

Univerzitet u Beogradu

Farmaceutski Fakultet

Daniela Č. Ardalić

**Pokazatelji oksidativnog stresa,
lipidni profil i status enzima
paraoksonaza 1 tokom trudnoće bez
komplikacija i nakon porođaja**

DOKTORSKA DISERTACIJA

BEOGRAD, 2014.

University of Belgrade

Faculty of Pharmacy

Daniela Č. Ardalić

**Indicators of oxidative stress, lipid
profile and status of the enzyme
paraoxonase 1 in pregnancy without
complication and after delivery**

DOCTORAL DISSERTATION

BEOGRAD, 2014.

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

Dr sc. Slavica Spasić, profesor emeritus – mentor

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr sc. Aleksandra Stefanović, docent

Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr sc. Željko Miković, vanredni profesor

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane _____

IZRAZI ZAHVALNOSTI

Ova doktorska disertacija urađena je u Institutu za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, u saradnji sa Ginekološko - akušerskom klinikom „Narodni Front“ u Beogradu, pod rukovodstvom prof. dr Slavice Spasić.

Zahvaljujem se mentoru ovog rada prof. dr Slavici Spasić na sveukupnoj i svesrdnoj podršci, pomoći i razumevanju tokom celokupnog rada na ovoj doktorskoj disertaciji, korisnim savetima i sugestijama u svim fazama izrade.

Zahvaljujem se prof. dr Željku Mikoviću na pomoći oko definisanja grupe ispitanica i korisnim sugestijama koje su bile osnova za naša proučavanja oksidativnog stresa kod trudnica.

Najiskrenije se zahvaljujem doc. dr Aleksandri Stefanović na nesebičnoj pomoći u svim fazama izrade ovog rada, bezrezervnoj podršci i trudu koji je uložila u naš zajednički rad.

Ass dr Vesni Mandić - Marković se zahvaljujem na pomoći prilikom kliničke obrade ispitanica, korisnim savetima i sugestijama.

Dr Nikoli Ceroviću se zahvaljujem na pomoći i razumevanju u toku sakupljanja uzoraka.

Zahvaljujem se osoblju Kliničko biohemijske i hematološke laboratorije GAK „Narodni Front“ na pomoći prilikom sakupljanja uzoraka.

Najiskrenije se zahvaljujem v. prof. dr Jeleni Kotur-Stevuljević, doc. dr Aleksandri Zeljković i doc. dr Jeleni Vekić na pomoći prilikom eksperimentalne faze odredjivanja laboratorijskih parametara u laboratorijama Instituta za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta.

Svim ostalim profesorima i kolegama Instituta za medicinsku biohemiju i GAK „Narodni Front“, prijateljima koji su mi na bilo koji način pomogli najiskrenije se zahvaljujem.

POKAZATELJI OKSIDATIVNOG STRESA, LIPIDNI PROFIL I STATUS ENZIMA PARAOKSONAZA 1 TOKOM TRUDNOĆE BEZ KOMPLIKACIJA I NAKON POROĐAJA

SAŽETAK

Veliki broj studija poslednjih godina bavi se ispitivanjem potencijalnog aterogenog efekta trudnoće na zdravlje žene u kasnijem životnom dobu. Rezultati ovih istraživanja su kontradiktorni i dok jedni isključuju tu povezanost, drugi ukazuju na činjenicu da veći broj trudnoća povećava rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti (KVB) u kasnijem životu.

Povećan rizik za razvoj KVB vidi se u specifičnim metaboličkim promenama u trudnoći, a uslovljen je pre svega intenzivnim oksidativnim stresom i izmenjenim lipidnim profilom.

Oksidativni stres predstavlja poremećaj ravnoteže oksidoredukcionih procesa u organizmu koji nastaje zbog prekomernog stvaranja slobodnih kiseonikovih radikala (ROS), a koje ćelijski homeostatski mehanizmi nisu u stanju da neutrališu. Slobodni kiseonikovi radikali igraju značajnu ulogu kao sekundarni glasnici u mnogim ćelijskim signalnim procesima, omogućavajući ćelijsku homeostazu, a njihova velika reaktivnost potiče od jednog ili više nesparenih elektrona. Kada se naruši ravnoteža sa antioksidativnim sistemom, a to se dešava kada su slobodni kiseonikovi radikali u visokim koncentracijama, dolazi do ozbiljnih oštećenja bioloških molekula, što za posledicu ima niz patofizioloških i patoloških promena, pa i smrt ćelije. Zbog toga oksidativni stres ima značajnu ulogu u patogenezi mnogih komplikacija koje mogu nastati tokom trudnoće, kao što su preeklampsija, spontani pobačaj, zastoj u razvoju fetusa, gestacijski dijabetes melitus, prevremeni porođaj i dr. Takođe je pokazano da postoji veza između oksidativnog stresa majke i težine novorođenčeta. Upravo ova povezanost oksidativnog stresa i komplikacija u trudnoći, ishoda trudnoće i razvoja fetusa, predmet je intenzivnog istraživanja poslednjih godina.

U toku trudnoće dolazi do povećane koncentracije lipidnih parametara, ali i povećanog nakupljanja triglicerida u LDL česticama, usled čega one postaju male i guste čestice sa mnogo većim aterogenim potencijalom. Lipidi u malim gustim LDL

česticama su osjetljiviji na oksidativnu modifikaciju u poređenju sa LDL česticama normalne gustine. Smatra se takođe, da male guste LDL čestice doprinose endotelijalnoj disfunkciji u preeklampsiji.

Poznato je da HDL lipoproteinske čestice imaju ateroprotektivnu ulogu u metabolizmu lipida, a smatra se da ovaj protektivni učinak omogućuje enzim paraoksonaza (PON1, arildialkilfosfataza, EC 3.1.8.1) koja je sastavni deo ovih čestica i ima antioksidativna svojstva. Dokazano je da ovaj enzim ima sposobnost da spreči stvaranje novih i razgradi već stvorene lipidne hidroperokside na LDL lipoproteinskim česticama. Neki autori su utvrdili sniženu aktivnost ovog antioksidativnog HDL-enzima u stanjima koja su povezana sa povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti (diabetes mellitus, ateroskleroza), kao i da su niže aktivnosti ovog enzima uočene kod starijih ispitanika u odnosu na mlađe.

Na oksidativni status trudnica takođe utiču životne navike, ishrana, pušenje, izloženost zagađenju okoline. Pušenje dovodi do povećane produkcije slobodnih radikala, smanjenja antioksidativnog kapaciteta plazme i posledično nastanka oksidativnog stresa. Aktivno i pasivno pušenje izaziva oksidativni stres i kod trudnica, a sličan efekat ima i na fetus. Težina trudnice takođe predstavlja značajan aspekt očuvanja oksidativnog balansa, a prekomerna težina doprinosi povećanju oksidativnog stresa i komplikacija u trudnoći, kao što je preeklampsija, gestacijski dijabet, hipertenzija i povećava rizik razvoja kardiovaskularnog oboljenja u kasnijem životu.

Naše istraživanje je sprovedeno na grupi od 43 zdrave trudnice, kod kojih su trudnoća i porođaj prošli bez komplikacija i 42 zdrave negravidne žene uparene po godinama. Ispitane su promene parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, lipidnih parametara, aterogenih indeksa, subfrakcija LDL i HDL čestica i aktivnost i status enzima paraoksonaza 1. Promene navedenih parametara ispitali smo u prvom, drugom, trećem trimestru, neposredno pred porođaj i sedam nedelja nakon porođaja i poredili ih sa vrednostima kontrolne grupe zdravih negravidnih žena. Ispitan je uticaj telesne težine trudnica tokom trudnoće, kao i uticaj pušenja i suplementacije vitaminima na parametre oksidativnog stresa, lipidne parametre i aktivnost enzima paraoksonaza 1. Takođe je ispitana povezanost parametara oksidativnog stresa, lipidnih parametara i aktivnosti paraoksonaze 1 sa telesnom masom, dužinom i obimom glave novorođenčadi.

Kod ispitanica su se od antropometrijskih karakteristika merili telesna masa i telesna visina da bi se izračunao indeks telesne mase (ITM), kao i dobijanje na težini tokom trudnoće. Pri svakom ispitivanju meren je i krvni pritisak.

Od bihemijskih parametara određivana je koncentracija glukoze, ukupni proteini, albumin, hsCRP, mokraćna kiselina i parametri lipidnog statusa (ukupni holesterol, trigliceridi, HDL-holesterol, LDL-holesterol, apolipoprotein AI i apolipoprotein B) korišćenjem gotovih komercijalnih testova. Iz dobijenih vrednosti lipida izračunati su aterogeni indeksi, a određene su i subfrakcije LDL i HDL čestica. Za proveru zdravstvenog stanja ispitanica određivani su i kreatinin, ureja, AST, ALT, bilirubin, kao i krvna slika.

Od parametara oksidativnog stresa određivani su koncentracija tiobarbiturna kiselina – reagujuće supstance (TBARS), produkti uznapredovale oksidacije proteina (AOPP), lipidni peroksidi (LOOH), totalni oksidativni status (TOS) i prooksidativni/antioksidativni balans (PAB). Od parametara antioksidativne zaštite, određivana je aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD), koncentracija sulfhidrilnih grupa (SH), totalni antioksidativni status (TAS), aktivnost i status enzima paraoksonaza (PON1).

Rezultati istraživanja pokazali su povećanje parametara oksidativnog stresa u trudnoći u poređenju sa kontrolnom grupom negravidnih žena, i intenziviranje rasta ispitivanih parametara razvojem trudnoće. Početak trudnoće prati sniženje parametara antioksidativne zaštite u poređenju sa zdravim negravidnim ženama, sa intenziviranjem antioksidativnog odgovora u trećem trimestru trudnoće. Nakon porođaja stanje pojačanog oksidativnog stresa je i dalje prisutno, uz odgovarajući antioksidativni odgovor. Parametri lipidnog profila u trudnoći su izmenjeni u pravcu hiperlipidemije, izmenjena je veličina i struktura HDL i LDL čestica pri čemu one postaju manje i gušće. Aktivnost enzima PON1 iako veća u odnosu na kontrolnu grupu na početku trudnoće, tokom trudnoće opada. Dobijanje na težini tokom trudnoće dovodi do porasta parametara oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite, lipidnih parametara i do sniženja vrednosti enzima PON1. Pušačke navike utiču na povećanu vrednost LDL-holesterola, TOS-a i sniženje aktivnosti PON1.

Na osnovu rezultata sprovedenog istraživanja može se zaključiti da je fiziološka nekomplikovana trudnoća stanje pojačanog oksidativnog stresa, adekvatnog antioksidativnog odgovora, sa izmenjenim lipidnim profilom u pravcu hiperlipidemije i

potencijalnim proaterogenim remodeliranjem lipoproteinskih LDL i HDL čestica u pravcu manjih i gušćih čestica. Snižena aktivnost enzima PON1 uz povećanje telesne težine i loše životne navike poput pušenja koje dalje pojačavaju stvaranje potencijalno rizičnih parametara, čine metaboličke promene u trudnoći potencijalno proaterogenim i osnovom za razvoj neke od komplikacija u trudnoći, pre svega preeklampsije.

Obzirom da zdrave trudnice imaju normalan tok trudnoće bez komplikacija, sa porođajem u predviđenom terminu i zdravom rođenom decom, navedene metaboličke promene koje su zapravo esencijalne za pravilan tok trudnoće i razvoj fetusa nalaze se pod kontrolom odgovarajućih mehanizama koji omogućavaju normalnu fiziologiju trudnoće i zdravo potomstvo.

Ključne reči: oksidativni stres, lipidni parametri, paraoksonaza, trudnoća

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj: 618.2-082 : [543.635.4 : 543.645.4] (043.3)

546.21 (043.3)

INDICATORS OF OXIDATIVE STRESS, LIPID PROFILE AND STATUS OF THE ENZYME PARAOXONASE 1 IN PREGNANCY WITHOUT COMPLICATION AND AFTER DELIVERY

ABSTRACT

A large number of studies conducted in the last couple of years deal with researching of potential atherogenic effect of pregnancy on the health of women of advanced age. The results of this research are contradictory and while some exclude the possibility of such connection, others point out that a large number of pregnancies increase the risk of development of cardiovascular diseases (CVD) later in life.

Increased risk of developing CVD can be identified in specific metabolic changes that occur during pregnancy which is primarily caused by intensive oxidative stress and changes in lipid profile.

Oxidative stress is an imbalance between oxidation and reduction processes in the body that occurs as a result of excessive generation of reactive oxygen species (ROS) which cellular homeostatic mechanisms are unable to neutralise. Reactive oxygen species play an important part as secondary messengers in many cell signalling processes, thus enabling homeostasis of cells and their high reactivity comes from one or more unmatched electrons. When the balance with antioxidant system is disturbed, which occurs as a result of high concentration of reactive oxygen species, biomolecules sustain serious damage which leads to a series of pathophysiological and pathological changes and even to cell death. For this reason, oxidative stress plays an important role in pathogenesis of many complications which may occur during pregnancy, such as preeclampsia, miscarriage, intrauterine growth restriction growth, gestational diabetes mellitus, preterm birth etc. It has also been ascertained that there is a correlation between oxidative stress of mother and weight of newborn. Precisely this correlation between oxidative stress and pregnancy complications, pregnancy outcome and fetal growth, has been a subject of extensive research over the last couple of years.

Lipid parameters increase during pregnancy, as well as the accumulation of triglycerides in LDL particles which causes them to become small and dense particles with much greater atherogenic potential. Lipids in small dense LDL particles are more sensitive to oxidative modification than LDL particles of normal density. Aside from this, LDL particles are believed to contribute to endothelial dysfunction in preeclampsia.

It is known that HDL lipoprotein particles play atheroprotective role in metabolism of lipids and this protective effect is believed to be enabled by enzyme paraoxonase (PON1, arylalkylphosphatase, EC 3.1.8.1) which constitutes an integral part of these particles and has antioxidant properties. It has been proved that this enzyme has the ability to prevent formation of new and degradation of already created lipid hydroperoxides on LDL lipoprotein particles. Some authors have found reduced activity of this antioxidant HDL enzyme in conditions connected with the increased risk of development of cardiovascular diseases (diabetes mellitus, arteriosclerosis) and observed lower activity of this enzyme in older than in younger examinees.

Oxidative status of pregnant women is also affected by lifestyle, nutrition, smoking, and exposure to environmental pollution. Smoking leads to increased production of free radicals, reduction of plasma antioxidant capacity and consequently, occurrence of oxidative stress. Active and passive smoking causes oxidative stress in pregnant women and has a similar effect on the fetus. The weight of pregnant women is also an important aspect of preservation of oxidative balance, whereas overweightness contributes to the increase in oxidative stress and complications during pregnancy, such as preeclampsia, gestational diabetes, hypertension and increased risk of developing cardiovascular diseases later in life.

Our research has been conducted on a group of 43 healthy pregnant women that went through pregnancy and labour without any complications and 42 healthy non-pregnant women paired according to their age. It consisted of examining the changes in parameters of oxidative stress and antioxidative protection, lipid parameters, atherogenic indexes, LDL and HDL subfractions and activity and status of enzyme paraoxonase 1. The changes of the above parameters have been tested in first, second, third trimester, just before labour and seven weeks after child birth and compared with the values of control group of healthy non-pregnant women. The effect of the body

weight of pregnant women as well as of smoking and vitamin supplementation to oxidative stress parameters, lipid parameters and activity of enzyme paraoxonase 1 have also been examined. Aside from this, connection of parameters of oxidative stress, lipid parameters and activity of paraoxonase 1 with body mass and length and circumference of newborn's head have been explored as well.

Body mass and body height of the examinees are the anthropometric characteristics that have been measured in order to calculate body mass index, as well as weight gain during pregnancy. Each testing included measurement of blood pressure.

The biochemical parameters that have been measured using ready-made commercial tests are glucose level, total proteins, albumin, hs-CRP, uric acid and parameters of lipid status (total cholesterol, triglycerides, HLD cholesterol, LDL cholesterol, apolipoprotein AI and apolipoprotein B). The obtained values of lipids have been used to calculate atherogenic indexes and to identify LDL and HLD subfractions. The parameters measured to determine the health condition of the examinees are creatinine, urea, AST, ALT, bilirubin and blood count.

The parameters of oxidative stress that have been determined are concentration of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS), advanced oxidation protein products (AOPP), lipid peroxides (LOOH), total oxidative status (TOS) and prooxidative/antioxidative balance (PAB). The antioxidative protection parameters that have been measured are activity of enzyme superoxide dismutase (SOD), concentration of sulfhydryl groups (SH), total antioxidant status (TAS), activity and status of enzyme paraoxonase (PON1).

The research results have shown an increase in oxidative stress parameters during pregnancy in comparison with the control group of non-pregnant women, as well as intensification of the growth of the examined parameters as the pregnancy advances. The beginning of pregnancy is followed by reduction of the parameters of antioxidative protection in comparison with healthy non-pregnant women and intensification of antioxidant response in the third trimester of pregnancy. After delivery, the state of increased oxidative stress is still present with suitable antioxidant response. The parameters of lipid profile change in pregnancy towards hyperlipidemia, the size and structure of HDL and LDL particles changes and they become smaller and denser. Although higher in comparison with the control group at the beginning of pregnancy,

the activity of PON1 enzyme decreases during pregnancy. Weight gain during pregnancy leads to an increase in parameters of oxidative stress, antioxidative protection, lipid parameters and decrease of PON1 enzyme value. Smoking habits cause an increase of LDL cholesterol and TOS and reduction of PON1 activity.

Based on the results of the conducted research, it can be concluded that physiologically uncomplicated pregnancy is a state of increased oxidative stress, suitable antioxidative response, with changed lipid profile towards hyperlipidemia and potential proatherogenic remodelling of lipoprotein LDL and HDL particles towards smaller and denser particles. Lowered activity of PON1 enzyme with increase in body weight and poor lifestyle with smoking habit which further increase development of potentially risky parameters, make metabolic changes that occur during pregnancy potentially proatherogenic, thus creating susceptibility to development of complications during pregnancy, primarily preeclampsia.

Since healthy pregnant women have normal course of pregnancy without complications, with timely delivery and healthy newborns, the presented metabolic changes which are essential for proper course of pregnancy and fetal growth are controlled by suitable mechanisms which enable normal physiology of pregnancy and healthy offspring.

