

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA KVAS

DOLOČANJE 8-IZOPROSTANA IN 8-HIDROKSIDEOKSIGVANOZINA V URINU IN
AMNIJSKI TEKOČINI KOT OZNAČEVALCA OKSIDATIVNEGA STRESA MED
NOSEČNOSTJO

DETERMINATION OF 8-ISOPROSTANE AND 8-HYDROXYDEOXYGUANOSINE
IN URINE AND AMNIOTIC FLUID AS MARKERS OF OXIDATIVE STRESS
DURING PREGNANCY

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Univerzitetnem kliničnem centru v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem. Analize sem izvedla na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB), v laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev.

Rada bi se zahvalila svojemu mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju za strokovno pomoč in usmerjanje pri izdelavi diplomskega dela.

Najlepša hvala vsem, ki ste kakorkoli pripomogli k nastanku moje diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja.

Urška Kvas

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	i
POVZETEK	1
ABSTRACT	2
SEZNAM OKRAJŠAV	3
1 UVOD	4
1.1 OKSIDATIVNI STRES	4
1.1.1 REAKTIVNE ZVRSTI	4
1.1.2 VIR REAKTIVNIH ZVRSTI	5
1.2 OKSIDATIVNE POŠKODBE	5
1.2.1 LIPIDNA PEROKSIDACIJA	6
1.2.2 OKSIDACIJA DNK.....	8
1.3 ANTIOKSIDANTI	9
1.4 VLOGA REAKTIVNIH ZVRSTI PRI NOSEČNOSTI	11
1.5 DOWNOV SINDROM	12
1.5.1 PRESEJALNI TESTI ZA ODKRIVANJE DOWNOVEGA SINDROMA	13
1.5.2 DIAGNOSTIČNI TESTI ZA ODKRIVANJE DOWNOVEGA SINDROMA.....	14
1.6 VREDNOTENJE OKSIDATIVNEGA STRESA	15
1.7 KVANTITATIVNI IMUNOLOŠKI TESTI Z OZNAČEVALCEM	16
1.7.1 DOLOČANJE ANTIGENA S POSREDNO TEHNIKO – Z OZNAČENIMI PROTITELESI	16
1.7.2 DOLOČANJE ANTIGENA S POSREDNO TEHNIKO – Z OZNAČENIMI ANTIGENI	18
2 NAMEN DELA	19
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 REAGENTI, MATERIALI IN OPREMA	20
3.2 OPIS IN PRIPRAVA VZORCEV	20
3.3 DOLOČANJE 8-OHdG S POSREDNO TEHNIKO – Z OZNAČENIMI PROTITELESI	21
3.4 DOLOČANJE 8-IP S POSREDNO TEHNIKO – Z OZNAČENIMI ANTIGENI	23
3.5 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	26

4	REZULTATI	27
4.1	PRIMERJAVA REZULTATOV MED SKUPINAMA NOSEČNIC	28
4.1.1	OPISNA STATISTIKA	28
4.1.2	TEST NORMALNE PORAZDELITVE.....	29
4.1.3	UGOTAVLJANJE RAZLIK V KONCENTRACIJAH OZNAČEVALCEV OS MED SKUPINAMA	30
4.2	OBRAVNAVA CELOTNE SKUPINE NOSEČNIC	31
4.2.1	UGOTAVLJANJE RAZLIK V KONCENTRACIJAH OZNAČEVALCEV OS V RAZLIČNIH MEDIJIH.....	33
4.2.2	MOČ POVEZAVE MED SPREMENLJIVKAMI (KORELACIJA).....	34
5	RAZPRAVA	37
6	SKLEP	41
7	LITERATURA	42

POVZETEK

Oksidativni stres je vključen v patofiziologijo mnogih bolezni. Razsežnost oksidativnega stresa zavisi od količine tvorjenih reaktivnih zvrsti in zmogljivosti antioksidativne obrambe v telesu. Normalna nosečnost je stanje oksidativnega stresa. Če je le-ta povišan, raziskave nakazujejo na pogostejši pojav zapletov med nosečnostjo. Uporaba označevalcev oksidativnega stresa za vrednotenje le-tega in iskanje povezav s pojavom bolezni je vedno bolj v porastu. Pri nosečnicah se predvsem pojavlja zanimanje, ali se stres, opažen pri materi, odraža tudi pri plodu.

V okviru moje naloge smo vrednotili oksidativni stres pri nosečnicah, katere so opravile amniocentezo, diagnostični test za odkrivanje kromosomskih nepravilnosti. Pozornost smo usmerili na dva biološka označevalca oksidativnega stresa, to sta 8-izoprostan in 8-hidroksideoksigvanozin. Za določitev njunih koncentracij v urinu in amnijski tekočini nosečnic smo v obeh primerih uporabili kompetitivni encimsko-immunski test.

Nosečnice, vključene v raziskavo, smo razdelili v dve skupini. V prvi skupini so bile preiskovanke, ki so se odločile za poseg amniocenteze zaradi svoje starosti ali lastne želje. Drugo skupino so predstavljale nosečnice, ki so bile napotene na amniocentezo zaradi visokega tveganja iz presejalnih testov za rojstvo otroka s kromosomskimi nepravilnostmi. Preverili smo, če se količina oksidativnega stresa med skupinama razlikuje in ugotovili, da so koncentracije označevalcev med skupinama primerljive, zato smo dalje skupini združili in obravnavali kot celoto. Preučili smo koncentracije obeh označevalcev v urinu in amnijski tekočini. Vrednosti le-teh v urinu so statistično značilno višje kot v amnijski tekočini. Med koncentracijo 8-hidroksideoksigvanozina v urinu in amnijski tekočini ni korelacije, enako velja tudi za 8-izoprostan. Spremembe v plodovem okolju torej ne korelirajo s spremembami pri materi, kar izniči možnost uporabe urinskih vzorcev matere za napoved stanja pri plodu. Preverili smo tudi korelacijo med obema ovrednotenima označevalcema v enakih medijih. Rezultati, tako v urinu kot v amnijski tekočini, niso pokazali statistično značilnih korelacij, iz česar zaključimo, da se označevalca v organizmu spreminjata neodvisno eden od drugega. Poleg tega smo pokazali, da pri našem vzorcu koncentracija označevalcev ne narašča s starostjo nosečnic.

ABSTRACT

Oxidative stress is associated with pathophysiology of many diseases. The extent of oxidative stress depends on the amount of reactive species produced and efficiency of antioxidant defense mechanism. Normal pregnancy is considered as a condition of oxidative stress. Many studies implicate elevated oxidative stress with higher rate of complications during pregnancy.

Our aim was to evaluate oxidative stress within the group of pregnant women who underwent amniocentesis to exclude chromosomal abnormalities. We analysed two biomarkers of oxidative damage: 8-isoprostane and 8-hydroxydeoxyguanosine in two types of body fluids, that is urine and amniotic fluid. We determined the concentration of biomarkers by competitive Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay. The group of pregnant women was divided in two. The first group was represented by women who decided for amniocentesis because of their age or their own wish. Pregnant women with high risk for having child with chromosomal abnormalities, discovered in first-trimester screening, were the second group of investigation. We examined if the quantity of oxidative stress differs between the groups. There were no statistical differences in biomarker levels between the groups, so we merged the groups and continued testing within the whole group. Concentrations of biomarkers in urine are significantly higher than in amniotic fluid. We examined the relationship between biomarkers in amniotic fluid and urine. There was no correlation between 8-hydroxydeoxyguanosine in amniotic fluid and urine, as well we can affirm the same hypothesis for 8-isoprostane. Our finding state is that alternations of oxidative stress within fetus do not correlate with alternations of oxidative stress within mother. Regarding this we cannot use oxidative stress biomarkers from urine samples of pregnant women as indicator of oxidative stress present within fetus. This study demonstrates also that there is no statistically significant correlation between 8-hydroxydeoxyguanosine and 8-isoprostane in urine and amniotic fluid. From this we conclude that concentrations of biomarkers are not dependent from each other. The statistics also excluded the associations between the age of pregnant women and concentrations of biomarkers.

SEZNAM OKRAJŠAV

AC...amniocenteza

ACh...acetilholin

AChE...acetilholin-esteraza

AFP... alfa-fetoprotein

AO...antioksidanti

AT...amnijska tekočina

CAT...katalaza

DNK...deoksiribonukleinska kislina

DS...Downov sindrom

EIA...encimski imunski test (*Enzyme ImmunoAssay*)

ELISA...encimski imunski test (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

OS...oksidativni stres

RS...reaktivne zvrsti

SOD...superoksidna dizmutaza

TBARS...s tiobarbiturno kislino reagirajoče snovi (*ThioBarbituric Acid Reactive Substances*)

UZ...ultrazvok

8-OHdG...8-hidroksi-2'-deoksigvanozin / 8-hidroksideoksigvanozin

8-isoPGF₂...8-izoprostaglandin-F_{2α}

8-IP...8-izoprostan

β-hCG...beta humani horijev gonadotropin (*β-human Chorionic Gonadotrophin*)

PAPP-A... nosečniški plazemski protein A (*Pregnancy Associated Plasma Protein A*)

1 UVOD

1.1 OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres (OS) opredeljuje stanje, ki nastopi v telesu zaradi neravnovesja med prooksidanti in antioksidanti, v prid prvim, in lahko vodi do možnih poškodb celic. Razlog za oksidativni stres je lahko prekomerna tvorba reaktivnih zvrsti, kakor tudi pomanjkljiva antioksidativna obramba telesa (¹).

Za oksidativni stres velja, da je vključen v razvoj mnogih bolezni, kot na primer ateroskleroza, hipertenzija, sladkorna bolezen, rakava in nevrodegenerativna obolenja, itd. Normalna nosečnost sama je prav tako stanje oksidativnega stresa. V telesu nosečnice na primer kroži večje število oksidiranih lipoproteinov z nizko gostoto in je zmanjšana celokupna antioksidativna zaščita v primerjavi z nenosečimi ženskami. OS je tako vključen tudi v patofiziologijo mnogih zapletov tekom nosečnosti. Negativen vpliv oksidativnega stresa izhaja predvsem iz radikalskih poškodb bioloških molekul (proteini, lipidi, DNK) (^{1, 2, 3}).

1.1.1 REAKTIVNE ZVRSTI

Kot reaktivne zvrsti bi opredelili radikale in neradikale, ki lahko nenadzorovano oksidirajo gradnike celic. Ločimo reaktivne kisikove, dušikove, žveplove, klorove in bromove zvrsti (^{4, 5}). Med pomembnejše predstavnike reaktivnih zvrsti v organizmu bi uvrstili superoksidni anion ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilni radikal (OH^{\bullet}), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroperoksilni radikal (HOO^{\bullet}), dušikov oksid (NO^{\bullet}) in dušikov peroksinitrit ($ONOO^-$) (^{3, 6, 7}).

V fizioloških pogojih je v organizmu najbolj običajno prisoten kisikov radikal, superoksidni anion ($O_2^{\bullet-}$). Njegov glavni vir je mitohondrij. Prenos elektronov preko encimov vzdolž dihalne verige ni popolnoma učinkovit. Dnevno uide med 1-3% elektronov direktno na molekularni kisik, pri čemer nastane superoksidni anion. Na enak način se tvori tudi znotraj endoplazmatskega retikuluma, kjer poteka krajši prenos elektronov. Zaradi svojega naboja ne more prehajati skozi membrane. V telesu se hitro pretvarja v manj škodljive spojine, saj vstopa v reakcijo dizmutacije, pri čemer se ena molekula $O_2^{\bullet-}$ oksidira (v kisik), druga molekula pa se reducira (v vodikov peroksid) (^{1,5}).

Med najinvazivnejše radikale spada hidroksilni radikal (OH^\bullet), ki takoj ob nastanku napade biološke molekule v njegovi neposredni bližini. Življenjska doba radikala je ocenjena na 10^{-9} s. Najpogosteje nastane pri reakciji kovinskih ionov s H_2O_2 v sklopu Haber-Weissove reakcije (Slika 1). *In vivo* sta najpomembnejša katalizatorja železo in baker. Najprej se $\text{O}_2^{\bullet-}$ ob prisotnosti oksidirane oblike prehodne kovine (Fe^{3+} ali Cu^{2+}) pretvori v kisik, obenem se kovinski ioni reducirajo. Naslednja stopnja je Fentonova reakcija, kjer reducirana oblika prehodne kovine katalizira pretvorbo H_2O_2 v OH^\bullet in hidroksilni ion (OH^-)⁽⁵⁾.

Prva stopnja – nastanek kisika: $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$

Druga stopnja - Fentonova reakcija: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$

Skupna reakcija - Haber-Weissova reakcija: $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$

Slika 1: Nastanek hidroksilnega radikala (OH^\bullet) v sklopu Haber-Weissove reakcije na primeru *in vivo* katalizatorja železa⁽⁵⁾

1.1.2 VIR REAKTIVNIH ZVRSTI

V organizmu nastajajo stalno med normalnim celičnim metabolizmom, pri encimskih in redoks reakcijah (prenos elektronov). Za endogeno tvorbo reaktivnih zvrsti skrbijo mitohondriji (celično dihanje), peroksisomi, endoplazmatski retikulum (transportna veriga elektronov), citokrom P_{450} (metabolizem telesu lastnih spojin in ksenobiotikov) ter fagociti (aktivacija oksidativnega izbruha). Zunanji dejavniki odgovorni za tvorbo reaktivnih zvrsti so infrardeče in ultravijolično sevanje, ultrazvočno valovanje, onesnaženost zraka, tobačni dim, kemikalije, zdravila, ipd.^(6, 7).

1.2 OKSIDATIVNE POŠKODBE

Odzivi na pojav OS na celični ravni so različni in se lahko med seboj tudi prepletajo:

- povečana proliferacija celic,
- prilagoditev celice na zvečanje OS z uravnavanjem antioksidativnega obrambnega sistema,
- poškodba celice, pri čemer so na molekularni ravni glavne tarče lipidi, DNK, proteini in ogljikovi hidrati,
- celica odpravi oksidativno škodo s popravljivimi mehanizmi ali pa z zamenjavo poškodovanih molekul,

- celica izgubi sposobnost delitve,
- oksidativna škoda nastane v taki meri, da vodi v celično smrt preko apoptoze, nekroze ali kombinacije teh dveh mehanizmov (⁵).

