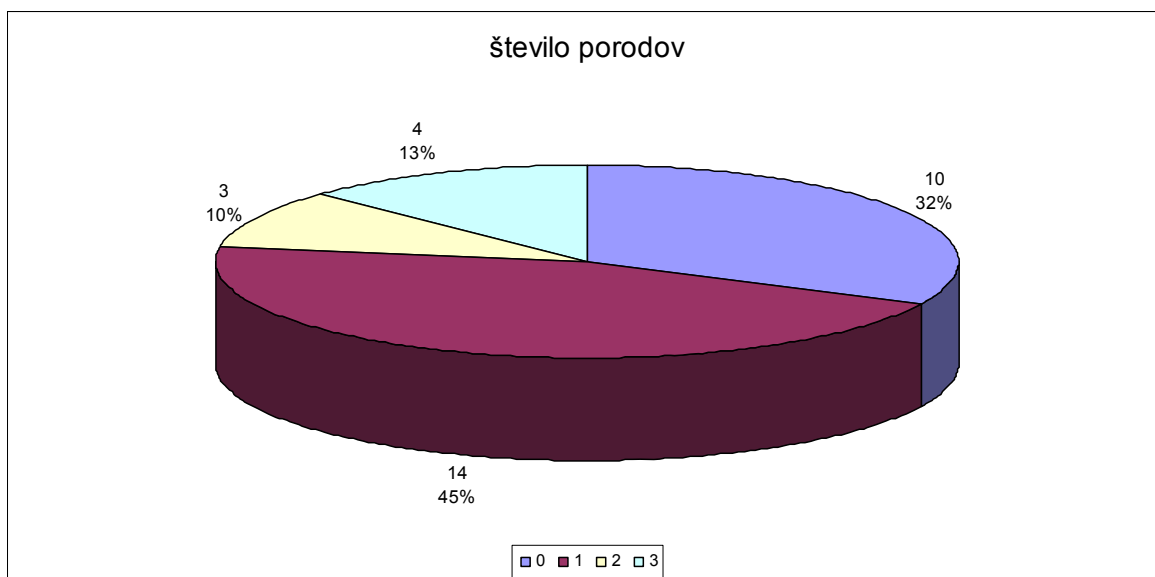


Graf 2: Starost ženske ob porodu

45% (n=14) preiskovank je predhodno že imelo splav (32% (n=10) en splav, 13% (n=4) pa dva splava), kar prikazuje **graf 3**. 32% (n=10) preiskovank ni še nikoli rodilo, 45% (n=14) jih je imelo za seboj že en porod, 10% (n=3) dva, 13% (n=4) pa tri porode (**graf 4**).

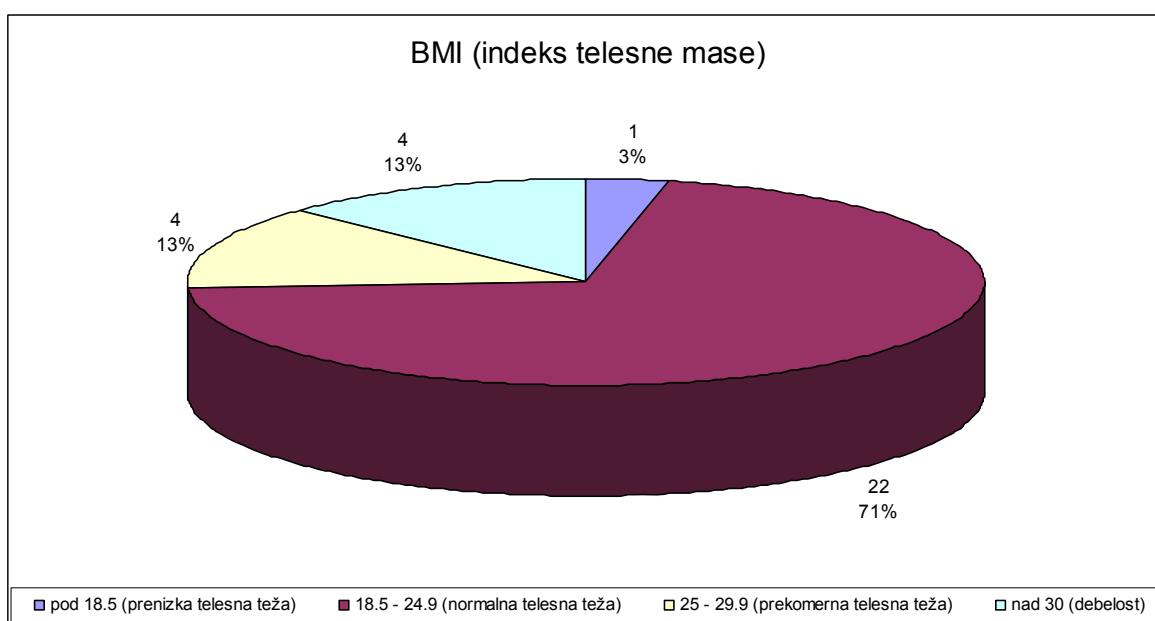


Graf 3: Število splavov, ki so jih preiskovanke doživele pred študijo



Graf 4: Število uspešnih porodov preiskovank pred študijo

71% (n=22) preiskovank je imelo normalno telesno težo (BMI = 18,5 – 24,9 kg/m²), 3% (n=1) jih je imelo prenizko težo (BMI pod 18,5 kg/m²), 26% (n=8) pa jih je imelo prekomerno telesno težo (BMI nad 25 kg/m²) (64), kar prikazuje **graf 5**.



Graf 5: Indeks telesne mase (BMI) ženske pred nosečnostjo

III.3. METODE ZA DOLOČANJE ENCIMOV

III.3.1. Opis metod

III.3.1.1. Določanje superoksid-dismutaze (SOD)

Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) smo določali spektrofotometrično z inhibicijsko metodo z avtomatskim biokemijskim analizatorjem Hitachi 917. Uporabili smo komercialno dostopni analizni komplet RANSOD («RANSOD«, Randox, Velika Britanija). Metoda temelji na reakciji ksantina in ksantin-oksidge. Produkt reakcije je superoksidni radikal, ki s spojino 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijev klorid (INT) tvori rdeč formazan (absorbanco produkta merimo pri valovni dolžini 505 nm). Aktivnost SOD merimo posredno s stopnjo inhibicije te reakcije. Aktivnost SOD v hemolizatu smo izrazili kot enote SOD na g hemoglobina (U/g Hb), v plodovnici pa kot enote SOD na liter plodovnice (U/L) (65).

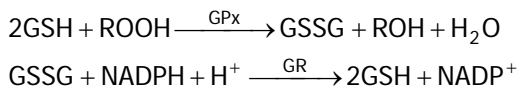
Encimski test na osnovi inhibicije: poteka po shemi spodaj navedenih reakcij. Nastajanje formazanskega barvila inhibira SOD iz vzorca. Intenziteta barvnega produkta pri 505 nm je obratno sorazmerna aktivnosti SOD v vzorcu (65).



III.3.1.2. Določanje glutation-peroksidaze (GPx)

Aktivnost glutation-peroksidaze (GPx) smo določali spektrofotometrično z avtomatskim biokemijskim analizatorjem Hitachi 917 z metodo Paglia in Valentine (60). Uporabili smo komercialno dostopni analizni komplet RANSEL («RANSEL«, Randox, Velika Britanija). GPx katalizira reakcijo oksidacije reduciranega glutationa s kumen hidroperoksidom. Meri se zmanjšanje absorbance NADPH pri 340 nm. Aktivnost GPx v hemolizatu smo izrazili kot enote GPx na g hemoglobina (U/g Hb), v plodovnici pa kot enote GPx na liter plodovnice (U/L) (61).

Encimski-UV test: poteka po shemi spodaj navedenih reakcij. Nastajanje NADP⁺ iz NADPH zaznamo kot padec absorbance pri 340 nm. Sprememba absorbance je sorazmerna aktivnosti GPx v vzorcu (61).



GSH – glutation, reducirana oblika
 GSSG – glutation, oksidirana oblika
 GR – glutation-reduktaza
 ROOH – kumen hidroperoksid

Analize obeh encimov smo izvajali na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo.

III.3.2. Uporabljeni materiali in oprema

III.3.2.1. Uporabljeni materiali/reagenti

Za določanje **superoksid-dismutaze (SOD)** smo uporabili naslednje reagente:

a) Reagenti, ki so bili vključeni v RANSOD analizni komplet:

- mešan substrat (oznaka R1a) - vsebuje ksantin (0,05 mmol/l) in 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijev klorid (INT) (0,025 mmol/l)
- pufer (oznaka R1b) – vsebuje 3-(cikloheksilamino)-1-propansulfonsko kislino (CAPS) (40 mmol/l, pH 10,2) in etilendiamintetraocetno kislino (EDTA) (0,94 mmol/l)
- ksantin-oksidaža (oznaka R2) (80 U/l)
- standard (oznaka CAL)

b) Dodatni reagenti za določanje SOD:

- redčitveni reagent (Ransod Diluent) – 0,01 mol/l fosfatni pufer, pH 7,0 (Cat. No. SD 124)
- kontrolni reagent (Ransod Control) (Cat. No. SD 126)

Za določanje **glutation-peroksidaze (GPx)** smo uporabili naslednje reagente:

a) Reagenti, ki so bili vključeni v RANSEL analizni komplet:

- reagent (oznaka R1a) – vsebuje glutation (4 mmol/l), glutation-reduktazo ($\geq 0,5$ U/l) in NADPH (0,34 mmol/l)
- pufer (oznaka R1b) – vsebuje fosfatni pufer (0,05 mol/l, pH 7,2) in EDTA (4,3 mmol/l)
- kumen hidroperoksid (oznaka R2) (0,18 mmol/l)
- redčilno sredstvo (oznaka R3)

b) Dodatni reagent za določanje GPx:

- kontrolni reagent (Ransel Control) (Cat. No. SC 692)
- bidestilirana voda
- hemoglobin reagent (Cat. No. HG 1539) – vsebuje kalijev fosfat (10,3 mmol/l), kalijev fericianid (6,08 mmol/l), kalijev cianid (7,68 mmol/l) in surfaktant (0,1% v/v)
- redčilno sredstvo za Ransel (Ransel Diluting Agent) (Cat. No. RS 2318)

III.3.2.2. Uporabljena laboratorijska oprema

- avtomatski biokemijski analizator Roche/Hitachi 917 (Roche Diagnostics, Basel, Švica) - oba encima smo določali z analizatorjem Roche/Hitachi 917. Ta analizator je selektiven, avtomatiziran kemijski sistem, namenjen za analizo bioloških vzorcev. Uporabljamo ga za določanje elektrolitov, encimov in metabolitov v serumu, deproteinizatu, hemolizatu, urinu ter punktatu (66).
- epruvete
- avtomatske pipete
- centrifuga za centrifugiranje krvi

III.3.3. Potek dela

III.3.3.1. Potek določanja superoksid-dismutaze

Priprava vzorcev:

Vzorci krvi: Vzorcem polne krvi smo dodali EDTA. 0,5 ml polne krvi smo centrifugirali 10 minut pri 3000 rpm in potem odsesali plazmo. Eritrocite smo nato štirikrat sprali s 3 ml 0,9% raztopine NaCl, po vsakem spiranju smo jih centrifugirali 10 minut pri 3000 rpm.

Spranim in centrifugiranim eritrocitom smo dodali redestilirano vodo do 2,0 ml, premešali in pustili stati 15 minut pri +4°C, da je prišlo do hemolize eritrocitov. Lizat smo razredčili z 0,01 mol/l fosfatnim pufrom (pH 7,0), da je delež inhibicije padel med 30% in 60%.

Vzorci plodovnice: Plodovnico so takoj po odvzemu centrifugirali 10 minut pri 1000 rpm in 4°C. Za analizo smo uporabili supernatant (tekočino brez celic).

Priprava reagentov:

Eno vialo mešanega reagenta R1a smo zmešali z 20 ml puфра R1b. Eno vialo ksantin-oksidge R2 smo zmešali z 10 ml redestilirane vode. Eno vialo standard CAL smo zmešali z 10 ml redestilirane vode.

Priprava standardov:

oznaka standarda	volumen standarda	redčitveni reagent
S6	nerazredčen standard	/
S5	5 ml standarda S6	5 ml
S4	5 ml standarda S5	5 ml
S3	5 ml standarda S4	5 ml
S2	5 ml standarda S3	6 ml

Analiza vzorcev:

Vzorci, standarde in reagente smo postavili na ustrezna mesta v analizatorju Hitachi 917 in pozicije označili v programu. Pri vzorcih krvi smo analizirali tudi koncentracijo hemoglobina (g Hb/ml). Analizator je izmeril absorbance pri valovni dolžini 505 nm in iz razlike absorbanc izračunal delež inhibicije ter preračunal rezultate v U/l. Pri vzorcih krvi smo te rezultate s pomočjo programa Excel pretvorili v enote U/g Hb.

III.3.3.2. Potek določanja glutation-peroksidaze

Priprava vzorcev:

Vzorci krvi: Vzorcem polne krvi smo dodali heparin. 0,05 ml heparinizirane polne krvi smo razredčili z 1 ml redčilnega sredstva R3, inkubirali za 5 minut in dodali 1 ml Hemoglobin reagenta. Dobro smo premešali vzorce.

Vzorci plodovnice: Plodovnico so takoj po odvzemu centrifugirali 10 minut pri 1000 rpm in 4°C. Za analizo smo uporabili supernatant (tekočino brez celic).

Priprava reagentov:

Eno vialo reagenta R1a smo zmešali z 10 ml pufru R1b. 10 µl kumen hidroperoksida R2 smo razredčili z 10 ml fiziološke raztopine (0,9% NaCl) in pretresli. Eno vialo redčilnega sredstva R3 smo zmešali z 200 ml redestilirane vode. Hemoglobin reagent smo razredčili z redestilirano vodo v razmerju 1:4.