Key words: oxidative stress, lipid parameters, paraoxonase, pregnancy

Scientific field: Pharmacy

Special topic: Medical biochemistry

UDC number: 618.2-082 : [543.635.4 : 543.645.4] (043.3)

546.21 (043.3)

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	METABOLIČKE PROMENE U TRUDNOĆI	1
1.2.	OKSIDATIVNI STRES I PROMENE U TRUDNOĆI	5
1.2.1.	OKSIDATIVNI STRES	5
1.2.1.1.	Štetne posledice slobodnih kiseonikovih radikala	8
1.2.2.	ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA	9
1.2.2.1.	Antioksidativni enzimi	9
1.2.2.2.	Neenzimski antioksidativni sistem	11
1.2.3.	OKSIDATIVNI STRES U TRUDNOĆI	11
1.2.4.	ANTIOKSIDATIVNI SISTEMI U TRUDNOĆI	12
1.3.	LIPIDI U TRUDNOĆI	14
1.4.	ENZIM PARAOKSONAZA 1 (PON1) I PROMENE UTRUDNOĆI	19
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	24
3.	MATERIJALI I METODE	25
3.1.	ISPITANICE	25
3.2.	METODE	27
3.2.1.	ODREĐIVANJE BIOHEMIJSKIH I HEMATOLOŠKIH PARAMETARA	28
3.2.2.	ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA	28
3.2.2.1.	Određivanje koncentracije tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBARS)	28

3.2.2.2.	Određivanje nivoa superoksid anjon radikala u plazmi	29
3.2.2.3.	Metoda za određivanje lipidnih hidroperoksida	30
3.2.2.4.	Metoda za određivanje produkata oksidativne modifikacije proteina (AOPP)	31
3.2.2.5.	Određivanje nivoa totalnog oksidativnog statusa (TOS)	33
3.2.2.6.	Određivanje nivoa prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB)	34
3.2.3.	ODREĐIVANJE PARAMETARA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE	36
3.2.3.1.	Određivanje enzima superoksid dismutaza (SOD) u plazmi	36
3.2.3.2.	Određivanje ukupnog sadržaja sulfhidrilnih grupa (SH)	37
3.2.3.3.	Određivanje nivoa totalnog antioksidativnog statusa u serumu (TAS)	38
3.2.4.	ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA PARAOKSONAZA 1 (PON 1)	39
3.2.4.1.	Određivanje aktivnosti paraoksonaze prema paraoksonu	39
3.2.4.2.	Određivanje aktivnosti paraoksonaze prema diazoksonu	40
3.2.5.	RAZDVAJANJE LDL I HDL SUBFRAKCIJA	41
3.3.	STATISTIČKA ANALIZA	46
4.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA	47
4.1.	DEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE ISPITANICA	47
4.2.	OSNOVNI BIOHEMIJSKI I HEMATOLOŠKI PARAMETRI	49
4.3.	REZULTATI ISPITIVANJA PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA I ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE	52
4.3.1.	REZULTATI ISPITIVANJA PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA	52
4.3.2.	REZULTATI ISPITIVANJA PARAMETARA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE	54
4.4.	REZULTATI ISPITIVANJA LIPIDNIH PARAMETARA	56

4.4.1.	PROMENE U VELIČINI LDL ČESTICA I RASPODELA LDL SUBFRAKCIJA TOKOM NORMALNE TRUDNOĆE	60
4.4.2.	PROMENE U VELIČINI HDL ČESTICA I RASPODELA HDL SUBFRAKCIJA TOKOM NORMALNE TRUDNOĆE	62
4.4.3.	UNIVARIJANTNA LINEARNA REGRESIONA ANALIZA NEZAVISNOG UTICAJA VELIČINE LDL I HDL ČESTICA KAO I RASPODELA SUBFRAKCIJA LDL I HDL ČESTICA U 38. NEDELJI TRUDNOĆE NA ANTROPOMETRIJSKEMERE NOVOROĐENČADI	63
4.4.4.	MULTIPLA LINEARNA REGRESIONA ANALIZA NEZAVISNOG UTICAJA RASPODELA SUBFRAKCIJA LDL I HDL ČESTICA U 38. NEDELJI TRUDNOĆE NA ANTROPOMETRIJSKE MERE NOVOROĐENČADI	65
4.5.	REZULTATI ISPITIVANJA AKTIVNOSTI ENZIMA PON1	67
4.5.1.	MULTIPLA LINEARNA REGRESIONA ANALIZA ZA ISPITIVANJE NEZAVISNOG UTICAJA ISPITIVANIH PARAMETARA NA DIAZOKSONAZNU AKTIVNOST U TREĆEM TRIMESTRU TRUDNOĆE	68
4.5.2.	MULTIPLA LINEARNA REGRESIONA ANALIZA ZA ISPITIVANJE NEZAVISNOG UTICAJA ISPITIVANIH PARAMETARA NA DIAZOKSONAZNU AKTIVNOST POSLE POROĐAJA	70
4.6.	REZULTATI ISPITIVANJA UTICAJA DEMOGRAFSKIH KARAKTERISTIKA TRUDNICA NA PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA, ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE, LIPIDNI STATUS I PON1 STATUS I AKTIVNOST	72
4.6.1.	UTICAJ INDEKSA TELESNE MASE NA PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA TOKOM TRUDNOĆE	72
4.6.2.	UTICAJ INDEKSA TELESNE MASE NA PARAMETRE ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE TOKOM TRUDNOĆE	74
4.6.3.	UTICAJ INDEKSA TELESNE MASE NA PARAMETRE LIPIDNOG STATUSA TOKOM TRUDNOĆE	76
4.6.4.	SPEARMAN-OVA NEPARAMETARSKA KORELACIONA ANALIZA ZA UTVRĐIVANJE POSTOJANJA KORELACIJE IZMEĐU PARAMETARA LIPIDNOG PROFILA I OKSIDATIVNO-STRESNOG STATUSA SA DOBIJENOM TEŽINOM TOKOM TRUDNOĆE (%)	78
4.6.5.	MULTIPLA LINEARNA REGRESIONA ANALIZA ZA ISPITIVANJE NEZAVISNOG UTICAJA ISPITIVANIH PARAMETARA NA ATEROGENI INDEKS PLAZME	80

4.6.6.	MULTIPLA LINEARNA REGRESIONA ANALIZA ZA ISPITIVANJE NEZAVISNOG UTICAJA ISPITIVANIH PARAMETARA NA PARAOKSONAZNU AKTIVNOST	81
4.6.7.	REZULTATI UTICAJA ANTIOKSIDANTNE SUPLEMENTACIJE TOKOM TRUDNOĆE I PUŠAČKIH NAVIKA TRUDNICA PRE TRUDNOĆE NA PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA, ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE, LIPIDNE PARAMETRE I AKTIVNOST ENZIMA PON1	82
5.	DISKUSIJA	88
5.1.	BIOMARKERI OKSIDATIVNOG STRESA I ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE U TRUDNOĆI BEZ KOMPLIKACIJA	88
5.2.	LIPIDI I FRAKCIJE LIPIDA U TRUDNOĆI BEZ KOMPLIKACIJA	94
5.3.	AKTIVNOST I STATUS ENZIMA PARAOKSONAZA1 (PON1) TOKOM TRUDNOĆE BEZ KOMPLIKACIJA	101
5.4.	UTICAJ DEMOGRAFSKIH KARAKTERISTIKA TRUDNICA NA PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA, ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE, LIPIDNI STATUS I AKTIVNOST PON1	104
6.	ZAKLJUČCI	108
6.1.	OPŠTI ZAKLJUČCI	111
7.	LITERATURA	113

LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

ABTS - azinobis-etilbenzotiazolin sulfonska kiselina

ADP - adenzin-difosfat

AIP - aterogeni indeks plazme

ALT - alanin aminotransferaza

ANOVA - analiza varijanse

AOPP - produkti uznapredovale oksidacije proteina

ApoAI - apolipoprotein AI

ApoB - apolipoprotein B

ATP - adenzin trifosfat

AST - aspartat aminotransferaza

CAT - katalaza

CETP - holesterol estar transportni protein

CI - interval pouzdanosti

DMSO - dimetilsulfoksid

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

DTNB - 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzojeva kiselina

DZO - diazoksonaza, aktivnost enzima paraoksonaza prema supstratu diazoksonu

DZOazna - diazoksonazna aktivnost

EDTA - etilendiamintetrasirćetna kiselina

GPX - glutation peroksidaza

GSR - glutation reduktaza

GST - glutation-S- transferaza

H₂O₂ – vodonik peroksid

Hb - hemoglobin

HCl - hlorovodonična kiselina

Hct - hematokrit

HDL - HDL lipoproteinske čestice

HDL hol - HDL holesterol

HKU - hidrogen peroksid komplementarne jedinice

HL - hepatička lipaza

HOCl - hipohlorna kiselina

hsCRP - visoko senzitivni C reaktivni protein

ITM - indeks telesne mase

IUGR - intrauterini zastoje u rastu fetusa

KVB - kardiovaskularna bolest

LDL - LDL lipoproteinske čestice

LDL –hol - LDL holesterol

LOOH - lipidni hidroperoksidi

LPL - lipoproteinska lipaza

MCH- prosečan sadržaj hemoglobina u eritrocitu

MCHC - prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima

MCV - prosečna zapremina eritrocita

MDA - malondialdehid

NAD⁺ - nikotinamid–adenin-dinukleotid

NADPH – nikotinamid–adenin-dinukleotid fosfat

NBT - nitrobluetetrazolijum

NO[•] - azot monoksid

NOOO⁻ - peroksinitrit

O₂^{•-} - superoksid anjon radikal

PAB – prooksidativno-antioksidativni balans

POazna - paraoksonazna aktivnost

PON1 - paraoksonaza 1

POX - paraoksonaza, aktivnost enzima paraoksonaza prema supstratu paraoksonu

ROS - reaktivna jedinjenja kiseonika

SD - standardna devijacija

SH – sulfhidrilne grupe

SOD - superoksid dismutaza

TAS - totalni antioksidativni status

TBA - tiobarbiturna kiselina

TBARS - tiobarbiturna kiselina-reagujuće supstance

TG - trigliceridi

TMB - tetrametilbenzidin

TNF - α – tumor nekroza faktor- α

TOS - totalni oksidativni status

VLDL- lipoproteini vrlo male gustine

1. UVOD

1.1. METABOLIČKE PROMENE U TRUDNOĆI

Trudnoća je dinamičko stanje, sa serijom kontinuiranih fizioloških metaboličkih promena u organizmu žene u cilju prilagođavanja potrebama rasta i razvoja fetusa, te pripremi za porođaj i laktaciju (1, 2). Promene metaboličkih parametara nesumnjivo široko variraju od žene do žene, zavisno od nutritivnog stanja pre trudnoće, veličine fetusa i životnih navika žene. Normalan razvoj fetusa zahteva odgovarajuću raspoloživost hranljivih materija kao što su glukoza, slobodne masne kiseline, nezasićene masne kiseline, aminokiseline, vitamini i minerali (1, 2).

Metaboličke promene kod trudnica dešavaju se već u ranoj trudnoći. U prvim nedeljama nakon koncepcije placenta je već formirana i počinje da luči hormone koji utiču na metabolizam svih hranljivih materija. Humani horionski gonadotropin se detektuje u serumu i urinu nekoliko dana nakon implantacije (1). Serumske koncentracije ovog hormona rastu ubrzano tokom rane trudnoće i dosežu svoj maksimum oko 60 dana nakon koncepcije. Nakon toga vrednosti isto tako brzo opadaju, da bi dosegle relativno nisku vrednost koja se održava sve do termina porođaja (1).

Humani placentalni laktogen raste progresivno tokom trudnoće, a njegova potpuna funkcija nije najjasnija (1). Međutim, obzirom da je biološki sličan hormonu rasta, moguće je da predstavlja neku vrstu faktora rasta za fetus i placentu. Ovaj hormon takođe utiče na metabolizam ugljenih hidrata i masti.

Biosinteza estrogenih hormona (estron, estradiol i estriol) je složen proces koji uključuje majku, fetus i placentu (1-3). Estrogeni, pored uticaja na matericu i druge reproduktivne organe, utiču takođe i na metabolizam ugljenih hidrata, lipida i metabolizam kostiju. Progesteron raste progresivno tokom trudnoće, relaksira glatke mišiće i utiče na atoniju gastrointestinalnog i urinarnog trakta (1, 3).

Rana faza trudnoće označava se kao anabolička faza, a kasna trudnoća koja je praćena kompleksnijim metaboličkim procesima zahvaljujući interakciji majke i fetusa, označava se kao katabolička faza (1-3).

Serumski albumin je niži 8-10% u prvih deset nedelja trudnoće (1). Obzirom da je nosač za mnoge hranjive elemente, ovo može objasniti sniženje koncentracije cirkulišućih nutrienata u tom periodu. Povećanje volumena plazme tokom trudnoće kreće se od 50 mL u 10-oj nedelji gestacije do 800 mL u 20-oj nedelji gestacije sa posledičnim opadanjem koncentracije cirkulišućih nutrienata (1-3).

Metabolizam lipida je esencijalan za razvoj nekomplikovane, zdrave trudnoće (3). Masne kiseline su važan izvor energije i važan element u sintezi ćelijskih membrana, dok je holesterol važan za sintezu steroidnih hormona, a takođe i ćelijskih membrana. Nakon prvih 10 nedelja trudnoće serumski trigliceridi su za oko 20% viši kod trudnica u odnosu na negravidne žene (1-3), a do termina porođaja dosežu vrednosti i do tri puta veće u odnosu na negravidne žene. Drugi serumski lipidi (holesterol, fosfolipidi, masne kiseline) takođe rastu tokom trudnoće, ali u manjoj meri.

Za vreme anaboličke faze trudnoće, dolazi do akumulacije masti u masnom tkivu trudnice, kao posledica povećane osetljivosti na insulin i povećanog broja insulinskih receptora u adipoznom tkivu, a time i povećane aktivnosti tkivne lipoproteinske lipaze (3). Hiperfagija, koja se povećava razvojem trudnoće, osigurava dovoljan unos supstrata putem hrane i tako podržava stvaranje depoa masti. Progesteron i kortizol takođe deluju u tom pravcu, pospešujući lipogenezu i suprimirajući lipolizu. Dakle, postoji niz mehanizama koji omogućavaju akumulaciju masti u ranoj trudnoći, pripremajući telo trudnice za složenije metaboličke zahteve kasne trudnoće. Nije u potpunosti jasno koji je to momenat koji opredeljuje akumulaciju masti u ranoj trudnoći ka njenoj mobilizaciji u zadnjem trimestru trudnoće. Smatra se da placentalni hormoni, koji su odgovorni za insulinsku rezistenciju, mogu imati u tome ključnu ulogu.

Placentalni hormon rasta, humani placentalni laktogen, leptin i tumor nekrozis faktor- α (TNF- α) su placentalni hormoni koji izazivaju insulinsku rezistenciju (3). Navedeni faktori, uključujući i stalni rast estradiola tokom trudnoće, doprinose porastu lipidnih parametara u trudnoći, tako da većina žena do kraja trudnoće razvije lipidni profil koji se kod zdravih negravidnih žena može smatrati aterogenim. U poslednje vreme sve veći je broj studija koje se bave istraživanjem eventualne povezanosti ovako izmenjenog lipidnog profila u trudnoći i razvoja kardiovaskularne bolesti majke u kasnijem životnom dobu, ali i deteta (4). Neke od njih su pokazale da postoji povezanost između broja trudnoća tokom života žene i razvoja kardiovaskularne bolesti

u kasnijem životnom dobu (5-7). Takođe se istražuje i eventualna poveznost ovako izmenjenog lipidnog profila sa razvojem komplikacija u trudnoći, pre svega hipertenzije i preeklampsije (3, 4, 8, 9).

Poznato je da HDL čestice imaju ateroprotektivnu ulogu u metabolizmu lipida, a smatra se da ovaj protektivni učinak omogućuje enzim paraoksonaza (PON1, arildialkifosfataza, EC 3.1.8.1) koja je sastavni deo ovih čestica i ima antioksidativna svojstva (10). Dokazano je da ovaj enzim ima sposobnost da spreči stvaranje novih i razgradi već stvorene lipidne hidroperokside na LDL lipoproteinskim česticama. Neki autori su utvrdili sniženu aktivnost ovog antioksidativnog HDL-enzima u stanjima koja su povezana sa povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti, kao i da su niže aktivnosti ovog enzima uočene kod starijih ispitanika u odnosu na mlađe (11). Pojedine studije pokazale su da aktivnost PON1 tokom trudnoće raste, što predstavlja još jedan mehanizam u očuvanju oksidativnog balansa tokom trudnoće, druge pak, ukazuju na smanjenje aktivnosti ovog enzima tokom trudnoće (12).

Trudnoća per se, je stanje povećane osetljivosti na oksidativni stres, koje se javlja uglavnom zbog povećane potrebe za kiseonikom i mitohondrijima bogate placente (7,8). Oksidativni stres nastaje kao posledica poremećaja ravnoteže oksidoredukcionih procesa u organizmu, zbog prekomernog stvaranja slobodnih kiseonikovih radikala (ROS), koje ćelijski homeostatski mehanizmi nisu u stanju da neutrališu, što dovodi do ozbiljnih oštećenja bioloških molekula, a za posledicu ima niz patofizioloških i patoloških promena, pa i smrt ćelije (7, 8).

Drugi faktori rizika za razvoj ateroskleroze su hipertenzija, pušenje, pretilost, fizička neaktivnost, pol. Smatra se da žene do menopauze imaju manji rizik oboljena od muškaraca zbog protektivne uloge hormonskog statusa, a posle menopauze taj rizik se izjednačava (13). Na oksidativni status trudnica takođe utiču životne navike, ishrana, pušenje, izloženost zagađenju okoline. Pušenje dovodi do povećane produkcije slobodnih radikala, smanjenja antioksidativnog kapaciteta plazme i posledično nastanka oksidativnog stresa (14, 15) . Aktivno i pasivno pušenje izaziva oksidativni stres i kod trudnica, a sličan efekat ima i na fetus (16). Težina trudnice takođe predstavlja značajan aspekt očuvanja oksidativnog balansa, a prekomerna težina doprinosi povećanju oksidativnog stresa i komplikacija u trudnoći, kao što je preeklampsija, gestacijski

dijabet, hipertenzija i povećava rizik razvoja kardiovaskularnog oboljenja u kasnijem životu (17, 18, 19) .

1.2. OKSIDATIVNI STRES I PROMENE U TRUDNOĆI

1.2.1. OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres predstavlja poremećaj ravnoteže oksidoredukcionih procesa u organizmu koji nastaje zbog prekomernog stvaranja slobodnih kiseonikovih radikala (ROS), koje ćelijski homeostatski mehanizmi nisu u stanju da neutrališu. Slobodni kiseonikovi radikali igraju značajnu ulogu kao sekundarni glasnici u mnogim ćelijskim signalnim procesima, a njihova velika reaktivnost potiče od jednog ili više nesparenih elektrona. Kada se naruši ravnoteža sa antioksidativnim sistemom, a to se dešava kada su slobodni kiseonikovi radikali u visokim koncentracijama, dolazi do ozbiljnih oštećenja bioloških molekula, što za posledicu ima niz patofizioloških i patoloških promena, pa i smrt ćelije. Zbog toga oksidativni stres ima značajnu ulogu u patogenezi mnogih komplikacija koje mogu nastati tokom trudnoće, kao što su preeklampsija, spontani pobačaj, zastoj u razvoju fetusa, gestacijski dijabetes melitus, prevremeni porodaj. Takođe je pokazano da postoji veza između oksidativnog stresa majke i težine novorođenčeta (20-22). Upravo ova povezanost oksidativnog stresa i komplikacija u trudnoći, ishoda trudnoće i razvoja fetusa, predmet je intenzivnog istraživanja poslednjih godina.

Visoka reaktivnost molekuskog kiseonika omogućava njegovo učešće u visoko energetske procesima koji se odigravaju u ćelijama koje sadrže mitohondrije, gde se odigrava proces oksidativne fosforilacije (7, 23, 24). Upravo sposobnost eukariota da koriste kiseonik u svojim metaboličkim procesima omogućava im relativno efikasno konvertovanje organskih supstrata u hemijsku energiju. Međutim, korišćenje kiseonika u metaboličkim procesima zahteva i optimalno funkcionisanje zaštitnih mehanizama protiv njegove toksičnosti (23, 24).

Preko 90% kiseonika iz vazduha u organizmu sisara redukuje se u vodu primanjem 4 elektrona od transportnog sistema elektrona u respiratornom lancu mitohondrija (6, 24). Molekulski kiseonik u ovom sistemu koristi se za dobijanje vode, a sukcesivno oslobođena energija u toku transporta elektrona koristi se za dobijanje elektrohemijskog potencijala i sintezu ATP-a. Transport elektrona je stepenast proces

koji počinje od vodonika tj. koenzima dehidrogenaza i završava enzimskim kompleksom citohrom c oksidaze (7, 23, 24).

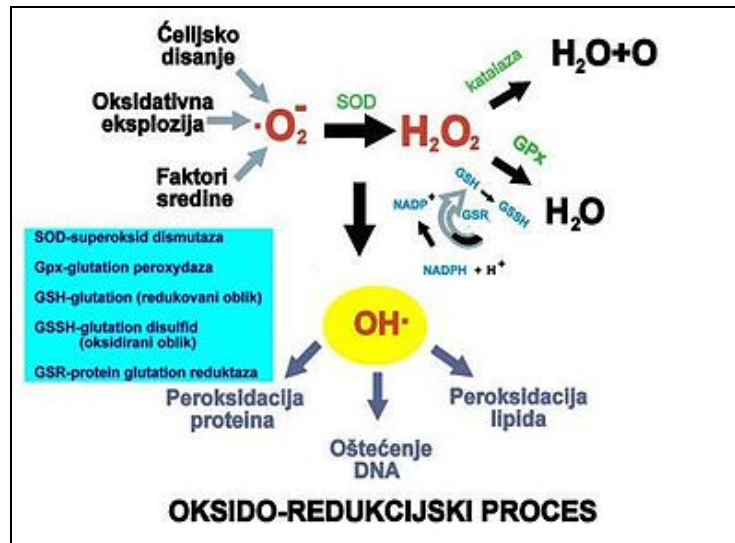
Mitohondrijski transportni sistem elektrona je jedan od najznačajnijih procesa u kome se stvara superoksid anjon radikal. Molekulski kiseonik, difuzno prisutan u ćelijama, čvrsto je vezan za enzimski kompleks citohrom c oksidaze. Međutim, pošto ta veza na prenosiocima elektrona koji su u respiratornom lancu ispred sistema citohrom c oksidaze nije tako čvrsta, neki od transportovanih elektrona mogu da se prenose na molekulski kiseonik, formirajući slobodno - radikalske forme (23, 24).

Superoksid anjon takođe može nastati i u okviru kraćeg elektronskog transportnog lanca u okviru endoplazmatskog retikuluma tokom sinteze proteina i biotransformacije egzogenih i endogenih supstrata (7, 23, 24).

Drugi izvori superoksida pod fiziološkim uslovima uključuju NADPH oksidazu, citohrom P450 i druge oksidoreduktaze. Različiti faktori rasta, lekovi, toksini, inflamacija, izloženost UV zracima, lipidna peroksidacija, takođe mogu dovesti do povećanog stvaranja ROS.

Enzim ksantin dehidrogenaza u normalnim uslovima razgrađuje purine, ksantin i hipoksantin do mokraćne kiseline, koristeći NAD^+ kao akceptor elektrona. U stanju hipoksije, povećano je stvaranje hipoksantina uz prenos elektrona na molekularni kisik i stvaranje superoksid aniona (23, 24).