Glavna posledica OS je poškodba nukleinskih kislin, lipidov in proteinov (Preglednica I). To ogroža »zdravje« celic, njihovo sposobnost za preživetje ter povzroči mnogo različnih celičnih odzivov preko tvorbe sekundarnih reaktivnih spojin, kar lahko sproži nekrozo ali apoptozo in tako vodi do celične smrti (⁸). Poškodbe razdelimo na genotoksične in epigenetične (⁹). Pri genotoksičnih poškodbah pride do dednih sprememb v strukturi DNK (spremenjeno nukleotidno zaporedje). Primer le-teh so mutacije. Epigenetične spremembe so del genomske regulacije in tudi povzročijo spremembo v izražanju genov. Za epigenetične spremembe velja, da niso neposredno zapisane v DNK zaporedju. Ločimo dve vrsti epigenetskih mehanizmov: modifikacije histonov (acetilacija, metilacija, fosforilacija) in modifikacija DNK (metilacija DNK). Tudi epigenetične poškodbe se ohranjajo v genomu skozi celične delitve in so torej dedne (^{10, 11, 12}). Teoretično vsaka poškodba katerekoli od teh biomolekul prispeva k razvoju bolezni. Oksidativni stres ima torej ključno vlogo pri patofiziologiji mnogih motenj, vključno s komplikacijami pri nosečnosti (^{1, 8}).

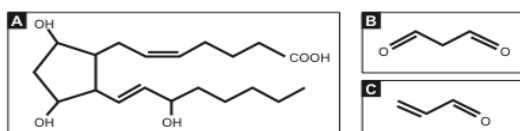
Preglednica I: Posledice napadov reaktivnih zvrsti na ključne tarče (^{5, 8})

	Tarče OS		
	DNK	Lipidi	Proteini
Produkti makromolekul ob izpostavljenosti OS	<ul style="list-style-type: none"> • oksidirane, nitrirane, deaminirane, klorove, bromove baze • produkti, ki nastanejo med aldehidi in nukleinskimi bazami 	<ul style="list-style-type: none"> • peroksidi • holesterolni oksidacijski produkti • halogenirani ter nitrirani lipidi • aldehidi (malonilaldehid, 4-hidroksi-2-nonenal,...) • izoprostani in njim sorodni produkti 	<ul style="list-style-type: none"> • -SH oksidacije • tvorba karbonilov • oksidacije, nitriranje ter halogeniranje aminokislin • tvorba peroksidov in hidroksidov
Posledice OS	<ul style="list-style-type: none"> • spremembe transkripcije • spremembe signalnih poti 	<ul style="list-style-type: none"> • zmanjšana integriteta membrane • zmanjšana membranska fluidnost 	<ul style="list-style-type: none"> • okvara funkcije encimov, receptorjev in transportnih proteinov • zvečana občutljivost za proteolizo in agregacijo

1.2.1 LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Z oksidativnim stresom sprožena peroksidacija membranskih lipidov povzroči spremembe v bioloških lastnostih membrane (npr. zmanjšana stopnja fluidnosti) in lahko vodi v inaktivacijo membranskih receptorjev in encimov ter ima za posledico okvarjene celične

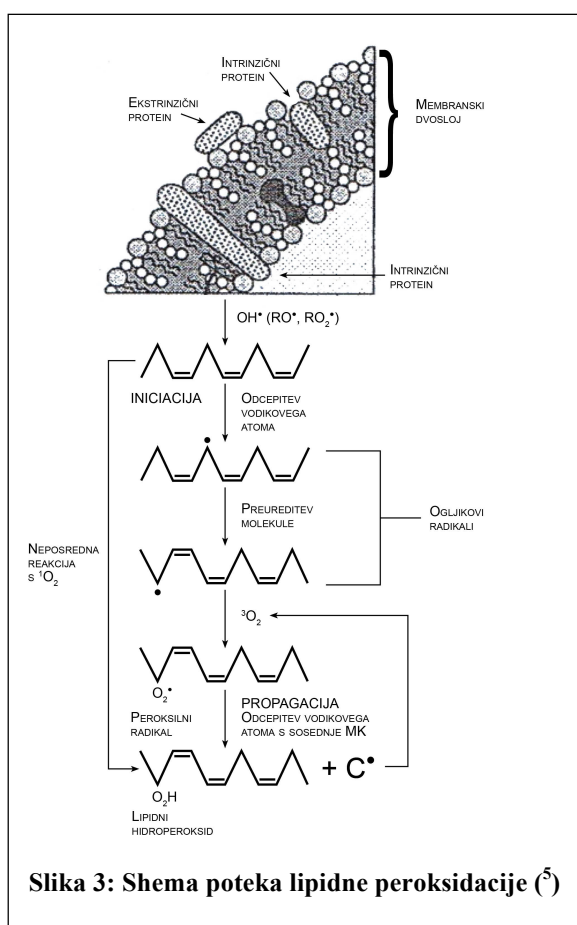
funkcije in povečano tkivno prepustnost. Lipidna peroksidacija torej prispeva k celičnim poškodbam s tvorbo oksidacijskih produktov. Le-ti produkti so lahko kemijsko aktivni in kovalentno spremenijo makromolekule. Produkti lipidne peroksidacije, kot na primer 8-izoprostan (8-IP) (Slika 2), so večinoma stabilni in jih tako lahko izmerimo v telesu kot posredne indikatorje OS (⁸).



Slika 2: Kemijske strukture označevalcev lipidne peroksidacije: A.) 8-IP, B.) malonilaldehid, C.) akrolein (⁸)

Raziskave so pokazale, da je raven produktov lipidne peroksidacije (npr. 8-IP) tekom nosečnosti v polni krvi in plazmi povečana. Značilno mesto za pojav lipidne peroksidacije pri nosečnicah je posteljica, od tam se produkti lipidne peroksidacije prenesejo v materin krvni obtok. Do drugega trimesečja koncentracija produktov lipidne peroksidacije v materinem krvnem obtoku naraste za 10 – 50% (⁶).

POTEK LIPIDNE PEROKSIDACIJE



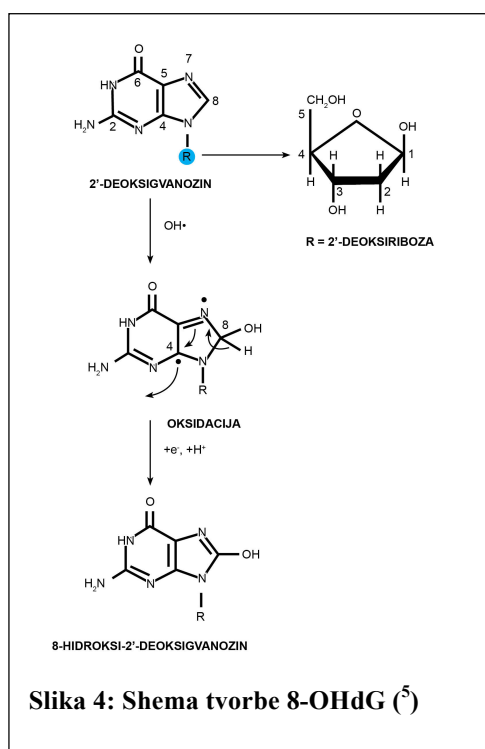
Slika 3: Shema poteka lipidne peroksidacije (⁵)

Shema lipidne peroksidacije je prikazana na sliki levo (Slika 3). Hidroksilni radikal (OH^\bullet) je tisti, ki ponavadi sproži pojav lipidne peroksidacije v organelih, ki imajo velike količine polinenasičenih maščobnih kislin (plazemska membrana), vendar lahko v primeru večkrat nenasičenih maščobnih kislin to naredijo tudi alkoksilni (RO^\bullet) in peroksilni (RO_2^\bullet) radikali. Z odcepom vodikovega atoma s stranske verige maščobne kisline se ustvari ogljikov radikal (C^\bullet). Po preureditvi atomov nastanejo konjugirani dieni in reakcija se ustavi, če na drugi strani lipidnega dvosloja pride v stik z drugim C^\bullet . To poveže molekule fosfolipidov na obeh straneh membrane,

posledično se zmanjša fluidnost in prožnost membran. Druga možnost je reakcija z membranskimi proteini, s čimer je njihovo normalno delovanje ovirano. V aerobnih pogojih je najverjetneje, da bližnja molekula kisika reagira z C•, pri čemer se tvori peroksilni radikal (RO₂•). Tvorba peroksilnega radikala je začetek verižne reakcije oksidacije lipidov. Ta peroksilni radikal je reaktivnejši od C• in ima ponovno sposobnost odcepitve vodikovega atoma s sosednje maščobne kisline, pri čemer nastaneta lipidni hidroperoksid (RO₂H) in nov ogljikov radikal. Iz lipidnega hidroperoksida nastajajo ciklični peroksidi in ciklični endoperoksidi, čemur lahko sledi razpad na aldehide (npr. malonilaldehid) in polimerizacija v druge toksične intermediate. Najugodnejše je, če reakcijo inhibira v maščobah topen vitamin E (tokoferol), ki se kopiči znotraj lipidnih membran. Le-ta reagira z RO₂• štirikrat hitreje kot lahko to naredijo sosednje maščobne kisline (^{1, 9}).

Izoprostani nastajajo *in vivo* z neencimsko, s prostimi radikali katalizirano peroksidacijo esterificirane arahidonske kisline. Fosfolipaze s hidrolizo estrske vezi omogočijo sprostitve proste oblike izoprostanov. Pokazano je, da je 8-izoprostan zanesljiv in specifičen označevalec lipidne peroksidacije, njegova *in vivo* tvorba narašča kot funkcija OS. Prisoten je v zaznavnih količinah v vseh zdravih tkivih in bioloških tekočinah. Uporablja se za spremljanje OS pri različnih kliničnih stanjih in kot indikator odziva na različna zdravila in antioksidante (⁸).

1.2.2 OKSIDACIJA DNK



DNK napadajo prevsem OH• radikali, pri čemer nastane množica produktov preko reakcij z nukleotidnimi bazami in z deoksiribozo. Med nukleotidnimi bazami je gvanin najbolj dovzeten za oksidacijo. Z adicijo OH• na 2'-deoksigvanozin nastane radikal, ki je največkrat podvržen oksidaciji, pri čemer nastane 8-hidroksi-2'-deoksigvanozin (8-hidroksidegvanozin, 8-OHdG) (Slika 4), ki omogoča ovrednotenje oksidativne okvare DNK (^{5, 8}). Le-ta ima mutagene lastnosti in druge škodljive vplive na celično delovanje (npr. pripomore k mikrosatelitni nestabilnosti in krajšanju telomer) (¹³).

Napadi reaktivnih zvrsti na sladkornem delu lahko povzročijo razcep DNK vijačnice. Interakcije s histonskimi proteini lahko vodijo do navzkrižnega premreževanja, kar ovira zvijanje kromatina, DNK popravljalne mehanizme in njeno prepisovanje. Rezultat so lahko različne mutacije ali napačno izražanje genov. Mitohondrijska DNK je še posebej občutljiva na prisotnost reaktivnih zvrsti. Razlog je v tem, da je DNK blizu mesta, kjer se v elektronski transportni verigi generirajo superoksidni anioni ($O_2^{\bullet-}$). Poleg tega mitohondrijske DNK ne ščitijo histoni in za popravilo obstajajo samo redki mehanizmi. Posledično se tudi pod običajnimi pogoji na mitohondrijski DNK naredi velika škoda, mutacije pa se pojavljajo od 5- do 10-krat pogosteje kot pri jedrni DNK. Ker je mitohondrijska DNK odgovorna za kodiranje več proteinov, vključno z encimi, ki sodelujejo v elektronski transportni verigi, lahko mutacije povzročijo motnje v proizvodnji energije in poveča se tveganje za dodaten primanjkljaj elektronov, kar stopnjuje začetni OS (¹).

Glede na nenoseče ženske je v normalni nosečnosti koncentracija 8-OHdG v urinu značilno povečana predvsem v 3. trimesečju in v zgodnji fazi poroda. Povišana koncentracija označevalca je opažena tudi v urinu nosečnic z zapleti (prezgodnji porod, izredno nizka porodna teža) v primerjavi z zdravimi nosečnicami (⁶).

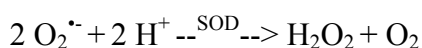
1.3 ANTIOKSIDANTI

Za ubranitev našega organizma pred prekomernim in škodljivim delovanjem reaktivnih zvrsti imamo na voljo antioksidante (AO). Gre za kakršnokoli snov, ki upočasni, prepreči ali odstrani oksidativno poškodbo tarčne molekule. Med encimske AO, ki katalitično odstranjujejo reaktivne zvrsti, uvrščamo superoksidno dizmutazo (SOD), glutation peroksidazo, glutation-S-transferazo in katalazo (CAT). Med neencimske AO uvrščamo spojine, ki zmanjšajo tvorbo reaktivnih zvrsti, tako da zmanjšajo razpoložljivost prooksidantov (železo, baker, hem) z vezavo nase. To so naslednji proteini: ceruloplazmin, transferin, laktoferin, albumin in haptoglobin. Poleg tega imamo na voljo AO, ki se "žrtvujejo", da bi ohranili pomembnejše biomolekule v organizmu. Gre za donorje elektronov, ki preferenčno reagirajo z reaktivnimi zvrstmi, preden bi imele le-te možnost napasti druge molekule. Ti AO se pretvorijo v manj reaktiven radikal, ki se ali regenerira ali pa izloči iz organizma. Predstavniki teh AO so glutation (GSH), vitamin E, bilirubin,

vitamin C (askorbinska kislina), urat, ubikinol, itd. Vitamin E na primer prispeva vodik peroksilnemu radikalu, s čimer pretrga verižno reakcijo lipidne peroksidacije, nato pa ga vitamin C ali ubikinol reducirata nazaj v prvotno obliko (^{4,5,7}).