Analiza vzorcev:

Vzorci, standarde in reagente smo postavili na ustrezna mesta v analizatorju Hitachi 917 in pozicije označili v programu. Pri vzorcih krvi smo analizirali tudi koncentracijo hemoglobina (g Hb/ml). Analizator je izmeril absorbance pri valovni dolžini 340 nm in iz razlike absorbanc izračunal aktivnost glutation-peroksidaze v U/l. Pri vzorcih krvi smo te rezultate s pomočjo programa Excel pretvorili v enote U/g Hb.

III.4. METODE ZA PRIDOBIVANJE PODATKOV

Podatke o nosečnicah sem pridobila s pregledovanjem njihovih zdravniških kartotek. Iz njih sem si izpisala podatke o nosečnicah in o poteku nosečnosti, ki so se mi zdeli pomembni za mojo nalogo, nato pa sem te podatke uredila v preglednice s pomočjo programa Microsoft Office Excel 2003. Iz kartotek sem si izpisala naslednje podatke:

rojstni datum nosečnice, prvi dan zadnje menstruacije, telesna teža pred nosečnostjo, telesna teža ob prvem odvzemu vzorcev, telesna višina, kadilski status, število preteklih porodov, število preteklih splavov, razlog za amniocentezo, datum prvega odvzema vzorcev, biparietalni diameter (BIP), dolžina stegenice ploda (FL), datum poroda, teža novorojenčka, dolžina novorojenčka in spol novorojenčka. V poglavju Rezultati so tej podatki razvidni v **tabeli 2**, **tabeli 3**, **tabeli 5** in **tabeli 6**.

Podatke, ki sem si jih izpisala, so pridobili in v kartoteke vpisali delno na ginekološki kliniki, delno v ljubljanski porodnišnici med junijem 2010 in februarjem 2011. Na ginekološki kliniki so nekatere podatke pridobili z izpraševanjem nosečnic (npr. ali kadijo, datum zadnje menstruacije itd.), nekatere pa z meritvami (npr. biparietalni diameter, dolžina stegenice ploda itd.). Podatke o porodu so pridobili v ljubljanski porodnišnici (datum poroda, teža in višina novorojenčka, spol novorojenčka).

Iz nekaterih podatkov sem nato izračunala določene vrednosti (v poglavju rezultati jih prikazuje **tabela 4**):

- **Indeks telesne mase** (body mass index – BMI) sem izračunala tako, da sem telesno težo preiskovanke pred nosečnostjo (v kilogramih) delila s kvadratom njene telesne višine (v metrih).
- **Gestacijsko dobo** (število dni gestacije ob porodu) sem izračunala glede na datum prvega dne zadnje menstruacije in datum poroda. S pomočjo programa Microsoft Office Excel 2003 sem od datuma poroda odštela datum prvega dne zadnje menstruacije, s tem sem dobila trajanje nosečnosti v dnevih oziroma celotno gestacijsko dobo.
- **Starost ženske** pri porodu sem prav tako izračunala s pomočjo programa Microsoft Office Excel 2003. Od datuma poroda sem odštela datum rojstva nosečnice, s tem sem dobila njihove starosti v dnevih, nato pa sem to delila s 365 in dobila njihove starosti v letih.
- **Število dni gestacije ob odvzemu prvega vzorca** sem izračunala po istem principu – v programu Microsoft Office Excel 2003 sem od datuma prvega odvzema vzorca odštela datum prvega dne zadnje menstruacije.

III.5. METODE ZA STATISTIČNO ANALIZO

Podatke sem obdelala s pomočjo programov **Microsoft Office Excel 2003** in **SPSS** (Statistical Package for the Social Sciences). Izračunala sem povprečne vrednosti in standardne napake ter podatke statistično obdelala. Za statistično obdelavo sem uporabila naslednje teste: t-test za neodvisne vzorce (Independent Samples t-test), test ANOVA, Tukey-ev test za primerjavo parov, Pearsonov koeficient korelacije r , determinacijski koeficient r^2 in Spearmanov koeficient korelacije r_s . Statistično značilnost sem ugotavljala na ravni 5% tveganja, sem pa omenila tudi nekaj povezav, ki se približujejo statistični značilnosti. S pomočjo programa Microsoft Office Excel 2003 sem nekatere podatke tudi predstavila s pomočjo tortnih, razsevnih in stolpičnih grafikonov.

IV. REZULTATI

IV.1. REZULTATI ANALIZ ENCIMOV

Aktivnosti superoksid-dismutaze smo izmerili v plodovnici v območju od 0,40 do 2,52 U/L (povprečna vrednost 0,835 U/L), v krvi pa od 1033 do 1682 U/g Hb (povprečna vrednost 1342 U/g Hb), aktivnosti glutacion-peroksidaze pa v plodovnici v območju od 144,1 do 557,7 U/L (povprečna vrednost 332,58 U/L) in v krvi od 29,7 do 68,7 U/g Hb (povprečna vrednost 50,34 U/g Hb), kar prikazuje **tabela 1**.

Tabela 1: Aktivnosti superoksid-dismutaze in glutacion-peroksidaze v krvi in plodovnici

OZNAKA vzorca	aktivnost superoksid-dismutaze v plodovnici (U/L)	aktivnost superoksid-dismutaze v krvi (U/g Hb)	aktivnost glutacion-peroksidaze v plodovnici (U/L)	aktivnost glutacion-peroksidaze v krvi (U/g Hb)
1-SL-24-11-1970	0,61	1091	212,3	56,6
2-VM-4-4-1972	0,78	1567	310,2	59,9
3-RJ-22-3-1973	1,03	1236	350,9	43,1
5-TKA-18-9-1970	0,58	1577	517	59,2
6-ST-3-2-1971	0,79	1682	486,2	44,5
7-ŠM-4-4-1975	1,6	1310	225,5	41,3
8-DT-14-4-1975	0,57	1033	154	51,4
9-BN-26-3-1971	0,95	1132	328,9	53,6
10-HB-20-10-1973	1,99	1491	400,4	41,2
11-SA-23-6-1970	0,64	1415	154	44,3
12-ČŠ-13-5-1975	0,67		297	
13-SM-29-11-1971	0,68	1406	144,1	58,1
14-GA-12-3-1981	0,73	1618	275	50,5
15-VVT-24-9-1973	0,67	1176	471,9	56,9
16-ŠN-19-6-1982	0,41	1282	243,1	42,2
17-SM-23-2-1973	0,76	1357	193,6	60,9
18-KAV-3-7-1973	0,84	1123	476,3	61,6
19-ŽD-21-12-1972	0,55	1199	292,6	60,7
20-USB-19-2-1972	2,52	1197	315,7	49,4
21-RM-30-1-1972	0,75		283,8	
24-ŠB-15-3-1969	0,66	1192	234,3	37,1
26-ST-2-1-1982	0,9	1168	350,9	47,8
27-VM-28-10-1973	0,4	1632	369,6	54,9
28-PPA-9-12-1972	0,64	1339	369,6	50
29-SN-28-4-1973	0,61	1261	369,6	48,4
30-CU-29-9-1973	0,79	1480	557,7	50,8
31-AHM-25-1-1971	0,6	1182	517	39,4
32-JS-11-8-1972	0,79	1471	359,7	29,7
33-KD-19-3-1973	0,73	1609	266,2	55,1
34-FV-20-3-1972	0,97	1295	413,6	33
35-NP-1-6-1973	0,71	1465	234,3	68,7
36-SM-5-2-1970	0,8	1274	467,5	59,9

IV.2. PODATKI, IZPISANI IZ KARTOTEK NOSEČNIC

Iz zdravniških kartotek nosečnic sem pridobila podatke o nosečnicah in nato z njihovo pomočjo izračunala določene vrednosti. Število dosedanjih porodov pri preiskovankah je bilo od 0 do 3 (v povprečju 1,03), število dosedanjih splavov pa od 0 do 2 (v povprečju 0,58). 94% preiskovank je bilo nekadilk, 6% pa kadilk. **Tabela 2** in **tabela 3** prikazujeta osnovne podatke o nosečnicah, ki sem jih izpisala iz njihovih zdravniških kartotek.

Tabela 2: Osnovni podatki o nosečnicah

OZNAKA vzorca	rojstni datum nosečnice	prvi dan zadnje menstruacije	teža pred nosečnostjo (kg)	teža ob 1. odvzemu (kg)	Višina (cm)	kajenje
1-SL-24-11-1970	24.11.1970	23.2.2010	61	65	173	ne
2-VM-4-4-1972	4.4.1972	20.2.2010	83	85	158	ne
3-RJ-22-3-1973	22.3.1973	14.2.2010	68	71	165	ne
5-TKA-18-9-1970	18.9.1970	26.2.2010	66	?	164	ne
6-ST-3-2-1971	3.2.1971	8.3.2010	62	64	169	ne
7-ŠM-4-4-1975	4.4.1975	1.3.2010	60	63,3	178	ne
8-DT-14-4-1975	14.4.1975	4.3.2010	60	64,5	164	da
9-BN-26-3-1971	26.3.1971	10.3.2010	68,5	?	175	ne
10-HB-20-10-1973	20.10.1973	11.3.2010	90,5	92,5	178	ne
11-SA-23-6-1970	23.6.1970	13.3.2010	82	84	164	ne
12-ČŠ-13-5-1975	13.5.1975	6.3.2010	61	65	171	da
13-SM-29-11-1971	29.11.1971	15.3.2010	64	66	167	ne
14-GA-12-3-1981	12.3.1981	13.3.2010	83	83	176	ne
15-VVT-24-9-1973	24.9.1973	22.3.2010	52	55	170	ne
16-ŠN-19-6-1982	19.6.1982	21.3.2010	88	89	165	ne
17-SM-23-2-1973	23.2.1973	16.3.2010	75	78	176	ne
18-KAV-3-7-1973	3.7.1973	16.4.2010	72	73,5	178	ne
19-ŽD-21-12-1972	21.12.1972	17.4.2010	51	53	160	ne
20-USB-19-2-1972	19.2.1972	14.4.2010	57	59	170	ne
21-RM-30-1-1972	30.1.1972	19.4.2010	55	60	171	ne
24-ŠB-15-3-1969	15.3.1969	24.4.2010	65	66	174	ne
26-ST-2-1-1982	2.1.1982	26.4.2010	66	70,5	173	ne
27-VM-28-10-1973	28.10.1973	25.4.2010	64	/	162	ne
28-PPA-9-12-1972	9.12.1972	30.4.2010	/	/	160	ne
29-SN-28-4-1973	28.4.1973	7.4.2010	55,5	61,5	163	ne
30-CU-29-9-1973	29.9.1973	2.5.2010	52	53,5	163	ne
31-AHM-25-1-1971	25.1.1971	5.5.2010	86	91	165	ne
32-JS-11-8-1972	11.8.1972	2.5.2010	57	59	160	ne
33-KD-19-3-1973	19.3.1973	7.5.2010	79	81	172	ne
34-FV-20-3-1972	20.3.1972	6.5.2010	68	72	170	ne
35-NP-1-6-1973	1.6.1973	4.5.2010	68	72	168	ne
36-SM-5-2-1970	2.5.1970	6.5.2010	71	73	156	ne

Iz podatkov, ki sem jih pridobila v kartotekah nosečnic, sem nato izračunala določene vrednosti: gestacijska doba (število dni gestacije ob porodu) je znašala od 256 do 288 dni (povprečna vrednost je bila 275 dni), starost preiskovank ob porodu pa je bila od 28 do 41 let (povprečna starost 37,57 let). Preiskovanke so imele BMI od 17,99 do 33,25 kg/m² (povprečna vrednost je bila 23,86 kg/m²). Izračunane vrednosti prikazuje **tabela 4**.

Tabela 3: Dosedanji porodi in splavi, zapleti v nosečnosti in kronične bolezni

OZNAKA vzorca	število dosedanjih porodov	število dosedanjih splavov	število dosedanjih nosečnosti	zapleti v nosečnosti in kronične bolezni
1-SL-24-11-1970	?	?	5	/
2-VM-4-4-1972	1	0	2	/
3-RJ-22-3-1973	1	0	2	/
5-TKA-18-9-1970	1	1	3	/
6-ST-3-2-1971	1	1	3	/
7-ŠM-4-4-1975	1	2	4	/
8-DT-14-4-1975	0	0	1	/
9-BN-26-3-1971	3	0	4	/
10-HB-20-10-1973	0	0	1	/
11-SA-23-6-1970	3	0	4	/
12-ČŠ-13-5-1975	0	0	1	/
13-SM-29-11-1971	1	0	2	/
14-GA-12-3-1981	1	1	3	/
15-VVT-24-9-1973	2	2	5	/
16-ŠN-19-6-1982	1	1	3	/
17-SM-23-2-1973	1	1	3	/
18-KAV-3-7-1973	2	0	3	/
19-ŽD-21-12-1972	0	1	2	/
20-USB-19-2-1972	1	1	3	/
21-RM-30-1-1972	1	2	4	/
24-ŠB-15-3-1969	0	0	1	/
26-ST-2-1-1982	0	0	1	/
27-VM-28-10-1973	0	0	1	/
28-PPA-9-12-1972	1	1	3	/
29-SN-28-4-1973	0	2	3	/
30-CU-29-9-1973	1	0	2	/
31-AHM-25-1-1971	0	0	1	/
32-JS-11-8-1972	0	0	1	kronično vnetje ščitnice
33-KD-19-3-1973	2	0	3	/
34-FV-20-3-1972	3	1	5	/
35-NP-1-6-1973	1	0	2	/
36-SM-5-2-1970	3	1	5	/

Tabela 4: Podatki o indeksu telesne mase, gestacijski dobi in starosti ženske ob porodu

OZNAKA vzorca	indeks telesne mase (kg/m ²)	dnevi gestacije pri 1.odvzemu vzorca	št. dni gestacije ob porodu	starost ženske pri porodu (v letih)
1-SL-24-11-1970	20,38	111	267	40
2-VM-4-4-1972	33,25	114	284	38
3-RJ-22-3-1973	24,98	120	285	37
5-TKA-18-9-1970	24,54	112	287	40
6-ST-3-2-1971	21,71	113	256	39
7-ŠM-4-4-1975	18,94	113	280	35
8-DT-14-4-1975	22,31	118	273	35
9-BN-26-3-1971	22,37	113	282	39
10-HB-20-10-1973	28,56	116	260	37
11-SA-23-6-1970	30,49	115	259	40
12-ČŠ-13-5-1975	20,86	123	270	35
13-SM-29-11-1971	22,95	119	276	39
14-GA-12-3-1981	26,8	122	286	29
15-VVT-24-9-1973	17,99	112	267	37
16-ŠN-19-6-1982	32,32	119	278	28
17-SM-23-2-1973	24,21	125	274	37
18-KAV-3-7-1973	22,72	117	284	37
19-ŽD-21-12-1972	19,92	118	267	38
20-USB-19-2-1972	19,72	121	284	38
21-RM-30-1-1972	18,81	119	279	39
24-ŠB-15-3-1969	21,47	115	269	41
26-ST-2-1-1982	22,05	114	279	29
27-VM-28-10-1973	24,39	117	279	37
28-PPA-9-12-1972		112	274	38
29-SN-28-4-1973	20,89	135	282	37
30-CU-29-9-1973	19,57	116	276	37
31-AHM-25-1-1971	31,59	113	288	40
32-JS-11-8-1972	22,27	117	287	38
33-KD-19-3-1973	26,7	112	261	37
34-FV-20-3-1972	23,53	130	267	38
35-NP-1-6-1973	24,09	118	270	37
36-SM-5-2-1970	29,17	117	284	40

Za oceno rasti ploda z **ultrazvokom** sta bila določena parametra BIP (biparietal diameter) in FL (femur length). **BIP** je razdalja med eno in drugo senčno kostjo ploda (prečni presek čez glavico) (67). Pri naših preiskovankah je BIP znašal od 31,7 do 45mm (povprečna vrednost je bila 36,93mm). **FL** pa je dolžina stegenice ploda in je pri naših preiskovankah znašala od 15,7 do 30,6mm (povprečna vrednost je bila 21,72mm). Te parametre prikazuje **tabela 5**, ki poleg tega prikazuje tudi datum odvzema vzorcev in razlog za amniocentezo.