Superoksid se neutrališe u prisustvu enzima superoksid dismutaze, pri čemu nastaje vodonik peroksid (H_2O_2), koji je manje reaktivan i nije slobodni radikal, ali obzirom da je uključen u stvaranje i detoksikaciju slobodnih radikala, smatra se delom ROS. Vodonik peroksid se delovanjem katalaze i glutation peroksidaze razgrađuje do vode. U narušenom antioksidativnom okruženju, sa superoksid anjonom, a u prisustvu gvožđa Fe^{2+} u Fentonovoj reakciji formira hidroksil jon ($\text{OH}\bullet$). Hidroksil jon je visoko reaktivan i vreme poluživota mu je oko 10^{-9} s (8). Usled visoke reaktivnosti, reaguje sa svakim biološkim molekulom koji se nađe u njegovoj neposrednoj blizini, a takođe, zbog te iste visoke reaktivnosti, nije poznat akceptor ovog slobodnog radikala (7, 23). Nekontrolisano stvaranje superoksida takođe dovodi do reakcije sa azot monoksidom ($\text{NO}\bullet$) i stvaranja peroksinitrita ($\text{NOOO}\cdot$), koji je takođe jak prooksidans (7, 8, 24).



Slika 1. Stvaranje slobodnih radikala u ćeliji

Slobodni kiseonikovi radikali i njihova kontrola od strane antioksidanasa, uključeni su i u fiziološke reproduktivne procese. Tako fiziološki nivoi ROS igraju značajnu regulatornu ulogu u različitim signalnim putevima folikulogeneze, maturacije oocite, funkcije corpus luteuma i uterusa, embriogeneze, implantacije embriona i fetoplacentalnog razvoja (7, 8, 25). Neravnoteža između antioksidanasa i stvaranja ROS (oksidativni stres), smatra se odgovornim za razvoj komplikacija u trudnoći, spontanih pobačaja, preeklampsije, intrauterinog zastoja u rastu fetusa (IUGR), smrti fetusa (26-29). Međutim, povezanost oksidativnog stresa i ovih komplikacija nije još uvek jasna, a tome svakako doprinosi i specifičnost populacije trudnica i etički momenti koji ograničavaju istraživanja, tako da nedostaju fundamentalna shvatanja u pogledu ćelijskih, biohemijskih i molekularnih adaptivnih odgovora i u fiziološkim i patofiziološkim stanjima trudnoće. Većina današnjih saznanja vezanih za ovu oblast potiču iz istraživanja koja su sprovedena na životinjama. Smatra se da polimorfizam antioksidativnih enzima, smanjen unos mikronutrienata kao što je selen, bakar i cink, mogu igrati značajnu ulogu u razvoju oksidativnog stresa i komplikacija u trudnoći (30).

1.2.1.1. Štetne posledice slobodnih kiseonikovih radikala

Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija nastaje kao posledica delovanja slobodnih radikala na polinezasićene masne kiseline lipida, a u manjoj meri prisutna je u svim ćelijama i tkivima. Pošto su lipidi sastavni deo membrana, brojne ćelijske organele koje sadrže membrane izložene su oštećenjima uzrokovanim nekontrolisanom lipidnom peroksidacijom, koja pak dovode u pitanje ne samo funkcionisanje ćelije, već i njeno preživljavanje (7, 8, 23-25).

Proces lipidne peroksidacije teče u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija. Tokom procesa menja se fluiditet i permeabilnost ćelijske membrane, dolazi do poremećaja transporta elektrolita kroz membranu, smanjenja električnog otpora, kao i mobilnosti membranskih proteina. Lipidna peroksidacija smatra se uzrokom brojnih oboljenja kao što su ateroskleroza, dijabetes, Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest, razna hronična inflamatorna stanja. Smatra se i uzrokom komplikacija u trudnoći, a posebno je ključna u razvoju preeklampsije (31-35). Nekontrolisana lipidna peroksidacija takođe dovodi do patoloških promena tokom trudnoće i kod majke i kod fetusa. Placenta i endotelne ćelije krvnih sudova majke i pupčane vrpce potencijalni su izvori lipidnih peroksida koji se sekretuju u cirkulaciju majke i fetusa (32-39).

Oštećenje proteina

Iako je lipidna peroksidacija u centru pažnje istraživača, u poslednje vreme oksidacija proteina, zbog njihove velike zastupljenosti i brojnih funkcija u organizmu, prepoznata je kao moguća glavna meta delovanja slobodnih radikala (13, 23).

Bočni lanci svih aminokiselinskih ostataka proteina osetljivi su na oksidaciju izazvanu delovanjem ROS. Smatra se da je održavanje redoks statusa proteina fundamentalno za održavanje normalne funkcije ćelije. Oksidacija proteina, a time izmenjena struktura i funkcija, kao i narušena homeostaza proteina plazme, povezani su sa patofiziološkim stanjima i starenjem. Smatra se da povećanje oksidacije proteina kod pacijentkinja sa gestacijskim dijabetesom melitusom, uz smanjenje aktivnosti enzima

paraoksonaza 1, koje se javlja kod ovih trudnica, može dovesti do kliničkih komplikacija tokom trudnoće (13).

Oštećenje DNK

Oštećenja DNK smatraju se najozbiljnijim negativnim odgovorom ćelije na prekomernu produkciju ROS i oksidaciju ovih molekula, obzirom da mogu izazvati mutacije i gensku nestabilnost koje se ogledaju u samom ishodu trudnoće, bilo da se radi o komplikacijama tokom trudnoće ili kvalitetu i zdravlju fetusa i novorođenčeta. Iako je sistem za reparaciju DNK veoma efikasan, prekomerna produkcija ROS koja vodi oksidaciji DNK, smatra se značajnim faktorom i u razvoju kancerogeneze, dijabetesa i starenja. Oštećenja mogu nastati na nivou purinskih i pirimidinskih baza, kao i na nivou šećera dezoksiriboze (7, 8, 23, 24).

1.2.2. ANTIOKSIDATIVNA ZAŠTITA

Mnogobrojne uloge slobodnih radikala u fiziološkim procesima čine njihovo stvaranje neophodnim, a obzirom na njihovu potencijalnu toksičnost, tokom evolucije razvila se potreba za uspostavljanjem zaštitnog sistema antioksidanasa. Enzimi superoksid dismutaza, katalaza, glutacion peroksidaza, glutacion reduktaza, glutacion-S transferaza čine tzv. prvu liniju antioksidativne zaštite, dok neenzimski antioksidansi predstavljaju sekundarnu liniju odbrane.

1.2.2.1. Antioksidativni enzimi

Superoksid dismutaza (SOD) je enzim koji katalizuje transformaciju superoksid anjon radikala do H_2O_2 i kiseonika i predstavlja prvu liniju odbrane protiv slobodnih radikala.



Neutralizaciju nastalog vodonik peroksida dalje vrši katalaza ili glutacion peroksidaza.

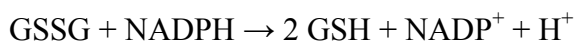
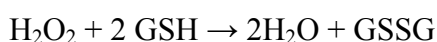
Kod čoveka prisutne su tri izoforme enzima superoksid dismutaze:

- bakar-cink zavisna SOD (Cu, Zn SOD1) je prevashodno citozolski enzim. U malim količinama nalazi se i u ćelijskoj membrani, jedru, mitohondrijima i lipozomima.

- mangan zavisna SOD (Mn SOD2) lokalizovana je u matriksu mitohondrija,

- ekstracelularna SOD (EC SOD3) lokalizovana je u intercelularnom prostoru i ekstracelularnoj tečnosti (plazma, limfa, sinovija, likvor, ascit).

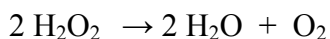
Glutation peroksidaza (GPX) je enzim koji štiti fosfolipide i sfingolipide u membranama od oksidativnog oštećenja a lokalizovan je u citozolu i mitohondrijima. Redukuje nastali vodonik peroksid i hidroperokside masnih kiselina.



Glutation reduktaza (GSR) katalizuje prevođenje oksidovane forme glutationa (GSSG) u redukovani glutation (GSH) u prisustvu NADPH i time obezbeđuje reciklizaciju glutationa koja se ostvaruje u „glutation redoks ciklusu“.

Glutation-S-transferaza (GST) obuhvata familiju multifunkcionalnih enzima čija je najvažnija uloga katalizovanje reakcije konjugacije glutationa i elektrofilnih jedinjenja, koji su najčešće produkti oksidativnog stresa. Prisutna je u gotovo svim tkivima i organima, uključujući jetru, pluća, bubrege, eritrocite, leukocite, testise i placentu. U ćeliji su izoenzimi GST prevashodno lokalizovani u citozolu, ali su izolovani i enzimi vezani za membranu (mikrozomi, mitohondrije, jedro).

Katalaza (CAT) je među najrasprostranjenijim enzimima u prirodi, a osnovna biološka uloga ovog enzima je razlaganje toksičnog vodonik peroksida.



U ćelijama je ovaj enzim pretežno lokalizovan u peroksizomima i mitohondrijima, dok je u eritrocitima najveći deo aktivnosti prisutan u citozolu.

Humana serumska paraoksonaza 1 (PON1) je enzim koji se sintetise u jetri i sastavni je deo molekule HDL lipoproteinskih čestica. Veliki broj studija pokazao je da PON1 ima značajnu ulogu pri zaštiti LDL čestica od oksidativne modifikacije i značajno doprinosi antioksidativnom potencijalu organizma.

1.2.2.2. Neenzimski antioksidativni sistem

Neenzimski antioksidativni sistem čine različita jedinjenja, koja se nalaze u samom organizmu ili se unose putem hrane i vitaminskih suplemenata. Tu heterogenu grupu neenzimskih antioksidanasa čine visokomolekulski proteinski antioksidansi (ceruloplazmin, transferin, feritin), antioksidansi male molekulske mase koji se nalaze u ćeliji (glutation) ili u plazmi (mokraćna kiselina, bilirubin), vitamini (vitamin C i E), elementi u tragovima koji su deo aktivnog centra antioksidativnih enzima ili su značajni kofaktori za njihovu punu aktivnost (Cu, Zn, Mn, Se), polifenoli prisutni u povrću, voću, čaju, crvenom vinu, ekstra devičanskom maslinovom ulju (40, 41) .

1.2.3. OKSIDATIVNI STRES U TRUDNOĆI

Na oksidativni status u trudnoći utiču i životne navike trudnica, kao što su pušenje, fizička aktivnost, izloženost zagađenju okoline kao i socio - ekonomski uslovi života.

Poznato je da pušenje u trudnoći, bilo ono aktivno ili pasivno, može dovesti do niza komplikacija, kao što su spontani pobačaj, abrupcija placente, prevremeni porođaj, intrauterini zastoj u rastu fetusa ili niska telesna masa novorođenčeta (42-45). Pušački dim sadrži smešu jedinjenja u gasovitom stanju ili kondenzovanu u formi katrana, koji su većinom oksidansi i prooksidansi sposobni da izazovu oksidativni stres povećanim stvaranjem slobodnih radikala i iscrpljivanjem antioksidativnog kapaciteta trudnica. Osim toga, ugljen monoksid i nikotin prolaze placentalnu barijeru i uzrokuju utero-placentalnu insuficijenciju, čime se smanjuje snabdevanje fetusa hranjivim materijama i kiseonikom (43-46). Ugljen monoksid se vezuje za hemoglobin i formira karboksihemoglobin izazivajući fetalnu hipoksiju. Trudnice koje puše rađaju decu koja imaju u proseku 150-300g manju telesnu masu u odnosu na decu trudnica koje nisu pušači, a pušenje u trudnoći takođe se može odraziti i na postnatalni rast i razvoj deteta (42-44).

Za normalan ishod trudnoće, zdrav razvoj fetusa i održavanje zdravlja žene, svakako je značajna optimalna telesna težina tokom trudnoće. Smatra se optimalnim da

trudnica dobije u težini tokom trudnoće 10-12kg (19). U terminskoj trudnoći, 40% dobijene težine odnosi se na masti, placentu, amnionsku tečnost i uterus (19, 47).

Trudnice koje imaju indeks telesne mase (ITM) $> 25 \text{ kg/m}^2$ imaju prekomernu težinu, a one koje imaju ITM $> 30 \text{ kg/m}^2$ su gojazne (48). Trudnice koje imaju prekomernu težinu, ili su gojazne, češće razvijaju neku od komplikacija u trudnoći, među kojima su svakako preeklampsija i gestacijski dijabetes. Takođe, istraživanja su pokazala da je vrednost ITM pre trudnoće značajan prediktor razvoja preeklampsije. Preeklampsija i razvoj kardiovaskularne bolesti u kasnijem životu, dele zajedničke faktore rizika - endotelijalnu disfunkciju, oksidativni stres i povećanu inflamatornu aktivnost.

Stav da su prekomerna težina trudnica i gojaznost nezavisno povezane sa oksidativnim stresom je relativno nov i zajedno sa placentalnim oksidativnim stresom i lipidnom peroksidacijom može doprineti razvoju komplikacija u trudnoći.

Oksidativni stres može značajno promeniti procese značajne za pravilan rast i razvoj fetusa, koji je manje ili više osetljiv tokom intrauterinog razvoja (49-52). Jedno od stanja tokom trudnoće koje je izvor značajnog oksidativnog stresa jeste dijabetes (49). Takođe je poznato da povećan oksidativni stres tokom trudnoće dovodi do smanjene telesne težine novorođenčeta, koja je povezana sa povećanim rizikom za razvoj neke od hroničnih bolesti u kasnijem životnom dobu odrasle osobe, kao što su hipertenzija, dijabetes, hiperholesterolemija, kardiovaskularna oboljenja itd (20, 53-56).

1.2.4. ANTIOKSIDATIVNI SISTEMI U TRUDNOĆI

Antioksidativni enzimski sistem značajna je komponenta preimplantacionog razvoja embriona i receptivnog endometrijuma uterusa. Brojna istraživanja na životinjama pokazala su povećanu aktivnost enzima SOD1, SOD2, GPX, GSR, GST i CAT u corpus luteumu tokom trudnoće, gde su uključeni kao odgovor na ROS u lutealnim ćelijama, inhibiciju apoptoze i steroidogenezu (7, 8, 25). Visoka ekspresija i aktivnost SOD1 nađena je u humanom corpus luteumu tokom rane trudnoće. Postimplantacioni period čini kritični deo trudnoće, usled povećane osetljivosti fetusa na oksidativni stres, koji je posebno izražen u momentu prekopčavanja

preimplantacionog anaerobnog metabolizma na postimplantacioni aerobni metabolizam.

U ovom momentu se dešava najveći broj spontanih pobačaja, i stoga je važno održavanje optimalnog antioksidativnog potencijala. Međutim, nisu poznati antioksidativni mehanizmi koji dovode do optimalne ekspresije mRNK ključnih antioksidativnih enzima, a koji su uključeni u preimplantacioni i postimplantacioni period. Buduća istraživanja u ovom pravcu trebalo bi da razjasne ove antioksidativne adaptibilne odgovore, što bi pomoglo u strategiji i prevenciji ranih pobačaja i komplikacija u trudnoći.

Placenta, zbog svoje značajne metaboličke aktivnosti, značajan je izvor oksidativnog stresa, a time i odgovarajućih antioksidativnih enzima, a adekvatna placentalna antioksidativna zaštita zavisi od stepena razvoja placente. Placentalni homogenat dobijen u ranoj trudnoći, sredini trudnoće i u terminu porođaja, pokazuje progresivno povećanje antioksidativnih parametara kao što su bilirubin, glutation, aktivnosti enzima SOD, katalaze, glutation peroksidaze i reduktaze (23, 25). Aktivnost glutation peroksidaze u eritrocitima i trombocitima i ekstracelularna SOD aktivnost takođe raste tokom trudnoće, najverovatnije kao odgovor na povećano prisustvo superoksid anjona (7, 8, 25).

Tokom trudnoće preporučuje se ishrana bogata prirodnim antioksidansima, koja doprinosi očuvanju antioksidativnog potencijala. Farmakološka suplementacija vitaminima prema nekim istraživanjima (u dozama u kojima je ordinirana) nije dala odgovarajuće rezultate, posebno kod patoloških trudnoća (39, 40). Druge pak studije pokazuju pozitivan uticaj vitaminske suplementacije na antioksidativni kapacitet trudnica i nalaze da je značajna uloga vitamina C i E u prevenciji oštećenja od strane ROS, te da u trudnoći postoji povećana potreba za njihovom upotrebom, a smatra se da njihov deficit dovodi do povećane osetljivosti na infekcije i sklonosti komplikacijama u trudnoći (41).

Pokazalo se da kombinovani tretman vitaminom E i C smanjuje oksidativni stres kod trudnica sa diabetes mellitusom i poboljšava kvalitet fetusa (39). S druge strane, suplementacija vitaminom C i E nije dala rezultata u prevenciji preeklampsije kod visoko rizičnih trudnica. Istraživanja u ovom pravcu u budućnosti pomogla bi u utvrđivanju onih farmakoloških doza koje bi mogle imati pozitivan uticaj na antioksidativni kapacitet, što bi bilo od posebnog značaja kod komplikacija u trudnoći.

1.3. LIPIDI U TRUDNOĆI

Metabolizam lipida smatra se esencijalnim za normalan ishod trudnoće i razvoj fetusa. Da bi zahtevi trudnoće bili zadovoljeni, dešavaju se odgovarajuće metaboličke promene koje dovode do izmenjenog lipidnog profila, tako da većina trudnica do kraja trudnoće razvije specifičan lipidni profil koji se kod zdravih negravidnih žena smatra proaterogenim (3,55). Tokom fiziološke trudnoće bez komplikacija vrednosti triglicerida rastu dva do četiri puta, dok je porast holesterola umereniji i iznosi oko 25-50% (3, 56, 57). Međutim, sam mehanizam koji dovodi do ovih adaptibilnih promena nije u potpunosti razjašnjen. Trudnoću prati i pojava insulinske rezistencije, povećanje postprandijalne glukoze, LDL holesterola i slobodnih masnih kiselina (3, 55, 56). Vrednost HDL holesterola raste u drugom trimestru i održava postignutu vrednost do kraja trudnoće.

Ove promene tokom trudnoće predstavljaju neophodnu adaptaciju metabolizma trudnice prema zahtevima fetusa i pripremaju trudnicu za predstojeći porođaj i laktaciju (3, 55, 56).

Međutim, obzirom da izmenjen lipidni profil tokom trudnoće ima karakteristike proaterogenog lipidnog profila, postavilo se pitanje potencijalne proaterogenosti trudnoće i njenog uticaja na povećani rizik za razvoj kardiovaskularne bolesti (KVB) u kasnijem životu žene. Pojedine studije pokazale su pozitivnu korelaciju između broja trudnoća i rizika za razvoj KVB u kasnijem životu, precizirajući da su žene koje su imale pet i više trudnoća imale veću incidencu oboljevanja od KVB (58, 59), dok druge studije pokazuju da takva povezanost ne postoji (60-61). Takođe, studije su pokazale da žene koje su imale pet i više trudnoća, imaju veću prevalencu oboljevanja od dijabetesa u kasnijem životnom dobu (62).

Povećanje vrednosti triglicerida u plazmi odgovara povećanju vrednosti VLDL lipoproteinskih čestica. Posredovanjem holesterol estar transportnog proteina (CETP), čija aktivnost raste sredinom trudnoće, dolazi do izmene triglicerida između VLDL i LDL ili HDL čestica, tako da dolazi do povećanog nakupljanja triglicerida i u ovim česticama. Tokom trudnoće dolazi do smanjenja aktivnosti hepatičke lipaze (HL), koja

omogućava konverziju HDL-2 čestica u HDL-3 lipoproteinske čestice, čime dolazi do akumulacije HDL-2 čestica bogatih trigliceridima (3, 62-70).

Povećana insulinska rezistencija u kasnoj trudnoći, kao i kontinuirani rast estrogena, glavni su hormonski faktori koji doprinose ovim metaboličkim promenama tokom trudnoće, koje rezultuju razvojem hipertrigliceridemije u trudnoći.

Slobodne masne kiseline koje su potrebne za pravilan rast fetusa transportuju se kroz placentu jednostavnom difuzijom (60). Sem toga placenta poseduje veliki broj receptora za vezivanje VLDL čestica (60). U kataboličkoj fazi hormoni placente povećavaju produkciju VLDL čestica i smanjuju aktivnost hepatičke lipaze, što zajedno sa povećanom ekspresijom VLDL/apoE receptora u placenti omogućava odgovarajući inluks trigliceridima bogatih lipoproteina majke u fetoplacentalnu jedinicu (3, 56, 63). Neadekvatna snabdevenost fetusa lipidima koja je povezana sa abnormalnim lipidnim profilom, a koji se ogleda u sniženim vrednostima ukupnog holesterola, triglicerida, LDL i HDL-holesterola dovodi do razvoja intrauterinog zastoja u rastu fetusa (IUGR) .

LDL čestice su heterogene i sadrže subfrakcije različite veličine i gustine, koje se na osnovu gustine mogu razdvojiti u fenotip A i B. Fenotip A je karakterisan česticama koje su veće (LDL1 i LDL2), a fenotip B čine čestice koje su manje i gušće (LDL3 i LDL4). Veće čestice dominiraju kod zdravih mladih žena generativne dobi, dok se manje čestice češće nalaze kod žena nakon menopauze. Lipidi u malim gustim LDL česticama su osetljiviji na oksidativnu modifikaciju u poređenju sa LDL česticama normalne gustine, pokazuju veće vezivanje za proteoglikane krvnog zida i smanjeno preuzimanje od strane LDL receptora. (3, 11, 70-76).

Visoko aterogene male guste LDL čestice dominiraju kod 97% žena u 35. i 36. nedelji trudnoće (71). Smatra se takođe, da male guste LDL čestice doprinose endotelijalnoj disfunkciji u preeklampsiji (11, 77).