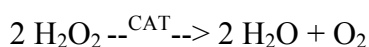
OPIS NEKATERIH AO

SOD: Je encim, ki katalizira reakcijo dizmutacije. V telesu se $O_2^{\bullet-}$ hitro pretvarja v manj škodljive spojine z reakcijo dizmutacije, ki jo katalizira SOD. Pri tem se ena molekula $O_2^{\bullet-}$ oksidira, druga molekula pa se reducira:



V glavnem ločimo dve vrsti SOD. Prva vrsta SOD v aktivnem mestu vsebuje baker in železo (Cu,Zn-SOD; SOD-1). Nahaja se predvsem v citosolu. Druga vrsta SOD v aktivnem mestu vsebuje mangan (Mn-SOD; SOD-2) in jo najdemo v mitohondriju.

CAT: Je encim, ki se nahaja zlasti v peroksisomih in služi odstranjevanju vodikovega peroksida. CAT tudi katalizira reakcijo dizmutacije. Ena molekula vodikovega peroksida se reducira v vodo, druga pa se oksidira v kisik:



Glutation peroksidaza in glutation: Glutation peroksidaza odstranjuje vodikov peroksid, tako da ga reducira v vodo, hkrati pa oksidira glutation:



Na enak način lahko odstrani tudi lipidne perokside (ROOH). Pri tem se peroksidna skupina zreducira v alkoholno:



Glutation reduktaza in glutation: Glutation je tripeptid, sestavljen iz glicina, cisteina in glutaminske kisline. Razmerje med reduciranim in oksidiranim glutationom je v normalnih celicah visoko. Pretvorbo oksidirane oblike glutationa, glutation disulfida (GSSG), v reduciran glutation omogoči encim glutation reduktaza. Ta katalizira naslednjo reakcijo:



Poleg tega, da je GSH vključen v encimsko katalizirane reakcije, lahko tudi sam neposredno reagira z reaktivnimi zvrstmi in tako zmanjša količino oksidativnih poškodb v telesu (⁵).

1.4 VLOGA REAKTIVNIH ZVRSTI PRI NOSEČNOSTI

Zavedanje, da ima OS vlogo pri nosečnosti in plodnosti je vedno večje. Vpliva na mnoge reakcije, ki imajo posledice za razvoj zarodka, tako pozitiven kot negativen. Pojavijo se spremembe v ekspresiji genov in signalizaciji transkripcijskih faktorjev ter spremembe v celičnih ciklih. Reaktivne zvrsti delujejo kot primarni in sekundarni prenašalci pri celičnem razvoju; vplivajo na rast in propad celic. So bistveni posredniki pri celični proliferaciji, diferenciaciji, apoptozi ali nekrozi ter so s tem bistvenega pomena za nekatere normalne razvojne procese (¹⁴).

Reaktivne zvrsti so med nosečnostjo vključene v procese folikulogeneze, zorenje oocita, steroidogeneze v jajčnikih, luteinizacije, vplivajo na delovanje rumenega telesca, na proces implantacije, embriogeneze in na fetoplacentni razvoj.

Nosečnost opredelimo kot stanje fiziološkega OS zaradi povečane metabolne aktivnosti v mitohondrijih posteljice (^{6, 13, 15}). Posteljica je vitalni organ v nosečnosti, ki nudi povezavo med matero in plodom ter tako omogoči prenos hranil, kisika in hormonov. Proti koncu prvega trimesečja je posteljica izpostavljena spremembam in dobi značilno diskoidno obliko. Znano je, da OS pri tem procesu igra glavno vlogo in ker se to preoblikovanje pojavi pri vsaki nosečnosti, proces smatramo za fiziološki. Razvoj posteljice se dogaja v relativno hipoksičnem okolju, kar je pomembno za zgodnjo organogenezo. V tem obdobju je zarodek najbolj občutljiv na OS iz okolja. Nizke koncentracije kisika ščitijo razvijajoči se zarodek pred s prostimi radikali povzročeno teratogenezo. Uteroplacentaren krvni obtok se vzpostavi šele proti koncu prvega trimesečja. Ob vzpostavitvi tega obtoka pride do trikratnega povečanja koncentracije kisika v posteljici. Izpostavljenost hipoksiji-reoksigenciji povzroči hitrejšo, zvišano tvorbo reaktivnih zvrsti ter oksidativne poškodbe tkiva. Odziv posteljice na višjo koncentracijo kisika in OS je povečana genska ekspresija za antioksidativne encime (SOD-1, CAT, glutation peroksidaza).

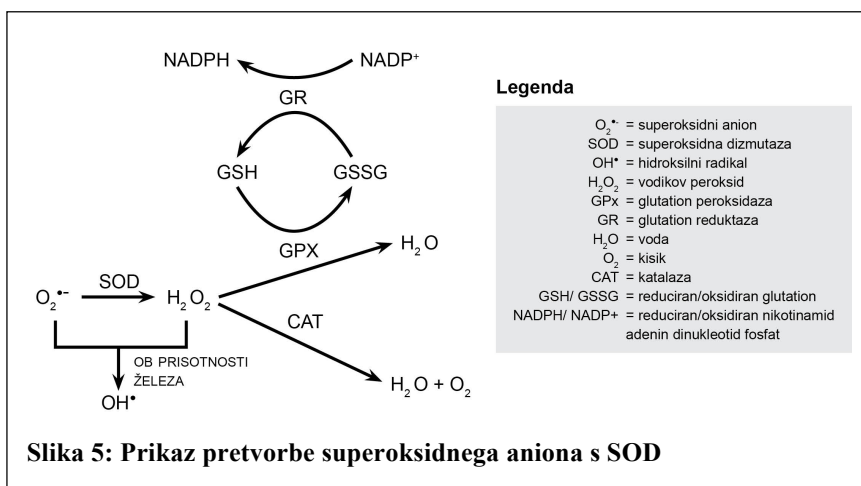
Obseg OS je torej odvisen od učinkovitosti antioksidativnega sistema posteljice in razširjenosti oksidativnih poškodb. Na to vplivajo mnogi dejavniki: dejavniki povezani z

življenjskim slogom (prehrana matere, kajenje, alkohol), dejavniki okolja (izpostavljenost onesnaženemu zraku) ter genetski dejavniki. Homeostaza se vzpostavi ob ravnovesju med delovanjem reaktivnih zvrsti in antioksidativno obrambo telesa. Neravnovesje lahko preko patofizioloških motenj (vpliv na razvoj zarodnih celic, zarodka, ploda) vodi do različnih zapletov. Povečan OS v uteroplacentarnem okolju je močno povezan z motnjami placentacije. Med najpogostejša zapleta tekom nosečnosti uvrščamo splav in preeklampsijo, oba spadata med motnje placentacije. Ostali zapleti, ki se tudi pogosto pojavijo tekom nosečnosti, so zastoj v rasti ploda, prezgodnji porod, gestacijski diabetes in inzulinska rezistenca pri potomcu (^{1, 14, 16, 17}). Raziskave kažejo, da je tudi kromosomska motnja Downovega sindroma (DS) povezana z OS.

1.5 DOWNOV SINDROM

DS ali trisomija 21 je kromosomska napaka, ki je najpogostejši genetski vzrok za pojav motenj v duševnem razvoju. Razvojne nepravilnosti, ki se pojavljajo pri DS, so poleg duševne zaostalosti različne nevrološke motnje (razvoj Alzheimerjeve bolezni), motnje imunskega odziva, nagnjenost k limfoblastnim in mieloidnim levkemijam, srčnim motnjam, sladkorni bolezni tipa 2, debelosti in prezgodnjemu staranju. DS nastopi zaradi popolne ali delne trisomije kromosoma 21. Trisomija celotnega kromosoma je prisotna v približno 95 odstotkih. Kromosom 21 vsebuje več genov, ki naj bi bili vključeni v nevrodegenerativne mehanizme. Med pomembnejše uvrščamo SOD-1, amiloidni prekursorski protein (APP), Ets-2 transkripcijski faktor in za DS kritična regija 1 stresno inducirajoč faktor. Prispevali naj bi k prezgodnjemu odmiranju nevronov, razvoju demence, za Ets-2-transkripcijski faktor pa velja tudi, da prispeva k razvoju mišičnih nepravilnosti (^{5, 18}). Večina pacientov z DS, ki dopolnijo starost 40 let, kažejo nevropatološke znake Alzheimerjeve bolezni, kot so amiloidne lehe in nevrofibrilne pentlje (¹⁹).

Številne študije so pokazale, da je fenotip Downovega sindroma povezan z OS. Etiološko gre za motnjo, ki je povezana z redoks neravnovesjem. Tega pripisujejo povečani ekspresiji SOD-1, ki jo kodira trisomski kromosom 21. Razmerje med SOD-1 in sklopom dveh encimov (CAT in glutation peroksidaza) je povišano in posledično se tvori več H₂O₂ kot ga CAT in glutation peroksidaza lahko katabolizirata. To vodi v porast OS v telesu, predvsem preko povišane tvorbe OH•. Shema pretvorbe O₂•- je prikazana na spodnji sliki (Slika 5).



DS se pojavi pri 1 od 700 novorojenčkov, pri čemer tveganje narašča z materino starostjo (Preglednica II). Več kot 20 % otrok z DS se rodi materam starejšim od 35 let (²⁰). Downov

sindrom lahko odkrivamo že pred rojstvom s prenatalno diagnostiko. Na voljo so presejalni in diagnostični testi.

Preglednica II: Vpliv materine starosti na tveganje rojstva otroka z DS (²⁰)

Starost matere (leta)	Tveganje za Downov sindrom (1 na število otrok)	Starost matere (leta)	Tveganje za Downov sindrom (1 na število otrok)
34	1 na 500	39	1 na 137
35	1 na 385	40	1 na 106
36	1 na 294	41	1 na 82
37	1 na 227	42	1 na 64
38	1 na 175	43	1 na 50

1.5.1 PRESEJALNI TESTI ZA ODKRIVANJE DOWNOVEGA SINDROMA

Presejalni test ali presejanje je preiskava, katere namen je prepoznati ljudi z večjim tveganjem za razvoj neke bolezni. Med nosečnostjo s presejalnimi testi ocenjujemo tveganje za določene prirojene nepravilnosti pri plodu. Med presejalne teste uvrščamo ultrazvočni pregled in kombinacije le-tega z določanjem koncentracije označevalcev v krvi nosečnic (Preglednica III).

Nuhalna svetlina je tekočina, ki je v zatilju ploda med 11. in 14. tednom nosečnosti. Merjenje debeline nuhalne svetline je ultrazvočna preiskava. Je presejalni test za odkrivanje plodov s kromosomskimi napakami (DS, Edwardsonov sindrom – trisomija 18, Patauov sindrom – trisomija 13), srčnimi napakami in skeletnimi anomalijami. V prvem trimesečju se kot normalno debelino nuhalne svetline obravnava vrednosti do 3 mm. Vsaki nosečnici se na podlagi starosti in opravljenih meritev s pomočjo računalniškega programa izračuna

individualno tveganje. Pri povečani oceni tveganja za kromosomsko napako (večje od 1:300) se svetuje še diagnostični test^(21, 22, 23). V prvem trimesečju se lahko v kombinaciji z nuhalno svetlino izmeri še serumska koncentracija β -humanega horijevega gonadotropina (β -hCG) in nosečniškega plazemskega proteina A (PAPP-A). Vrednosti β -hCG v prvih 8. tednih gestacije naglo naraščajo, nato pa padajo do 20. tedna, ko dosežejo plato. Pri sestavljenem testu nam nizke koncentracije obeh proteinov napovedujejo slab izid nosečnosti (povišano tveganje za DS, preeklampsijo, spontani splav). Če pri četvernem testu dobimo povišane vrednosti β -hCG in inhibina A ter znižane vrednosti nekonjugiranega estriola in alfafetoproteina (AFP), le-to povezujemo z višjim tveganjem za DS^(24, 25).

Preglednica III: Vrste presejalnih testov za oceno tveganja za pojav DS⁽²³⁾

	Vrsta presejalnega testa			
	Merjenje nuhalne svetline (UZ)	Sestavljeni test	Četverni test	Morfologija ploda (UZ)
Značilnosti testa	Izračun tveganja z računalniškim programom s spodaj navedenimi podatki:			Oceni se velikost ploda, pregled njegovih organskih sistemov
	debelina nuhalne svetline, velikost ploda, starost nosečnice	debelina nuhalne svetline, velikost ploda, starost nosečnice, serumska koncentracija β -hCG in PAPP-A	koncentracije 4 hormonov: β -hCG, inhibin A, serumski AFP, nekonjugiran estriol	
Čas izvedbe testa	Prvi trimester:		Drugi trimester:	
	med 11. in 13. tednom nosečnosti	med 11. in 13. tednom nosečnosti	po 16. tednu nosečnosti	med 20. in 24. tednom nosečnosti
Zanesljivost testa	Odkritje 75 % plodov z DS	Odkritje do 90 % plodov z DS	Odkritje 75 % plodov z DS	Odkritje 50 % plodov z DS

1.5.2 DIAGNOSTIČNI TESTI ZA ODKRIVANJE DOWNOVEGA SINDROMA

Diagnostični testi služijo prepoznavanju določene bolezni. Vrste, značilnosti ter indikacije za izvedbo diagnostičnih testov, biopsije hondrijskih celic in amniocenteze, so predstavljene spodaj v preglednicah (Preglednica IV, Preglednica V).

Diagnozo DS lahko pred rojstvom postavimo z analizo števila kromosomov v plodovih celicah (amniocenteza), kar imenujemo kariotipizacija ploda. Shema amniocenteze je predstavljena na sliki spodaj (Slika 6). Lahko naredimo tudi analizo celic posteljice (biopsija horionskih resic), saj imajo enako število kromosomov kot plod. DS se lahko potrdi ali izključi že v 48 urah, za podrobnejšo analizo kromosomov pa traja 2 – 4 tedne^(23, 26, 27).