Tabela 5: Podatki o odvzemu vzorcev in o parametrih določenih z ultrazvokom

OZNAKA vzorca	razlog za amniocentezo	datum 1. odvzema vzorca	biparietalni diameter (BIP)	dolžina stegenice ploda (FL)
1-SL-24-11-1970	starost + genetska indikacija	14.6.2010	35	20
2-VM-4-4-1972	starost	14.6.2010	33	17
3-RJ-22-3-1973	starost + pov.tveg. DS	14.6.2010	38	22
5-TKA-18-9-1970	starost	18.6.2010	32	19,5
6-ST-3-2-1971	starost	29.6.2010	41	24
7-ŠM-4-4-1975	pov.tveg.DS	29.6.2010	35	20
8-DT-14-4-1975	pov.tveg.DS	30.6.2010	37	22
9-BN-26-3-1971	starost	1.7.2010	33	20
10-HB-20-10-1973	starost	5.7.2010	36	22
11-SA-23-6-1970	starost	6.7.2010	39	22
12-ČŠ-13-5-1975	lastna želja	7.7.2010	39	25
13-SM-29-11-1971	starost	13.7.2010	42	26
14-GA-12-3-1981	pov.tveg.DS	13.7.2010	37	20
15-VVT-24-9-1973	starost	14.7.2010	34	22
16-ŠN-19-6-1982	genetska indikacija	14.7.2010	34	22
17-SM-23-2-1973	starost	19.7.2010	38	23
18-KAV-3-7-1973	starost	11.8.2010	37	21
19-ŽD-21-12-1972	starost	13.8.2010	35	24
20-USB-19-2-1972	starost + pov.tveg. DS	13.8.2010	39,3	24,1
21-RM-30-1-1972	starost	16.8.2010	36	24
24-ŠB-15-3-1969	starost	17.8.2010	35	21
26-ST-2-1-1982	pov.tveg.DS	18.8.2010	35	21
27-VM-28-10-1973	starost	19.8.2010	40	21
28-PPA-9-12-1972	starost	20.8.2010	32	15,7
29-SN-28-4-1973	starost	20.8.2010	43,4	30,6
30-CU-29-9-1973	starost	26.8.2010	37	21
31-AHM-25-1-1971	starost	26.8.2010	36	19
32-JS-11-8-1972	starost + pov.tveg. DS	27.8.2010	37,5	22,4
33-KD-19-3-1973	starost	27.8.2010	31,7	19,6
34-FV-20-3-1972	starost	30.8.2010	45	26
35-NP-1-6-1973	starost	30.8.2010	39	20
36-SM-5-2-1970	starost	30.8.2010	40	18

Legenda: pov. tveg. DS = povečano tveganje za Downov sindrom (na povečano tveganje nakazuje povečana vrednost nuhalne svetline in/ali hormonskih testov)

Težo in dolžino otroka so odčitali pri porodu, teža je bila od 2730 do 4590g (v povprečju 3495,6g), dolžina pa od 47 do 57cm (v povprečju 51,5cm) (**tabela 6**).

Tabela 6: Podatki o porodu

OZNAKA vzorca	datum poroda	teža novorojenčka (g)	dolžina novorojenčka (cm)	spol novorojenčka
1-SL-24-11-1970	17.11.2010	3440	52	moški
2-VM-4-4-1972	1.12.2010	3410	52	moški
3-RJ-22-3-1973	26.11.2010	3360	50	ženski
5-TKA-18-9-1970	10.12.2010	3420	53	moški
6-ST-3-2-1971	19.11.2010	3310	50	ženski
7-ŠM-4-4-1975	6.12.2010	3420	54	moški
8-DT-14-4-1975	2.12.2010	3310	53	moški
9-BN-26-3-1971	17.12.2010	3320	51	ženski
10-HB-20-10-1973	26.11.2010	2730	47	ženski
11-SA-23-6-1970	27.11.2010	4200	52	moški
12-ČŠ-13-5-1975	1.12.2010	2980	50	moški
13-SM-29-11-1971	16.12.2010	3140	50	ženski
14-GA-12-3-1981	24.12.2010	3490	50	moški
15-VVT-24-9-1973	14.12.2010	3260	52	ženski
16-ŠN-19-6-1982	24.12.2010	4590	54	moški
17-SM-23-2-1973	15.12.2010	3060	51	ženski
18-KAV-3-7-1973	25.1.2011	3370	53	ženski
19-ŽD-21-12-1972	9.1.2011	3050	48	moški
20-USB-19-2-1972	23.1.2011	3950	52	ženski
21-RM-30-1-1972	23.1.2011	3720	54	moški
24-ŠB-15-3-1969	18.1.2011	3370	50	moški
26-ST-2-1-1982	30.1.2011	3370	52	moški
27-VM-28-10-1973	29.1.2011	3940	52	moški
28-PPA-9-12-1972	29.1.2011	3650	51	moški
29-SN-28-4-1973	14.1.2011	3230	51	ženski
30-CU-29-9-1973	2.2.2011	4350	57	moški
31-AHM-25-1-1971	17.2.2011	4200	55	ženski
32-JS-11-8-1972	13.2.2011	4190	52	ženski
33-KD-19-3-1973	23.1.2011	2860	49	ženski
34-FV-20-3-1972	28.1.2011	3670	53	moški
35-NP-1-6-1973	29.1.2011	2930	47	ženski
36-SM-5-2-1970	14.2.2011	3570	52	ženski

IV.3. REZULTATI STATISTIČNIH ANALIZ

IV.3.1. Korelacija med encimi

Korelacija med antioksidantnima encimoma superoksid-dismutazo (SOD) in glutation-peroksidazo (GPx) je bila v tej študiji neznačilna pri 5% tveganju. Koeficient korelacije med obema encimoma v plodovnici je $r = 0,044$ ($p = 0,809$, $n = 32$), koeficient korelacije med obema encimoma v krvi pa je $r = 0,040$ ($p = 0,835$, $n = 30$). Koeficient korelacije med

SOD v plodovnici in GPx v krvi je $r = -0,22$ ($p = 0,236$, $n = 30$), med GPx v plodovnici in SOD v krvi pa $r = 0,14$ ($p = 0,467$, $n = 30$).

Tudi korelacija med posameznim encimom v plodovnici in krvi ni bila značilna: koeficient korelacije med SOD v plodovnici in SOD v krvi je $r = -0,071$ ($p = 0,711$, $n = 30$), koeficient korelacije med GPx v plodovnici in GPx v krvi pa je $r = -0,081$ ($p = 0,669$, $n = 30$).

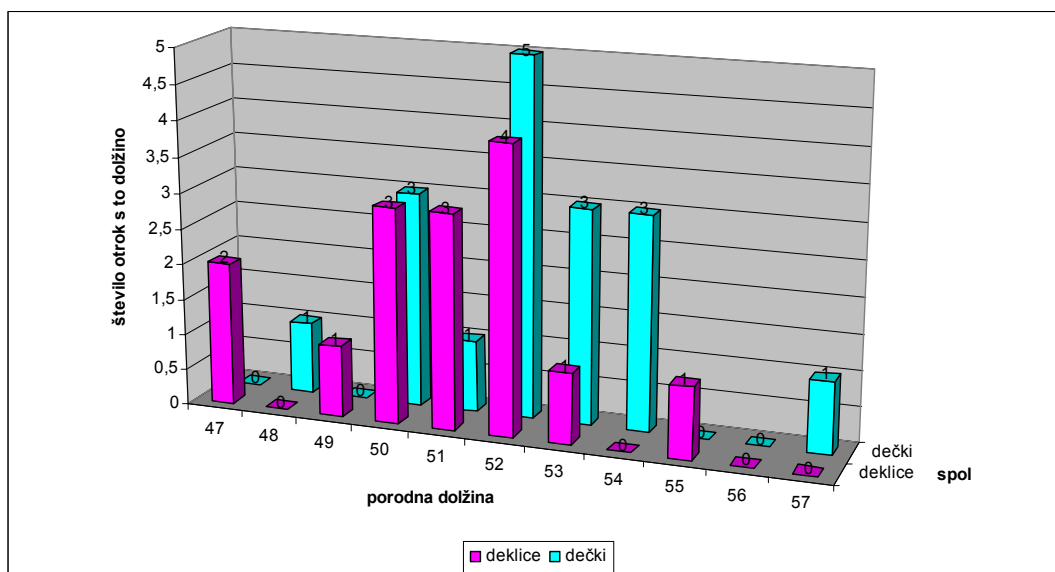
IV.3.2. Povezave med spolom otroka in ostalimi parametri

V **tabeli 7** so predstavljeni rezultati povezav med spolom otroka in nekaterimi drugimi parametri v nosečnosti.

Tabela 7: Rezultati povezav med spolom otroka in ostalimi parametri

Spol otroka	t-test za neodvisna vzorca	Pearsonov koeficient korelacije	moč povezave	značilna povezava? (pri 5% tveganju)
dolžina gestacijske dobe	$p = 0,748$ ($n = 32$)	$r = 0,059$	$r^2 = 0,003$	NE
porodna teža otroka	$p = 0,127$ ($n = 32$)	$r = 0,275$	$r^2 = 0,076$	NE
porodna dolžina otroka	$p = 0,073$, $n = 32$	$r = 0,322$	$r^2 = 0,103$	bliža statistični značilnosti
aktivnost SOD v plodovnici	$p = 0,113$ ($n = 32$)	$r = 0,286$	$r^2 = 0,082$	NE
aktivnost GPx v plodovnici	$p = 0,227$ ($n = 32$)	$r = 0,220$	$r^2 = 0,048$	NE
aktivnost SOD v krvi	$p = 0,894$ ($n = 30$)	$r = 0,025$	$r^2 = 0,0006$	NE
aktivnost GPx v krvi	$p = 0,556$ ($n = 30$)	$r = 0,112$	$r^2 = 0,013$	NE

Večina povezav je statistično neznačilnih, se pa povezava med **spolom otroka** in njegovo **porodno dolžino** bliža statistični značilnosti. Porodna dolžina dečkov je pri 7,3% tveganju značilno večja od porodne dolžine deklic. To se vidi tudi na **grafu 6**.



Graf 6: Povezava med spolom otroka in porodno dolžino otroka

IV.3.3. Povezave med indeksom telesne mase ženske in ostalimi parametri

V **tabeli 8** so predstavljeni rezultati povezav med indeksom telesne mase ženske in nekaterimi drugimi parametri v nosečnosti.