Obzirom na specifično izmenjen lipidni profil tokom trudnoće, postavlja se pitanje da li je hiperlipidemija tokom trudnoće dislipidemija? Klasična dislipidemija karakterisana je smanjenjem vrednosti HDL holesterola, što tokom trudnoće bez komplikacija nije slučaj. Kod preeklampsije se viđa ova karakteristika klasične dislipidemije sa smanjenjem vrednosti HDL holesterola (77-79).

Pored vrednosti LDL holesterola za procenu razvoja KVB, definisano je i nekoliko aterogenih indeksa da bi se optimizirao prediktivni kapacitet lipidnog profila.

Njihova upotreba je posebno značajna tokom trudnoće, obzirom na specifične promene lipidnog profila koje prate celu trudnoću (3, 10, 80). Među njima je za trudnoću posebno interesantan indeks TG/HDL-hol (Castelli index), odnosno log (TG/HDL-hol) obzirom na manifestnu hipertrigliceridemiju tokom trudnoće. Vrednost indeksa log (TG/HDL-hol) preko 0,5 smatra se indikatorom aterogenosti (3, 21, 80). Takođe je interesantan indeks LDL-hol/ApoB, koji daje aproksimativno informaciju o veličini LDL čestica, tako da vrednost ovog indeksa $< 1,3$ ukazuje na predominaciju malih gustih LDL čestica (63, 81, 82).

U zdravoj populaciji negravidnih žena povećanje vrednosti serumskih triglicerida je povezano sa povećanjem koncentracije VLDL-1 čestica, koje predstavljaju povećani rizik za razvoj KVB, dok se koncentracija VLDL-2 čestica kao glavnog prekursora cirkulišućih IDL i LDL čestica ne menja značajno. Kod trudnica, kako trudnoća napreduje, VLDL-1 i VLDL-2 rastu paralelno, tako da njihov međusobni odnos ne raste porastom triglicerida, već ostaje konstantan (VLDL-1/VLDL-2 kod negravidnih žena je 1,0 za vrednost TG 0,5 mmol/L, a za vrednost TG 2,5 mmol/L iznosi 2,0) (3, 83-86).

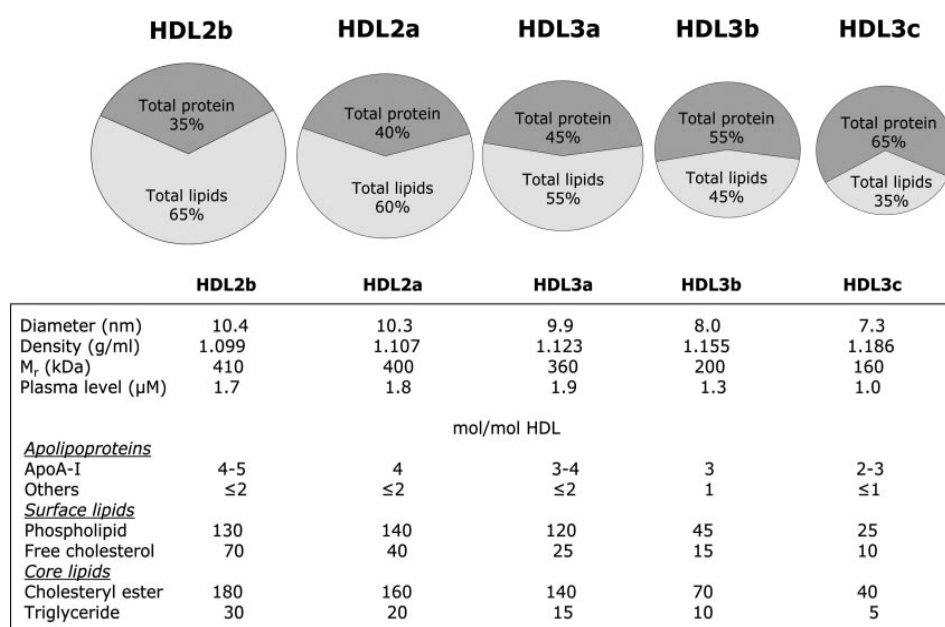
Povećanje vrednosti VLDL čestica tokom trudnoće smatra se da nastaje usled povećane sinteze ovih čestica, a ne kompozicijskih promena unutar čestica, obzirom da se i indeks VLDL/Hol ne menja značajno tokom trudnoće i niži je u svim trimestrima trudnoće u poređenju sa negravidnim ženama (3, 10). Prema tome, iako je lipidni metabolizam u trudnoći specifično izmenjen, uzevši u obzir lipidne i lipoproteinske indekse, radi se o balansiranoj hiperlipidemiji.

Studije su pokazale da između triglicerida i LDL subfrakcija postoji tzv. „threshold“ efekat. Naime kod niskih i normalnih vrednosti triglicerida, postoji pozitivna korelacija sa LDL-2 subfrakcijom, a kod vrednosti triglicerida iznad 1,5 mmol/L, pozitivno korelira LDL-3 subfrakcija, koja je relativno konstantna ispod navedenih vrednosti triglicerida (3, 63). U prvom trimestru trudnoće povećana vrednost triglicerida može biti odgovorna za povećanje malih gustih LDL čestica (3, 63).

Vrednost ukupnog holesterola u fetalnoj plazmi je povišena i proporcionalna vrednostima holesterola majke u drugom trimestru, a opada sa daljom gestacijskom starošću fetusa do termina porođaja (63). Pokazano je da su vrednosti lipida u umbilikalnoj krvi normalnih trudnoća značajno niže od onih koje se nalaze u krvi

majke, a povišen HDL holesterol i niži odnos LDL-hol/HDL-hol umbilikalne krvi pokazuje da je fetus tokom normalne trudnoće zaštićen od aterogenosti lipida (63). S druge strane, smatra se da hiperholesterolemija tokom trudnoće, iako je limitirana i prolazna, može izazvati razvoj patoloških promena i masnih pruga u aorti fetusa, a time uticati na razvoj ateroskleroze u kasnijem životu potomaka (10, 71, 73).

Tokom drugog trimestra nekomplikovane trudnoće dolazi do porasta vrednosti HDL holesterola i ta se vrednost održava do termina porođaja (3, 77, 78), a posledica je u prvom redu delovanja estrogena. Antiaterogeni efekat HDL holesterola objašnjava se njegovom funkcionalnom zaštitom, posredovanjem transporta holesterola iz perifernih tkiva u jetru, ali i njegovom antiinflamatornom i antioksidativnom ulogom (87).



Slika 2. Heterogenost fizičko-hemijskih osobina HDL subfrakcija (preuzeto iz Kontush A, Chapman MJ. Pharmacol Rev 2006;58:342-74).

Pokazano je, međutim da žene koje su imale veći broj trudnoća, imaju niže vrednosti HDL holesterola u kasnijem životu, što se može povezati sa povećanim rizikom nastanka KVB u kasnijem životu kod ovih žena (58 - 61). Kada su subfrakcije HDL holesterola u pitanju, obično se govori o dve frakcije: HDL-2, većoj, i HDL-3, koja je manja i gušća i ima manji ateroprotektivni karakter.

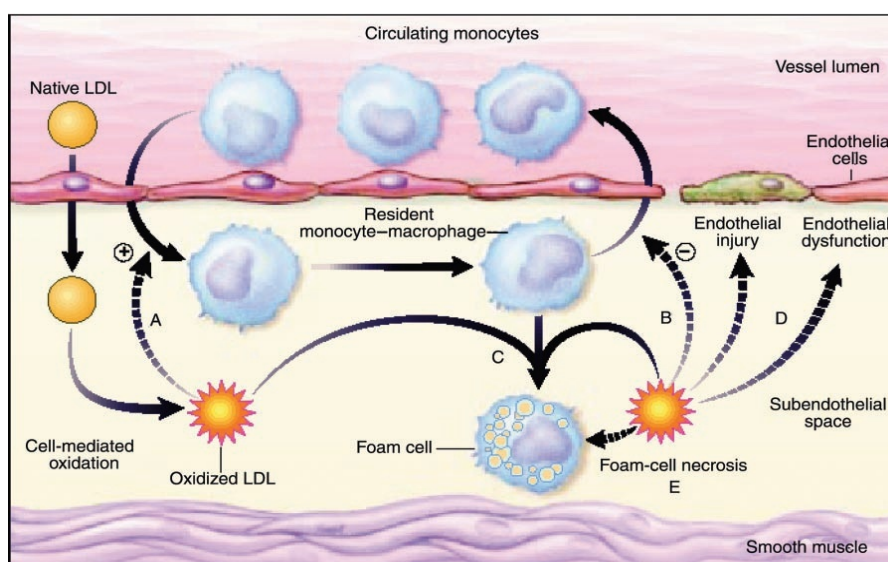
Smatra se da i HDL takođe podleže lipidnoj peroksidaciji, čak lakše nego LDL, a obzirom da je manja molekula od LDL-a, lakše difunduje u subendotelni prostor.

Kada su subfrakcije HDL u pitanju, oksidaciji je podložnija frakcija HDL-2 nego HDL-3 frakcija.

1.4. ENZIM PARAOKSONAZA 1 (PON1) I PROMENE UTRUDNOĆI

Antioksidativna svojstva HDL-a pripisuju se prvenstveno enzimu paraoksonazi 1 (PON1) za koji se smatra da je glavni enzim koji ima protektivnu ulogu prema oksidaciji LDL čestica. HDL svojom strukturom omogućava odgovarajuće hidrofobno okruženje za optimalnu aktivnost PON1, a s druge strane, PON1 svojom aktivnošću štiti sam HDL od oksidacije i povećava kapacitet reversnog transporta holesterola.

Paraoksonaza 1 (EC 3.1.8.1, arylalkylphosphatase) je kalcijum zavisani glikoproteinski enzim, koji je svojim ateroprotektivnim značajem i ulogom u vaskularnoj fiziologiji, privukao pažnju istraživača poslednjih godina i može se reći, otvorio novo poglavlje istraživanja u oblasti enzimologije.



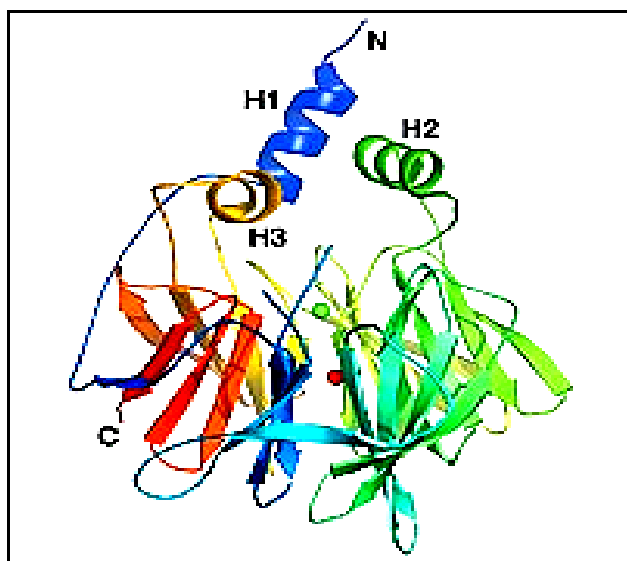
Slika 3. Oksidativna modifikacija lipida u procesu nastanka ateroskleroze (preuzeto iz Stocker, Roland, and John F. Keaney, Jr. *Physiol Rev* 2004; 84: 1381–1478).

Paraoksonaza se sintetise u jetri i vezana za površinu HDL čestica transportuje se u cirkulaciju i tkiva. PON gen smešten je na hromosomu 7q21.22 i kodira sintezu familije enzima paraoksonaza (PON1, PON2 i PON3) koji pokazuju homologiju sekvence aminokiselina oko 65% (88,89). PON2 i PON3 takođe imaju antioksidativna svojstva, s tim da je PON2 intracelularni enzim i ne nalazi se u cirkulaciji, a PON3 je

identifikovan kao laktonaza vezana za HDL i takođe štiti LDL od oksidativnog oštećenja (89).

Harel i saradnici (90) su 2004. godine definisali kristalnu strukturu rekombinantnog enzima PON1, koja pokazuje da se radi o šestolisnom β propeleru, od kojih se svaki list sastoji od 4 β ploče (Slika 4). Enzim sadrži dva kalcijumova jona, od kojih je jedan značajan za katalitičku aktivnost enzima i za njega je vezan fosfatni anjon, a drugi jon kalcijuma značajan je za stabilizaciju strukture enzima. Aktivno mesto enzima okrenuto je prema fosfolipidnoj površini HDL čestice i omogućava vezivanje velikog broja supstrata (91 - 93).

Fiziološki supstrat za PON 1 nije poznat. Enzim je nazvan po njegovom najčešće korišćenom supstratu paraoksonu, aktivnom metabolitu organofosfornog insekticida parationa. PON1 može da hidrolizuje aromatične estre i laktone i u manjoj meri druga organofosforna jedinjenja, uključujući nervne otrove i pesticide (91 - 93).



Slika 4. Kristalna struktura PON1 proteina (preuzeto iz Harel M et al. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying anti-atherosclerotic enzymes. Nat Struct Mol Biol 2004;11:412-419).

Enzim PON1 ima dva uobičajena kodirajuća polimorfizma, supstitucija metionina leucinom na poziciji 55 (L55M) i glutamina argininom na poziciji 192 (Q192R) (91 - 93). Mnoge studije su pokazale da oba polimorfizma mogu biti povezana sa raznim patofiziološkim stanjima, kao što su KVB, familijarna hiperholesterolemija, Parkinsonova bolest, tip 2 dijabetes, Alchajmerova bolest i dr. (91 - 96).

Polimorfizam na poziciji 192 je najviše proučavan. Polimorfizam PON1_{Q192R} značajno utiče na katalitičku aktivnost enzima PON1 i to na supstrat specifičan način, tako da Q varijanta ima izraženiji afinitet prema diazoksonu kao supstratu, dok R varijanta ima izraženiji afinitet prema paraoksonu (91 - 96). Određivanje PON1 fenotipa bolje reflektuje povezanost ovog enzima sa rizikom za razvoj ateroskleroze.

Pojam „status enzima“ uključuje PON1 aktivnost oba PON1 192 genotipa a merenjem odnosa aktivnosti PON1 prema dva supstrata (diazokson / paraokson), određuje se status enzima i moguće je razdvojiti osobe na PON1_{Q192}, PON1_{QR192} i PON1_{R192} genotipove (91 - 96). Konstruisanjem grafika (97) brzine hidrolize diazoksiona prema brzini hidrolize paraoksiona, može se izvesti zaljučak o PON1 fenotipu i aktivnosti PON1 za određenu osobu (Slika 5).

Enzim je vrlo nestabilan u odsustvu optimalnih fizioloških uslova koje mu omogućuje čestica HDL svojom strukturom. Njegova aktivnost izrazito varira između individua i ta razlika može iznositi i do 40 puta, a kod osoba sa istim PON1₁₉₂ genotipom do 13 puta (94).

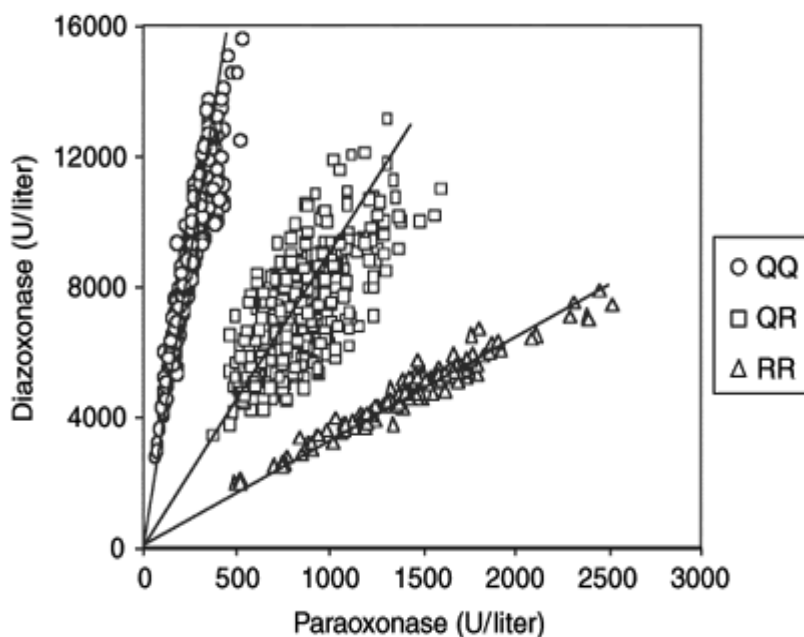
PON1 aktivnost zavisi od godina starosti i niska je na rođenju, da bi rasla tokom prve dve godine života, kada doseže vrednosti koje se nalaze kod odraslih osoba, mada pojedine studije pokazuju da raste i do sedme godine (13). Razlike u aktivnosti enzima tokom razvoja i rasta vezane su za genski polimorfizam (13) Aktivnost enzima opada sa godinama (12), a kod trudnica je pokazano da je aktivnost enzima niža kod trudnica iznad 35 godina starosti u poređenju sa onima koje su mlađe od 25 godina (14).

Pored toga, aktivnost enzima zavisi i od ishrane i životnih navika. Uticaj okoline, kao što je izloženost zagađenjima, posebno izloženost organofosfatima, može dovesti do sniženja aktivnosti enzima (96, 97).

Obzirom da je enzim deo HDL čestice, zdrav način života koji pozitivno utiče na porast HDL-a i do 10%, a koji podrazumeva redukciju telesne težine, fizičku aktivnost, prestanak pušenja i odgovarajući umereni unos alkohola, pozitivno utiče i na aktivnost PON1. Ishrana bogata prirodnim antioksidansima, vitamin C i E, umerena konzumacija crvenog vina, kao i devičanskog maslinovog ulja, svakako pozitivno utiče na aktivnost PON1 (98 - 103).

Mackness i saradnici (104) su još 1991. godine pokazali da u in vitro uslovima PON1 ima sposobnost da spreči stvaranje i akumulaciju lipidnih peroksida u LDL-u. Od tada

do danas brojna istraživanja, posebno poslednjih godina, pokazala su da ovaj enzim ima sposobnost da zaštiti LDL čestice od oksidacije, ukloni već stvorene lipidne perokside, ali i da sačuva HDL čestice od oksidacije. Time PON1 dobija značajnu ulogu u zaštiti od razvoja ateroskleroze, bolesti koja u savremenom svetu predstavlja najveći uzrok smrtnosti.



Slika 5. Dijagram raspodele diazoksonazne prema paraoksonaznoj aktivnosti – PON1_{Q192R} izoforme, (preuzeto iz Jarvik G. P. *et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2441-2447).

Poslednjih godina se sve više istražuje trudnoća kao fiziološko stanje upravo zbog specifičnog metabolizma koji u svojoj osnovi ima elemente uzroka za razvoj ateroskleroze, koji mogu u kasnijem životnom dobu dovesti do razvoja ateroskleroze kod žena ili njihovog potomstva. PON1 kao deo antioksidativnog kapaciteta značajan je element prooksidativnog / antioksidativnog statusa organizma. Istraživanja koja su rađena kod trudnica dala su oprečne rezultate, tako da su prema jednim autorima aktivnosti PON1 više (14), a prema drugim autorima niže tokom trudnoće (96), u odnosu na negravidne žene. Sam dizajn studije može dovesti do ovakvih rezultata, kao i sastav ispitanica, jer na aktivnost enzima mogu uticati brojni već ranije navedeni faktori. Tako trudnice koje su starije od 35 godina pokazuju nižu aktivnost enzima nego trudnice mlađe od 25 godina (12). Starosna dob majki, međutim ne utiče na aktivnost

PON1 kod njihove novorođenčadi, tako da ne postoji razlika aktivnosti između beba čije su majke imale veću aktivnost enzima u odnosu na bebe majki niže PON1 aktivnosti (12).

Huen i saradnici (14) su pokazali da je tokom trudnoće, posebno u kasnoj trudnoći i na porođaju aktivnost PON1 povećana što doprinosi očuvanju antioksidativnog potencijala u momentu povećanog oksidativnog stresa.

U studiji rađenoj na Kineskoj populaciji, Chen i saradnici (105) pokazali su da je PON1 RR genotip novorođenčadi povezan sa prevremenim porođajem. Kumru i saradnici (106) smatraju da snižena aktivnost PON1 učestvuje u patogenezi preeklampsije, dok druge studije nisu pokazale razliku aktivnosti PON1 između trudnica sa preeklampsijom i zdravih trudnica.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Kod zdravih trudnica, kod kojih su trudnoća i porođaj prošli bez komplikacija, ispitati promenu parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, lipidnih parametara, aterogenih indeksa, subfrakcija LDL i HDL čestica, status enzima paraoksonaza 1 i distribuciju fenotipova enzima paraoksonaza 1.

2. Ispitati promene navedenih parametara u svim stupnjevima trudnoće, prvom trimestru, drugom trimestru, trećem trimestru, neposredno pre porođaja kao i dva meseca posle porođaja.

3. Ispitati da li postoji razlika u parametrima oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite i lipidnog profila između trudnica u različitim periodima trudnoće i zdravih negravidnih ispitanica iste starosne dobi.