Preglednica IV: Vrste diagnostičnih testov ⁽²³⁾

	Vrsta diagnostičnega testa	
	Biopsija horionskih resic	Amniocenteza
Značilnost testa	Analiza celic posteljice	Analiza plodovih celic pridobljenih iz amnijske tekočine (plodovnice)
Čas izvedbe testa	Med 11. in 14. tednom nosečnosti	Po 16. tednu nosečnosti
Tveganje ob izvedbi testa	0,5 – 1 % možnosti, da nosečnica zaradi posega splavi	0,5 – 1 % možnosti, da nosečnica zaradi posega splavi

Preglednica V: Medicinske indikacije za izvedbo diagnostičnega testa za DS ⁽²³⁾

Medicinske indikacije za biopsijo horionskih resic ali amniocentezo

Ultrazvočno ugotovljene nepravilnosti pri plodu

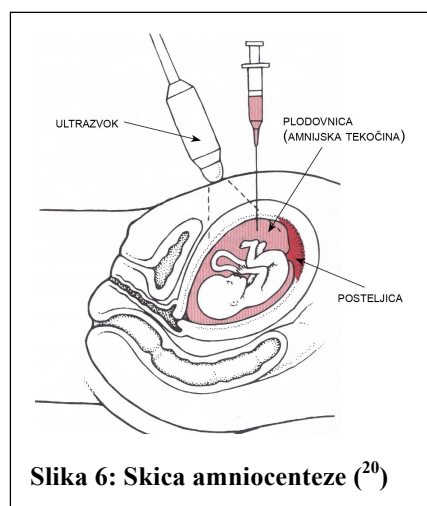
Določene genetske bolezni v družini (medicinski genetik)

Starost nosečnice ob pričakovanem dnevu poroda 37 let ali več

Tveganje 1/300 ali več pri presejalnih testih v 1. trimesečju

Tveganje 1/190 ali več pri presejalnih testih v 2. trimesečju

Predhodna nosečnost z DS



Slika 6: Skica amniocenteze ⁽²⁰⁾

1.6 VREDNOTENJE OKSIDATIVNEGA STRESA

Oksidativni stres sam po sebi nima klinične slike, s katero bi potrdili njegovo prisotnost. Opredelitev oksidativnega stanja v telesu poteka z:

- neposrednim določanjem reaktivnih zvrsti,
- merjenjem poškodb bioloških makromolekul,
- določanjem antioksidativnih encimov in celokupnega antioksidantnega statusa ⁽⁷⁾.

Označevalci OS imajo specifične lastnosti, ki jih lahko objektivno izmerimo in ovrednotimo kot indikatorje za normalne biološke procese, patogene procese ali za farmakološki odziv na terapijo. Mnogim označevalcem OS *in vivo* manjka specifičnosti, imajo premajhno občutljivost ali pa zahtevajo invazivne posege. Reaktivne zvrsti so

preveč reaktivne in imajo prekratek razpolovni čas, da bi bilo omogočeno njihovo direktno merjenje v celicah, tkivih ali telesnih tekočinah. Produkti bioloških molekul z reaktivnimi zvrstmi so stabilnejši in se tako pogosteje uporabljajo za vrednotenje OS (⁸).

Metode, ki se ponavadi uporabljajo za vrednotenje OS so: elektronska spinska resonanca, kemiluminiscenca, d-ROMs test, TBARS test, plinska in tekočinska kromatografija, ki sta lahko sklopljeni z masno spektrometrijo, encimsko-imunski testi (EIA, ELISA) in radioimunski testi. Za določanje antioksidativnega statusa v telesu merimo aktivnost antioksidativnih encimov (SOD, glutation peroksidaza, CAT, itd) ali pa določimo celokupni antioksidativni status (^{7, 8}).

1.7 KVANTITATIVNI IMUNOLOŠKI TESTI Z OZNAČEVALCEM

Temelj imunološkim tehnikam, ki se uporabljajo za dokazovanje in vrednotenje antigenov ali protiteles v vzorcih, je sama reakcija med antigenom in protitelesom. Pri testih imunske komplekse označimo z različnimi vrstami označevalcev. Najpogostejše uporabljeni so radioaktivni in encimski, na voljo so tudi fluorokromni. Kvantitativno vrednotenje nam omogoči uporaba standardov, s katerimi pripravimo umeritveno krivuljo, iz katere razberemo neznano koncentracijo snovi v vzorcu. Občutljivost testov je visoka in omogoča določitev izredno majhnih količin merjene snovi (²⁸).

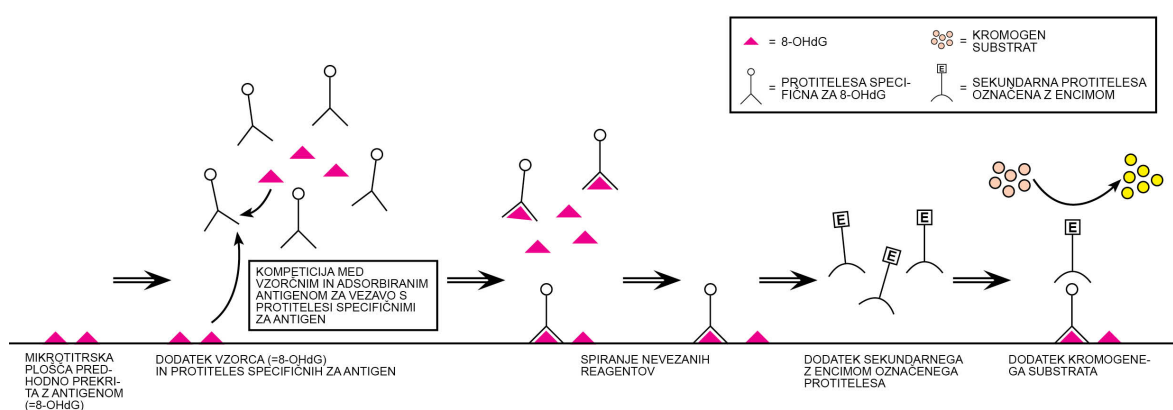
ENCIMSKO-IMUNSKI TESTI

Encimsko-imunski testi se uporabljajo za določanje antigenov ali protiteles. Imunski kompleks označimo z encimom. Ob dodatku brezbarvnega substrata se tvori obarvan produkt. Intenziteto barvne reakcije izmerimo spektrofotometrično. Osnovna razdelitev ELISA testov loči neposredno (določanje antigenov) in posredno (določanje antigenov in protiteles) tehniko, vendar obstaja mnogo različic izvedb samega testa (^{28, 29}). Spodaj sta opisana osnovna principa tehnik, ki jih bomo uporabili pri eksperimentalnem delu naloge.

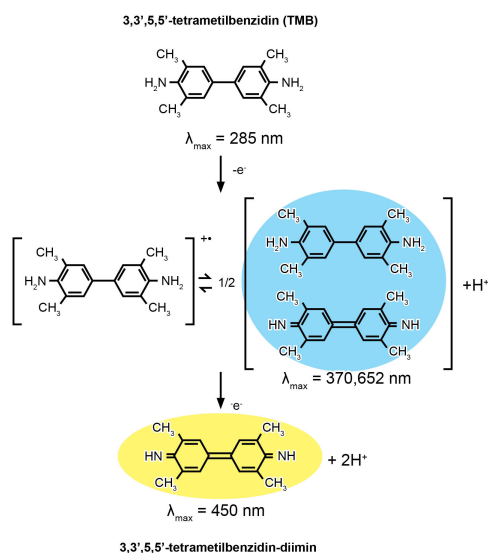
1.7.1 DOLOČANJE ANTIGENA S POSREDNO TEHNIKO – Z OZNAČENIMI PROTITELESI

Mikrotitrsko ploščo prekrijemo z antigenom. Ob dodatku vzorca in z encimom označenega protitelesa pride do kompeticije med vzorčnim in adsorbiranim antigenom za vezavo z označenim protitelesom. Inkubaciji sledi spiranje nevezanih reagentov, dodatek substrata

za encim in merjenje ekstinkcije. Intenziteta barve je sorazmerna koncentraciji označenega kompleksa protiteles z antigeni vezanimi na mikrotitrsko ploščo in obratno sorazmerna koncentraciji antigena v vzorcu ⁽²⁸⁾. V isto skupino štejemo primer določitve 8-OHdG (Slika 7), pri kateri za detekcijo uporabimo kromogen reagent 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin. Ta se ob prisotnosti hrenove peroksidaze in vodikovega peroksida na koncu pretvori v rumeno obarvan diiminski derivat (Slika 8).



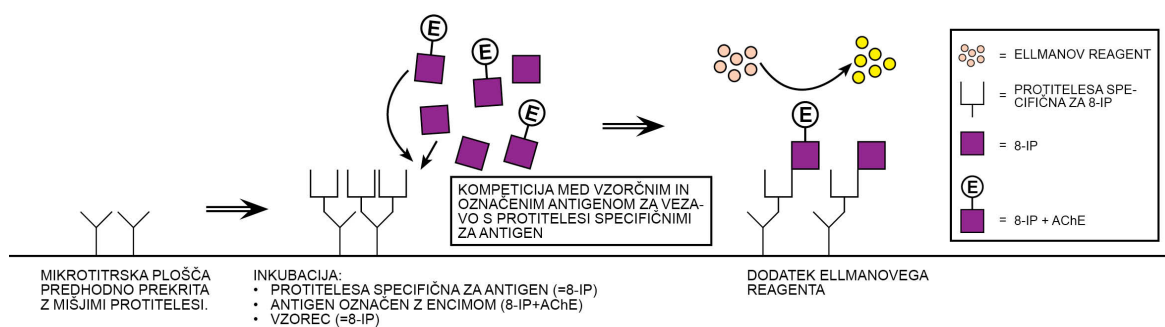
Slika 7: Shema določitve 8-OHdG



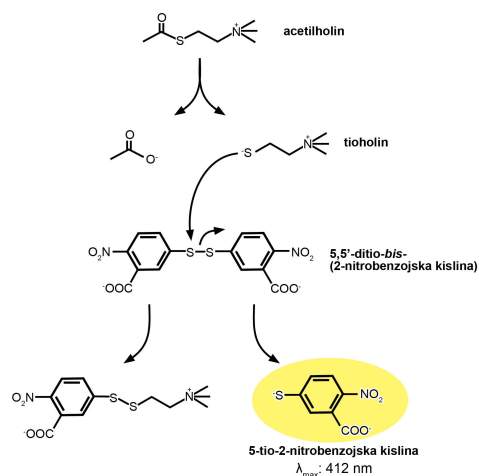
Slika 8: Reakcija katalizirana s hrenovo peroksidazo ⁽³⁰⁾

1.7.2 DOLOČANJE ANTIGENA S POSREDNO TEHNIKO – Z OZNAČENIMI ANTIGENI

Primarna protitelesa, specifična za antigen, naneseemo na mikrotitrsko ploščo. Dodamo vzorec in poznano količino z encimom označenega antigena. Med vzorčnim in označenim antigenom poteka kompeticija za vezavo s primarnimi protitelesi na plošči. Po inkubaciji, z ustreznim pufrom za spiranje, speremo nevezane reagente. Dodamo kromogeni substrat za encim, pri čemer dobimo obarvan produkt. Intenziteta svetlobe je sorazmerna koncentraciji vezanega označenega antigena in obratno sorazmerna koncentraciji antigena v vzorcu (²⁸). Na tak način smo določili 8-IP (Slika 9). Za detekcijo uporabimo Ellmanov reagent, ki ga encim acetilholinesteraza razcepi do končnega rumeno obarvanega produkta (Slika 10).



Slika 9: Shema določitve 8-IP



Slika 10: Reakcija katalizirana z acetilholinesterazo (³¹)

2 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je ovrednotiti koncentracije označevalcev oksidativnega stresa (8-OHdG in 8-IP) v urinu in amnijski tekočini nosečnic. Koncentracijo označevalcev bomo v obeh medijih izmerili z metodo encimsko-immunskega testa (ELISA).

V raziskavo bomo vključili skupino nosečnic, ki so prišle na ginekološko kliniko UKC Ljubljana na poseg amniocenteze. To skupino nosečnic bomo razdelili v dve skupini. Predstavnice prve skupine bodo nosečnice, ki so se odločile za diagnostični test zaradi svoje starosti ali lastne želje. V drugo skupino bomo uvrstili nosečnice, ki so se odločile za poseg amniocenteze na podlagi rezultatov presejalnih testov. Zanimalo nas bo, ali bo med skupinama prisotnost oksidativnega stresa različna. Pogledali bomo kako se posamezen označevalec OS obnaša v urinu in kako v amnijski tekočini ter sočasno ugotavljali razliko med obema skupinama.

V dosednji literaturi je veliko zapisanega o vplivu povišanega OS tekom nosečnosti na pojav zapletov kot so preeklampsija, splav in rojstvo otrok s prenizko telesno težo. Pomanjkljivi pa so podatki o vplivu OS med nosečnostjo na razvoj kromosomskih nepravilnosti pri plodu. Zato bomo pogledali, če vrednosti označevalcev OS pri nosečnicah z ugotovljenimi kromosomskimi nepravilnostmi izstopajo v primerjavi z nosečnicami z zdravim plodom.

Poleg tega bomo preverili ali spremembe označevalcev v amnijski tekočini korelirajo s spremembami le-teh v urinu. S tem bomo videli, če spremembe v plodovem okolju korelirajo s spremembami pri materi. Enostavno bi namreč bilo, če bi z odvzemom urina nosečnice lahko napovedali stanje oksidativnega stresa pri plodu.

Zanimale nas bodo tudi povezave med koncentracijami 8-IP in 8-OHdG v urinu in amnijski tekočini. Prav tako bomo moč povezave preverili med starostjo preiskovank in koncentracijo obeh označevalcev. Pri starejših nosečnicah namreč pričakujemo višjo stopnjo OS.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 REAGENTI, MATERIALI IN OPREMA

- 8-OHdG Check (high sensitive) ELISA kit, proizvajalec JaICA
- 8-Isoprostane EIA Kit, proizvajalec Cayman Chemical
- Drobn laboratorijski material: pipete, tipsi, steklovina (čase, merilne bučke, merilni valji, falkonke)
- Hladilnik (4°C)
- Zamrzovalnik (-20°C)
- Vibracijski mešalnik
- Centrifuga
- Destilirana voda
- Avtomatizirani analizator za izvedbo ELISA metod (Personal Lab™, proizvajalec Adaltis) skupaj s programom WorkBench 3.2

3.2 OPIS IN PRIPRAVA VZORCEV

Vzorci smo dobili iz ginekološke klinike UKC Ljubljana od nosečnic, ki so opravile poseg amniocenteze. Nosečnice so dale prvi jutranji urin, za tem jim je bila odvzeta amnijska tekočina. Vzorce smo shranili na -20°C. Analize smo izvedli na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB), v laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev.