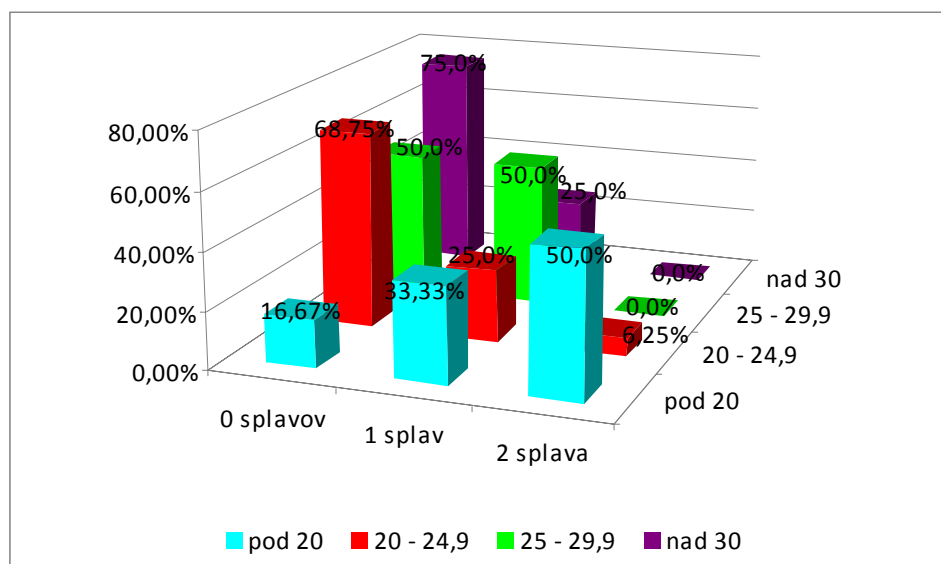
Tabela 8: Rezultati povezav med indeksom telesne mase ženske in ostalimi parametri

Indeks telesne mase ženske	enosmerna ANOVA	Pearsonov koeficient korelacije	Spearmanov koeficient korelacije	moč povezave	značilna povezava? (pri 5% tveganju)
število splavov	p = 0,041, n = 30	/	/	/	DA
dolžina gestacijske dobe	/	r = 0,105, p = 0,574, n = 31	r _s = 0,199, p = 0,282, n = 31	r ² = 0,011	NE
porodna teža otroka	/	r = 0,235, p = 0,204, n = 31	r _s = 0,113, p = 0,546, n = 31	r ² = 0,055	NE
porodna dolžina otroka	/	r = -0,030, p = 0,874, n = 31	r _s = -0,091, p = 0,625, n = 31	r ² = 0,0009	NE
aktivnost SOD v plodovnici	/	r = -0,148, p = 0,428, n = 31	r _s = -0,104, p = 0,579, n = 31	r ² = 0,022	NE
aktivnost GPx v plodovnici	/	r = -0,016, p = 0,932, n = 31	r _s = -0,005, p = 0,979, n = 31	r ² = 0,0003	NE
aktivnost SOD v krvi	/	r = 0,303, p = 0,110, n = 29	r _s = 0,361, p = 0,054, n = 29	r ² = 0,092	bliža statistični značilnosti
aktivnost GPx v krvi	/	r = -0,056, p = 0,774, n = 29	r _s = 0,005, p = 0,978, n = 29	r ² = 0,003	NE

Izkazalo se je, da je povezava med **indeksom telesne mase (BMI) matere** in **število splavov** statistično značilna. Pri testu enosmerna ANOVA (one-way ANOVA) se je pri 5% tveganju pokazala značilna razlika med skupinami z različnim številom splavov glede na indeks telesne mase (p = 0,041, n = 30). Da bi ugotovila, med katerimi skupinami so razlike, sem izvedla Tukey-ev post-hoc test, ki je razkril, da je bil pri 5% tveganju indeks telesne mase značilno nižji v skupini z 2 splavoma ($19,16 \pm 1,23 \text{ kg/m}^2$), v primerjavi s skupino z 0 splavi ($24,74 \pm 4,00 \text{ kg/m}^2$, p = 0,038). Pokazal se je tudi trend, da je pri 6,3% tveganju indeks telesne mase značilno nižji v skupini z 2 splavoma, v primerjavi s skupino z 1 splavom ($24,66 \pm 4,19 \text{ kg/m}^2$, p = 0,063). Med skupino z 0 splavi in z 1 splavom pa ni bilo statistično značilnih razlik (p = 0,998).

Rezultati torej kažejo na to, da se pri nižjem indeksu telesne mase pojavlja več splavov. To je razvidno tudi iz grafa – vse preiskovanke, ki so imele že več splavov, imajo dokaj nizko vrednost BMI (**graf 7**). Kar 50% (n = 3) preiskovank z BMI pod 20 kg/m^2 je imelo že 2 splava, v skupini z BMI $20\text{-}24,9 \text{ kg/m}^2$ jih je 2 splava imelo le 6,25% (n = 1), med

preiskovankami z BMI nad 25 kg/m² pa nobena ni imela dveh splavov. Med preiskovankami z BMI, nižjim od 20 kg/m² jih le 16,67% (n = 1) še ni imelo nobenega splava, medtem ko jih je bilo v skupini z BMI 20-24,9kg/m² brez splavov kar 68,75% (n = 11), v skupini z BMI 25-29,9 kg/m² jih je bilo brez splavov 50% (n = 2) in v skupini z BMI nad 30 kg/m² pa kar 75% (n = 3).



Graf 7: Povezava med indeksom telesne mase in številom splavov

Povezava med indeksom telesne mase matere in aktivnostjo superoksid-dismutaze v krvi se je sicer izkazala za neznačilno pri 5% tveganju, je pa treba omeniti, da se glede na Spearmanov koeficient korelacije povezava približuje statistični značilnosti. S 5,4% tveganjem lahko trdimo, da sta indeks telesne mase in aktivnost superoksid-dismutaze v krvi povezana.

IV.3.4. Povezave med aktivnostjo superoksid-dismutaze (SOD) v plodovnici in ostalimi parametri

V **tabeli 9** so predstavljeni rezultati povezav med aktivnostjo SOD v plodovnici in nekaterimi drugimi parametri v nosečnosti.

Tabela 9: Rezultati povezav med aktivnostjo SOD v plodovnici in ostalimi parametri

Aktivnost SOD v plodovnici	ANOVA	Pearsonov koeficient korelacije	Spearmanov koeficient korelacije	moč povezave	značilna povezava? (pri 5% tveganju)
biparietalni diameter (BIP)	/	$r = 0,079$, $p = 0,667$, $n = 32$	$r_s = 0,162$, $p = 0,377$, $n = 32$	$r^2 = 0,006$	NE
dolžina stegenice ploda (FL)	/	$r = 0,080$, $p = 0,665$, $n = 32$	$r_s = 0,069$, $p = 0,707$, $n = 32$	$r^2 = 0,006$	NE
število splavov	$p = 0,889$, $n = 31$	/	/	/	NE
dolžina gestacijske dobe	/	$r = 0,033$, $p = 0,857$, $n = 32$	$r_s = 0,138$, $p = 0,452$, $n = 32$	$r^2 = 0,0011$	NE
porodna teža otroka	/	$r = -0,105$, $p = 0,566$, $n = 32$	$r_s = -0,069$, $p = 0,708$, $n = 32$	$r^2 = 0,011$	NE
porodna dolžina otroka	/	$r = -0,110$, $p = 0,548$, $n = 32$	$r_s = -0,051$, $p = 0,782$, $n = 32$	$r^2 = 0,012$	NE

IV.3.5. Povezave med aktivnostjo superoksid-dismutaze (SOD) v krvi in ostalimi parametri

V tabeli 10 so predstavljeni rezultati povezav med aktivnostjo SOD v krvi in nekaterimi drugimi parametri v nosečnosti.

Tabela 10: Rezultati povezav med aktivnostjo SOD v krvi in ostalimi parametri

Aktivnost SOD v krvi	ANOVA	Pearsonov koeficient korelacije	Spearmanov koeficient korelacije	moč povezave	značilna povezava? (pri 5% tveganju)
biparietalni diameter (BIP)	/	$r = 0,058$, $p = 0,760$, $n = 30$	$r_s = 0,128$, $p = 0,502$, $n = 30$	$r^2 = 0,0034$	NE
dolžina stegenice ploda (FL)	/	$r = -0,115$, $p = 0,544$, $n = 30$	$r_s = -0,080$, $p = 0,674$, $n = 30$	$r^2 = 0,013$	NE
število splavov	$p = 0,546$, $n = 29$	/	/	/	NE
dolžina gestacijske dobe	/	$r = -0,145$, $p = 0,443$, $n = 30$	$r_s = -0,070$, $p = 0,712$, $n = 30$	$r^2 = 0,021$	NE
porodna teža otroka	/	$r = -0,015$, $p = 0,936$, $n = 30$	$r_s = 0,023$, $p = 0,904$, $n = 30$	$r^2 = 0,0002$	NE
porodna dolžina otroka	/	$r = -0,215$, $p = 0,254$, $n = 30$	$r_s = -0,256$, $p = 0,172$, $n = 30$	$r^2 = 0,046$	NE

IV.3.6. Povezave med aktivnostjo glutacion-peroksidaze (GPx) v plodovnici in ostalimi parametri

V **tabeli 11** so predstavljeni rezultati povezav med aktivnostjo GPx v plodovnici in nekaterimi drugimi parametri v nosečnosti.

Tabela 11: Rezultati povezav med aktivnostjo GPx v plodovnici in ostalimi parametri

Aktivnost GPx v plodovnici	ANOVA	Pearsonov koeficient korelacije	Spearmanov koeficient korelacije	moč povezave	značilna povezava? (pri 5% tveganju)
biparietalni diameter (BIP)	/	$r = 0,0006$, $p = 0,997$, $n = 32$	$r_s = 0,027$, $p = 0,883$, $n = 32$	$r^2 = 4 \cdot 10^{-7}$	NE
dolžina stegenice ploda (FL)	/	$r = -0,130$, $p = 0,479$, $n = 32$	$r_s = -0,140$, $p = 0,446$, $n = 32$	$r^2 = 0,017$	NE
število splavov	$p = 0,772$, $n = 31$	/	/	/	NE
dolžina gestacijske dobe	/	$r = 0,225$, $p = 0,216$, $n = 32$	$r_s = 0,276$, $p = 0,127$, $n = 32$	$r^2 = 0,050$	NE
porodna teža otroka	/	$r = 0,194$, $p = 0,287$, $n = 32$	$r_s = 0,208$, $p = 0,253$, $n = 32$	$r^2 = 0,038$	NE
porodna dolžina otroka	/	$r = 0,315$, $p = 0,079$, $n = 32$	$r_s = 0,249$, $p = 0,169$, $n = 32$	$r^2 = 0,099$	<i>bliža statistični značilnosti</i>

Povezava med **aktivnostjo GPx v plodovnici** in **porodno dolžino otroka** se je sicer izkazala za neznačilno, se pa povezava približuje statistični značilnosti, na kar nakazuje Pearsonov koeficient korelacije. Pri 7,9% tveganju je povezava med aktivnostjo GPx v plodovnici in porodno dolžino otroka statistično značilna in nakazuje, da imajo otroci večjo porodno dolžino pri visokih vrednostih GPx v plodovnici. Ta trend se pozna predvsem pri aktivnostih GPx v plodovnici nad 500 U/l, ker imajo tisti otroci najvišje porodne dolžine.

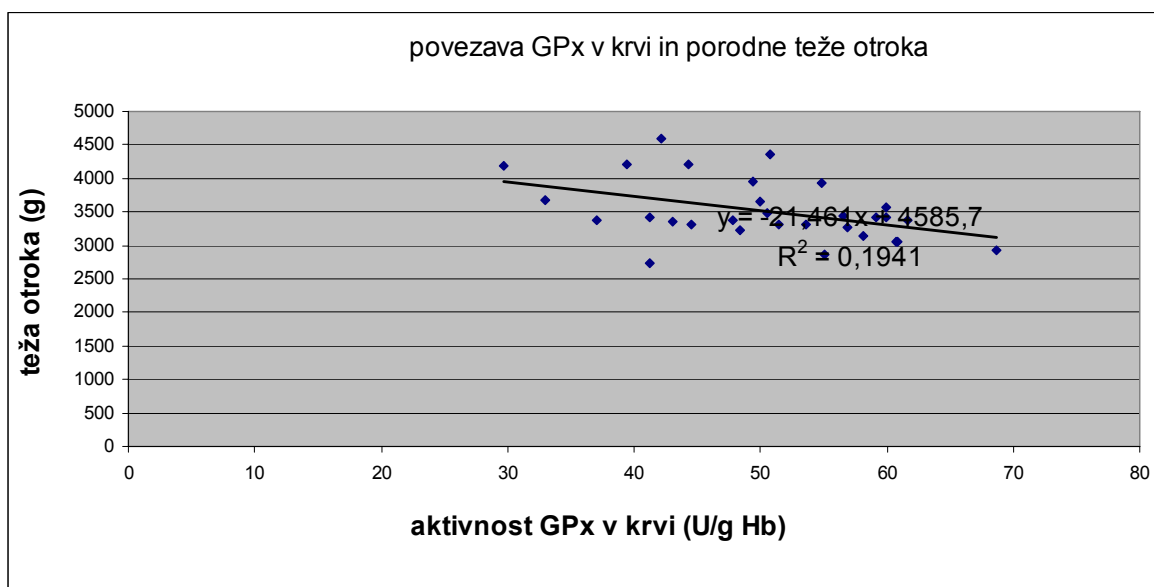
IV.3.7. Povezave med aktivnostjo glutacion-peroksidaze (GPx) v krvi in ostalimi parametri

V **tabeli 12** so predstavljeni rezultati povezav med aktivnostjo GPx v krvi in nekaterimi drugimi parametri v nosečnosti.

Tabela 12: Rezultati povezav med GPx v krvi in ostalimi parametri

Aktivnost GPx v krvi	ANOVA	Pearsonov koeficient korelacije	Spearmanov koeficient korelacije	moč povezave	značilna povezava? (pri 5% tveganju)
biparietalni diameter (BIP)	/	$r = -0,171$, $p = 0,367$, $n = 30$	$r_s = -0,104$, $p = 0,584$, $n = 30$	$r^2 = 0,029$	NE
dolžina stegenice ploda (FL)	/	$r = -0,217$, $p = 0,250$, $n = 30$	$r_s = -0,233$, $p = 0,214$, $n = 30$	$r^2 = 0,047$	NE
število splavov	$p = 0,926$, $n = 29$	/	/	/	NE
dolžina gestacijske dobe	/	$r = 0,029$, $p = 0,879$, $n = 30$	$r_s = -0,007$, $p = 0,972$, $n = 30$	$r^2 = 0,0008$	NE
porodna teža otroka	/	$r = -0,441$, $p = 0,015$, $n = 30$	$r_s = -0,407$, $p = 0,026$, $n = 30$	$r^2 = 0,194$	DA
porodna dolžina otroka	/	$r = -0,233$, $p = 0,215$, $n = 30$	$r_s = -0,177$, $p = 0,351$, $n = 30$	$r^2 = 0,054$	NE

Povezava med aktivnostjo GPx v krvi in porodno težo otroka se je izkazala za statistično značilno pri 5% tveganju, računano tako s Pearsonovim koeficientom korelacije kot tudi s Spearmanovim koeficientom korelacije. Povezava kaže, da se pri višjih vrednostih GPx v krvi pojavljajo nižje porodne teže otroka, kar je razvidno tudi iz grafa (graf 8).