4. Utvrditi da li između parametara oksidativnog stresa, lipidnih parametara, i aktivnosti enzima paraoksonaza 1 u trudnoći postoji povezanost, kao i da li fiziološka trudnoća predstavlja rizik za razvoj ateroskleroze.

5. Ispitati uticaj povećanja telesne težine trudnica tokom trudnoće, kao i uticaj pušenja i suplementacije vitaminima na parametre oksidativnog stresa, lipidne parametre i aktivnost enzima paraoksonaza 1.

6. Ispitati povezanost parametara oksidativnog stresa, lipidnih parametara i aktivnosti paraoksonaze 1 sa telesnom masom, dužinom i obimom glave norođenčadi.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ISPITANICE

Ovim istraživanjem, koje je dizajnirano kao longitudinalna studija, obuhvaćeno je 60 zdravih gravidnih žena starosti 20-38 godina (mediana 31 godina), koje su se javile na pregled u Savetovalište za trudnice Ginekološko akušerske klinike (GAK) „Narodni front“, Beograd, radi prenatalnog laboratorijskog screening-a.

Svi uzorci su sakupljeni prema utvrđenom kalendaru poseta savetovalištu za trudnice GAK „Narodni front“ i organizovani su u pet poseta: prvi trimestar, drugi trimestar, treći trimestar, neposredno pred porođaj (38. nedelja trudnoće) i sedam nedelja posle porođaja. Pri svakoj poseti trudnice su kompletno klinički i laboratorijski obrađene. Gestacijska starost određivana je ultrazvučnim pregledom. Kontrolnu grupu čine 42 negravidne žene uparene po godinama (22-38 godina, mediana 32godine).

Sve ispitanice su dale pismeni pristanak za učešće u studiji, koju je za trudnice odobrio Etički odbor GAK „Narodni front“, a za kontrolnu grupu Etički odbor Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Od antropometrijskih podataka, trudnicama je merena visina i težina, kako bi se izračunao indeks telesne mase [(ITM = težina (kg)/kvadrat visine (m²)] i dobijanje u težini od jednog kontrolnog pregleda do drugog, izraženo u kg i kao procenat u odnosu na težinu pre trudnoće. Sve ispitanice imale su normalnu težinu na početku trudnoće, sa ITM između 18,5 kg/m² i 24,9 kg/m². Krvni pritisak je meren pri svakoj poseti, nakon 15-20 min mirovanja na desnoj nadlaktici sfigmomanometrom. Izražen je kao srednja vrednost dva uzastopna merenja.

Kriterijumi za isključivanje iz studije bili su prekomerna težina pre trudnoće, kao i prisustvo bilo koje hronične bolesti pre trudnoće ili redovno uzimanje lekova, blizanačka trudnoća, gestacijska hipertenzija, gestacijski dijabetes, preeklampsija, prisustvo bilo koje druge komplikacije u trudnoći i prevremeni porođaj. Na osnovu ovih kriterijuma, iz studije je isključeno 17 trudnica, i to iz sledećih razloga: osam trudnica je u raznim etapama odustalo od studije svojevoljno, tri trudnice su razvile gestacijski dijabetes, tri trudnice su razvile hipertenziju, dve trudnice su porođene pre 38. nedelje

trudnoće i jedna trudnica je namerno prekinula trudnoću zbog lošeg nalaza amniocenteze koji je ukazivao na Turner sindrom.

U studiji su na kraju preostale 43 trudnice koje su kompletno obrađene, donele trudnoću do kraja i došle na zakazanu kontrolu sedam nedelja posle porođaja. Među njima je bilo 21 nulipara, 17 primipara i 5 multipara. Sve trudnice porodile su se vaginalnim putem i rodile su zdravu decu. Među novorođenom decom bilo je 22 dečaka i 21 devojčica.

Trudnice su tokom trudnoće bile na adekvatnom režimu ishrane prema savetu lekara, a 21 trudnica je uzimala vitaminsku suplementaciju (multivitamine i minerale), koja je sadržavala u proseku 200-300 mg kalcijuma, 15 mg cinka, 17 mg gvožđa, 400 mcg folne kiseline, 400 IU vitamina D, 70 mg vitamina C, 3 mg tiamina, 2 mg riboflavina, 20 mg niacina, 6 mcg vitamin B12 i 10 mg vitamina E. Suplementi su uzimani jednom dnevno. Takođe, 21 trudnica je imala pušačke navike pre trudnoće sa konzumacijom do 20 cigareta dnevno, a prestale su sa pušenjem nakon što su saznale za trudnoću.

Uzorci su sakupljeni nakon prekonoćnog gladovanja (12 h) prema utvrđenom kalendaru poseta; u prvom trimestru, mediana 14. nedelja trudnoće, drugom trimestru, mediana 24. nedelja trudnoće, trećem trimestru, mediana 32. nedelja trudnoće, neposredno pred porođaj, 38. nedelja trudnoće i sedam nedelja posle porođaja. Uzorci su uzimani u dva vakutejnera (1 serumski i 1 plazma sa EDTA kao antikoagulansom), centrifugirani na 1500 g 10 min na 4⁰C; podeljeni u odgovarajuće alikvote od 200 µL i čuvani do analiziranja na temperaturi -80⁰C.

3.2. METODE

Kod ispitanica su određeni sledeći parametri:

1. Antropometrijski podaci

- Starost
- Visina
- Težina
- Indeks telesne mase
- Dobijanje u težini

2. Biohemijski i hematološki parametri

- Osnovni biohemijski parametri - Ureja, kreatinin, glukoza, albumin, ukupni proteini, mokraćna kiselina, gvožđe, hsCRP, ukupan bilirubin, alanin aminotransferaza (ALT), aspartat aminotransferaza (AST)
- Lipidni status - ukupni holesterol, HDL-holesterol, LDL-holesterol, razdvajanje LDL i HDL subfrakcija, ApoAI, ApoB
- Kompletna krvna slika - broj leukocita, eritrocita, trombocita, hemoglobin (Hb), hamatokrit (Hct), zapremina eritrocita (MCV), prosečna količina hemoglobina u eritrocitu (MCH), prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC)

3. Parametri oksidativnog stresa:

- Tiobarbiturna kiselina-reagujuća supstanca – TBARS
- Superoksid anjon radikal – O_2^-
- Lipidni hidroperoksidi – LOOH
- Produkti oksidativne modifikacije proteina – AOPP
- Totalni oksidacioni status – TOS
- Prooksidativni-antioksidativni balans – PAB

4. Parametri antioksidativne zaštite:

- Aktivnost superoksid dismutaze – SOD
- Ukupne sulfhidrilne grupe – SH grupe
- Totalni antioksidativni status – TAS

5. Status i aktivnost enzima PON1

- Aktivnost enzima paraoksonaze prema paraoksonu kao supstratu
- Aktivnost enzima paraoksonaze prema diazoksonu kao supstratu

3.2.1. ODREĐIVANJE BIOHEMIJSKIH I HEMATOLOŠKIH PARAMETARA

Osnovni biohemijski parametri određeni su na automatskom biohemijskom analizatoru Ilab 300+ primenom gotovih komercijalnih testova proizvođača Biosystems S.A. (Barcelona, Spain) i Byoanalitica (Belgrade, Serbia). Kompletna krvna slika određivana je na hematološkom brojaču Cell-Dyn 1700 (Abbott Diagnostics, Illinois, USA).

3.2.2. ODREĐIVANJE PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA

3.2.2.1. Određivanje koncentracije tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBARS)

Princip metode za određivanje koncentracije TBARS zasniva se na činjenici da krajnji produkti oksidacije lipida imaju sposobnost da reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA), pri čemu nastaje obojeni kompleks sa maksimumom apsorbance na 535 nm (107).

Reagensi

1. **TBA reagens:** 0.917 mmol / L trihlorsirćetne kiseline (TCA, 15% rastvor), 2.6 mol / L (0.375 %) TBA-tiobarbiturne kiseline, 0.25 mol / L HCL rastvoriti u destilovanoj vodi i reagens čuvati na +4 °C
2. **TRIS-Cl pufer:** 0.05 mol/L, pH 7,4.

Postupak za određivanje TBARS

	Slepa proba	Analiza
Plazma	-	0,3 mL
TRIS-Cl pufer	0,3 mL	-
Standard	-	-
TBA reagens	0,6 mL	0,6 mL

Promešati i inkubirati 5 minuta u vodenom kupatilu na 100 °C. Ohladiti, centrifugirati na 10.000 g deset minuta na +4 °C i čitati apsorbancu na 535 nm.

Koncentracija TBARS se izračunava metodom molarnog apsorpcionog koeficijenta koji iznosi $1.56 \times 10^5 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ za nastali obojeni kompleks.

3.2.2.2. Određivanje nivoa superoksid anjon radikala u plazmi

Superoksid anjon redukuje nitro grupu aromatičnog jedinjenja nitrobluetetrazolijuma [NBT, 2,2'-di-p-nitrofenil-5,5'-difetil-3,3'-(3,3'-dimetoksi-4,4'-difetilen)-ditetrazolijum hlorid]. Redukcija NBT-a se odvija u dva stupnja i to nepotpuna redukcija do monoformazana i potpuna redukcija do diformazana. U oksidovanoj formi NBT je rastvorljiv u vodi, a redukcijom postaje manje rastvorljiv, zbog čega se dodaje želatin koji održava diformazan u rastvorenom obliku. U vodenim rastvorima, u reakcijama u kojima se stvara superoksid anjon, NBT se nepotpuno redukuje do monoformazana. Pojačana redukcija NBT-a pri višim pH vrednostima je rezultat inhibicije reakcije spontane dismutacije kiseonika, koja kompetira sa reakcijom redukcije NBT. Redukcija NBT se povećava smanjenjem pritiska kiseonika u medijumu, što se postiže uvođenjem azota pod pritiskom i to 1h pre određivanja. Nivo $\text{O}_2^{\cdot-}$ je određivan na automatskom analizatoru ILab300+, nakon optimizacije originalne

metode (108) u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

Reagensi

1. **Fosfatni pufer** , 0.05 mol/L, pH 8,6 uz dodavanje EDTA nu koncentraciji od 0.1 mmol/L.
2. **Radni reagens.** Rastvoriti 1 mmol / L [NBT-a 2,2'-di-p-nitrofenil-5,5'-difenil-3,3'-(3,3'-dimetoksi-4,4'-difenilen)-ditetrazolijum hlorid].

Postupak za određivanje koncentracije superoksidnog anjona

Radni reagens	0,2 mL
Plazma	0,02 mL

Promešati i pratiti povećanje apsorbance na 515 nm na svakih 15 sekundi u toku jednog minuta. Izračunati $\Delta A/\Delta t$. Brzina generisanja superoksidnog anjona se izražava preko brzine stvaranja redukovanog NBT-a. Brzina redukovanja NBT-a se određuje kinetičkim postupkom, a izračunava se metodom molarnog apsorpcionog koeficijenta.

Krajnji izraz za izračunavanje glasi: **Red NBT, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{L} = \Delta A/\text{min} \times 1466$**

3.2.2.3. Metoda za određivanje lipidnih hidroperoksida

U kiseljoj sredini u prisustvu LOOH iz uzorka dolazi do oksidacije Fe^{2+} u Fe^{3+} . Nastali Fe^{3+} formira kompleks sa bojom ksilenol-oranž (o-krezosulfonftalein-3,3'-bismetilimino-bisirčetna kiselina). Intenzitet boje meri se na 540 nm na kojoj apsorbuju uzorak i eventualno prisutne interferirajuće supstance, i na 670 nm gde apsorbuju samo interferirajuće supstance, čime se poništava njihov uticaj. Analiza se izvodi uz proces deproteinizacije sa perhlornom kiselinom. Kao uzorak mogu se koristiti serum ili plazma (EDTA, heparin) (109).

Reagensi

- 1. Ksilenol-oranž 2,5 mM.** U 100 mL H₂O rastvoriti 0,1901g ksilenol-oranža. Napravljeni rastvor ksilenol-oranža stabilan je tri nedelje na temperaturi +4°C.
- 2. Mohrova so, Fe (NH₄)₂(SO₄)₂ 2,5mM u 1,1M HClO₄.** U perhlornoj kiselini rastvoriti 0,098g Mohrove soli. Napravljeni rastvor stabilan je tri nedelje na temperaturi +4°C.
- 3. Perhlorna kiselina, HClO₄ (60%) 1,1M.** U 88 mL destilovane vode dodati 12 mL kiseline (za 100 mL rastvora). Napravljeni rastvor perhlorne kiseline stabilan je mesec dana na temperaturi +4°C.
- 4. Standard-terc-butilhidroperoksid, štok-rastvor 20mM.** Priprema 10 mL rastvora standarda: u normalnom sudu rastvoriti 0,0257 mL tercbutilhidroperoksida i dopuniti do 10 mL redestilovanom vodom. Rastvor je stabilan mesec dana na +4°C.

Izrada standardne krive

Za izradu standardne krive koristiti razblaženja rastvora standarda (štoka) u 0,9% NaCl: 3,125 μM, 6,25 μM, 12,5 μM, 25 μM, 100 μM, 200 μM. Rastvor standarda pripremiti svež, neposredno pre upotrebe.

Izvođenje analize

Metoda je prilagođena za izvođenje na automatskom analizatoru. U kivete se doda 260 μL rastvora ksilenol-oranža i 40 μL dilutovanog uzorka, i inkubira 5 minuta. Zatim dodati 60 μL rastvora Mohrove soli u perhlornoj kiselini i inkubirati na sobnoj temperaturi još 30 minuta i meriti na 540 nm i 670 nm.

3.2.2.4. Metoda za određivanje produkata oksidativne modifikacije proteina (AOPP)

Dodavanjem sirćetne kiseline i rastvora kalijum-jodida 1,16M u uzorak seruma, u prisustvu AOPP-a dolazi do promene apsorbancije koja se meri na 340 nm. Koncentracija AOPP se izražava preko ekvivalenta hloramina T koji se koristi

za izradu standardne krive u koncentracijama 10-100 $\mu\text{mol} / \text{L}$, pri čemu njegova apsorbanacija linearno raste sa porastom koncentracije (110).

Reagensi

- 1. Standardni rastvor Hloramina T (N-hloro-p-toluensulfonamid natrijum), 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$.** Odmeri se 0,028 g Hloramin T-hidrata i rastvori destilovanom vodom do 1000 mL.
- 2. Glacijalna sirćetna kiselina**
- 3. Rastvor kalijum jodida (1,16M).** Odmeri se 19,257g KJ i rastvori destilovanom vodom do 1000 mL.
- 4. Fosfatni pufer 20 mM, pH=7.4.** Rastvori se 3,4 g KH_2PO_4 u 250 mL destilovane vode, i 4,45 g Na_2HPO_4 u 250 mL destilovane vode. U rastvor Na_2HPO_4 dodaje se KH_2PO_4 do pH rastvora 7,4.

Postupak za određivanje AOPP

Koncentracija AOPP je određivana na automatskom analizatoru Ilab 300+, nakon optimizacije originalne metode (110) u laboratoriji Instituta za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Određivanje AOPP se zasniva na metodi završne tačke sa slepom probom reagensa. Za pripremu standardne krive mogu se koristiti koncentracije Hloramina-T: 12,5, 25,50 i 100 $\mu\text{mol} / \text{L}$, koje su pripremljene od Hloramin-T osnovnog rastvora (100 $\mu\text{mol} / \text{L}$). Glacijalna sirćetna kiselina izmešana sa PBS u odnosu 1:8 čini reagens 1 (R1), dok reagens 2 (R2) sadrži kalijum jodid pripremljen takođe u PBS. Uzorku seruma, odnosno standarda (60 μL) se dodaje 300 μL R1 i nakon inkubacije od 60s očitava se prva apsorbanacija uzorka. Nakon toga, reakcionoj smeši dodaje se kalijum jodid i nakon inkubacije od 180s, ponovo meri apsorbanacija na talasnoj dužini 340 nm. Koncentracija AOPP se izračunava iz standardne krive, a izražava se u jedinicama $\mu\text{mol} / \text{L}$ ekvivalenata Hloramina T.

3.2.2.5. Određivanje nivoa totalnog oksidativnog statusa (TOS)

Glavne komponente TOS u serumu su H_2O_2 i lipidni hidroperoksidi. Ukupni oksidansi prisutni u uzorku oksiduju fero jon-orto-dianizidni kompleks u feri jon. Reakcija oksidacije olakšana je molekulom glicerola koji je prisutan u reakcionom medijumu. Nastali feri jon gradi obojeni kompleks sa ksilenol-oranžom u kiseloj sredini, a intenzitet nastale boje meri se spektrofotometrijski na 560 nm i proporcionalan je ukupnom sadržaju oksidacionih molekula u uzorku. Kao standard se koristi vodeni rastvor vodonik-peroksida koncentracija 10-200 $\mu\text{mol/L}$, što odgovara linearnosti metode i očekivanim koncentracijama u biološkom materijalu (111). TOS je određivan na automatskom analizatoru ILab 300+, nakon optimizacije originalne metode u laboratoriji Instituta za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

Reagensi

1.Reagens 1-TOS 1: Priprema se rastvaranjem ksilenol-oranža (114 mg) i NaCl (8,18 g) u 900 mL rastvora H_2SO_4 ($c=25\text{mM}$). U tako dobijeni rastvor dodato je 100 mL glicerola. pH vrednost reagensa treba podesiti na 1,75.

2. Reagens 2-TOS 2: Priprema se rastvaranjem feroamonijum sulfata (1,96 g) i o-dianizidin dihidrohlorida (3,17 g) u 1000 mL rastvora H_2SO_4 ($c=25\text{mM}$).

Postupak za određivanje TOS

	Analiza	Standard	Slepa proba
TOS 1	450 μL	450 μL	450 μL
TOS 2	22 μL	22 μL	-
Serum	70 μL	-	-
Standard	-	70 μL	-
Dejonizovana voda	-	-	70 μL

Sadržaj se promeša i inkubira 3 minuta, nakon čega se apsorbance čitaju pri talasnoj dužini od 560nm.

3.2.2.6. Određivanje nivoa prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB)

Određivanjem PAB meri se koncentracija vodonik peroksida (H_2O_2) u antioksidativnom okruženju. Hromogen 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) reaguje sa vodonik peroksidom i sa antioksidansima (mokraćnom kiselinom) istovremeno, obzirom da su obe komponente prisutne u uzorku zajedno. Reakcija vodonik peroksida i hromogena je enzimski katalizovana enzimom peroksidazom, pri čemu oksidovanjem TMB-a nastaje intenzivno plavo obojeni produkt. Reakcija mokraćne kiseline i hromogena je nekatalizovana hemijska reakcija u kojoj se TMB katjon redukuje do bezbojnog proizvoda. Intenziteti obojenosti standardnih rastvora su srazmerni odnosu dodatih količina H_2O_2 i mokraćne kiseline. Za pravljenje standardne krive se koriste rastvori H_2O_2 i mokraćne kiseline u različitim odnosima, tako da u početku dominira mokraćna kiselina a na kraju H_2O_2 . Ove dve komponente su izabrane za predstavnike prooksidanasa i antioksidanasa jer ne reaguju jedna sa drugom i ne ometaju aktivnost jedna drugoj prema hromogenu (112).

Reagensi

- 1. TMB I rastvor:** 60 mg TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) supstance rastvori se u 10 mL dimetilsulfoksida (DMSO), rastvor se podeli na zapremine od 1,1 mL i čuva na $-20^{\circ}C$.
- 2. TMB katjon:** 1 mL TMB / DMSO (TMB I) doda se u 50 mL acetatnog pufera (0,05M, pH 4,5), zatim se doda 175 μL sveže pripremljenog hloramina T ($100 \text{ mmol} \times L^{-1}$), dobro se promeša i inkubira 1 sat na $37^{\circ}C$, na tamnom mestu uz stalno mešanje. Nakon toga, u 50 mL TMB katjona doda se 25 U enzima peroksidaze. Dobijeni rastvor pažljivo se promeša, podeli u zapremine od 1,1 mL i čuva na $-20^{\circ}C$.
- 3. TMB II rastvor:** 200 μL TMB/DMSO se rastvori u 10 mL acetatnog pufera (0,05M, pH 5,6). Rastvor je najbolje koristiti sveže pripremljen ili maksimalno u roku od 2 dana, uz čuvanje na $+4^{\circ}C$.
- 4. Radni rastvor:** 1 mL TMB katjona se doda u 10 mL TMB rastvora II i 6 minuta meša na sobnoj temperaturi na tamnom mestu. Radni rastvor se koristi odmah, sveže pripremljen.

- 5. Standardni rastvor:** Standardni rastvori se pripremaju mešanjem različitih odnosa (0-100%) 1 mmol / L H₂O₂ sa 6 mmol / L mokraćnom kiselinom (rastvorenom u 10 mM NaOH).

Priprema standardnih rastvora za određivanje PAB

Standardni rastvor	1	2	3	4	5
Mokraćna kiselina (μL)	100	75	50	25	0
H ₂ O ₂ (μL)	0	25	50	75	100

Postupak za određivanje PAB

Pomeša se 10 μL uzorka, standardnog rastvora i slepe probe (destilovana voda) sa 180 μL radnog rastvora i inkubira 12 minuta na 37°C na tamnom mestu. Nakon inkubacije, reakcija se prekida dodatkom 40 μL 2mol / L hlorovodonične kiseline, pri čemu se dobijena plava boja prevodi u žutu. Apsorbancija se meri na 450 nm. Koncentracije PAB uzorka određuju se iz standardne krive pripremljene sa standardnim rastvorima. Vrednosti PAB izražavaju se u arbitrarnim jedinicama - HKU (hidrogenperoksid komplementarne jedinice), koje predstavljaju procenat H₂O₂ u standardnim rastvorima pomnožen sa 6.