Vzorci urina smo pred analizo odtalili in temperirali na sobni temperaturi (2 uri). Nato smo jih homogenizirali z mešanjem na vibracijskem mešalniku in centrifugirali pri pogojih: 3000 rpm, 4 °C, 15 minut. Supernatant smo potem 10-kratno redčili z ustreznim pufrom za redčenje. Vzorce amnijske tekočine smo prav tako odtalili in temperirali na sobni temperaturi 2 uri, sledila je homogenizacija vzorca z vibracijskim mešalnikom.

3.3 DOLOČANJE 8-OHdG S POSREDNO TEHNIKO – Z OZNAČENIMI PROTITELESI

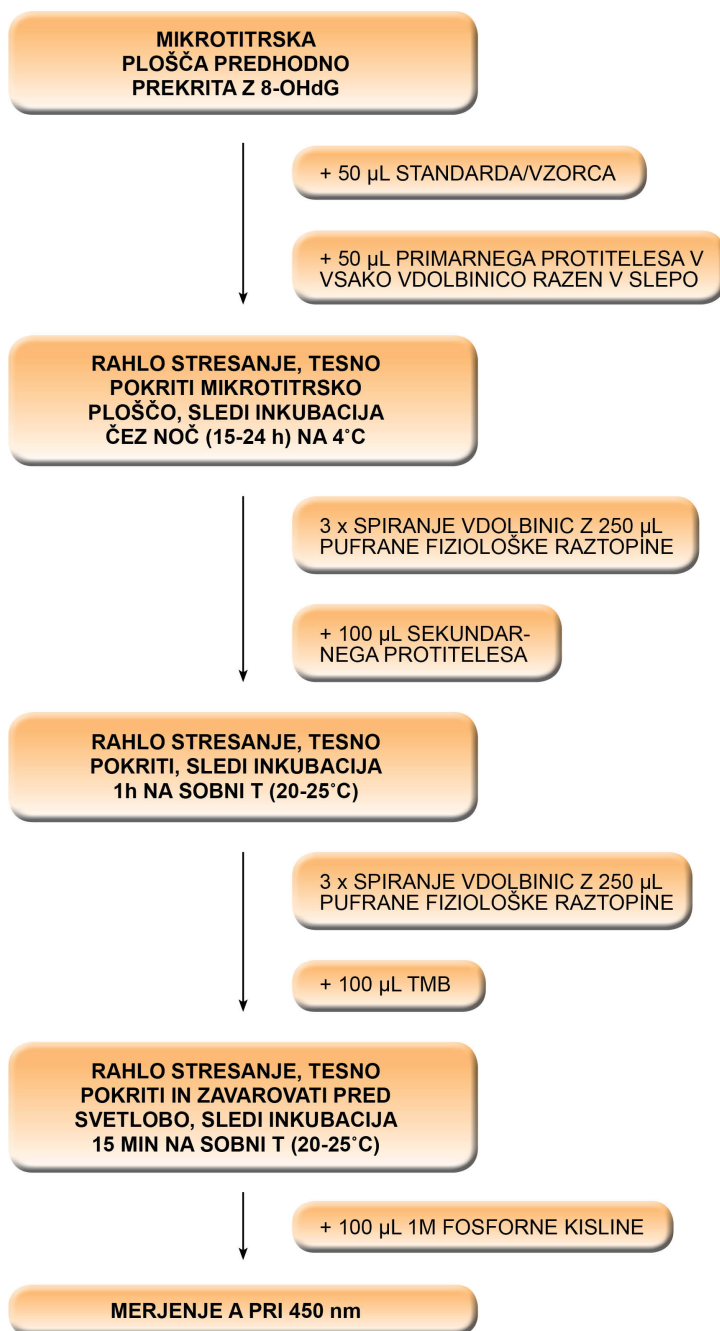
8-OHdG Check (high sensitive) ELISA kit (JaICA, Fukuroi, Japan, kataloška številka: JI51021)

- Mikrotitrna plošča predhodno prekrita z 8-OHdG
- Primarno protitelo specifično za 8-OHdG
- Raztopina za rekonstitucijo primarnega protitelesa; pufrana fiziološka raztopina
- Sekundarno protitelo konjugirano s hrenovo peroksidazo (HRP); konjugat
- Raztopina za rekonstitucijo sekundarnega protitelesa; pufrana fiziološka raztopina
- Kromogen reagent; 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB)
- Raztopina za redčenje; pufrana fiziološka raztopina z vodikovim peroksidom
- Raztopina za spiranje; 5-kratno koncentrirana pufrana fiziološka raztopina, pred uporabo se redči z destilirano vodo
- Raztopina za zaustavitev reakcije; 1M fosforna kislina
- Standardne raztopine 8-OHdG; 0,125 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 4 ng/ml, 10 ng/ml
- Zaščitni sloj za mikrotitrsko ploščo

Potek dela (Slika 11):

Na mikrotitrsko ploščo smo nanegli slepi vzorec, 6-točkovno umeritveno krivuljo standardov in pripravljene redčene vzorce. Vse reagente smo 1 uro pred začetkom analize prinesli na sobno temperaturo. Najprej smo rekonstituirali primarno protitelo v raztopini za primarno protitelo in pazili, da se le-ta popolnoma raztopi. Na mikrotitrsko ploščo smo v vdolbinice nanegli po 50 µl vzorca/standarda. Dodali smo 50 µl rekonstituiranega primarnega protitelesa v vse vdolbinice, razen v vdolbinice za slepi vzorec. Sledilo je rahlo stresanje plošče, ki smo jo potem pokrili in pustili inkubirati v hladilniku (4°C) čez noč. Po inkubaciji smo vdolbinice trikrat spirali z 250 µl pufrane fiziološke raztopine. Rekonstituirali smo konjugat in ga dodali 100 µl v vsako vdolbinico. Ponovno je sledilo stresanje plošče in nato enourna inkubacija na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo vdolbinice spet trikrat spirali z 250 µl pufrane fiziološke raztopine. Pripravili smo kromogeno raztopino (rekonstitucija v raztopini za redčenje) in jo dodali po 100 µl v

vsako vdolbinico. Po stresanju smo ploščo inkubirali 15 minut na sobni temperaturi, pri čemer je bila plošča zavarovana pred svetlobo. Sledil je še nanos 100 μl 1M fosforne kisline za zaustavitev reakcije in nato merjenje ekstinkcije pri 450 nm. Intenziteta svetlobe v vdolbinicah je obratno sorazmerna koncentraciji 8-OHdG v vzorcu. Z uporabo umeritvene krivulje (krivulja s prileganjem s 4 parametri) smo izračunali vrednosti 8-OHdG v vzorcu.



Slika 11: Shema izvedbe encimsko-imunskega testa za določitev 8-OHdG

3.4 DOLOČANJE 8-IP S POSREDNO TEHNIKO – Z OZNAČENIMI ANTIGENI

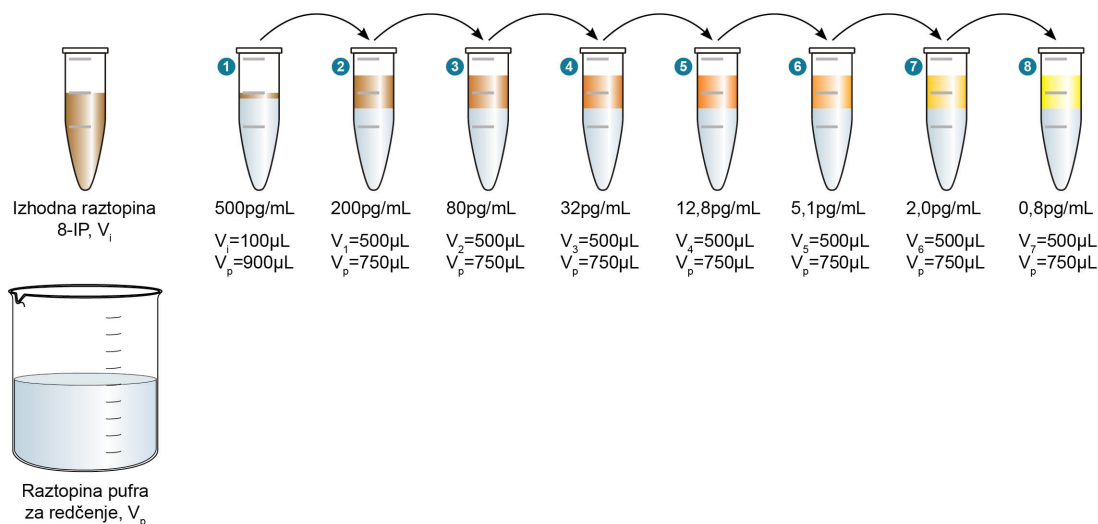
8-Isoprostane EIA Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA, kataloška številka: 516351)

- Mikrotitrna plošča predhodno prekrita z mišjimi protitelesi proti zajčjemu IgG
- Protitelesa specifična za 8-IP (zajčji antiserum)
- Z encimom (acetilholinesteraza) sklopljen 8-IP
- 8-IP standard
- Koncentrat pufrne raztopine za redčenje
- Koncentrat spiralne raztopine
- Tween 20
- Ellmanov reagent (acetilholin + 5,5'-ditio-*bis*-(2-nitrobenzojska kislina))
- Barvilo za označitev z encimom sklopljenega 8-IP
- Barvilo za označitev protiteles specifičnih za 8-IP
- Zaščitni sloj za mikrotitrsko ploščo

Priprava reagentov

- a.) Pufrna raztopina za redčenje: razredčili smo vsebino ene vial koncentrata pufrne raztopine za redčenje v 90 ml destilirane vode
- b.) Pufrna raztopina za spiranje: razredčili smo 5 ml koncentrata spiralne raztopine v 2 l destilirane vode in dodali 1 ml Tween-a 20
- c.) Z encimom sklopljen 8-IP: rekonstituirali smo vsebino vial 8-IP sklopljenega z AchE z 6 ml pufra za redčenje. Dodali smo še 60 μ l barvila za označitev z encimom sklopljenega 8-IP. Tako pripravljen reagent se shranjuje v hladilniku (2-8°C) in je uporaben 1 mesec.
- d.) Protitelesa specifična za 8-IP: protitelesa smo rekonstituirali s 6 ml pufra za redčenje in mu dodali 60 μ l barvila za označitev 8-IP protiteles.
- e.) Standardne raztopine 8-IP: pripravili smo izhodno raztopino 8-IP standarda ($c = 5$ ng/ml), tako da smo 100 μ l standarda ($c = 50$ ng/ml) razredčili z 900 μ l destilirane vode. Vzeli smo 8 falkonk, katere smo napolnili s pufrom za redčenje in stopenjsko redčili (Slika 12). Pripravili smo standardne raztopine 8-IP z naslednjimi

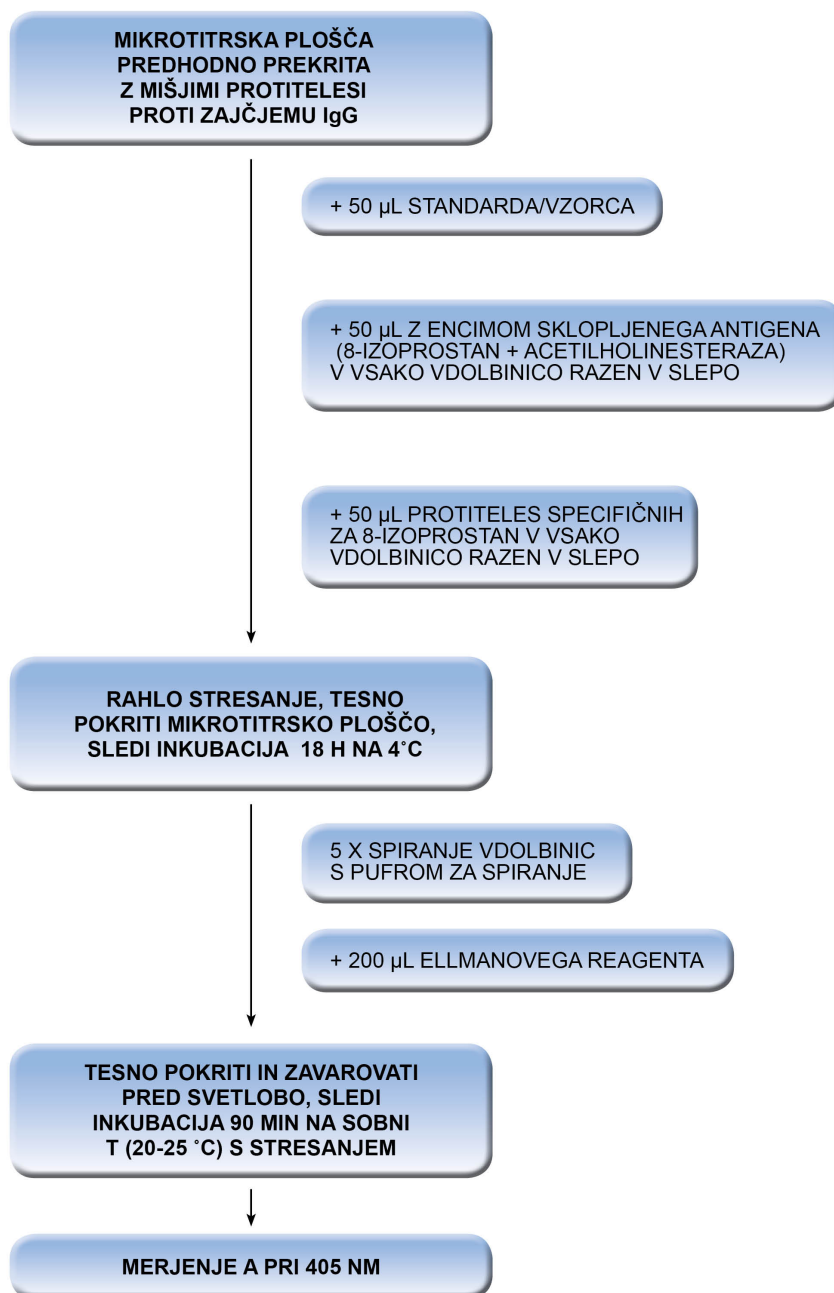
koncentracijami: 0,8, 2, 5,1, 12,8, 32, 80, 200, 500 pg/ml (= ng/l). Le-te imajo rok uporabe 1 dan.