Graf 8: Povezava med aktivnostjo glutation-peroksidaze v krvi in porodno težo otroka

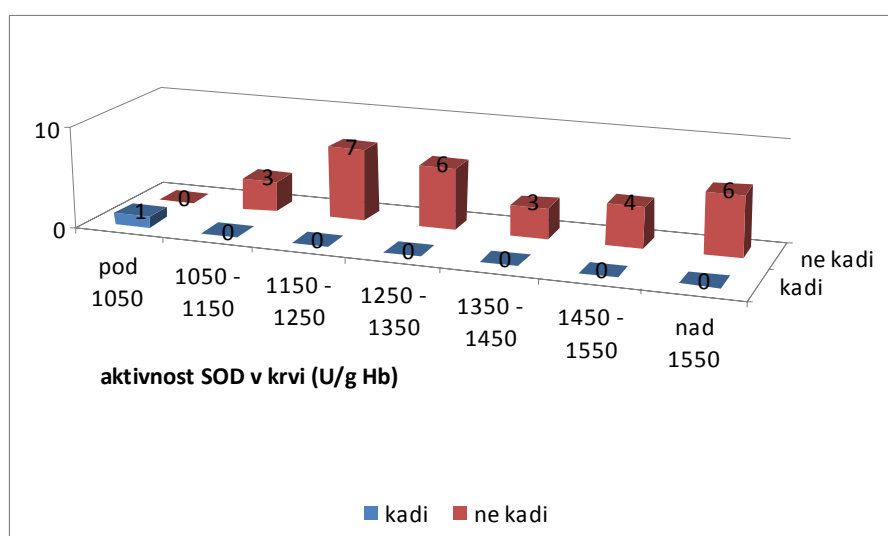
IV.3.8. Povezave med kajenjem nosečnice in aktivnostjo antioksidantnih encimov

V tabeli 13 so predstavljeni rezultati povezav med kajenjem nosečnice in aktivnostjo antioksidantnih encimov.

Tabela 13: Rezultati povezav med kajenjem nosečnice in aktivnostjo antioksidantnih encimov

Kajenje nosečnice	t-test za neodvisna vzorca	Pearsonov koeficient korelacije	moč povezave	značilna povezava? (pri 5% tveganju)
aktivnost SOD v plodovnici	p = 0,478 (n = 32)	r = 0,130	r ² = 0,017	NE
aktivnost SOD v krvi	p = 0,084 (n = 30)	r = 0,320	r ² = 0,103	bliža statistični značilnosti
aktivnost GPx v plodovnici	p = 0,174 (n = 32)	r = 0,246	r ² = 0,061	NE
aktivnost GPx v krvi	p = 0,910 (n = 30)	r = 0,021	r ² = 0,0005	NE

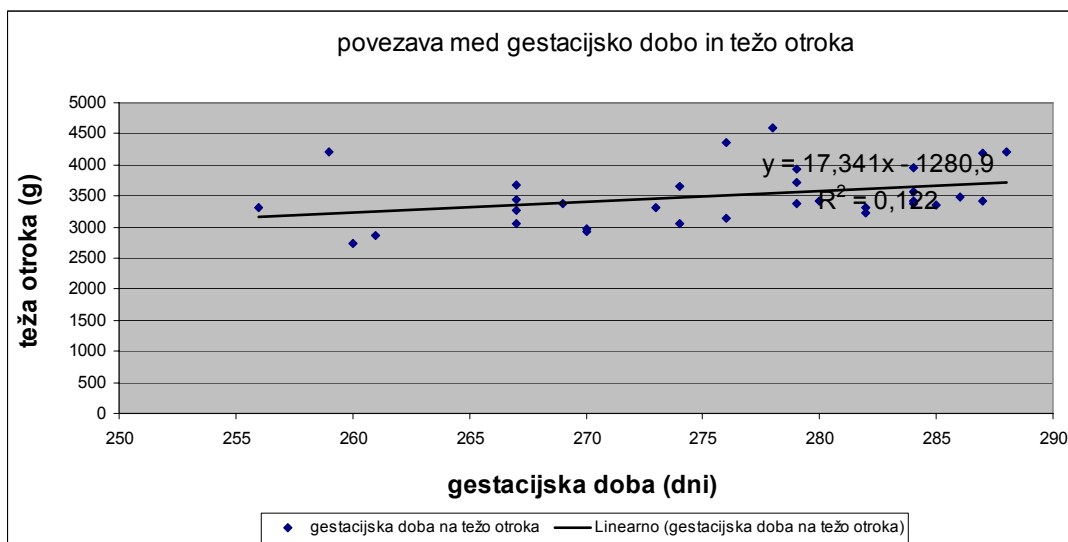
Vse povezave med kajenjem in aktivnostmi antioksidantnih encimov so se izkazale za neznačilne. Se pa povezava med **kajenjem nosečnice** in **aktivnostjo superoksid-dismutaze v krvi** približuje statistični značilnosti. Z 8,4% tveganjem lahko trdimo, da sta kajenje in aktivnost superoksid-dismutaze v krvi povezana. Pri kadilki je vrednost SOD v krvi precej nizka (nižja od vrednosti SOD pri vseh nekadilkah, kar je razvidno iz **grafa 9**), pri kadilki je namreč aktivnost SOD v krvi znašala 1033 U/g Hb, pri nekadilkah pa je povprečna aktivnost SOD v krvi znašala 1352,7 ± 175,7 U/g Hb.



Graf 9: Aktivnosti superoksid-dismutaze v krvi

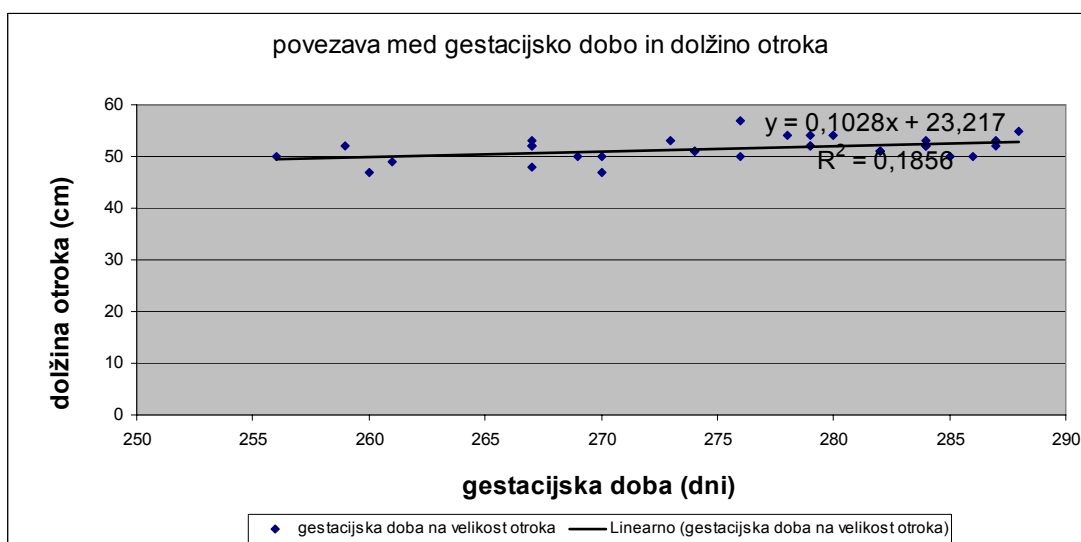
IV.3.9. Povezava med dolžino gestacijske dobe in porodnimi merami

Povezava med dolžino gestacijske dobe in porodno težo otroka se je izkazala za statistično značilno pri 5% tveganju. Povezava je glede na Pearsonov koeficient korelacije ravno na meji, da bi bila značilna ($r = 0,349$, $p = 0,050$, $n = 32$), glede na Spearmanov koeficient korelacije pa je značilna ($r_s = 0,404$, $p = 0,022$, $n = 32$). To je razvidno tudi iz **grafa 10**. Moč povezave znaša $r^2 = 0,122$.



Graf 10: Povezava med dolžino gestacijske dobe in porodno težo otroka

Povezava med dolžino gestacijske dobe in porodno dolžino otroka se je izkazala za statistično značilno pri 5% tveganju, računano tako s Pearsonovim koeficientom korelacije ($r = 0,431$, $p = 0,014$, $n = 32$) kot tudi s Spearmanovim koeficientom korelacije ($r_s = 0,382$, $p = 0,031$, $n = 32$). Moč povezave je znašala $r^2 = 0,186$. Povezava je razvidna iz **grafa 11**.



Graf 11: Povezava med dolžino gestacijske dobe in porodno dolžino otroka

IV.3.10. Povezava med bolezenskimi stanji nosečnic in aktivnostjo antioksidantnih encimov

Le ena izmed nosečnic je imela bolezensko stanje, in sicer kronično vnetje ščitnice, zato sem ugotavljala, če so pri tej nosečnici aktivnosti encimov statistično značilno odstopale.

V **tabeli 14** so predstavljeni rezultati povezav med kroničnim vnetjem ščitnice in aktivnostjo antioksidantnih encimov.

Tabela 14: Rezultati povezav med kroničnim vnetjem ščitnice in aktivnostjo antioksidantnih encimov

Kronično vnetje ščitnice	t-test za neodvisna vzorca	značilna povezava? (pri 5% tveganju)
aktivnost SOD v plodovnici	p = 0,918 (n = 32)	NE
aktivnost SOD v krvi	p = 0,481 (n = 30)	NE
aktivnost GPx v plodovnici	p = 0,813 (n = 32)	NE
aktivnost GPx v krvi	p = 0,022 (n = 30)	DA

Povezava med kroničnim vnetjem ščitnice in aktivnostjo glutathion-peroksidaze v krvi se je izkazala za statistično značilno. Pri nosečnici s kroničnim obolenjem ščitnice aktivnost GPx v krvi znaša 29,7 U/g Hb, pri ostalih (zdravih) nosečnicah pa je povprečna aktivnost GPx v krvi $51,05 \pm 8,64$ U/g Hb.

V. RAZPRAVA

V nosečnosti pogosto pride do zapletov, kar nas spodbuja k iskanju vzrokov in označevalcev za napovedovanje tveganja in za lažje prepoznavanje teh zapletov. V nalogi sem kot možna označevalca vrednotila antioksidantna encima superoksid-dismutazo in glutation-peroksidazo in sicer njuno aktivnost v venski krvi nosečnic in v plodovnici. Naša raziskava je bila ena prvih raziskav z določanjem antioksidantnih encimov v plodovnici. Pred nami so jih v plodovnici določali le v brazilski študiji, kjer so vrednotili razlike med aktivnostjo superoksid-dismutaze pri nosečnicah z normalnim plodom in tistimi, ki so nosile plod z Downovim sindromom, pri čemer so ugotovili, da je aktivnost superoksid-dismutaze značilno višja v skupini z Downovim sindromom (68).

S tem, ko smo določali antioksidantne encime v plodovnici, smo ovrednotili oksidativni stres v neposrednem plodovem okolju. V primeru dobre korelacije med antioksidantnimi encimi v plodovnici in v krvi nosečnice (torej med plodovim in materinim okoljem), bi lahko razvili nove manj invazivne metode za spremljanje oksidativnega stresa ploda (ker je veliko manj invazivno nosečnici odvzeti kri kot plodovnico), ampak žal je bila korelacija slaba.

Vrednotila sem tudi povezave med različnimi parametri v nosečnosti. V naslednjih podglavljih sledi razprava o posameznih rezultatih.

V.1. Povezave med spolom otroka in ostalimi parametri

Pokazalo se je, da spol otroka ne vpliva značilno na nobenega od ostalih parametrov. Se pa povezava med spolom otroka in porodno dolžino približuje statistični značilnosti. Porodna dolžina dečkov je pri 7,3% tveganju značilno večja od porodne dolžine deklic, kar niti ni presenetljivo. Že mnoge študije so pokazale, da so telesne mere dečkov večje kot pri deklicah iste starosti. V Jeruzalemu so leta 1975 opravili antropometrične meritve pri 273 novorojenčkah v prvih 24 urah po porodu. Rezultati so pokazali, da so se dečki rodili težji, daljši in z večjim obsegom glavice kot deklice (69). Tudi raziskava, ki je potekala na oddelku Splošne bolnišnice v Kotorju je pokazala, da sta porodna teža in porodna dolžina

razlikujeta po spolu, vedno v korist dečkov (70). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi drugi avtorji.

Glede na pretekle študije (69, 70) sem pričakovala, da se bo tudi povezava med porodno težo in spolom otroka izkazala za značilno ali pa se vsaj približevala statistični značilnosti, ampak v naši raziskavi ni bilo nobene povezave med tema dvema parametroma. Morda povezava ni bila značilna, ker sem imela premajhen vzorec (32 nosečnic) ali pa vzorec ni bil popolnoma reprezentativen glede te spremenljivke.

V.2. Povezave med indeksom telesne mase ženske in ostalimi parametri

Indeks telesne mase (BMI) je število, ki nam pove, v kateri razred prehranjenosti spadamo. Naši rezultati so pokazali, da se pri nižjem indeksu telesne mase (BMI) matere značilno pojavlja več splavov, kar je bilo zlasti vidno v skupini žensk z BMI nižjim od 20 kg/m². Podobne rezultate je pokazalo že več raziskav. Raziskava, ki so jo naredili v Londonu je pokazala, da imajo ženske z zelo nizko težo (BMI pod 18,5 kg/m²) kar za 72% več možnosti, da pride do spontanega splava v prvih treh mesecih nosečnosti, v primerjavi z ženskami z normalno težo (71). Ena od raziskav je pokazala, da se možnost za splav zelo poveča že pri BMI manjšem od 20 kg/m², poleg tega so kot pomembna dejavnika, ki povečujeta možnost za splav navedli še starost nosečnice (več splavov, če je nosečnica stara nad 33 let) in nizke koncentracije progesterona v serumu (<12 ng/ml) (72).

Obstaja pa tudi mnogo raziskav, ki kažejo, da prevelika telesna teža zelo poveča možnost za spontani splav (73, 74, 75). Ena od raziskav je pokazala, da povezava med BMI in spontanim splavom ni linearna, ampak je v obliki črke U, kar pomeni, da imajo tako ženske z nizkim BMI kot ženske z visokim BMI povečano tveganje za spontani splav (76).