3.2.3. ODREĐIVANJE PARAMETARA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE

3.2.3.1. Određivanje aktivnosti enzima superoksid dismutaza (SOD) u plazmi

Aktivnost SOD određivana je na automatskom analizatoru ILab 300+, nakon optimizacije originalne metode (113) u laboratoriji Instituta za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Metoda se zasniva na sposobnosti SOD da u baznoj sredini (pH 10,2) inhibira spontanu autooksidaciju adrenalina. Autooksidacija adrenalina je inicirana tragovima teških metala koji su prisutni u reagensima kao nečistoće. Aktivnost enzima izražava se u relativnim jedinicama, koje se dobijaju merenjem apsorbancije nastalog crvenog produkta oksidacije adrenalina na 480 nm, bez prisustva SOD (kontrola) i u prisustvu SOD (analiza). Aktivnost SOD u uzorku se izračunava kao procenat inhibicije autooksidacije adrenalina.

Reagensi:

1. **Karbonatni pufer:** 0,05 mmol/L, pH 10,2, kome je dodat 1 mmol/L EDTA
2. **Hlorovodonična kiselina,** 15 mmol/L
3. **Osnovni rastvor adrenalina,** 10 mmol/L, rastvoren u 15 mmol/L HCL

Postupak za određivanje aktivnosti enzima SOD

	Kontrola	Analiza
Plazma	-	0,010 mL
Pufer	0,700 mL	0,690 mL
Adrenalin	0,050 mL	0,050 mL

Nakon pokretanja reakcije, koja započinje dodavanjem adrenalina u reakcionu smešu i perioda preinkubacije (3 minuta), apsorbancija se očitava svaki minut u toku naredna 3 minuta. Iz dobijenih vrednosti, izračuna se $\Delta A/\text{min}$ za kontrolu i analize.

Izračunavanje:

Relativna jedinica aktivnosti SOD definisana je kao ona aktivnost koja dovodi do 50% inhibicije adrenalina pod određenim uslovima. Izabrana je ona koncentracija adrenalina (5 mmol / L) koja u kontroli daje $\Delta A / \text{min}$ 0,025, obzirom da pri ovoj vrednosti promene apsorbancije, SOD postiže najviši procenat inhibicije autooksidacije adrenalina. Pri tome se polazi od koncentracije adrenalina od 10 mmol/L, a zatim se on razblažuje dok se ne postigne ΔA od 0,025. Obzirom na definiciju relativne jedinice aktivnosti enzima SOD, jedinična aktivnost bi dovela do 50%-nog smanjenja apsorbancije odnosno $\Delta A / \text{min}$ u takvom uzorku bi bila 0,0125.

Aktivnost SOD u relativnim jedinicama izračunava se preko sledeće proporcije:

$$0,0125: 1U = [0,025 - (\Delta A \text{ analize} / \text{min})] : X$$

Da bi se dobila aktivnost u 1 mL plazme dobijena vrednost se množi sa razblaženjem uzorka ($V_{\text{ukupna}} / V_{\text{uzorka}}$), a zatim sa 1000 da bi se dobila aktivnost u zapremini od 1 L plazme.

$$\text{SOD U/L} = X \times V_{\text{uk}} / V_{\text{uz}} \times 1000$$

3.2.3.2. Određivanje ukupnog sadržaja sulfhidrilnih grupa (SH)

Princip metode zasniva se na činjenici da 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzojeva kiselina (DTNB) u baznoj sredini reaguje sa alifatičnim tiolima i daje žuto obojeni p-nitrofenol, a intenzitet reakcije meri se spektrofotometrijski na 412 nm. Ukupan sadržaj SH grupa određivan je na automatskom analizatoru ILab 300+, nakon optimizacije originalne metode (114) u laboratoriji Instituta za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu.

Reagensi

- 1. Fosfatni pufer:** 0,2 mol/L K_2HPO_4 , 2 mmol/L EDTA, pH 9,0
- 2. DTNB reagens,** 10 mmol/L, rastvoren u 50 mmol/L fosfatnog pufera, pH 7,0.

Postupak za određivanje koncentracije sulfhidrilnih grupa

	Slepa proba	Analiza
Pufer	0,95 mL	0,90 mL
Plazma	-	0,05 mL
DTNB reagens	0,02mL	0,02mL

Smeša se inkubira na tamnom mestu 25 minuta na 25°C i nakon toga apsorbancija se očitava na 412 nm prema slepoj probi. Koncentracija ukupnog sadržaja SH grupa izračunava se preko molarnog apsorpcionog koeficijenta p-nitrofenola na 412 nm, koji za date uslove iznosi $13600 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

$$\text{SH grupe mmol/L} = A_a / \epsilon \times V_{\text{uk}} / V_{\text{uz}} \times 1000$$

$$\epsilon = 13600 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

V_{uk} – ukupna zapremina (0,97 mL)

V_{uz} – zapremina uzorka (0,05 mL)

3.2.3.3. Određivanje nivoa totalnog antioksidativnog statusa u serumu (TAS)

Totalni antioksidativni status određen je kolorimetrijskom metodom na automatskom analizatoru ILab 300+, nakon optimizacije originalne metode (115) u laboratoriji Instituta za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Princip reakcije zasniva se na oksidaciji stabilnog hromogena 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonska kiselina katjona (ABTS⁺) pomoću vodonik peroksida u kiseloj sredini, pri čemu nastaje smaragdna boja. Kada se obojeni ABTS⁺ jon pomeša sa nekom supstancom koja može da se oksiduje (antioksidans), redukuje se do bezbojnog ABTS-a, što se manifestuje promenom boje i obezbojavanjem ispitivanog rastvora. Intenzitet obezbojavanja srazmeran je koncentraciji prisutnih ukupnih antioksidanasa u uzorku. Vrednosti se očitavaju iz standardne krive, a najčešće upotrebljavan standard je trolox, hidrosolubilni ekvivalent vitamina E. Dobijeni rezultati izražavaju se u mmol Trolox ekvivalenta / L. Pri konstruisanju standardne krive koriste se rastvori Troloxa

sledećih koncentracija: 0,125 mmol/L, 0,25 mmol/L, 0,5 mmol/L, 0,75 mmol/L, 1 mmol/L, 1,5 mmol/L i 2,0 mmol/L.

3.2.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA PARAOKSONAZA 1 (PON 1)

Aktivnost enzima paraoksonaza određuje se preko brzine razgradnje supstrata paraoksona (paraoksonazna, POazna aktivnost) i diazoksona (diazoksonazna, DZOazna aktivnost) po metodi Richter-a i Furlong-a (116).

3.2.4.1. Određivanje aktivnosti paraoksonaze prema paraoksonu

Određivanje aktivnosti PON 1 prema paraoksonu zasniva se na delovanju enzima na supstrat paraokson, pri čemu nastaje obojeni p-nitrofenol. Brzina reakcije prati se kinetički na 405 nm, što je maksimum apsorbance p-nitrofenoksidnog anjona, u koji prelazi p-nitrofenol u baznim uslovima reakcije. Paraoksonazna aktivnost određivana je na automatskom analizatoru ILab 300+, nakon optimizacije originalne metode u laboratoriji Instituta za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Reagensi

1. Radni pufer: 116 g NaCl se rastvori u 800 mL destilovane vode koja već sadrži 100 mL 1 mol/L TRIS-HCl pufera, pH 8,5 i 2 mL 1 mol/L rastvora CaCl₂. Rastvor se dopuni do 1000 mL destilovanom vodom i čuva na sobnoj temperaturi.

2. Diluent pufer: U 800 mL destilovane vode doda se 10 mL 1 mol/L TRIS-HCl pufera, pH 8,5 i 2 mL 1 mol/L rastvora CaCl₂, dopuni se destilovanom vodom do 1000 mL i čuva na sobnoj temperaturi.

3. Zasićeni rastvor NaOH minimalne koncentracije 2 mol/L, koristi se za dekontaminaciju korišćenog posuđa i razgradnju preostalog paraoksona i diazoksona pre bacanja u slivnik.

4. Paraokson supstrat 1,2 mmol/L: 12,9 µL paraoksona rastvori se u 50 mL radnog pufera u normalnom sudu i dobro promeša.

Postupak za određivanje paraoksonazne aktivnosti

4 μL razblaženog seruma (diluent puferom u odnosu 1:10) pomeša se sa 400 μL rastvora paraoksona i meri promena apsorbance na 405 nm u toku 3 min. Paraoksonazna aktivnost se izražava kao μmol stvorenog p-nitrofenola/min/L ili kao U/L.

3.2.4.2. Određivanje aktivnosti paraoksonaze prema diazoksonu

Određivanje diazoksonazne aktivnosti zasniva se na delovanju PON 1 enzima na supstrat diazokson, pri čemu nastaje 2-izopropil-4-metil-6-hidroksipirimidin (IMHP). Brzina ove promene meri se kinetički na 270 nm u toku 3 minuta i računa se promena apsorbancije u minutu. Za izračunavanje $\Delta A/\text{min}$ softverski se selektuje samo linearni deo reakcije.

Reagensi

1. Radni pufer: 116 g NaCl rastvori se u 800 mL destilovane vode, u kojoj se nalazi 100 mL 1 mol/L TRIS-HCl pufera, pH 8,5 i 2 mL 1 mol/L rastvora CaCl_2 . Rastvor se dopuni do 1000 mL destilovanom vodom i čuva na sobnoj temperaturi.

2. Diluent pufer: U 800 mL destilovane vode doda se 10 mL 1 mol/L TRIS-HCl pufera, pH 8,5 i 2 mL 1 mol/L rastvora CaCl_2 , dopuni vodom do 1000 mL i čuva na sobnoj temperaturi.

3. Zasićen rastvor NaOH minimalne koncentracije 2 mol/L, koristi se za dekontaminaciju korišćenog posuđa i razgradnju preostalog paraoksona i diazoksona pre bacanja u slivnik.

4. Diazokson supstrat 1,0 mmol/L: 2,8 μL diazoksona rastvori se u 10 mL radnog pufera i dobro promeša.

Postupak za određivanje diazoksonazne aktivnosti

50 μL razblaženog seruma (diluent puferom 1:20) pomeša se sa 500 μL rastvora diazoksona i promena apsorbancije meri spektrofotometrijski na 270 nm. Diazoksonazna aktivnost se meri na 23°C na pH 8,5. DZOazna aktivnost se izražava kao μmol stvorenog IMHP/min/L ili kao IU/L.

Krajnja formula za izračunavanje aktivnosti PON1 prema diazoksonu glasi:

$$\Delta A/\text{min} \times 73\,333 = \mu\text{mol IMHP}/\text{min}/\text{L} = \text{IU}/\text{L PON1 aktivnosti}$$

Određivanje" fenotipa aktivnosti" PON1_{Q192R}

Poređenjem enzimске aktivnosti PON1 prema dva supstrata, paraoksonu i diazoksonu, može se odrediti fenotip PON1 na položaju 192 (116,117). U tu svrhu se u koordinatnom sistemu na x-osu nanese paraoksonazne aktivnosti, a na y-osu diazoksonazne aktivnosti svake osobe. Određivanjem odnosa DZOazne / POazne aktivnosti, i položajem tačaka na grafiku koji predstavlja presek ove dve aktivnosti, određuje se fenotip PON1_{Q192R}. Na osnovu izračunatog odnosa enzimskih aktivnosti osobe se mogu podeliti u tri fenotipa: PON1_{Q192}, PON1_{Q192R} i PON1_{R192} fenotip.

3.2.5. RAZDVAJANJE LDL I HDL SUBFRAKCIJA

Razdvajanje LDL i HDL subfrakcija vršeno je metodom vertikalne elektroforeze na poliakrilamidnom gradijent gelu (3-31%), koji omogućava istovremeno razdvajanje ovih čestica na osnovu njihove razlike u veličini, a pod dejstvom istosmerne struje (118,119).

Reagensi

- 1. Tris pufer pH 8,3:** 90 mmol/L Tris, 80 mmol/L borne kiseline i 2,5 mmol/L Na₂EDTA
- 2. Rastvor akrilamida 3%:** 28,8 g/L akrilamida i 1,2 g/L metilen-bis-akrilamida

3. **Rastvor akrilamida 31%:** 292,5 g/L akrilamida i 17,05 g/L metilen-bis-akrilamida
4. **APS rastvor:** amonijum-persulfat rastvor 100 mg/1 mL Tris pufera
5. **TEMED** (tetrametilen-diamid)
6. **Boja Sudan black B:** 5 g boje zagreva se u 45% etanolu na +50°C uz mešanje u toku 6 sati
7. **Coomassie brilliant blue G-250 0,75%:** rastvori se u smeši etanol : sirćetna kiselina : voda 3:1:8 (v/v)

Rastvori monomera se nakon pripreme i degaziranja mogu čuvati na +4°C.

Postupak za izvođenje gradijent gel elektroforeze

Elektroforetsko razdvajanje vršeno je u vertikalnoj kadi Hoefer SE 600 Ruby (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria) na 8°C u Tris puferu pH 8,35 (90 mmol/L Tris, borne kiseline 80mmol/L i 2,7 mmol/L Na₂EDTA). Pre nanošenja uzorka, gelovi se aktiviraju u toku 50 min na 290 V. 30 µL plazme meša se sa 10 µL 0,1% rastvora bromfenol-plavog u 40% rastvoru saharoze i na gel se nanosi 25 µL ove smeše. Paralelno sa uzorcima na svaki gel su u posebne trake nanošeni standardi.

Elektroforeza je izvođena pri konstantnom naponu, po sledećem protokolu:

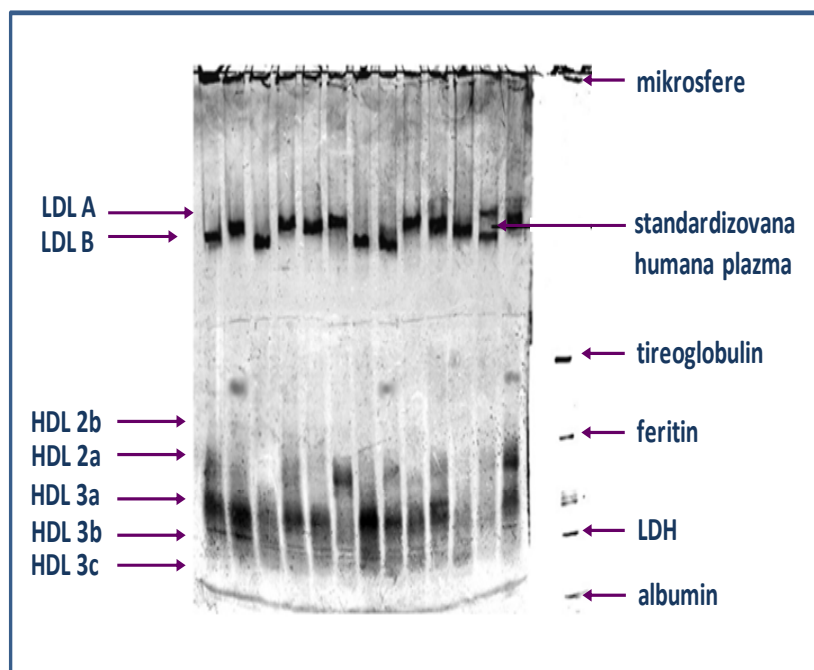
1. 60 V u toku 30 minuta
2. 170 V u toku 20 minuta
3. 300 V u toku 20 sati.

Gelovi su kalibrisani upotrebom sledećih standarda:

1. Visokomolekularni proteinski standardi za kalibraciju (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria) koji sadrže proteine poznatog dijametra: tireoglobulin (17,0 nm), feritin (12,2 nm), laktat dehidrogenazu (8,4 nm) i albumin (7,1 nm). Proteinski standardi se pripremaju tako što se na jednu bočicu standarda dodaje 100 µL TRIS pufera za elektroforezu pH 8,35. 20 µL rastvorenog standarda se meša sa 10 µL 0,1% rastvora bromfenol-plavog u 40% rastvoru saharoze. Na svaki gel se u krajnju traku nanosi po 10 µL obojenog standarda.

2. Standardizovana smeša humane plazme koja sadrži dve LDL subfrakcije (dijametri 26,99 nm i 25,52 nm). Smeša je standardizovana u Laboratoriji za genetiku lipoproteina (Southwest Foundation for Biomedical Research, San Antonio, TX, USA) zahvaljujući timu prof. Rainwatera. Na svaki gel u posebnu traku nanosi se po 30 μ L standardne humane plazme.
3. Karboksilovane polistirenske mikrosfere dijametra 40nm (Duke Scientific Corporation, Paolo Alto, CA, USA). Na 10 μ L mikrosfera dodaje se 40 μ L TRIS pufera za elektroforezu pH 8,35 i 50 μ L boje Sudan Black B (5 g/L u 45% etanolu), a zatim 6 sati zagreva uz mešanje na +4°C. Nakon hlađenja smeši se dodaje 100 μ L 0,1% rastvora bromfenol-plavog u 40% rastvoru saharoze. Na svaki gel nanosi se 10 μ L smeše mikrosfera u traku sa proteinskim standardima i to 60 minuta nakon otpočinjanja treće faze protokola za izvođenje elektroforeze, kako bi se izbeglo mešanje sa standardnim proteinima. Zajedno sa standardizovanom humanom plazmom i tireoglobulinom, karboksilovane mikrosfere služe za konstruisanje kalibracione krive za veličinu LDL čestica.

Po završetku elektroforeze, proteinski standardi i ostatak gela fiksiraju se sat vremena u 10% rastvoru trihlorsirćetne kiseline, a zatim sat vremena ispiraju u 45% rastvoru etanola. Gelovi se preko noći boje u rastvoru Sudan black B (Merck, Darmstadt, Germany), a nakon toga odbojavaju u 45% etanolu. Traka sa proteinskim standardima se nakon fiksiranja u trihlorsirćetnoj kiselini ispere destilovanom vodom, a zatim se boji sa 0,75% Coomassie brilliant blue G-250 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Uklanjanje viška boje vrši se smešom etanol : sirćetna kiselina : voda 3 : 1 : 8 (v/v). nakon odbojavanja, gelovi i proteinski standardi se drže preko noći u TRIS puferu pH 8,35.



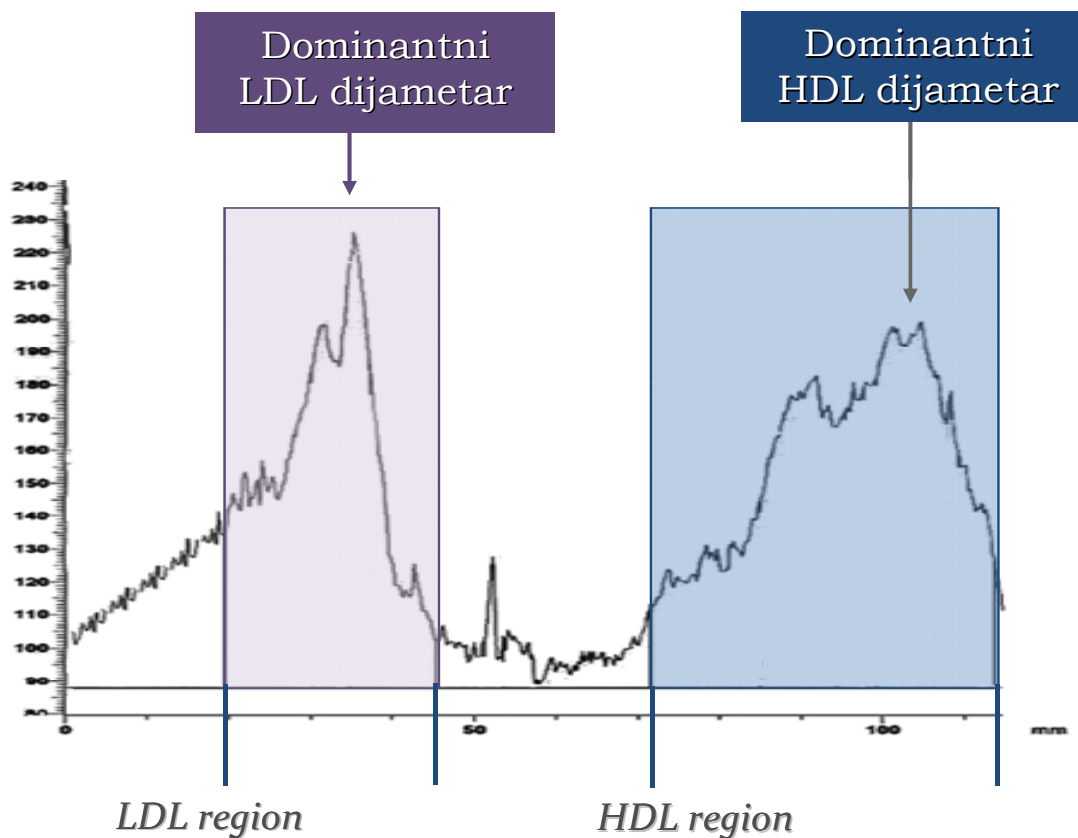
Slika 6. Vizualizacija lipoproteinskih subfrakcija i standarda nakon elektroforeze i bojenja gela

Denzitometrijsko skeniranje gelova zajedno sa proteinskim standardima vršeno je na skeneru Image Scanner (Amersham Pharmacia Biotech, Vienna, Austria), uz korišćenje programa: Magic scan software (version 4.6;1999; UMAX Data Systems, Inc) po transmisivnom modelu na 300 dpi, a dobijeni prikaz se zatim prenosio u program za analizu: Image Quant software (version 5.2;1999; Molecular Dynamics), koji omogućava određivanje dijametara i raspodele LDL i HDL subfrakcija. Po završetku skeniranja, gelovi se čuvaju na +4°C u hermetički zatvorenim plastičnim kesicama u TRIS puferu pH 8,35 uz dodatak Na-azida (20 mg/L).