Slika 12: Shema priprave standardov

Nanos na mikrotitrsko ploščo (Slika 13):

Na mikrotitrsko ploščo smo nanegli 8-točkovno umeritveno krivuljo in vzorce. Poleg tega smo nanegli slepi vzorec, ki nam služi za določitev absorbance Ellmanovega reagenta. Dodali smo po 50 μl standardov oz. vzorcev na vdolbinico. Z encimom označen antigen in protitelesa specifična za 8-IP smo dodali (oba po 50 μl) v vse vdolbinice razen v slepo. Ploščo smo pokrili in inkubirali 18 ur v hladilniku (4°C). Po inkubaciji smo vdolbinice 5-krat sprali s pufrom za spiranje. Rekonstituirali smo vsebino ene viala Ellmanovega reagenta z 20 ml destilirane vode in ga dodali 200 μl /vdolbinico. Sledila je 90-minutna inkubacija s stresanjem v temi. Na koncu smo pomerili absorbanco pri 405 nm in s pomočjo umeritvene krivulje (krivulja s prileganjem s 4 parametri) izračunali koncentracije 8-IP. Pomerjena absorbanca je obratno sorazmerna koncentraciji 8-IP v vzorcu. Torej smo pri višji absorbanci določili nižjo koncentracijo 8-IP.



Slika 13: Shema izvedbe analize za določitev 8-IP

3.5 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

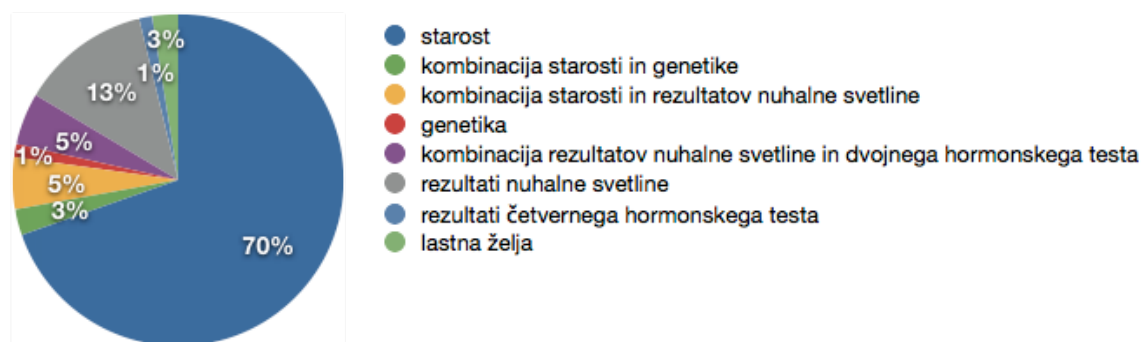
Analiza podatkov je bila narejena s pomočjo standardnih statističnih programov: Microsoft Excel in SPSS. Podatke smo statistično ovrednotili s pomočjo parametrov opisne statistike. Preverili smo porazdelitev spremenljivk, na podlagi le-te izbrali ustrezne teste ter tako nadaljevali s statistično obravnavo podatkov.

Uporaba statističnih testov za analizo naših rezultatov:

- Kolmogorov-Smirnov test – preverjanje normalnosti porazdelitve spremenljivk
- Mann-Whitneyjev test – testiranje domneve, da dva neodvisna vzorca prihajata iz iste populacije, neparametrični analog t-testu
- Spearmanov koeficient korelacije rangov – uporabili za analizo povezanosti spremenljivk, neparametrična alternativa Pearsonovemu koeficientu korelacije

4 REZULTATI

V raziskavo je bilo vključenih 79 nosečnic. Starost udeleženk je segala od 28 do 44 let, pri čemer je bila povprečna starost 36,8 let. Največ jih je bilo starih 37 let (21), kar 49 jih je bilo starih 37 let ali več. Ob dnevu preiskave so bile nosečnice med 16. in 19. tednom nosečnosti, povprečno so bile noseče 16,7 tednov. Za poseg amniocenteze se mora vedno odločiti nosečnica sama, seveda po posvetu z zdravnikom. Tudi če ustrezajo medicinski indikaciji za diagnostični test za odkrivanje DS, se od nosečnic nikoli ne sme zahtevati, da bi poseg opravile, če tega ne želijo. K odločitvi za poseg amniocenteze naših preiskovank so botrovali predvsem njihova visoka starost in rezultati presejalnih testov (Graf 1).



Graf 1: Razlogi, ki so vplivali na odločitev za poseg amniocenteze

Analizirali smo 79 vzorcev amnijske tekočine in urina, ki smo jim določili koncentracijo 8-IP in 8-OHdG. Preiskovanke smo razdelili v dve skupini. V prvo skupino smo vključili nosečnice, ki so se odločile za poseg amniocenteze zaradi visoke starosti ali zaradi lastne želje. Teh preiskovank je bilo 57 (skupina 1). V drugi skupini je bilo 22 nosečnic, ki so se odločile za poseg amniocenteze na podlagi rezultatov presejalnih testov (skupina 2). V spodnji preglednici (Preglednica VI) je predstavljena starost preiskovank v obeh skupinah.

Preglednica VI: Prikaz starosti preiskovank v obeh skupinah

Starost preiskovanke (leta)	Število preiskovank	
	Skupina 1 (N=57)	Skupina 2 (N=22)
28	0	3
29	0	2
32	0	1
33	0	1
34	1	2 *
35	2	5
36	11	2
37	17	4
38	7	1
39	7	1
40	6	0
41	2 **	0
43	3 *	0
44	1	0
Povprečna starost (leta)	38,0	34,0
	36,8	

LEGENDA: *... Ena izmed preiskovank je imela plod z DS,

** ... Ena izmed preiskovank je imela plod z Edwardsonovim sindromom

Na začetku smo med obema skupinama primerjali koncentracije obeh označevalcev OS. Preučili smo porazdelitev podatkov v obeh skupinah in na osnovi tega testirali ničelno hipotezo o enakosti povprečij obeh skupin.

4.1 PRIMERJAVA REZULTATOV MED SKUPINAMA NOSEČNIC

4.1.1 OPISNA STATISTIKA

Rezultati opisne statistike so predstavljeni spodaj v preglednici (Preglednica VII). Če primerjamo obe skupini preiskovank opazimo, glede na povprečno vrednost koncentracije, rahlo višjo vrednost označevalca 8-IP v skupini 2, predvsem v urinskih vzorcih. Potencialno razliko v koncentraciji označevalca med obema skupinama smo kasneje tudi statistično preverili (Preglednica XI, Preglednica XII). Iz rezultatov deskriptivne statistike je razvidno tudi, da je koncentracija označevalca 8-IP v urinu višja (21-krat v skupini 1 oz. 27-krat v skupini 2) kot v amnijski tekočini.

Preglednica VII: Vrednosti statističnih parametrov za 8-IP v obeh skupinah preiskovank

	8-IP v amnijski tekočini [ng/l]		8-IP v urinu [ng/l]	
	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 1	Skupina 2
Aritmetična sredina	22,7	24,0	472,4	636,3
Minimum	4,8	7,5	52,9	42,7
Maksimum	123,2	101,8	1709,1	4688,5
Standardna deviacija	21,0	19,4	422,4	980,7
Število vzorcev	57	22	57	22

Osnovne parametre deskriptivne statistike smo izračunali tudi za drug označevalec OS, to je 8-OHdG (Preglednica VIII). Podobno kot za 8-IP, opazimo tudi pri 8-OHdG višje koncentracije označevalca v urinu kot v amnijski tekočini (26-krat v skupini 1, 29-krat v skupini 2). Koncentracija označevalca v urinu in amnijski tekočini je glede na rezultate primerljiva med skupinama, rahlo višja je za skupino 1.

Preglednica VIII: Vrednosti statističnih parametrov za 8-OHdG v obeh skupinah preiskovank

	8-OHdG v amnijski tekočini [ng/l]		8-OHdG v urinu [ng/l]	
	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 1	Skupina 2
Aritmetična sredina	129	102	3361	2956
Minimum	0	0	0	300
Maksimum	1300	600	10600	7600
Standardna deviacija	214	178	3005	2099
Število vzorcev	57	22	57	22

4.1.2 TEST NORMALNE PORAZDELITVE

Nadalje smo preverili porazdelitev podatkov za obe preiskovani skupini nosečnic, za oba označevalca OS in za obe vrsti vzorca. To smo preizkusili s Kolmogorov-Smirnovim testom. Kadar je $p < 0,05$, lahko trdimo, da je porazdelitev podatkov statistično značilno drugačna od normalne porazdelitve. V nasprotnem primeru ($p > 0,05$) lahko porazdelitev označimo za normalno. V našem primeru se noben parameter ne porazdeljuje normalno, kar je razvidno iz spodnjih preglednic (Preglednica IX, Preglednica X).

Preglednica IX: Preverjanje normalne porazdelitve 8-IP v AT in urinu v obeh skupinah

8-IP v AT	Kolmogorov-Smirnov test			8-IP v urinu	Kolmogorov-Smirnov test		
	Statistic	df	p		Statistic	df	p
Skupina 1	0,320	57	0,000	Skupina 1	0,184	57	0,000
Skupina 2	0,226	22	0,005	Skupina 2	0,272	22	0,000

Preglednica X: Preverjanje normalne porazdelitve 8-OHdG v AT in urinu v obeh skupinah

8-OHdG v AT	Kolmogorov-Smirnov test			8-OHdG v urinu	Kolmogorov-Smirnov test		
	Statistic	df	p		Statistic	df	p
Skupina 1	0,306	57	0,000	Skupina 1	0,193	57	0,000
Skupina 2	0,399	22	0,000	Skupina 2	0,214	22	0,010

4.1.3 UGOTAVLJANJE RAZLIK V KONCENTRACIJAH OZNAČEVALCEV OS MED SKUPINAMA

Želeli smo ugotoviti ali je koncentracija označevalcev OS med skupinama preiskovank statistično značilno različna. Ker naši rezultati niso normalno porazdeljeni, smo se odločili za uporabo Mann-Whitneyjevega testa. Gre za neparametričen test, ki testira ničelno hipotezo, ki trdi, da dva vzorca prihajata iz iste populacije.

V spodnjih preglednicah (Preglednica XI, Preglednica XII) so prikazane vsote rangov in povprečne vrednosti rangov Mann-Whitneyjevega testa za skupino 1 in 2. Pri obeh označevalcih OS, tako v urinu kot v amnijski tekočini, se povprečne vrednosti rangov minimalno razlikujejo. Te razlike pri 5 % stopnji tveganja niso statistično značilne (Preglednica XIII). V vseh primerih lahko potrdimo ničelno hipotezo in rečemo, da vzorca prihajata iz iste populacije ($p > 0,05$). Torej zaključujemo, da pri nosečnicah, z večjim tveganjem za razvoj ploda s kromosomskimi nepravilnostmi na osnovi presejalnih testov (skupina 2), ne beležimo višje koncentracije OS v primerjavi z nosečnicami, ki so se za poseg amniocenteze odločile zaradi starosti ali lastne želje (skupina 1).

Preglednica XI: Povprečni rang in vsota rangov za 8-IP

8-IP v AT	Mann-Whitneyjev test			8-IP v urinu	Mann-Whitneyjev test		
	N	Povprečni rang	Vsota rangov		N	Povprečni rang	Vsota rangov
Skupina 1	57	38,5	2194,5	Skupina 1	57	39,9	2274,9
Skupina 2	22	43,9	965,5	Skupina 2	22	40,2	885,1

Preglednica XII: Povprečni rang in vsota rangov za 8-OHdG

8-OHdG v AT	Mann-Whitneyjev test			8-OHdG v urinu	Mann-Whitneyjev test		
	N	Povprečni rang	Vsota rangov		N	Povprečni rang	Vsota rangov
Skupina 1	57	41,0	2338,5	Skupina 1	57	40,1	2288,5
Skupina 2	22	37,3	821,5	Skupina 2	22	39,6	871,5

Preglednica XIII: Testne statistike (Mann-Whitneyjev test)

	8-IP v AT	8-IP v urinu	8-OHdG v AT	8-OHdG v urinu
Mann-Whitney U	541,500	622,000	568,500	618,500
Z	-0,935	-0,055	-0,727	-0,093
p	0,350	0,956	0,467	0,926

4.2 OBRAVNAVA CELOTNE SKUPINE NOSEČNIC

Ker med skupinama ni bilo statistično značilnih razlik, smo ju v drugem delu združili in dalje obravnavali kot enovito celoto. Na osnovi celotnega vzorca smo preverili ali se koncentracija posameznega označevalca v urinu in amnijski tekočini razlikuje.

Najprej smo pogledali osnovne opisne statistike vzorca (Preglednica XIV, Preglednica XV) in kakšna je porazdelitev podatkov (Preglednica XVI).

Opazili smo, da so aritmetične sredine koncentracije 8-OHdG v obeh vrstah vzorcev višje od koncentracije 8-IP. V amnijski tekočini je ta razlika 5-kratna, pri urinskih vzorcih pa 6-kratna.

V amnijski tekočini smo določili 8-IP povprečno koncentracijo 23 ng/l, medtem ko je v urinu povprečna koncentracija 8-IP približno 22-krat višja. Podobno razliko smo opazili med povprečnimi koncentracijami 8-OHdG; v urinu so koncentracije približno 27-krat višje od povprečne koncentracije v amnijski tekočini, ki je 121 ng/l.