Večje pojavljanje spontanih splavov pri ženskah z nizkim in visokim BMI morda lahko razložimo z delovanjem leptina, to je hormon, ki se proizvaja pretežno v maščobnem tkivu (77). Plazemske koncentracije leptina sovpadajo z BMI pri nenosečih ženskah (78) in pri nosečnicah (79). Leptin in njegov receptor sta izražena v sekretornem endometriju (80), v katerem lahko regulirata angiogenezo v maternici in ugnezditev zarodka (76). Nizke plazemske vrednosti leptina so povezane z zgodnjim splavom in ponavljajočimi splavi (79) in lahko pojasnijo zakaj se pri ženskah z nizko težo pojavlja več spontanih splavov.

Natančni mehanizmi za povečano pojavljanje splavov pri čezmerno težkih ženskah trenutno še niso znani. Endokrine motnje, kot so sindrom policističnih jajčnikov (PCOS), hipotiroza in inzulinska rezistenca so pogostejše pri ženskah s povišanim BMI in morda prispevajo k višji stopnji pojavljanja splavov (74). Za debelost je značilna visoka raven leptina in pri nekaterih tudi leptinska rezistenca. Visoke vrednosti leptina lahko vodijo do inzulinske rezistence s spremenjeno presnovo maščobnih kislin v skeletnih mišicah (81). Inzulinska rezistenca je značilna za predebele ženske (82) in je morda povezana s spontanim splavom preko različnih mehanizmov, na primer s tem, da vpliva na zmanjšano nastajanje nekaterih faktorjev v endometriju (adhezijski faktorji, inzulinu podoben rastni faktor-vezavni protein-1 itd.) (76).

Povezava med indeksom telesne mase nosečnice in porodno težo otroka se v naši raziskavi ni izkazala za značilno, sem pa zasledila več raziskav, ki kažejo, da je ta povezava značilna (83, 84). To morda lahko spet pripišemo premajhnemu oziroma nereprezentativnemu vzorcu na področju porodne teže.

Povezava med indeksom telesne mase in aktivnostjo superoksid-dismutaze v krvi se v naši raziskavi ni izkazala za statistično značilno, je pa treba omeniti, da se glede na Spearmanov koeficient korelacije povezava približuje statistični značilnosti, saj lahko s 5,4% tveganjem trdimo, da sta BMI in aktivnost superoksid-dismutaze v krvi povezana. Naša povezava nakazuje, da so pri višjih vrednostih BMI aktivnosti superoksid-dismutaze v krvi rahlo višje. Zanimivo je, da sem v neki drugi raziskavi zasledila ravno obratne rezultate in sicer, da aktivnost superoksid-dismutaze pada z naraščanjem BMI (85). Morda gre v naši raziskavi le za naključje, da se ta povezava glede na Spearmanov koeficient korelacije bliža statistični značilnosti, glede na Pearsonov koeficient korelacije je namreč neznačilna.

V.3.Povezave med aktivnostjo antioksidantnih encimov in ostalimi parametri

Glutation-peroksidaza (GPx) je encim, ki naše celice ščiti pred lipidno peroksidacijo. V naši raziskavi se je pokazalo, da se višje aktivnosti GPx v krvi nosečnice značilno pogosteje pojavljajo z nižjo porodno težo otroka. Takšnega rezultata nisem zasledila v nobeni drugi raziskavi, pravzaprav nisem zasledila nobene raziskave, kjer bi sploh preverjali to povezavo. O vzrokih za to povezavo lahko le ugibam. Možno je, da gre za

posredno povezavo, oba parametra sta namreč povezana z oksidativnim stresom. Do povečanja aktivnosti glutathion-peroksidaze v krvi lahko pride zaradi prilagoditvenega odziva na oksidativni stres (86), poleg tega pa je oksidativni stres povezan z nižjo porodno težo (87). Povezavo bi lažje ocenila, če bi imela podatke še o drugih označevalcih oksidativnega stresa pri preiskovankah (npr. o izoprostanih, 8-hidroksidegvanozinu itd.), saj bi na ta način lahko ocenila raven oksidativnega stresa pri ženskah z višjo aktivnostjo glutathion-peroksidaze.

Sem pa za primerjavo našla raziskavo o povezavi med aktivnostjo glutathion-peroksidaze pri novorojenčkih in njihovo porodno težo. Povečan GPx pri otrocih z nižjo težo so zabeležili pri študiji, pri kateri so ugotavljali antioksidativni status pri novorojenčkih z nizko porodno težo (< 2500 g). V tej študiji se je izkazalo, da so pri teh novorojenčkih vrednosti vitamina A in E, superoksid-dismutaze (SOD) in katalaze (CAT) bile signifikantno znižane, vrednost glutathion-peroksidaze pa je bila signifikantno zvišana v primerjavi z vrednostmi kontrolne skupine. Ker so novorojenčki v tej študiji imeli pomanjkanje pomembnih antioksidantnih encimov (SOD, CAT), so raziskovalci sklepali, da se je pri njih morda zato povečala sinteza GPx, da bi se uravnalo ravnotežje med prooksidanti in antioksidanti v telesu (88).

Nekatere druge raziskave pa so dobile rezultate, da je aktivnost glutathion-peroksidaze signifikantno nižja pri novorojenčkih z nizko porodno težo v primerjavi z novorojenčki z normalno težo (89). Te raziskave so pokazale tudi nizko vrednost selena pri novorojenčkih z nizko porodno težo. Selen je pomemben del selenoencimov, med katere spada tudi glutathion-peroksidaza. Neka raziskava je pokazala, da so plazemske koncentracije selena in glutathion-peroksidaze v korelaciji s porodno težo (90) in da pri novorojenčkih z zelo nizko porodno težo aktivnost glutathion-peroksidaze dosega le približno eno tretjino aktivnosti v primerjavi z normalno težkimi novorojenčki (91).

V neki raziskavi so merili aktivnost antioksidantnih encimov pri novorojenčkih (v popkovni krvi), pri njihovih materah in pri kontrolni skupini (nenoseče ženske in moški). Aktivnosti katalaze in glutathion-peroksidaze v eritrocitih novorojenčkov so bile značilno nižje ($15,27 \pm 4,48$ U/g Hb za GPx) v primerjavi z aktivnostmi pri njihovih materah ($29,28 \pm 5,49$ U/g Hb za GPx) in pri kontrolni skupini ($21,53 \pm 4,53$ U/g Hb za GPx), aktivnost superoksid-dismutaze pa je bila nespremenjena. So pa matere imele značilno višje aktivnosti katalaze in glutathion-peroksidaze v primerjavi s kontrolno skupino (92). Aktivnosti encimov so torej pri novorojenčkih znatno nižje kot pri njihovih materah, nikjer

pa ni bil ovrednoten vpliv matere na aktivnost encimov pri otroku, saj ni bilo navedene korelacije med aktivnostmi encimov pri materi in novorojenčku.

Povezava med aktivnostjo GPx v plodovnici in dolžino otroka se v naši raziskavi ni izkazala za statistično značilno, se pa približuje statistični značilnosti. Pri 7,9% tveganju lahko trdimo, da so visoke vrednosti GPx v plodovnici povezane z večjo dolžino otroka. Ta trend se pozna predvsem pri aktivnostih GPx v plodovnici nad 500 U/l, ker imajo tisti otroci najvišje porodne dolžine. Ta povezava bi lahko nakazovala vlogo antioksidantnih encimov pri lažjem anatomskem razvoju plodu in s tem večji rasti. Iz tega bi lahko sklepali, da bodo pri nizki antioksidantni zaščiti otroci bolj podvrženi težavam zastoja rasti. Glede tega bi bilo smiselno izvesti nadaljnje študije, saj povezave med aktivnostjo GPx v plodovnici in dolžino otroka nisem zasledila še v nobeni drugi raziskavi.

Zanimivo je, da so naši rezultati glede vloge glutation-peroksidaze malce nasprotujoči, saj nakazujejo, da višje aktivnosti GPx v plodovnici olajšajo rast otroka v dolžino, višje aktivnosti GPx v krvi pa zmanjšujejo težo otroka. Lahko da je ena od teh povezav zgolj slučajna ali pa da ne gre za neposredno povezavo, ampak sta obe spremenljivki odvisni od kakšne tretje spremenljivke, ki je v naši raziskavi nismo upoštevali. Možno pa je tudi, da ima GPx v plodovnici bolj izrazit pozitiven vpliv na otroka (da mu olajša rast), ker je plodovnica neposredno otrokovo okolje. GPx v krvi pa je, kot sem že omenila, lahko povezan s prilagoditvenim odzivom na oksidativni stres, ob katerem se aktivnost GPx v krvi poveča, hkrati pa oksidativni stres lahko vpliva tudi na nižjo porodno težo.

V.4. Povezave med kajenjem nosečnice in aktivnostjo antioksidantnih encimov

Superoksid-dismutaza (SOD) je encim, ki ima antioksidantno vlogo v celicah. Naša raziskava je pokazala, da se povezava med aktivnostjo SOD v krvi in kajenjem približuje statistični značilnosti, saj lahko z 8,4% tveganjem trdimo, da je pri kadilkah aktivnost SOD v krvi značilno nižja kot pri nekadilkah. Treba je omeniti, da naš vzorec glede tega ni bil najbolj reprezentativen, ker smo pri tej meritvi imeli le eno kadilko in 29 nekadilk. Je pa bila pri kadilki aktivnost SOD v krvi znatno nižja kot pri nekadilkah, seveda pa ne moremo vedeti, če je to zgolj posledica kajenja ali pa so morda na to vplivali še kakšni drugi dejavniki. V testni skupini bi morale biti več kadilk, da bi bila naša ugotovitev bolj verodostojna.

Povezava med vrednostmi SOD in kajenjem je bila navedena že v mnogih raziskavah. Več raziskav je pokazalo, da se vrednost SOD postopno in značilno zmanjšuje s pogostostjo in trajanjem kajenja – najvišje vrednosti SOD v krvi so pri zdravih nekadilcih, nižje pri lažjih kadilcih in najnižje pri težkih kadilcih (93, 94). V neki raziskavi so izmerili, da imajo sedanji kadilci le 67% vrednosti SOD v plazmi v primerjavi z nekadilci, bivši kadilci pa imajo neko vmesno vrednost SOD (višjo kot sedanji kadilci, še vedno pa nižjo kot nekadilci, ki nikoli oziroma zelo dolgo niso kadili) (95).

Naredili so tudi raziskavo, v kateri so primerjali serumske vrednosti SOD in GPx pri aktivnih kadilkah, pasivnih kadilkah in nekadilkah ter njihovih novorojenčkih. Ker je porod že sam po sebi lahko povezan z nastajanjem radikalov, so antioksidantni status ocenili 7. dan po porodu. Izkazalo se je, da je povprečna aktivnost SOD nižja pri novorojenčkih v skupini kadilk v primerjavi z ostalimi, kar nakazuje na oksidativni stres. Pokazala se je tudi značilna razlika v aktivnosti GPx med novorojenčki v skupini kadilk in nekadilk (96).

Več raziskav je pokazalo, da obstaja povezava med pogostostjo spontanih splavov in kajenjem (97, 98, 99, 100). V naši raziskavi populacija glede tega ni bila reprezentativna, ker sta bili v raziskavo zajeti le 2 kadilki in 30 nekadilk in nobena od njiju še ni imela spontanega splava, zato te povezave nisem mogla preveriti.

V.5. Povezava med dolžino gestacijske dobe in porodnimi merami

Gestacijska doba je obdobje nosečnosti od oploditve jajčeca do poroda, zaradi lažjega določanja pa se gestacijska doba šteje od prvega dne zadnje menstruacije do poroda. Naši rezultati so pokazali, da daljša gestacijska doba značilno vpliva na večjo porodno težo in tudi porodno dolžino otroka. Dolžina gestacije in porodna teža sta zelo povezani, kar se je pokazalo tudi v mnogih raziskavah in statističnih študijah (101, 102, 103). Razni avtorji so razvili tabele, ki prikazujejo povprečno težo otroka po mesecih. Na gestacijsko dobo pa naj bi vplivala tudi dolžina menstrualnega cikla, dednost in še mnogi dejavniki (104). Tudi za porodno dolžino so raziskave pokazale, da je zelo povezana z dolžino gestacijske dobe (105, 106).

V.6. Povezava med bolezenskimi stanji nosečnic in aktivnostjo antioksidantnih encimov

Le ena od nosečnic je imela zdravstvene težave in sicer kronično vnetje ščitnice. Izkazalo se je, da obstaja značilna povezava med to boleznijo in aktivnostjo glutacion-peroksidaze (GPx) v krvi. Nosečnica s kroničnim vnetjem ščitnice je imela bistveno nižjo aktivnost GPx v krvi v primerjavi z zdravimi nosečnicami. Ker smo imeli le eno nosečnico s to težavo, vzorec ni reprezentativen, ker ne moremo vedeti, če je na nizko vrednost GPx v krvi vplivala bolezen ali še kakšni drugi dejavniki. Da bi bila ta povezava bolj verodostojna, bi morali v raziskavo ciljano vključiti več nosečnic s to boleznijo, ki bi jih primerjali z zdravimi nosečnicami.

Ta povezava je kar smiselna, saj sem v več raziskavah zasledila, da zmanjšana aktivnost GPx prispeva k oksidativnim poškodbam celic ščitnice in s tem k razvoju in vzdrževanju avtoimunskih bolezni ščitnice (107, 108, 109). Za znižano aktivnost GPx je lahko odgovorno pomanjkanje selena (107), v aktivnem mestu encima GPx je namreč selenocistein, zato je za normalno delovanje encima potrebna zadostna preskrbljenost organizma s selenom. Pomanjkanje selena povzroča zmanjšanje aktivnosti GPx, kar lahko povzroči kopičenje vodikovega peroksida (H_2O_2), ki povzroča škodo na ščitnici in motnje presnove ščitničnih hormonov (107). Lahko pa tudi, da gre za dedne dejavnike.