Za ispitivanje LDL i HDL subfrakcija korišćene su dve kalibracione krive zasnovane na inverznom odnosu relativne migracione daljine (R_f) i prirodnog logaritma dijametara odgovarajućih standarda. Nakon kalibracije, na gelu su određeni regioni koji su odgovarali pojedinačnim LDL i HDL subfrakcijama. Karakteristike korišćenih gelova omogućile su razdvajanje i identifikaciju sledećih LDL subfrakcija: LDL I (27,2-28,5 nm), LDL II (25,5-27,2 nm), LDL III (24,2-25,5 nm) i LDL IV (22,0-24,2 nm). HDL čestice su razdvojene na: HDL 2b (9,7-12,0nm), HDL 2a (8,8-9,7nm), HDL 3a (8,2-8,8 nm) i HDL 3c (7,2-7,8nm).

Na osnovu denzitometrijskog prikaza moguće je odrediti dominantni LDL i HDL dijametar čestice, a na osnovu dominantnog dijametra procenjuje se da li ispitanik pripada LDL fenotipu A ili B, odnosno HDL fenotipu 2 ili 3.

Površina ispod denzitometrijskog pika omogućuje određivanje relativnog (%) udela svake pojedinačne subfrakcije u ukupnom LDL ili HDL profilu ispitanika. Zbir relativnih udela LDL III i IV subfrakcija jednak je relativnom udelu malih gustih LDL, a zbir relativnih udela HDL 3a, 3b i 3c subfrakcija jednak je relativnom udelu malih gustih HDL čestica.



Slika 7. Denzitometrijski scan razdvojenih LDL i HDL subfrakcija u uzorku plazme: LDL dijametar $> 25,5$ nm, LDL I i LDL II (LDL A fenotip), LDL dijametar $\leq 25,5$ nm, LDL III i LDL IV (LDL B fenotip), HDL dijametar $> 8,8$ nm, HDL 2 fenotip, HDL dijametar $\leq 8,8$ nm, HDL 3 fenotip.

3.3. STATISTIČKA ANALIZA

Provera tipa raspodele kontinuiranih podataka u ovom istraživanju rađena je upotrebom Kolmogorov-Smirnov testa. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti i standardne devijacije ($\bar{x} \pm SD$) ukoliko su sledili normalnu raspodelu, odnosno kao geometrijske srednje vrednosti i intervali pouzdanosti (CI), ukoliko vrednosti nisu bile normalno distribuirane ali su nakon logaritmovanja sledile normalan tok (120). Ukoliko varijable ni nakon logaritamske transformacije nisu sledile normalnu raspodelu prikazane su kao medijane i interkvartilni rasponi. Kategorički podaci su prikazani kao apsolutne frekvence.

Poređenje normalno distribuiranih kontinuiranih varijabli izvođeno je upotrebom Studentovog t-testa ili testa analize varijanse (ANOVA) sa Tukey's post hoc testom, u zavisnosti od toga koliko grupa podataka se poredi. Varijable koje ne prate normalnu raspodelu poređene su Mann-Whitney i Kruskal-Wallis testovima. Razlike između kategoričkih varijabli proveravane su upotrebom χ^2 testa (tablice kontigencije).

Provera postojanja značajnih korelacionih odnosa između ispitivanih varijabli rađena je Spearmanovom neparametarskom korelacionom analizom. Multipla regresiona analiza je korišćena za identifikaciju nezavisnih faktora uticaja na pojedine promenljive.

Minimalni uslov za postojanje statistički značajne razlike je bio kada je verovatnoća (p , nivo značajnosti) bio manji ili jednak 0,05.

Statistička obrada podataka izvedena je korišćenjem računarskih programa MS Excel i Medcalc (MedCalc ver. 11.4 Software, Belgium).

4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

4.1. DEMOGRAFSKE KARAKTERISTIKE ISPITANICA

U sprovedenom istraživanju su učestvovala 43 zdrave trudnice prosečne starosne dobi $30,0 \pm 4,15$ godine i 42 zdrave negravidne žene prosečne starosne dobi $30,4 \pm 4,93$ godine, uparene po godinama starosti ($P = 0,718$). Najveći broj ispitanica, 34 trudnice (79%) imale su pre trudnoće indeks telesne mase (ITM) u granicama optimalne uhranjenosti ($18,5 < \text{ITM} < 24,9$), 3 trudnice (7,0%) bilo je pothranjeno pre trudnoće ($\text{ITM} < 18,5$), 5 trudnica (11,6 %) su imale prekomernu težinu ($25,0 < \text{ITM} < 29,9$), jedna je bila gojazna ($\text{ITM} > 30,0$). Srednja vrednost ITM u grupi trudnica je bila $21,5 \pm 2,88$, a u kontrolnoj grupi $21,9 \pm 3,54$, tako da među njima nije bilo statistički značajne razlike ($P = 0,552$). Među trudnicama njih 21 (49%) imale su pušačke navike pre trudnoće, a među ženama u kontrolnoj grupi iste navike je imalo 15 (35,7%) žena ($P = 0,154$).

Tokom trudnoće trudnice su dobijale u težini i te promene tokom trudnoće prikazane su u Tabeli 1.

Tabela 1. Dobijanje u težini (%) tokom trudnoće i nakon porođaja (srednja vrednost \pm SD)

Parametar	I Trimestar	II Trimestar	III Trimestar	38. nedelja trudnoće	Posle porođaja
Dobijanje u težini, kg	$2,6 \pm 2,42$	$8,3 \pm 3,31$	$13,1 \pm 3,82$	$15,4 \pm 4,94$	$6,6 \pm 5,22$
Dobijanje u težini, %	$4,2 \pm 4,10$	$13,6 \pm 5,37$	$21,6 \pm 6,47$	$25,2 \pm 7,92$	$11,0 \pm 8,43$

Tokom trudnoće dobijanje u težini je kontinuirano, a posle porođaja, kako je i očekivano težina opada, ali je još uvek 11,0 % viša u odnosu na težinu pre trudnoće.

Vrednosti sistolnog i dijastolnog pritiska kod trudnica tokom trudnoće i nakon porođaja, kao i u kontrolnoj grupi, prikazane su u Tabeli 2.

Tabela 2. Vrednosti sistolnog (SBP) i dijastolnog pritiska (DBP) ispitanica tokom trudnoće i nakon porođaja (srednja vrednost \pm SD)

Parametar	I Trimestar	II Trimestar	III Trimestar	38. nedelja trudnoće	Posle porođaja	Kontrolna grupa
SBP, mmHg	111,7 \pm 11,8	109,5 \pm 11,0	108,3 \pm 8,6	107,8 \pm 9,8	108,3 \pm 11,4	118,3 \pm 11,8
DBP, mmHg	71,3 \pm 8,7	70,2 \pm 7,4	69,4 \pm 6,5	68,6 \pm 7,5	67,9 \pm 8,3	76,3 \pm 10,6

Sve ispitanice su tokom trudnoće i nakon porođaja bile normotenzivne, iako pokazuju nešto niže vrednosti (ali bez statistički značajne razlike) sistolnog i dijastolnog pritiska u odnosu na kontrolnu grupu što je fiziološka karakteristika trudnoće.

Sve trudnice donele su trudnoću do kraja, porodile se u predviđenom terminu prirodnim vaginalnim putem i rodile zdravu decu koja su obzirom na svoje fiziološke karakteristike dobila visoku ocenu na rođenju, sa visokim Apgar skorom u prvom i petom minutu. Termin porođaja i karakteristike novorođenih beba prikazani su u Tabeli 3.

Tabela 3. Termin porođaja i karakteristike novorođenih beba (srednja vrednost \pm SD)

Nedelja trudnoće na porođaju	Pol novorođenih beba M/ Ž	Težina novorođenih beba (g)	Dužina novorođenih beba (cm)	Obim glave novorođenih beba (cm)	Apgar score novorođenih beba u 1. i 5. min
39,5 \pm 1,00	22/21	3459,3 \pm 426,26	51,6 \pm 2,04	35,3 \pm 1,03	8,9 \pm 1,11/ 9,7 \pm 0,98

4.2. OSNOVNI BIOHEMIJSKI I HEMATOLOŠKI PARAMETRI

Vrednosti osnovnih biohemijskih i hematoloških parametara tokom trudnoće i nakon porođaja prikazani su u Tabeli 4 i Tabeli 5. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD, a kod parametara koji ne slede normalnu raspodelu rezultati su prikazani kao geometrijska sredina i 95-ti interval pouzdanosti.

Vrednosti osnovnih biohemijskih parametara naših ispitanica kreću se tokom trudnoće u skladu sa očekivanim fiziološkim promenama koje prate zdravu trudnoću bez komplikacija. Vrednosti ukupnih proteina opadaju tokom trudnoće, da bi porasli nakon porođaja, dok mokraćna kiselina raste u drugom trimestru i dalje tokom trudnoće do porođaja, kao i posle porođaja. Glukoza se kreće tokom trudnoće bez većih varijacija, a nakon porođaja te su vrednosti više nego tokom trudnoće. Ostali biohemijski parametri posle porođaja takođe su u porastu u odnosu na vrednosti tokom trudnoće, sem gvožđa koje ima nižu vrednost u odnosu na period trudnoće. Interesantno je da hsCRP raste tokom trudnoće, da bi u 38. nedelji trudnoće vrednost opadala sa daljom tendencijom pada i nakon porođaja.

Vrednosti osnovnih hematoloških parametara odgovaraju fiziološkim promenama tokom trudnoće. Ukupan broj leukocita i vrednosti granulocita imaju tendenciju rasta tokom trudnoće, da bi opale posle porođaja. Eritrociti, hemoglobin i hematokrit usled fiziološke anemije tokom trudnoće opadaju, a nakon porođaja ove vrednosti rastu. Eritrocitni indeksi ne prate značajne promene tokom trudnoće, kao ni nakon porođaja. Sve promene biohemijskih i hematoloških parametara tokom trudnoće i posle porođaja nisu statistički značajne.

Tabela 4. Osnovni biohemijski parametri tokom trudnoće i nakon porođaja

Parametar	I Trimestar	II Trimestar	III Trimestar	38. nedelja trudnoće	Posle porođaja	Kontrolna grupa
Ukupni proteini, g/L	68,7 ± 10,16	64,2 ± 6,13	63,8 ± 3,20	63,7 ± 4,34	73,5 ± 4,44	70,5 ± 3,73
Glukoza, mmol/L	4,3 ± 0,44	4,3 ± 0,48	4,5 ± 0,50	4,3 ± 0,48	4,8 ± 0,40	4,4 ± 0,45
Mokraćna kiselina, μmol/L	172,5 ± 32,92	218,8 ± 54,09	219,2 ± 38,64	260,8 ± 42,72	275,6 ± 48,13	168,6 ± 25,45
hsCRP, mg/L	2,60 (1,86 - 3,64)	2,78 (2,09 - 3,72)	2,79 (1,95 - 3,93)	2,52 (1,79-3,53)	1,51 (1,10-2,07)	1,40 (1,06-2,05)
Urea, mmol/L	3,1 ± 0,68	2,9 ± 0,75	2,6 ± 0,84	2,7 ± 0,77	4,8 ± 1,23	4,4 ± 1,09
Kreatinin, μmol/L	63,6 ± 6,41	62,4 ± 6,51	62,9 ± 8,03	67,9 ± 7,61	82,5 ± 8,20	63,5 ± 8,41
Bilirubin, μmol/L	9,2 ± 5,06	7,5 ± 3,37	7,5 ± 4,20	8,6 ± 5,33	11,1 ± 8,23	11,9 ± 5,42
Gvožđe, μmol/L	20,7 ± 5,56	18,7 ± 8,07	15,5 ± 7,89	17,7 ± 8,57	13,3 ± 5,95	16,3 ± 5,74
AST, U/L	17,5 ± 2,97	20,2 ± 7,74	21,7 ± 7,49	23,0 ± 12,71	24,1 ± 10,71	18,2 ± 2,55
ALT, U/L	14,4 ± 6,17	19,4 ± 17,00	21,9 ± 21,28	22,5 ± 35,18	28,2 ± 23,09	17,4 ± 3,12

Tabela 5. Osnovni hematološki parametri trudnica tokom trudnoće i nakon porođaja

Parametar	I Trimestar	II Trimestar	III Trimestar	38 .nedelja trudnoće	Posle porođaja	Kontrolna grupa
Leukociti, x 10 ⁹	8,1 ± 1,96	9,3 ± 2,05	9,7 ± 2,21	10,2 ± 5,40	6,7 ± 1,38	5,7 ± 1,29
Eritrociti, x 10 ¹²	4,0 ± 0,23	3,7 ± 0,25	3,8 ± 0,25	3,9 ± 0,28	4,4 ± 0,31	4,42 ± 0,32
Hemoglobin, g/L	124,5 ± 8,49	115,8 ± 8,37	115,0 ± 8,28	118,9 ± 9,42	129,0 ± 8,74	131,0 ± 8,29
Hematokrit, %	35,6 ± 2,28	33,0 ± 2,30	33,5 ± 2,27	34,5 ± 2,57	37,5 ± 2,45	39,8 ± 2,83
MCV, fL	87,9 ± 3,15	88,5 ± 3,65	88,2 ± 4,00	87,8 ± 4,59	85,4 ± 4,73	90,3 ± 4,16
MCH, pg	30,7 ± 1,36	31,0 ± 1,41	30,3 ± 1,72	30,2 ± 2,01	29,4 ± 2,04	29,7 ± 1,69
MCHC, g/L	349,6 ± 7,60	349,2 ± 17,60	342,9 ± 8,66	342,1 ± 18,41	344,1 ± 8,96	329 ± 9,60
Trombociti, x 10 ⁹	217,7 ± 50,52	236,9 ± 54,18	218,8 ± 50,78	216,0 ± 56,66	289,1 ± 57,40	210,5 ± 48,82

4.3. REZULTATI ISPITIVANJA PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA I ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE

4.3.1. REZULTATI ISPITIVANJA PARAMETARA OKSIDATIVNOG STRESA

Parametri oksidativnog stresa naših ispitanica tokom trudnoće i nakon porođaja, kao i vrednosti ispitivanih parametara kontrolne grupe negravidnih žena prikazani su u Tabeli 6. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD. Kod parametara koji ne prate normalnu raspodelu rezultati su prikazani kao geometrijska srednja vrednost i 95-ti interval pouzdanosti.

Analizom Student-t testa svakog od ispitivanih parametara tokom trudnoće i posle porođaja utvrđena je značajnost razlike u kretanju vrednosti tokom ispitivanog perioda prema prvom trimestru. Takođe je izvršeno poređenje u odnosu na kontrolnu grupu, i to prvog trimestra kako bismo videli da li postoji odstupanje vrednosti sa početka trudnoće u odnosu na negravidne žene, kao i perioda posle porođaja da bi se videla dinamika kretanja ispitivanih parametara u ovom periodu prema vrednostima populacije negravidnih žena, odnosno vraćanje na nivo vrednosti negravidnih žena.

TBARS je krajnji produkt razgradnje lipidnih peroksida i predstavlja marker kasne faze oštećenja oksidansima. Tokom trudnoće te vrednosti su uglavnom nepromenjene, a statistička analiza pokazala je da ne postoji značajna razlika u vrednostima tokom trudnoće u odnosu na početak trudnoće. Vrednosti posle porođaja su, međutim, značajno više u odnosu na početak trudnoće, kao i u odnosu na kontrolnu grupu.

Slično je kretanje i vrednosti LOOH tokom trudnoće, a vrednosti na početku trudnoće, kao i sedam nedelja nakon porođaja značajno su više od vrednosti u kontrolnoj grupi.

AOPP kao pouzdan indirektan marker oksidativnog oštećenja proteina značajno raste tokom trudnoće i već od drugog trimestra vrednosti su značajno veće nego na početku trudnoće. Posle porođaja vrednosti značajno opadaju u odnosu na početak trudnoće, ali nisu značajno različite od vrednosti kontrolne grupe.

Tabela 6. Vrednosti parametara oksidativnog stresa

Parametar	I Trimestar	II Trimestar	III Trimestar	38. nedelja trudnoće	Posle porođaja	Kontrolna grupa
TBARS, $\mu\text{mol/L}$	$1,0 \pm 0,28$	$1,1 \pm 0,30$	$1,1 \pm 0,35$	$1,0 \pm 0,22$	$1,3 \pm 0,23^{a,b}$	$0,9 \pm 0,42$
LOOH, $\mu\text{mol/L}$	$9,5 \pm 2,1^b$	$9,5 \pm 1,80$	$9,2 \pm 2,39$	$9,4 \pm 2,57$	$9,8 \pm 2,89^b$	$7,9 \pm 1,84$
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	$15,4 \pm 7,46$	$19,2 \pm 7,70^a$	$21,3 \pm 6,88^a$	$21,9 \pm 7,55^a$	$12,7 \pm 7,25^a$	$14,4 \pm 5,51$
$\text{O}_2 \cdot^-$, $\mu\text{mol/L}$	$78,0 \pm 24,4^b$	$82,7 \pm 85,31$	$55,7 \pm 33,72^a$	$71,9 \pm 36,34$	$46,7 \pm 25,28^a$	$48,3 \pm 13,08$
TOS, $\mu\text{mol/L}$	$13,1 \pm 3,24$	$13,6 \pm 3,94$	$14,9 \pm 4,61^a$	$13,0 \pm 3,90$	$12,6 \pm 5,35$	-
PAB, HK jedinice	107,1 (102,9 - 123,3) ^b	146,0 (142,5 - 154,2) ^a	160,6 (147,4 - 170,2) ^a	170,7 (155,4 - 185,3) ^a	60,9 (53,6 - 77,9) ^a	68,6 (61,4 - 76,6)

Tabela 7. Vrednosti parametara antioksidativne zaštite

Parametar	I Trimestar	II Trimestar	III Trimestar	38.nedelja trudnoće	Posle porođaja	Kontrolna grupa
SOD, kU/L	$101,1 \pm 27,38^b$	$73,7 \pm 34,52^a$	$143,2 \pm 38,00^a$	$136,2 \pm 36,08^a$	$151,9 \pm 31,73^{a,b}$	$119,2 \pm 41,19$
SH, g/L	$0,47 \pm 0,08^b$	$0,40 \pm 0,06^a$	$0,51 \pm 0,08^a$	$0,47 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,08^a$	$0,52 \pm 0,10$
TAS, mmol/L	$1,1 \pm 0,14$	$1,1 \pm 0,19$	$1,2 \pm 0,1^a$	$1,2 \pm 0,21^a$	$1,4 \pm 0,13^a$	-

a-statistički značajna razlika u odnosu na prvi trimestar; b-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu; nivo značajnosti: $p < 0,05$

Superoksid anjon ($O_2^{\bullet-}$), slobodni radikal koji se i normalno stvara u metaboličkim reakcijama, raste na početku trudnoće i ta vrednost kasnije tokom trudnoće varira, tako da je u trećem trimestru značajno niža nego u prvom trimestru. Posle porođaja superoksid anjon značajno je niži nego na početku trudnoće, ali se ne razlikuje od vrednosti u kontrolnoj grupi.

Vrednosti TOS rastu tokom trudnoće i u trećem trimestru vrednost je značajno viša u odnosu na prvi trimestar. Dalje prema kraju trudnoće i nakon porođaja vrednosti opadaju prema vrednostima sa početka trudnoće, ali ta razlika nije statistički značajna.

PAB pokazuje značajno više vrednosti u prvom trimestru trudnoće u odnosu na vrednosti kontrolne grupe ne gravidnih žena, ali i u svim ispitivanim periodima trudnoće u odnosu na prvi trimestar. Posle porođaja vrednost PAB-a opada i značajno je niža u odnosu na početak trudnoće i doseže približne vrednosti kontrolne grupe.

4.3.2. REZULTATI ISPITIVANJA PARAMETARA ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE

Rezultati ispitivanja parametara antioksidativne zaštite u grupi trudnica i u kontrolnoj grupi prikazani su u Tabeli 7. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD.

Endogeni sistem antioksidativne zaštite čine antioksidativni enzimi i neenzimski antioksidansi. Superoksid dismutaza (SOD) predstavlja enzim prve linije odbrane od oksidativnog stresa, i njegove vrednosti prema dobijenim rezultatima variraju tokom trudnoće, tako da su u drugom trimestru značajno niže u poređenju sa prvim trimestrom, a u trećem trimestru i neposredno pred porođaj SOD značajno je viša nego na početku trudnoće. Posle porođaja ovaj enzim je značajno viši u odnosu na početak trudnoće i kontrolnu grupu.