Preglednica XIV: Vrednosti statističnih parametrov za označevalce OS med preiskovankami

	8-IP v [ng/l]		8-OHdG v [ng/l]	
	AT	urin	AT	urin
Aritmetična sredina	23,1	518,1	121	3248
Minimum	4,8	42,7	0	0
Maksimum	123,2	4688,5	1300	10600
Standardna deviacija	20,5	626,5	204	2775
Število vzorcev	79	79	79	79

Za lažjo primerjavo naših izmerjenih vrednosti z literaturnimi podatki, smo pridobili podatke za koncentracije kreatinina pri nosečnicah, kar nam je služilo za izračun povprečnih vrednosti označevalcev standardiziranih na kreatinin.

Preglednica XV: Pregled koncentracij označevalcev v urinu podanih na kreatinin

	8-IP v urinu		8-OHdG v urinu	
	[nmol/mmol kreatinina]	[ng/mg kreatinina]	[nmol/mmol kreatinina]	[ng/mg kreatinina]
Aritmetična sredina	0,4	1,0	3,6	9,0
Število vzorcev	78	78	78	78

Dosedanje raziskave so pokazale vrednosti 8-OHdG v urinu pri zdravih nosečnicah v razponu med 6 in 20 ng/mg kreatinina (^{17, 32}), medtem ko so za amnijsko tekočino zabeležili 0,46 nM, kar je enako 130 ng/l (¹³). Naše meritve 8-OHdG v urinu (9,0 ng/mg kreatinina) in amnijski tekočini (121,4 ng/l) se ujemajo z vrednostmi teh raziskav. Za 8-IP v urinu zdravih nosečnicah smo iz raziskav zbrali naslednje podatke: 2 ng/mg kreatinina (³³) in 2149 ng/l (³⁴). Tu opazimo rahlo odstopanje naših rezultatov, ki so nekje od 1- do 4-krat nižji. Enake razlike opazimo pri rezultatih 8-IP v amnijski tekočini (^{35, 36, 37}).

Preglednica XVI: Preverjanje normalne porazdelitve

8-IP	Kolmogorov-Smirnov test			8-OHdG	Kolmogorov-Smirnov test		
	Statistic	df	p		Statistic	df	p
V urinu	0,230	79	0,000	V urinu	0,173	79	0,000
V AT	0,292	79	0,000	V AT	0,332	79	0,000

Iz zgornje preglednice (Preglednica XVI) je razvidno, da se naši rezultati ne porazdeljujejo normalno ($p < 0,05$).

4.2.1 UGOTAVLJANJE RAZLIK V KONCENTRACIJAH OZNAČEVALCEV OS V RAZLIČNIH MEDIJIH

V drugem delu smo želeli preveriti, če se vrednosti označevalcev v urinu statistično značilno razlikujejo od tistih v amnijski tekočini. Tudi ko smo obravnavali vse preiskovanke kot eno skupino, se rezultati ne porazdeljujejo normalno, tako da smo se ponovno odločili za uporabo Mann-Whitneyjevega testa. Ničelna hipoteza trdi, da dva vzorca prihajata iz iste populacije oziroma da ima označevalec OS v urinu kot tudi v amnijski tekočini enako koncentracijo. Nasprotno pa alternativna hipoteza trdi, da označevalca v različnih medijih nimata enakih koncentracij.

V preglednici spodaj (Preglednica XVII) so prikazane vsote rangov in povprečne vrednosti rangov za oba označevalca. Pri obeh označevalcih OS je razvidno, da so povprečne vrednosti rangov v urinu višje od vrednosti v amnijski tekočini. Te razlike so pri 5 % stopnji tveganja statistično značilne (Preglednica XVIII), saj v obeh primerih zavrnamo ničelno hipotezo in rečemo, da imata označevalca v različnih medijih statistično različne koncentracije ($p < 0,05$). Koncentracije označevalcev v urinu so višje od tistih v amnijski tekočini.

Preglednica XVII: Pregled vsote rangov in vrednosti povprečnega ranga za 8-IP in 8-OHdG

8-IP	Mann-Whitneyjev test			8-OHdG	Mann-Whitneyjev test		
	N	Povprečni rang	Vsota rangov		N	Povprečni rang	Vsota rangov
V urinu	79	118,5	9363,0	V urinu	79	116,9	9231,5
V AT	79	40,5	3198,0	V AT	79	42,1	3329,5

Preglednica XVIII: Testne statistike Mann-Whitneyjevega testa

	8-IP	8-OHdG
Mann-Whitney U	38,000	169,500
Z	-10,719	-10,430
p	0,000	0,000

4.2.2 MOČ POVEZAVE MED SPREMENLJIVKAMI (KORELACIJA)

KORELACIJA MED KONCENTRACIJO OZNAČEVALCA V RAZLIČNIH MEDIJIH

Kljub temu, da smo pokazali, da so vrednosti označevalcev v urinu mnogo višje od tistih v amnijski tekočini, smo preverili če obstaja korelacija med koncentracijo označevalca v različnih medijih. Ugotavljali smo povezavo med stopnjo OS pri plodu in materi.

Korelacijo med našimi spremenljivkami smo izračunali s Spearmanovim koeficientom korelacije rangov (ρ), ki se uporablja za oceno stopnje povezanosti spremenljivk, ki niso porazdeljene normalno. Vrednosti koeficienta korelacije ranga segajo od vrednosti -1 do +1. Vrednost -1 nam nakaže maksimalno negativno korelacijo, obratno nam vrednost +1 pomeni maksimalno pozitivno korelacijo. V primeru, da je koeficient korelacije enak 0, med spremenljivkama ni nobene povezanosti (³⁸). Dalje korelacijo lahko opredelimo kot močno, če je koeficient korelacije večji od 0,5; srednje močno, če je koeficient korelacije med 0,3 in 0,5; šibko, če je koeficient korelacije med 0,1 in 0,3; neznatno, če je koeficient korelacije manjši od 0,1 (³⁹).

V obeh naših primerih vidimo (Preglednica XIX), da med označevalcema v različnih medijih ni korelacije. Koeficient korelacije je enak 0.

Preglednica XIX: Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije za 8-IP in 8-OHdG v različnih medijih

		8-IP v AT	8-IP v urinu			8-OHdG v AT	8-OHdG v urinu
8-IP v AT	ρ	1,000	0,040	8-OHdG v AT	ρ	1,000	0,007
	p	/	0,725		p	/	0,950
	N	79	79		N	79	79

LEGENDA: ρ ... Spearmanov koeficient korelacije

KORELACIJA MED OBEMA OZNAČEVALCEMA V ENAKIH MEDIJIH

V sklopu analitike smo določili dva različna označevalca OS, 8-IP kot pokazatelja lipidne peroksidacije in 8-OHdG kot označevalca poškodb na nukleinskih kislinah. Zanimalo nas je, ali obstaja pozitivna korelacija med obema označevalcema v enakih medijih. To smo ponovno izvedli z računanjem Spearmanovega koeficienta korelacije rangov.

Pri prvi hipotezi smo trdili, da obstaja pozitivna korelacija med 8-IP in 8-OHdG v urinu. Izračunan korelacijski koeficient med tem dvema spremenljivkama kaže na šibko korelacijo ($\rho = 0,2$), vendar vrednost ni statistično značilna. Z drugo hipotezo smo preverili, če obstaja pozitivna korelacija med obema označevalcema v amnijski tekočini. Tu nam izračunan koeficient korelacije ($\rho = 0,1$) prav tako pokaže, da je med označevalcema zelo šibka korelacija, ki tudi ni statistično značilna. Korelacije so predstavljene spodaj v preglednici (Preglednica XX).

Preglednica XX: Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije za oba označevalca v urinu in v AT

		8-IP v urinu	8-OHdG v urinu			8-IP v AT	8-OHdG v AT
8-IP v urinu	ρ	1,000	0,221	8-IP v AT	ρ	1,000	0,079
	p	/	0,050		p	/	0,490
	N	79	79		N	79	79

LEGENDA: ρ ... Spearmanov koeficient korelacije

KORELACIJA MED STAROSTJO NOSEČNICE IN KONCENTRACIJO OZNAČEVALCA

Številne študije so pokazale, da ima OS pri nosečnici vpliv na pojav Downovega sindroma pri otroku. Ob dejstvu, da tveganje za Downov sindrom narašča z materino starostjo, nas je zanimalo, ali se tudi vrednosti označevalcev OS višajo s starostjo.

Iz spodnje preglednice (Preglednica XXI) je razvidno, da obstaja negativna šibka korelacija med koncentracijo 8-IP (urin in AT) in starostjo nosečnice ($\rho = -0,1$), vendar ta ni statistično značilna ($p > 0,05$). Med starostjo preiskovank in koncentracijo 8-OHdG ni korelacije v nobenem mediju. Težavo pri iskanju korelacij nam tu predstavlja vzorec sam. Razpon starosti nosečnic sega od 28 do 44 let, pri čemer jih je največ starih 37 let (21), več kot polovica pa jih je starih 37 let ali več.

Preglednica XXI: Izračun Spearmanovega koeficienta korelacije med starostjo preiskovanke in koncentracijo označevalca

		8-IP v urinu	8-IP v AT	8-OHdG v urinu	8-OHdG v AT
Starost preiskovanke	ρ	-0,085	-0,085	0,003	0,016
	p	0,456	0,456	0,977	0,891
	N	79	79	79	79

LEGENDA: ρ ... Spearmanov koeficient korelacije

5 RAZPRAVA

Skupini 79 nosečnic, ki so se odločile za poseg amniocenteze, smo izmerili koncentracijo dveh poznanih označevalcev oksidativnega stresa, 8-IP in 8-OHdG, v vzorcih urina in amnijske tekočine. 8-IP je pokazatelj procesa lipidne peroksidacije, medtem ko je 8-OHdG pokazatelj oksidacije na nukleinskih kislinah. Analiziranje smo izvedli s kompetitivnim encimsko-immunskim testom (ELISA).

V prvem delu smo primerjali rezultate med dvema skupinama nosečnic. V prvo skupino smo uvrstili nosečnice, ki so se odločile za diagnostični test zaradi svoje visoke starosti ali lastne želje. Drugo skupino so sestavljale nosečnice, ki so se odločile za poseg amniocenteze na podlagi izračunanega visokega tveganja za rojstvo otroka s kromosomskimi nepravilnostmi iz presejalnih testov (vsaj 1:300). Pregled vrednosti deskriptivnih statistik je nakazal primerljivost rezultatov za posamezen označevalec OS med obema skupinama v istem mediju. Razvidno je tudi, da so vrednosti povprečnih koncentracij 8-IP, kot tudi 8-OHdG, večje v urinu kot v amnijski tekočini. S Kolmogorov-Smirnovim testom smo določili, da se naši rezultati ne porazdeljujejo normalno. To velja za obe preiskovani skupini nosečnic in za oba označevalca OS v urinu in v AT. Z uporabo neparametričnega Mann-Whitneyjevega testa smo potrdili, da so vrednosti obeh označevalcev OS, pri materi (urin) in plodu (amnijska tekočina), v obeh skupinah primerljive. Na podlagi rezultatov lahko rečemo, da nosečnice, z večjim tveganjem za razvoj ploda s kromosomskimi nepravilnostmi na osnovi presejalnih testov (skupina 2), ne kažejo višje koncentracije označevalcev OS, v primerjavi z nosečnicami iz skupine 1. To si lahko razložimo z dejstvom, da je bila večina preiskovank (43 od 57) v prvi skupini starih 37 let ali več oziroma njihova povprečna starost je bila 38 let. V drugi skupini je bila povprečna starost nosečnic 34 let. Po sedanjih priporočilih o odkrivanju kromosomskih nepravilnosti med nosečnostjo imajo nosečnice pri starosti 37 let medicinsko indikacijo za amniocentezo in za njih velja tudi višje tveganje za razvoj nezdravega ploda (1:227) v primerjavi z mlajšimi nosečnicami (1:500 pri starosti 34 let). Pri tako visoki starosti nosečnic v obeh skupinah in ob upoštevanju rezultatov presejalnih testov nosečnic v skupini 2 ter neenakomerno porazdeljenem številu nosečnic med skupinama, je torej razumljivo, da so v obeh skupinah podobne koncentracije pokazateljev OS.

V dosedANJI literaturi je veliko zapisanega o vplivu povišanega OS tekom nosečnosti na pojav zapletov kot so preeklampsija, splav in rojstvo otrok s prenizko telesno težo. Pomanjkljivi pa so podatki o vplivu OS med nosečnostjo na razvoj kromosomskih nepravilnosti pri zarodku. Rezultati ene izmed študij, ki je raziskovala vpliv OS med nosečnostjo na razvoj Downovega sindroma, so pokazali 9-krat višjo koncentracijo 8-IP v AT nosečnic, ki so nosile plod z DS, v primerjavi z nosečnicami, ki so nosile zdrav plod (³⁷). V naši raziskavi sta bili dve nosečnici, ki sta nosili plod z Downovim sindromom in ena, ki je nosila plod z Edwardsonovim sindromom. Vrednosti 8-IP v AT za te tri nosečnice so pod izračunanim povprečjem tega označevalca v AT, torej obratno od pričakovanja da bi bile višje. Gre za premajhno število primerov, da bi lahko statistično ovrednotili ali so prisotne razlike v koncentracijah označevalcev OS zdravih nosečnic in tistih s patološko nosečnostjo. Če pogledamo naše koncentracije 8-IP v AT nosečnic, ki nosijo plod z DS (8,8 ng/l in 17,8 ng/l), le-te niso v območju koncentracij pokazanih v članku, kjer so koncentracije od 542,96 ng/l do 631,64 ng/l (³⁷). Smiselno bi bilo narediti raziskavo z večjo skupino preiskovank, pri katerih bi lahko ovrednotili te razlike. Težavo pri izvajanju raziskav z določitvijo označevalcev OS v amnijski tekočini seveda predstavlja invazivnost posega amniocenteze in odstotek tveganja za splavitev zaradi opravljenega posega.