V.7. Uporabljene metode za statistično analizo

Pri statistični obdelavi sem uporabila več različnih testov. Pri povezavah, kjer se je ena od spremenljivk pojavljala v dveh opisnih kategorijah (npr. spol: moški-ženski, kajenje: da-ne), sem uporabila t-test za neodvisne vzorce (Independent Samples t-test), s katerim se preverja razlike med aritmetičnima sredinama dveh neodvisnih vzorcev in je primeren tudi za preverjanje razlik majhnih vzorcev ($n < 30$). Pri povezavah, kjer je imela ena od spremenljivk več kategorij (npr. število splavov: 0,1,2) sem najprej uporabila test ANOVA, s katerim sem ugotovila, ali med skupinami sploh obstajajo kakšne razlike. Če se je izkazalo, da obstajajo, sem uporabila še Tukey-ev test za primerjavo parov, da sem ugotovila, med katerimi skupinami so razlike.

Pri spremenljivkah, pri katerih sem računala korelacijo med njimi, oziroma moč povezave med njimi, sem večinoma uporabila Pearsonov koeficient korelacije r in zraven dopisala še

determinacijski koeficient r^2 , ki nam pove moč povezave med dvema spremenljivkama. Pri večini spremenljivk sem izračunala še Spearmanov koeficient korelacije r_s , ki se je številčno sicer razlikoval od Pearsonovega koeficienta, ampak pri ugotavljanju, če je neka povezava statistično značilna ($p < 0,05$), sta oba koeficienta dajala enake rezultate. Oba koeficienta sem izračunala, ker povezave večinoma niso bile čisto linearne (to sem ugotovila s pomočjo razsevnega grafikona), zato sem se odločila, da poleg Pearsonovega koeficienta izračunam še Spearmanov koeficient, ki ne zahteva linearne povezanosti spremenljivk. Statistično značilnost sem ugotavljala na ravni 5% tveganja, sem pa omenila tudi nekaj povezav, ki se približujejo statistični značilnosti.

V.8. Splošen zaključek razprave

Omejitev pri naši raziskavi je predstavljal predvsem majhen vzorec, saj je bilo v raziskavo vključenih le 32 nosečnic, in pa to, da populacija naših nosečnic ni povsem reprezentativna, ker smo zajeli predvsem ženske nad 37 letom, saj se pri njih amniocenteza pogosteje izvaja (zaradi večjega tveganja nepravilnosti ploda). Kljub temu sem lahko dobila približne ocene glede tega, kako aktivnosti antioksidantnih encimov v krvi in v plodovnici vplivajo na nekatere druge parametre v nosečnosti, osredotočila sem se namreč na absolutne vrednosti encimov v krvi in plodovnici.

V diplomu sem nameravala primerjati, če imajo nosečnice z različnimi zapleti v nosečnosti (hipertenzija, sladkorna bolezen, preeklampsija...) značilno drugačne aktivnosti antioksidantnih encimov (višje ali pa nižje), ampak nobena od nosečnic, ki so bile zajete v to raziskavo, ni imela nobenega od teh problemov, zato v tej raziskavi tega nisem mogla oceniti. Prav tako nobena od nosečnic ni imela prezgodnjega poroda ali zastoja rasti ploda, tako da tudi tukaj nisem mogla narediti primerjav glede aktivnosti encimov.

V naši raziskavi se je izkazalo, da aktivnost encimov v krvi in plodovnici ni povezana s kakšnim od bistvenih parametrov v nosečnosti (npr. številom splavov, prenizko porodno težo itd.), tako da glede tega ni bilo kakšnih klinično pomembnih povezav. Vseeno se mi zdi, da sta povezavi med aktivnostjo glutathion-peroksidaze in porodnimi merami otroka zelo zanimivi in da bi bilo glede tega smiselno izvesti nadaljnje študije. V teh študijah bi lahko ugotavljali, če bi se dala aktivnost glutathion-peroksidaze v krvi in/ali plodovnici uporabljati za napovedovanje rasti plodu.

Tudi večina ostalih statistično značilnih povezav se mi ne zdi klinično pomembnih, saj na večino od njih ne moremo vplivati. Menim pa, da se je kot klinično pomembna povezava izkazala povezava med indeksom telesne mase (BMI) in številom spontanih splavov, ki je bilo pri ženskah z nižjim BMI značilno višje. Ta povezava se je sicer pokazala že v preteklih študijah in to v obeh smereh – pokazalo se je, da je povečano tveganje za spontani splav povezano tako z visokim kot z nizkim BMI, zato je pomembno, da se ženskam, ki nameravajo zanositi poudari, kako pomemben je BMI oziroma ustreza telesna teža glede na njihovo telesno višino in da se jih spodbuja, da ustrezno telesno težo vzdržujejo z gibanjem in z ustrežno prehrano vsaj v rodnem obdobju, da se izognejo zapletom pri nosečnosti.

Omenila bi tudi povezavo med kajenjem in oksidativnim stresom, saj je to eden od dejavnikov, na katerega lahko nosečnice same vplivajo. V naši raziskavi sicer povezava med kajenjem in ostalimi parametri ni bila statistično značilna (se je pa pri aktivnosti superoksid-dismutaze v krvi približevala statistični značilnosti), je pa veliko drugih raziskav to povezavo potrdilo kot značilno, prav tako je več raziskav pokazalo, da pri kadilkah pogosteje pride do spontanega splava.

Zaključim lahko, da se v preiskovani skupini aktivnosti antioksidantnih encimov niso značilno povezovale z ostalimi parametri v nosečnosti. Zaradi nekaterih omejujočih dejavnikov (majhen vzorec, starost preiskovank) ter nekaterih povezav na meji značilnosti pa bi bile vsekakor smiselne dodatne raziskave, pri katerih bi zajeli več nosečnic, naredili primerjave med različnimi skupinami nosečnic (zdravimi nosečnicami in nosečnicami z raznimi zapleti) in v raziskavo vključili več parametrov.

VI. SKLEP

Rezultati naše raziskave so pokazali, da antioksidantni encimi niso bistveno povezani z ostalimi parametri v nosečnosti. Vpliv je bil izrazit samo pri glutation-peroksidazi (GPx), ki je pri višjih aktivnostih v krvi povezana z nižjo porodno težo otroka, pri višjih aktivnostih v plodovnici pa se nakazuje povezava z večjo porodno dolžino otroka. Pri superoksid-dizmutazi (SOD) nisem našla nobenega značilnega vpliva. Smiselno bi bilo preveriti tudi povezavo med antioksidantnimi encimi in zapleti v nosečnosti, kot so na primer hipertenzija, preeklampsija in gestacijski diabetes, ampak v naši raziskavi so bile vse nosečnice zdrave, zato te povezave nisem mogla ovrednotiti.

Pokazala se je povezava med indeksom telesne mase (BMI) in številom splavov in sicer, da je pri nižjem BMI večja verjetnost, da pride do spontanega splava. Vse preiskovanke, ki so imele že več kot en splav, imajo dokaj nizko vrednost BMI.

Rezultati so pokazali tudi nekatere pričakovane povezave in sicer vpliv gestacijske dobe na težo in dolžino otroka. Daljša gestacijska doba vpliva na večjo porodno težo in večjo porodno dolžino otroka.

Izkazalo se je tudi, da obstaja značilna povezava med kroničnim vnetjem ščitnice in aktivnostjo glutation-peroksidaze (GPx) v krvi in sicer, da je bila aktivnost GPx v krvi nosečnice s to boleznijo značilno nižja. Povezava je smiselna, saj zmanjšana aktivnost GPx lahko zaradi kopičenja vodikovega peroksida prispeva k oksidativnim poškodbam celic ščitnice.

Menim, da je bil vzorec v naši raziskavi premajhen in premalo reprezentativen in da bi bile na tem področju potrebne dodatne raziskave, ki bi vključile več nosečnic in upoštevale več parametrov oksidativnega stresa, ne le aktivnosti antioksidantnih encimov. Zanimivo bi bilo narediti tudi raziskavo, v kateri bi vrednotili povezave med parametri oksidativnega stresa, zapleti v nosečnosti in življenjskim slogom nosečnice (prehrano, telesno aktivnostjo, količino spanja, intenzivnostjo psihičnega stresa, socialnim statusom itd.).

VII. VIRI IN LITERATURA

- 1) Halliwell B, Gutteridge J: Free radicals in biology and medicine, 4. izdaja, Oxford University Press, New York, 2007.
- 2) Aragwal A, Gupta S, Sharma RK: Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2005; 3:28.
- 3) Ribarič S: Temelji patološke fiziologije (poglavje: Šuput D: Reaktivne kisikove spojine v patofizioloških procesih str. 25-32), Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana 2009.
- 4) Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ: Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature genetics* 1995; 11(4):376-381.
- 5) Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson Roberts L, Van Remmen H, Epstein CJ, Huang TT: CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 2005; 24(3):367-380.
- 6) Muller FL, Song W, Liu Y, Chaudhuri A, Pieke-Dahl S, Strong R, Huang TT, Epstein CJ, Roberts LJ 2nd, Csete M, Faulkner JA, Van Remmen H: Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free radical biology & medicine* 2006; 40(11):1993-2004.
- 7) Sentman ML, Granström M, Jakobson H, Reaume A, Basu S, Marklund SL: Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *The journal of biological chemistry* 2006; 281(11):6904-6909.
- 8) Treiber N, Maity P, Singh K, Ferchiu F, Wlaschek M, Scharffetter-Kochanek K: The role of manganese superoxide dismutase in skin aging. *Dermatoendocrinology* 2012; 4(3):232-235.
- 9) Sasaki H, Akamatsu H, Horio T: Protective role of copper, zinc superoxide dismutase against UVB-induced injury of the human keratinocyte cell line HaCaT. *The Journal of investigative dermatology* 2000; 114(3):502-507.
- 10) Segui J, Gironella M, Sans M, Granell S, Gil F, Gimeno M, Coronel P, Pique JM, Panes J: Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative

stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *Journal of Leukocyte Biology* 2004; 76(3):537-544.

11) Marberger H, Huber W, Bartsch G, Schulte T, Swoboda P: ORGOTEIN: a new antiinflammatory metalloprotein drug evaluation of clinical efficacy and safety in inflammatory conditions of the urinary tract. *International Urology and Nephrology* 1974; 6(2):61-74.

12) Metz JM, Smith D, Mick R, Lustig R, Mitchell J, Cherakuri M, Glatstein E, Hahn SM: A phase I study of topical Tempol for the prevention of alopecia induced by whole brain radiotherapy. *Clinical cancer research* 2004; 10(19):6411-6417.

13) Hurko O, Walsh FS: Novel drug development for amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the neurological sciences* 2000; 18:21-28.

14) Oberley LW, Buettner GR: Role of Superoxide Dismutase in Cancer: A Review. *Cancer research* 1979; 39:1141-1149.

15) Jenkins C, Wilson R, Roberts J, Miller H, McKillop JH, Walker JJ: Antioxidants: their role in pregnancy and miscarriage. *Antioxidants & redox signaling* 2000; 2(3):623-628.

16) Lapointe S, Sullivan R, Sirard MA: Binding of a bovine oviductal fluid catalase to mammalian spermatozoa. *Biology of reproduction* 1998; 58(3):747-753.

17) Kirkman HN, Gaetani GF: Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984; 81(14):4343-4347.

18) Aebi H: Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 1984; 105:121-126.

19) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molecular Biology of the Cell*, 4. izdaja, Garland Science, New York, 2002.

20) Rozman B, Gašperlin M, Kristl J: Preventivno delovanje naravnih antioksidantov na nastanek kožnega raka pod vplivom ultravijoličnih žarkov. *Medicinski razgledi* 2006; 45:141-153.

21) Wolfe AD, Beers RF Jr, Sizer IW: Cyanide inhibition of the catalase system. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1957; 72(2):353-357.

22) Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman HN: Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*. 1996; 87(4):1595-1599.

23) Goth L: Catalase deficiency and type 2 diabetes. *Diabetes care* 2008; 31(12):93.

- 24) Edenberg HJ: The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol Research & Health* 2007; 30(1):5–13.
- 25) Wood JM, Decker H, Hartmann H, Chavan B, Rokos H, Spencer JD, Hasse S, Thornton MJ, Shalhaf M, Paus R, Schallreuter KU: Senile hair graying: H₂O₂-mediated oxidative stress affects human hair color by blunting methionine sulfoxide repair. *The FASEB journal* 2009; 23(7):2065-2075.
- 26) Knapen MF, Zusterzeel PL, Peters WH, Steegers EA: Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology* 1999; 82(2):171-184.
- 27) Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H: Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine* 2007; 43(4):477-503.
- 28) Burton GJ, Jauniaux E: Oxidative stress. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2011; 25:287-299.
- 29) 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(6):747-755.
- 30) Casanueva E, Viteri FE: Iron and Oxidative Stress in Pregnancy. *J. Nutr.* 2003; 133:1700-1708.
- 31) Stein TP, Scholl TO, Schuller MD: Oxidative stress early in pregnancy and pregnancy outcome. *Free Radic Res* 2008; 42(10):841-848.
- 32) Djordjevic A, Spasic S, Jovanovic-Galovic A: Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity and lipid peroxidation products. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004; 16:367-372.
- 33) Rejc B, Osredkar J, Geršak K: Oksidacijski stres in nosečnost. *Farmacevtski vestnik* 2012; 63(3):153-161.
- 34) Hubel CA, Kagan VE, Kisin ER, McLaughlin MK, Roberts JM: Increased ascorbate radical formation and ascorbate depletion in plasma from women with preeclampsia: implications for oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 1997; 23(4):597-609.
- 35) Romero R, Chaiworapongsa T, Espinoza J: Micronutrients and Intrauterine Infection, Preterm Birth and the Fetal Inflammatory Response Syndrome. *J. Nutr.* 2003; 133:1668-1673.