Ker nismo opazili statistično signifikantnih razlik v koncentracijah označevalcev med obema skupinama preiskovanih nosečnic, smo v drugem delu obe skupini združili in jih obravnavali kot celoto. S pomočjo Kolmogorov-Smirnovega testa smo ponovno ugotovili, da se naši rezultati ne porazdeljujejo normalno. Pri pregledu deskriptivne statistike smo opazili, da so vrednosti označevalcev OS v urinu nekajkrat višje od tistih v amnijski tekočini. To razliko smo ovrednotili za statistično signifikantno z Mann-Whitneyjevim testom. Glavni dejavnik povezovanja nosečnosti z OS je posteljica. Le-ta je bogata z mitohondriji in tako bogat vir tvorbe reaktivnih zvrsti. Je značilno mesto za pojav lipidne peroksidacije. Od tu se produkti lipidne peroksidacije v veliki meri prenesejo v materin krvni obtok. Za proste izoprostane velja, da imajo izredno kratek razpolovni čas (20 minut). Iz telesa se lahko izločijo direktno preko ledvic, ali pa se najprej metabolizirajo in nato izločijo z urinom. Za 8-IP torej obrazložimo večjo koncentracijo v urinu z večinsko porazdelitvijo označevalca iz posteljice v materin krvni obtok. Enako bi rekli za 8-OHdG. Sklepamo, da oksidativni produkti verjetno ne prehajajo v obratni smeri, od matere k

plodu, zaradi zaščitne funkcije posteljice pred vdorom prevelike količine škodljivih snovi za plod.

Odločili smo se, da primerjamo naše rezultate koncentracij 8-OHdG in 8-IP z dosedanjimi raziskavami. Primerjali smo jih s koncentracijami označevalcev pri nosečnicah z zdravim plodom. Pri tem moramo upoštevati dejstvo, da so prisotne razlike v populacijah npr. starost nosečnic, teden nosečnosti odvzema vzorca, itd, ki lahko vplivajo na rezultate. V splošnem smo opazili, da se naše izmerjene vrednosti 8-OHdG, tako v urinu kot v amnijski tekočini, ujemajo z vrednostmi zdravih nosečnic. V nasprotju so naši rezultati za 8-IP nižji od tistih v literaturi.

Za izračun korelacij med spremenljivkami smo se poslužili Spearmanovega koeficienta korelacije rangov. Preverili smo ali obstaja korelacija med koncentracijo označevalca OS v urinu in le-tega v amnijski tekočini. Spraševali smo se torej, ali zvišanje koncentracije označevalca pri materi (urin) vpliva na zvišanje vrednosti tega označevalca pri plodu (amnijska tekočina). Spearmanov koeficient korelacije smo izračunali tako za 8-IP kot tudi za 8-OHdG. V obeh primerih nismo našli korelacije med koncentracijo označevalca v dveh različnih medijih. Iz teh rezultatov bi sklepali, da spremembe v plodovem okolju ne korelirajo s spremembami v materinem okolju. Če bi ugotovili pozitivno korelacijo, bi lahko koncentracije označevalcev OS v urinu uporabili kot indikator za stanje OS pri plodu. Amniocenteza se opravlja šele od 16. tedna nosečnosti dalje in je zahteven, tudi tvegan poseg. Za razliko od le-te, je pridobitev urinskega vzorca mnogo enostavnejša, nima točno določenega obdobja izvajanja preiskave, poleg tega so v urinu prisotne višje koncentracije označevalcev, kar je lažje za kvantifikacijo.

Dalje smo preverili korelacijo med obema označevalcema OS v enakih medijih. Na vprašanje ali obstaja pozitivna korelacija med 8-IP in 8-OHdG v urinu, smo odgovorili pritrdilno. Izračunan koeficient korelacije ($\rho = 0,2$) kaže na šibko korelacijo, ki pa ni statistično značilna in rezultata tako ne moremo posplošiti na celotno populacijo. Na enak način smo preverili korelacijo med obema označevalcema OS v amnijski tekočini. Med ovrednotenima označevalcema OS v amnijski tekočini je prav tako prisotna šibka korelacija, ki ni statistično značilna. Glede na ugotovitve pri obeh hipotezah, bi rekli, da se koncentracije označevalcev v telesu spreminjajo neodvisno en od drugega. Rezultati niso v skladu s predvidevanji, da se ob pojavu OS, le-ta odraža na vseh ravneh. Vendar je treba

upoštevati kompleksnost določitve OS v telesu, ki se konstantno spreminja. Delež 8-OHdG in ostalih oksidacijskih poškodb na DNK je odvisen od razmerja med samo oksidativno škodo, ki poteka na DNK in deležem popravljalnih mehanizmov na DNK. Za izoprostane smo že poudarili, da se izredno hitro metabolizirajo. Tudi če je v istem trenutku poškodovanih več vrst tarčnih molekul OS, je njihov obseg lahko zelo različen. Poleg tega na določitve OS vpliva tudi časovni interval v katerem ga vrednotimo. Obenem ne smemo pozabiti na vlogo antioksidantov, ki lahko različno spremenijo obseg prisotnega OS.

Preverili smo tudi korelacijo med starostjo preiskovank in vrednostmi pokazateljev OS. Zaradi podatkov v literaturi, ki kažejo na vpliv OS pri nosečnici na pojavnost Downovega sindroma pri plodu in dejstva, da tveganje za Downov sindrom narašča z materino starostjo, nas je zanimalo, ali se vrednosti označevalcev OS višajo s starostjo. Obstaja negativna šibka korelacija med koncentracijo 8-IP in starostjo nosečnice, vendar ta ni statistično značilna ($p > 0,05$). Med starostjo preiskovank in koncentracijo 8-OHdG korelacije ni v nobenem mediju. To ni v skladu s pričakovanji, kjer pri starejših nosečnicah pričakujemo več OS oziroma višjo koncentracijo označevalca. Težavo pri iskanju korelacije nam tu predstavlja ustreznost vzorca preiskovank. Ozek razpon starosti nosečnic sega od 28 do 44 let, pri čemer jih je največ starih 37 let (21), več kot polovica pa jih je starih 37 let ali več. Če bi hoteli dobro ovrednotiti korelacijo med OS in starostjo nosečnic, bi morali imeti skupino nosečnic z večjim starostnim razponom.

V naši raziskavi nismo uspeli pokazati statistično značilnih korelacij. Smiselno bi bilo nadaljevati raziskavo z bistveno večjo skupino preiskovank. Tako bi lažje vrednotili:

- korelacijo med označevalci OS v urinu in amnijski tekočini ob tem, da bi upoštevali le nosečnice čim bolj enake starosti,
- vpliv OS na razvoj ploda s kromosomskimi nepravilnostmi, saj bi zajeli več nosečnic s kromosomskimi nepravilnostmi pri plodu.

Ker zbiranje podatkov traja daljše časovno obdobje, bi bilo dobro preveriti tudi vpliv stabilnosti označevalcev OS v zamrznjenih vzorcih.

V nadaljnje raziskave bi bilo smiselno vključiti tudi določitve antioksidantov, saj bi potem lažje ovrednotili v kakšni meri se odraža oksidativen stres.

Vredno bi bilo razmisliti tudi o možni uporabi katere druge analitske metode.

6 SKLEP

V okviru diplomske naloge z naslovom "Določanje 8-izoprostana in 8-hidroksideoksigvanozina v urinu in amnijski tekočini kot označevalca oksidativnega stresa med nosečnostjo" smo ugotovili naslednje:

- * Pri nosečnicah, ki naj bi glede na presejalne teste imele povišano tveganje za rojstvo otroka s kromosomskimi nepravilnostmi, ne beležimo višjega OS v primerjavi z drugo skupino nosečnic, ki se je za amniocentezo odločila zaradi starosti ali prostovoljno.
- * Koncentracije obeh označevalcev oksidativnega stresa (8-IP in 8-OHdG) v urinu so višje (20- do 30-krat) od le-teh v amnijski tekočini.
- * Med koncentracijo 8-OHdG v urinu in koncentracijo le-tega v amnijski tekočini ni korelacije. Enako velja za 8-IP, iz česar sledi trditev, da spremembe v plodovem okolju ne korelirajo s spremembami v materinem okolju.
- * Obstaja šibka korelacija med koncentracijo 8-OHdG in 8-IP v urinu, ki ni statistično značilna. Med ovrednotenima označevalcema OS v amnijski tekočini prav tako obstaja šibka, statistično neznačilna korelacija.
- * Obstaja negativna šibka korelacija med koncentracijo 8-IP in starostjo nosečnice, vendar ta ni statistično značilna. Med starostjo preiskovank in koncentracijo 8-OHdG korelacije ni v nobenem mediju.
- * Smiselno bi bilo razširiti raziskavo na večje število nosečnic in primerjati ELISA metodo s katero drugo metodo merjenja označevalcev oksidativnega stresa.

7 LITERATURA

- ¹ Burton GJ, Jauniaux E: Oxidative stress. Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology 2011; 25: 287-99.
- ² Yoshikawa T, Naito Y: What Is Oxidative Stress. Japan Medical Association Journal 2002; 45: 271-6.
- ³ Hirokazu T: Biomarkers for oxidative stress: Clinical application in pediatric medicine. Current Medicinal Chemistry 2007; 14: 339-51.
- ⁴ http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/FK/Gradiva_FK/2012-13/FK3_predavanja_2012-2013/Radikali_16102012.pdf
- ⁵ Halliwell B, Gutteridge JMC: Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press Inc. , New York, 2007: 102, 103, 132, 187-207, 222, 223, 493.
- ⁶ Rejc B, Osredkar J, Geršak K: Oksidacijski stres in nosečnost. Farmaceutski vestnik 2012; 63: 153- 61.
- ⁷ Osredkar J: Oksidativni stres. Zdravniški vestnik, 2012; 81: 393-406.
- ⁸ Dalle-Donne I, Rossi R, et al. : Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. Clinical Chemistry 2006; 52: 601-23.
- ⁹ Šuput D, Ribarič S: Temelji patološke fiziologije, Reaktivne kisikove zvrsti v patofizioloških procesih, Medicinska fakulteta, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2009: 25-31
- ¹⁰ <http://www.termania.net/slovarji/slovenski-medicinski-slovar/5516607/genotoksicen?query=genotoksičen>
- ¹¹ <http://www.termania.net/slovarji/slovenski-medicinski-slovar/5528109/mutacija?query=mutacija>
- ¹² <http://ibk.mf.uni-lj.si/teaching/objave/3epigenetika.pdf>
- ¹³ Lam P, Marczyklo HT, Mistry V, et al. : Rapid measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in human biological matrices using ultra-high-performance liquid

chromatography-tandem mass spectrometry. *Free Radical Biology and Medicine* 2012; 52: 2057-63.

¹⁴ Dennery PA: Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 2007; 81: 155-62.

¹⁵ Agarwal A, Gupta S, et al. : Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2005; 3: 28.

¹⁶ Agarwal A, Aponte-Mellado A, et al. : The effects of oxidative stress on female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2012; 10: 49.

¹⁷ Kim YJ, Hong YC, et al. : Oxidative stress in pregnant women and birth weight reduction. *Reproductive Toxicology* 2005; 19: 487-92.

¹⁸ Pagano G and Castello G: Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Down Syndrome. *Neurodegenerative Diseases*. S. Ahmad, Springer US. 2012; 724: 291-99.

¹⁹ Lott IT, Head E, et al. : Beta-Amyloid, Oxidative Stress and Down Syndrome. *Current Alzheimer Research* 2006; 3: 521-8.

²⁰ Berkow R: Veliki zdravstveni priročnik za domačo uporabo. Mladinska knjiga, Ljubljana, 2000: 1129-36, 1237-8.

²¹ <http://www.bolezen.si/ostale-zdravstvene-teme/diagnostika-in-testiranje/2234-merjenje-nuhalne-svetline>

²² http://www.ginekoloska-ambulanta-meglic.si/pregledi_nosecnost_8_12_teden.html

²³ <http://pednevro.pedkl.si/wp-content/uploads/2008/07/Sporocanje-suma-diagnoze-Downovega-sindroma.pdf>

²⁴ <http://www.aafp.org/afp/2002/0301/p915.html>

²⁵ <http://www.aafp.org/afp/2009/0115/p117.html>

²⁶ http://www.ginekoloska-ambulanta-meglic.si/nuhalna_svetlina.html

²⁷ <http://www.strah.si>

- ²⁸ V. Kotnik, Ihan A, et al. : Imunološki priročnik. Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo, Ljubljana, 2010: 19-20, 29, 42-4
- ²⁹ Vozelj M: Temelji imunologije, DZS, d. d. , Ljubljana, 2000: 112-3.
- ³⁰ Josephy DP, Eling T and Mason RP: The Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine. The journal of biological chemistry 1982; 257: 3669.
- ³¹ <https://www.caymanchem.com/pdfs/516351.pdf>
- ³² Potdar N, Singh R, et al. : First-trimester increase in oxidative stress and risk of small-for-gestational-age fetus. An International Journal of Obstetrics & Gynaecology 2009; 116: 637-42.
- ³³ Tetteh PW, Antwi-Boasiako C, et al. : Impaired renal function and increased urinary isoprostane excretion in Ghanaian women with pre-eclampsia. Research and Reports in Tropical Medicine 2013; 4: 7-13.
- ³⁴ McKinney ET, Shouri R, et al. : Plasma, urinary, and salivary 8-epi-prostaglandin $F_{2\alpha}$ levels in normotensive and preeclamptic pregnancies. American journal of obstetrics and gynecology 2000; 183: 874-7.
- ³⁵ Longini M, Perrone S, et al. : Isoprostanes in amniotic fluid: a predictive marker for fetal growth restriction in pregnancy. Free Radical Biology and Medicine 2005; 38: 1537-41.
- ³⁶ Wang CN, Chen YSJ, et al. : Elevated amniotic fluid F2-isoprostane: A potential predictive marker for preeclampsia. Free Radical Biology and Medicine 2011; 50: 1124-30.
- ³⁷ Perrone S, Longini M, et al. : Early oxidative stress in amniotic fluid of pregnancies with Down syndrome. Clinical Biochemistry 2007; 40: 177-80.
- ³⁸ Adamič Š: Temelji biostatistike, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 1989: 113-22.
- ³⁹ <http://www.medicine.ox.ac.uk/bandolier/booth/glossary/effect.html>