- 36) Eriksson UJ: The pathogenesis of congenital malformations in diabetic pregnancy. *Diabetes metabolism reviews* 1995; 11(1):63-82.
- 37) Hagay ZJ, Weiss Y, Zusman I, Peled-Kamar M, Reece EA, Eriksson UJ, Groner Y: Prevention of diabetes-associated embryopathy by overexpression of the free radical scavenger copper zinc superoxide dismutase in transgenic mouse embryos. *American journal of obstetrics and gynecology* 1995; 173(4):1036-1041.
- 38) Simán CM, Eriksson UJ: Vitamin C supplementation of the maternal diet reduces the rate of malformation in the offspring of diabetic rats. *Diabetologia* 1997; 40(12):1416-1424.
- 39) Sivan E, Reece EA, Wu YK, Homko CJ, Polansky M, Borenstein M: Dietary vitamin E prophylaxis and diabetic embryopathy: morphologic and biochemical analysis. *American journal of obstetrics and gynecology* 1996; 175:793-799.
- 40) Perkins AV: Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2006; 46(2):77-83.
- 41) Roggensack AM, Zhang Y, Davidge ST: Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension* 1999; 33(1):83-89.
- 42) Leal CA, Schetinger MR, Leal DB, Morsch VM, da Silva AS, Rezer JF, de Bairros AV, Jaques JA: Oxidative stress and antioxidant defenses in pregnant women. *Redox report* 2011; 16(6):230-236.
- 43) Saczko J, Daczewska M, Malarska A, Seweryn E, Saczko Z, Ogorzalek A, Banas T: Catalase (CT) activity in placentas complicated with pregnancy induced hypertension (PIH). *Zoologica Poloniae* 2002; 47:69-73.
- 44) Funai EF, MacKenzie A, Kadner SS, Rogue H, Lee MJ, Kuczynski E: Glutathione peroxidase levels throughout normal pregnancy and in pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2002; 12(5):322-326.
- 45) Zachara BA, Wardak C, Didkowski W, Maciag A, Marchaluk E: Changes in blood selenium and glutathione concentrations and glutathione peroxidase activity in human pregnancy. *Gynecologic and obstetric investigation* 1993; 35(1):12-17.
- 46) Prokopenko VM, Partsalis GK, Pavlova NG, Burmistrov SO, Arutyunyan AV: Glutathione-dependent system of antioxidant defense in the placenta in preterm delivery. *Bull Exp Biol Med* 2002; 133(5):442-443.

- 47) Sharma JB, Sharma A, Bahadur A, Vimala N, Satyam A, Mittal S: Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and pre-eclampsia. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* 2006; 94:23-27.
- 48) Chappell LC, Seed PT, Briley AL, Kelly FJ, Lee R, Hunt BJ, Parmar K, Bewley SJ, Shennan AH, Steer PJ, Poston L: Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *The Lancet* 1999; 354(9181):810-816.
- 49) Beazley D, Ahokas R, Livingston J, Griggs M, Sibai BM: Vitamin C and E supplementation in women at high risk for preeclampsia: a double-blind, placebo-controlled trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2005; 192(2):520-521.
- 50) Geršak K, Ismaili H, Kavšek G: Uspešnost prenatalnega odkrivanja zastoja plodove rasti. *Zdravniški vestnik* 2010; 79:690-697.
- 51) Gupta P, Narang M, Banerjee BD, Basu S: Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: a case control study. *BMC Pediatrics* 2004; 4:14.
- 52) Halliwell B, Whiteman M: Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology* 2004; 142(2):231-255.
- 53) Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R: Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 2003; 329:23-38.
- 54) Little RE, Gladen BC: Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reproductive Toxicology* 1999; 13(5):347-352.
- 55) Myatt L, Cui X: Oxidative stress in the placenta. *Histochemistry and cell biology* 2004; 122(4):369-382.
- 56) Longini M, Perrone S, Kenanidis A, Vezzosi P, Marzocchi B, Petraglia F, Centini G, Buonocore G: Isoprostanes in amniotic fluid: a predictive marker for fetal growth restriction in pregnancy. *Free radical biology & medicine* 2005; 38(11):1537-1541.
- 57) Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT: Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica Chimica Acta* 2004; 339:1-9.
- 58) <http://www.antibodies-online.com/kit/416206/8-Hydroxydeoxyguanosine+ELISA/>

- 59) McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). The Journal of biological chemistry 1969; 244(22):6049-6055.
- 60) Paglia DE, Valentine WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. The Journal of laboratory and clinical medicine 1967; 70(1):158-169.
- 61) RANSEL Glutathione peroxidase manual, Randox laboratories (originalna navodila proizvajalca, priložena k RANSEL analiznemu kompletu)
- 62) Benzie IF, Strain JJ: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry 1996; 239(1):70-76.
- 63) <http://www.eurogentest.org/index.php?id=625> (dostop: 12.8.2013)
- 64) http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html (dostop: 25.4.2013)
- 65) RANSOD Superoxide dismutase manual, Randox laboratories (originalna navodila proizvajalca, priložena k RANSOD analiznemu kompletu)
- 66) Operator's Manual BM/Hitachi 917, V 2.0, 1996. (originalna navodila proizvajalca)
- 67) Kališnik M: Slovenski medicinski slovar, 3. izdaja, Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2007.
- 68) Netto CB, Siqueira IR, Fochesatto C, Portela LV, da Purificação Tavares M, Souza DO, Giugliani R, Gonçalves CA: S100B content and SOD activity in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. Clinical Biochemistry 2004; 37(2):134-137.
- 69) Palti H, Adler B: Anthropometric measurements of the newborn, sex differences, and correlations between measurements. Human Biology 1975; 47(4):523-530.
- 70) Stefanović M, Božić-Krstić V: Antropometrijske karakteristike novorođenčadi Kotor, rođenih 1974. i 2004. godine. Glasnik Antropološkog društva Srbije 2008; 43:512-518.
- 71) Maconochie N, Doyle P, Prior S, Simmons R: Risk factors for first trimester miscarriage--results from a UK-population-based case-control study. BJOG 2007; 114(2):170-186.
- 72) Arck PC, Rütcke M, Rose M, Szekeres-Bartho J, Douglas AJ, Pritsch M, Blois SM, Pincus MK, Bärenstrauch N, Dudenhausen JW, Nakamura K, Sheps S, Klapp BF: Early risk factors for miscarriage: a prospective cohort study in pregnant women. Reproductive biomedicine online 2008; 17(1):101-113.

- 73) Metwally M, Ong KJ, Ledger WL, Li TC: Does high body mass index increase the risk of miscarriage after spontaneous and assisted conception? A meta-analysis of the evidence. *Fertility and sterility* 2008; 90(3):714-726.
- 74) Landres IV, Milki AA, Lathi RB: Karyotype of miscarriages in relation to maternal weight. *Human reproduction* 2010; 25(5):1123.
- 75) Wang JX, Davies MJ, Norman RJ: Obesity increases the risk of spontaneous abortion during infertility treatment. *Obesity research* 2002; 10(6):551-554.
- 76) Veleva Z, Tiitinen A, Vilska S, Hyden-Granskog C, Tomas C, Martikainen H, Tapanainen JS: High and low BMI increase the risk of miscarriage after IVF/ICSI and FET. *Human reproduction* 2008; 23(4):878-884.
- 77) Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ: Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction* 2005; 130(5):583-597.
- 78) Andrico S, Gambera A, Specchia C, Pellegrini C, Falsetti L, Sartori E: Leptin in functional hypothalamic amenorrhoea. *Human reproduction* 2002; 17(8):2043-2048.
- 79) Lage M, Garcia-Mayor RV, Tomé MA, Cordido F, Valle-Inclan F, Considine RV, Caro JF, Dieguez C, Casanueva FF: Serum leptin levels in women throughout pregnancy and the postpartum period and in women suffering spontaneous abortion. *Clinical endocrinology* 1999; 50(2):211-216.
- 80) Alfer J, Müller-Schöttle F, Classen-Linke I, von Rango U, Happel L, Beier-Hellwig K, Rath W, Beier HM: The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility. *Molecular human reproduction* 2000; 6(7):595-601.
- 81) Dyck DJ, Heigenhauser GJ, Bruce CR: The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity. *Acta physiologica* 2006; 186(1):5-16.
- 82) Pasquali R, Pelusi C, Genghini S, Cacciari M, Gambineri A: Obesity and reproductive disorders in women. *Human reproduction update* 2003; 9(4):359-372.
- 83) Fleten C, Stigum H, Magnus P, Nystad W: Exercise during pregnancy, maternal prepregnancy body mass index, and birth weight. *Obstetrics and gynecology* 2010; 115:331-337.
- 84) Stamnes Koepf UM, Frost Andersen L, Dahl-Joergensen K, Stigum H, Nass O, Nystad W: Maternal pre-pregnant body mass index, maternal weight change and offspring birthweight. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 2012; 91(2):243-249.

- 85) Nojima M, Sakauchi F, Mori M, Tamakoshi A, Ito Y, Watanabe Y, Inaba Y, Tajima K, Nakachi K; JACC Study Group: Relationship of serum superoxide dismutase activity and lifestyle in healthy Japanese adults. *Asian Pacific journal of cancer prevention* 2009; 10:37-40.
- 86) Percy ME, Dalton AJ, Markovic VD, McLachlan DR, Hummel JT, Rusk AC, Andrews DF: Red cell superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in Down syndrome patients with and without manifestations of Alzheimer disease. *American Journal of Medical Genetics* 1990; 35(4):459-467.
- 87) Kim YJ, Hong YC, Lee KH, Park HJ, Park EA, Moon HS, Ha EH: Oxidative stress in pregnant women and birth weight reduction. *Reproductive toxicology* 2005; 19(4):487-492.
- 88) Kumar A, Ranjan R, Basu S, Khanna HD, Bhargava V: Antioxidant levels in cord blood of low birth weight newborns. *Indian pediatrics* 2008; 45(7):583-585.
- 89) Lockitch G, Jacobson B, Quigley G, Dison P, Pendray M: Selenium deficiency in low birth weight neonates: an unrecognized problem. *The journal of pediatrics* 1989; 114(5):865-870.
- 90) Knuppel RA, Hassan MI, McDermott JJ, Tucker JM, Morrison JC: Oxidative stress and antioxidants: preterm birth and preterm infants. *Intechopen* 2012.
- 91) Trindade CEP: Minerals in the nutrition of extremely low birth weight infants. *Jornal de pediatria* 2005; 81:43-51.
- 92) Agostoni A, Gerli GC, Beretta L, Bianchi M, Vignoli M, Bombelli F: Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in maternal and cord blood erythrocytes. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry* 1980; 18(11):771-773.
- 93) Agnihotri R, Pandurang P, Kamath SU, Goyal R, Ballal S, Shanbhogue AY, Kamath U, Bhat GS, Bhat KM: Association of cigarette smoking with superoxide dismutase enzyme levels in subjects with chronic periodontitis. *Journal of periodontology* 2009; 80(4):657-662.
- 94) Reddy S, Swapna LA, Ramesh T, Singh TR, Pradeep K: Influence of cigarette smoking on blood and salivary superoxid dismutase levels among smokers and non-smokers. *Journal of investigative and clinical dentistry* 2012; 3(4):298-303.
- 95) Wang XL, Adachi T, Sim AS, Wilcken DEL: Plasma extracellular superoxide dismutase levels in an Australian population with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1998; 18(12):1915-1921.

- 96) Ermis B, Ors R, Yildirim A, Tastekin A, Kardas F, Akcay F: Influence of smoking on maternal and neonatal serum malondialdehyde, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase levels. *Annals of clinical and laboratory science* 2004; 34(4):405-409.
- 97) Mishra GD, Dobson AJ, Schofield MJ: Cigarette smoking, menstrual symptoms and miscarriage among young women. *Australian and New Zealand journal of public health* 2000; 24(4):413-420.
- 98) George L, Granath F, Johansson AL, Olander B, Cnattingius S: Risks of repeated miscarriage. *Paediatric and perinatal epidemiology* 2006; 20(2):119-126.
- 99) Kmietowicz Z: Smoking is causing impotence, miscarriages, and infertility. *British Medical Journal* 2004; 328:364.
- 100) Bartal M: Health effects of tobacco use and exposure. *Monaldi archives for chest disease* 2001; 56(6):545-554.
- 101) Kramer MS, Platt RW, Wen SW, Joseph KS, Allen A, Abrahamowicz M, Blondel B, Bréart G; Fetal/Infant Health Study Group of the Canadian Perinatal Surveillance System: A new and improved population-based Canadian reference for birth weight for gestational age. *Pediatrics* 2001; 108(2):35.
- 102) Bonellie S, Chalmers J, Gray R, Greer I, Jarvis S, Williams C: Centile charts for birthweight for gestational age for Scottish singleton births. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2008; 8:5.
- 103) Wilcox M, Gardosi J, Mongelli M, Ray C, Johnson I: Birth weight from pregnancies dated by ultrasonography in a multicultural British population. *BMJ* 1993; 307:588-591.
- 104) Lesinski J: Relationship between length of gestation, birth weight and certain other factors. *Bulletin of the world health organisation* 1962; 26(2):183-191.
- 105) Fok TF, So HK, Wong E, Ng PC, Chang A, Lau J, Chow CB, Lee WH; Hong Kong Neonatal Measurements Working Group: Updated gestational age specific birth weight, crown-heel length, and head circumference of Chinese newborns. *Archives of disease in childhood* 2003; 88(3):229-236.
- 106) Davidson S, Sokolover N, Erlich A, Litwin A, Linder N, Sirota L: New and improved Israeli reference of birth weight, birth length, and head circumference by gestational age: a hospital-based study. *The Israel Medical Association journal* 2008; 10(2):130-134.

- 107) Zimmermann MB, Köhrle J: The impact of iron and selenium deficiencies on iodine and thyroid metabolism: biochemistry and relevance to public health. *Thyroid* 2002; 12(10):867-878.
- 108) Contempre B, Dumont JE, Deneff JF, Many MC: Effects of selenium deficiency on thyroid necrosis, fibrosis and proliferation: a possible role in myxoedematous cretinism. *European Journal of Endocrinology* 1995; 133(1):99–109.
- 109) Dakhel Ghani Omran Al-Watify: Oxidative Stress in Hypothyroidism. *Journal of Babylon University* 2011; 19(2):444-449.