SH grupe proteina kao deo neenzimskog sistema odbrane od oksidativnog stresa, ne variraju bitno tokom trudnoće ako se posmatraju srednje vrednosti. Međutim, zbog male standardne devijacije statistička analiza pokazuje da postoji značajna razlika među pojedinim trimestrima: vrednosti u drugom trimestru su značajno niže, a vrednosti u trećem trimestru značajno više u odnosu na prvi trimestar. Vrednosti posle porođaja su

značajno više od vrednosti na početku trudnoće, ali se ne razlikuju od vrednosti u kontrolnoj grupi.

TAS kao marker sveukupne antioksidativne zaštite pokazuje značajno više vrednosti u trećem trimestru, neposredno pred porođaj i nakon porođaja u poređenju sa vrednošću u prvom trimestru.

4.4. REZULTATI ISPITIVANJA LIPIDNIH PARAMETARA

Rezultati ispitivanja lipidnih parametara tokom trudnoće, nakon porođaja i kod kontrolne grupe prikazani su u Tabeli 8. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD, a kod parametara koji ne slede normalnu raspodelu kao geometrijska sredina i 95-ti interval pouzdanosti.

Tabela 8. Vrednosti osnovnih lipidnih parametara tokom trudnoće i posle porođaja

Parametar	I Trimestar	II Trimestar	III Trimestar	38. nedelja trudnoće	Posle porođaja	Kontrolna grupa
Holesterol, mmol/L	4,9 \pm 0,79 ^b	6,3 \pm 0,97 ^a	6,8 \pm 1,05 ^a	6,9 \pm 1,10 ^a	5,4 \pm 1,07 ^{a,b}	4,5 \pm 0,71
Trigliceridi mmol/L	1,0 (0,95 - 1,12) ^b	1,6 (1,48 - 1,78) ^a	2,3 (2,13 - 2,56) ^a	2,7 (2,54 - 3,01) ^a	1,0 (0,87 - 1,14) ^b	0,8 (0,71 - 0,90)
HDL-hol, mmol/L	1,9 \pm 0,36 ^b	2,3 \pm 0,50 ^a	2,1 \pm 0,52 ^a	1,9 \pm 0,45	1,6 \pm 0,35 ^a	1,5 \pm 0,30
LDL-hol, mmol/L	2,5 \pm 0,73	3,2 \pm 0,96 ^a	3,7 \pm 1,04 ^a	3,6 \pm 1,08 ^a	3,3 \pm 1,01 ^{a,b}	2,6 \pm 0,66
ApoAI, g/L	1,5 \pm 0,29	1,7 \pm 0,28 ^a	1,7 \pm 0,32 ^a	1,6 \pm 0,30 ^a	1,2 \pm 0,17 ^{a,b}	1,5 \pm 0,18
ApoB, g/L	0,6 \pm 0,14 ^b	0,8 \pm 0,15 ^a	1,0 \pm 0,17 ^a	1,1 \pm 0,18 ^a	0,8 \pm 0,18 ^a	0,8 \pm 0,15

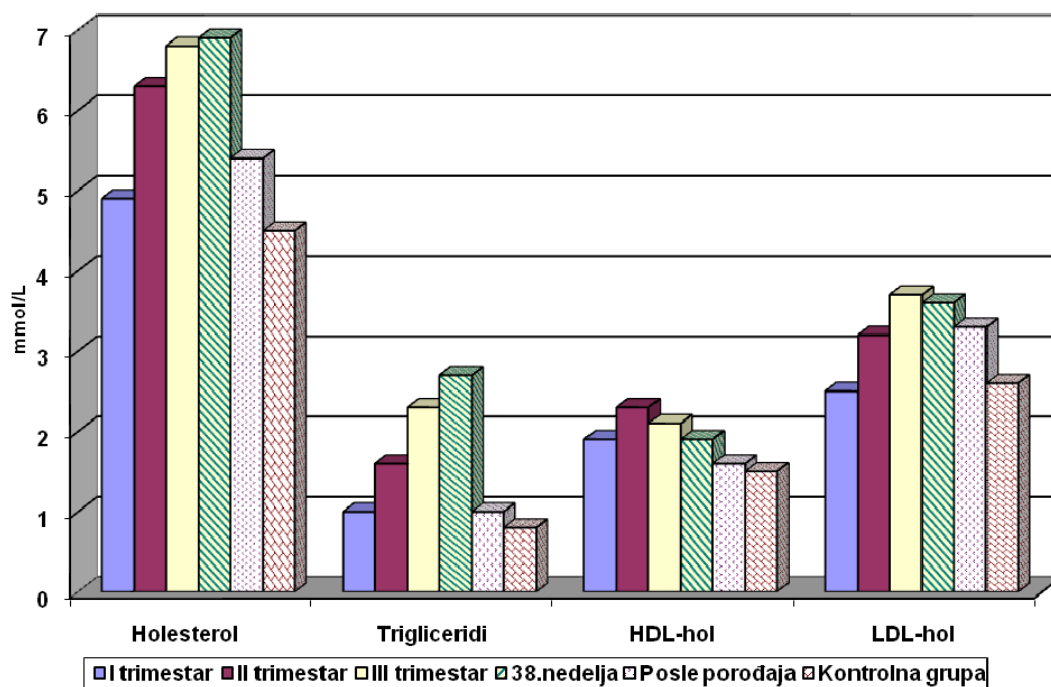
a-statistički značajna razlika u odnosu na prvi trimestar; b-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu; nivo značajnosti $p < 0,05$

Rezultati analize pokazuju kontinuirani porast ukupnog holesterola tokom trudnoće, sa značajno višim vrednostima u odnosu na prvi trimestar. Posle porođaja, iako dolazi do pada vrednosti u odnosu na predporođajni period, ta vrednost ostaje i dalje značajno viša u odnosu na prvi trimestar, ali i u odnosu na kontrolnu grupu.

Značajan porast vrednosti holesterola već u prvom trimestru je očekivan, imajući u vidu značaj holesterola za normalan razvoj fetusa.

Vrednosti triglicerida prate isti trend kretanja tokom trudnoće kao i vrednosti holesterola, sa značajno višim vrednostima u odnosu na početak trudnoće, da bi nakon porođaja te vrednosti opale do nivoa prvog trimestra. Ipak, ova vrednost nakon porođaja ostaje značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu.

Vrednosti pojedinih lipidnih parametara tokom trudnoće, kao i kretanja istih parametara kroz različite trimestre trudnoće i nakon porođaja prikazani su na Slici 8 i Slici 9.

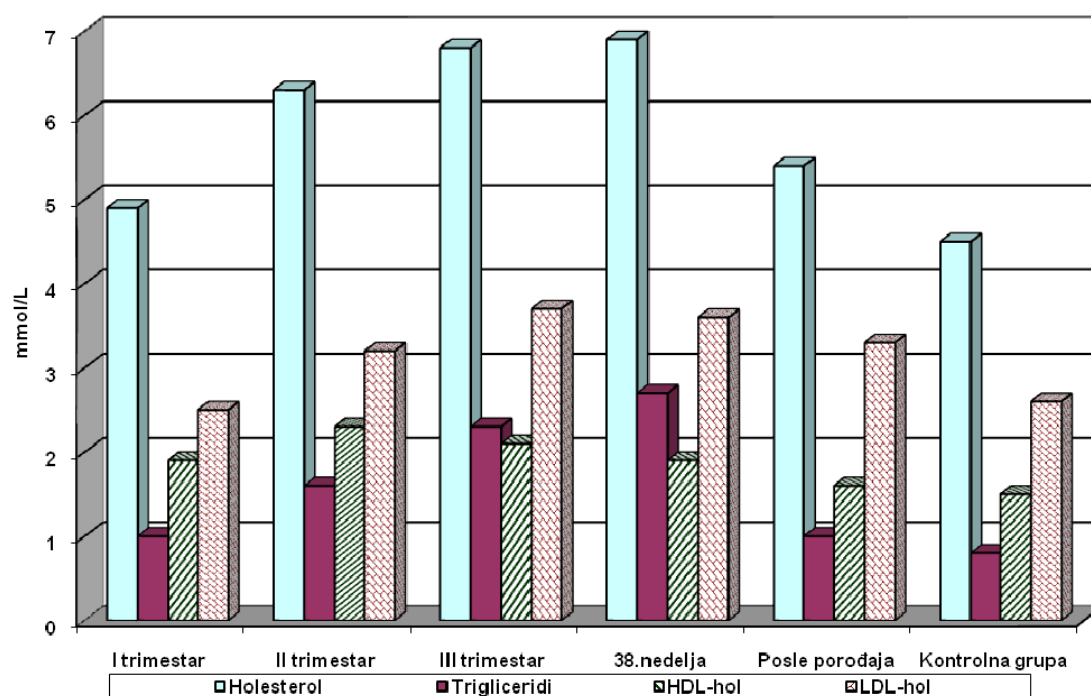


Slika 8. Vrednosti lipidnih parametara tokom trudnoće i nakon porođaja

Vrednosti HDL-holesterola značajno rastu već u prvom trimestru u odnosu na kontrolnu grupu, a najveće su u drugom trimestru, nakon čega lagano opadaju do termina porođaja. Posle porođaja beleži se dalji pad vrednosti, koje su značajno niže u odnosu na vrednosti sa početka trudnoće i približno su jednake vrednostima u kontrolnoj grupi.

LDL-holesterol značajno raste u drugom trimestru i dalje tokom trećeg trimestra i neposredno pred porođaj. Posle porođaja vrednosti LDL-holesterola neznatno opadaju ali su i dalje značajno više nego na početku trudnoće i u odnosu na kontrolnu grupu, odnosno potreban je duži period od ispitivanog da bi se vrednost normalizovala i dovela na nivo pre trudnoće.

Iako HDL-holesterol tokom trudnoće raste, dobijeni rezultat pokazuje da u odmakloj trudnoći, u momentu stagnacije vrednosti HDL holesterola koji ima ateroprotektivno dejstvo, LDL-holesterol svojim daljim rastom u istom periodu postaje dominantna strana ovog odnosa, što ćemo dalje razmotriti analizom ovog odnosa (Tabela 9).



Slika 9. Kretanje lipidnih parametara tokom trudnoće i nakon porođaja

Promene vrednosti ApoAI i ApoB tokom ispitivanog perioda uglavnom prate kretanje vrednosti HDL i LDL-holesterola. Posle porođaja vrednosti su na nivou vrednosti kontrolne grupe u slučaju ApoB, ili niže kada je u pitanju ApoAI.

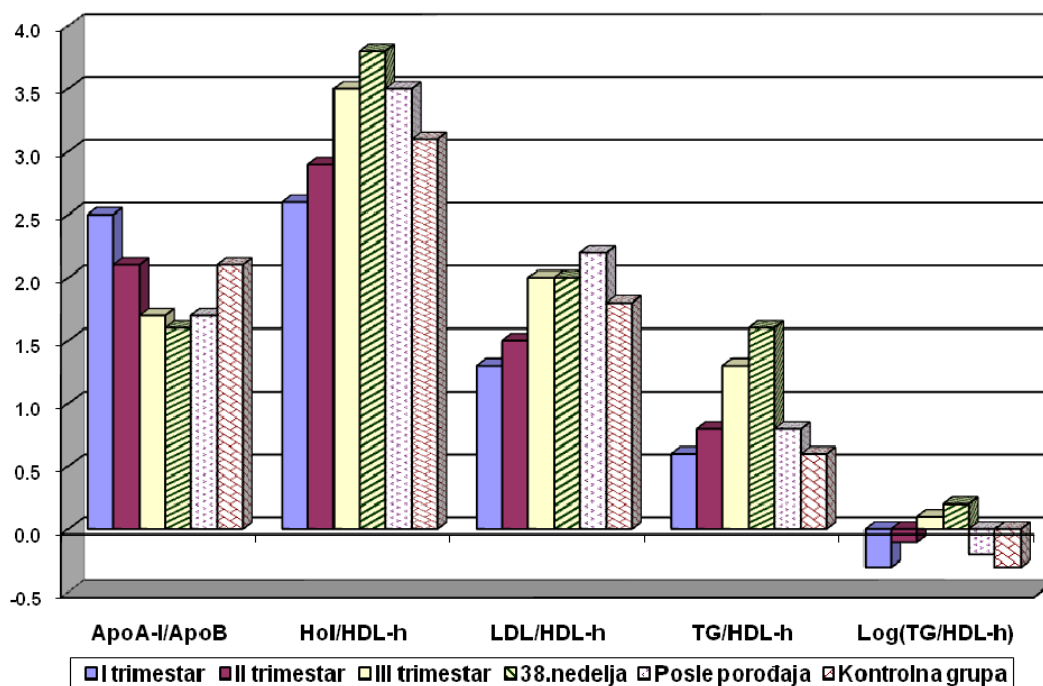
Iz osnovnih lipidnih parametara izračunati su lipidni indeksi a rezultati su prikazani u Tabeli 9 (prikazani kao srednja vrednost \pm SD).

Tabela 9. Vrednosti lipidnih indeksa tokom trudnoće i nakon porođaja

Lipidni indeksi	I Trimestar	II Trimestar	III Trimestar	38. nedelja trudnoće	Posle porođaja	Kontrolna grupa
ApoAI/ApoB	$2,5 \pm 0,72^b$	$2,1 \pm 0,54^a$	$1,7 \pm 0,49^a$	$1,6 \pm 0,43^a$	$1,7 \pm 0,47^{a,b}$	$2,1 \pm 0,49$
Hol/HDL-hol	$2,6 \pm 0,64^b$	$2,9 \pm 0,74^a$	$3,5 \pm 1,19^a$	$3,8 \pm 1,12^a$	$3,5 \pm 1,08^{a,b}$	$3,1 \pm 0,77$
LDL/HDL-hol	$1,3 \pm 0,56^b$	$1,5 \pm 0,67^a$	$2,0 \pm 0,99^a$	$2,0 \pm 0,91^a$	$2,2 \pm 0,91^{a,b}$	$1,8 \pm 0,66$
TG/HDL-hol	$0,6 \pm 0,24$	$0,8 \pm 0,27^a$	$1,3 \pm 0,59^a$	$1,6 \pm 0,72^a$	$0,8 \pm 0,52^a$	$0,6 \pm 0,46$
AIP	$-0,3 \pm 0,16$	$-0,1 \pm 0,17^a$	$0,1 \pm 0,20^a$	$0,2 \pm 0,19^a$	$-0,2 \pm 0,25$	$-0,3 \pm 0,23$

a-statistički značajna razlika u odnosu na prvi trimestar; b-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu; nivo značajnosti $p < 0,05$

Lipidni indeksi koji pokazuju međusobne odnose prethodno prikazanih pojedinačnih lipidnih parametara (Tabela 8) pokazuju rast tokom trudnoće ukazujući na povećanje proaterogenih komponenti lipidnih parametara. Vrednosti značajno rastu u odnosu na prvi trimestar kod svih lipidnih indeksa, sem indeksa ApoAI/ApoB, koji je u drugom trimestru značajno niži nego u prvom trimestru. Do kraja trudnoće ovaj indeks ima dalju tendenciju pada vrednosti, kao i posle porođaja, kada je značajno niži i u odnosu na kontrolnu grupu.



Slika 10. Vrednosti lipidnih indeksa tokom trudnoće i nakon porođaja

Indeksi koji uključuju holesterol i frakcije holesterola Hol/HDL-hol i LDL/HDL-hol značajno su niži u prvom trimestru nego u kontrolnoj grupi zato što je veći porast HDL i LDL-holesterola nego ukupnog holesterola. Daljim tokom trudnoće ovi indeksi rastu i značajno su veći od indeksa u prvom trimestru, a ostaju značajno veći i posle porođaja, kada su značajno veći i u odnosu na kontrolnu grupu, ukazujući da je potreban duži postporođajni period za normalizaciju ovih vrednosti od perioda koji smo mi ispitivali.

Indeks TG/HDL-hol, kao i AIP (aterogeni indeks plazme, log (TG/HDL-hol)) takođe rastu tokom trudnoće u odnosu na prvi trimestar, ali posle porođaja te vrednosti nisu značajno različite u odnosu na kontrolnu grupu.

4.4.1. PROMENE U VELIČINI LDL ČESTICA I RASPODELA LDL SUBFRAKCIJA TOKOM NORMALNE TRUDNOĆE

Kako je prethodnom analizom parametara lipidnog profila utvrđeno da se tokom normalne, nekomplikovane trudnoće većina lipidnih parametara menja i ide ka aterogenom lipidnom profilu, sledeći korak u ovoj studiji bio je ispitivanje veličine LDL čestica i promena raspodele LDL subfrakcija tokom trudnoće. Kako ispitivani parametri ne slede normalnu raspodelu, vrednosti su logaritmovane i utvrđeno je da logaritmovane vrednosti slede normalnu raspodelu a zatim su iz logaritmovanih vrednosti računane srednje vrednosti i 95% intervali pouzdanosti. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 10.

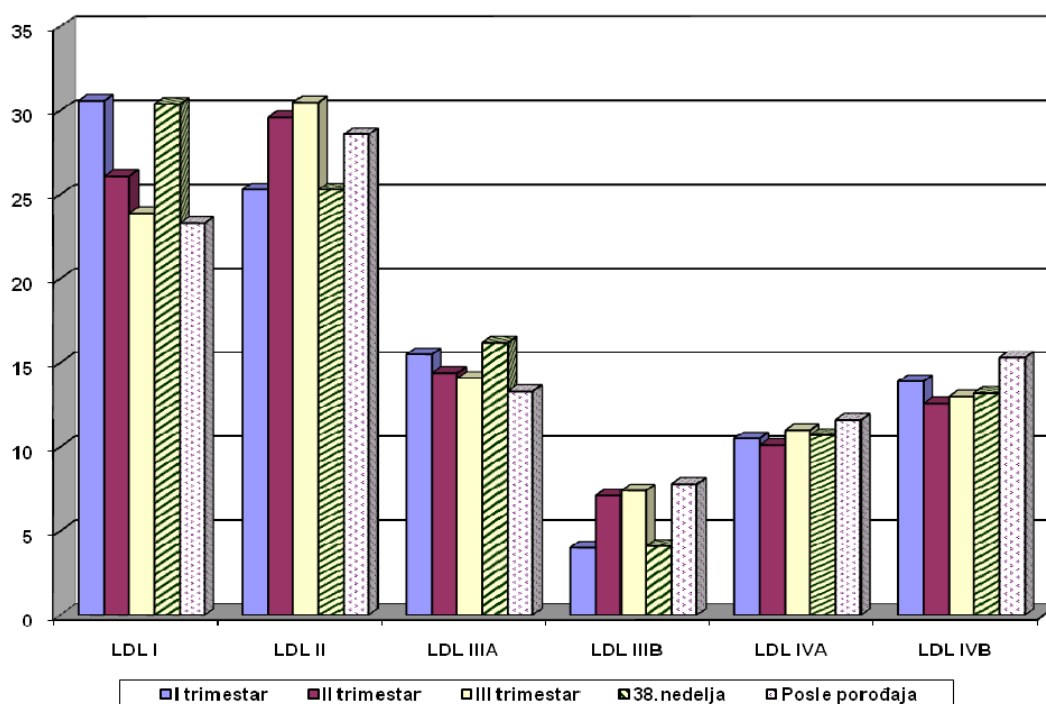
Tabela 10. Veličina LDL čestica i raspodela LDL subfrakcija tokom trudnoće

Parametar	I Trimestar	II Trimestar	III Trimestar	38. nedelja trudnoće	Posle porođaja
Dominantan LDL dijametar, nm	26,87 (26,54 -27,18)	26,52 (26,08-26,96)	25,72 (25,29-26,16)*	25,45 (25,04-25,86)*	26,88 (26,49-27,28)
% LDL subfrakcije					
LDL I	30,6 (27,5-33,7)	26,1 (21,9-30,3)	23,9 (20,3-27,6)*	30,4 (26,6-34,3)	23,3 (20,3-26,3)*
LDL II	25,3 (22,8-27,9)	29,6 (27,4-31,8)*	30,5 (28,4-32,6) ^a *	25,3 (22,2-28,4)	28,6 (26,4-30,8)
LDL IIIA	15,5 (14,0-17,1)	14,4 (12,5-16,3)	14,1 (12,8-15,6)	16,2 (14,2-18,3)	13,3 (12,3-14,9)*
LDL IIIB	4,0 (2,8-5,2)	7,1 (5,9-8,4)*	7,4 (6,2-8,6)*	4,1 (2,7-5,4)	7,8 (7,1-8,5)*
LDL IVA	10,5 (9,6-11,5)	10,1 (9,0-11,2)	11,0 (9,6-12,4)	10,7 (9,5-11,9)	11,6 (10,5-12,7)
LDL IVB	13,9 (12,3-15,7)	12,6 (11,0-14,2)	13,0 (11,4-14,6)	13,2 (11,5-14,9)	15,3 (13,6-16,9)

*nivo značajnosti $p < 0.05$

Na osnovu statističke analize, može se zaključiti da veličina LDL čestica opada tokom trudnoće i u trećem trimestru i pred porođaj postaje statistički značajno manja u odnosu na prvi trimestar. Nakon porođaja su vrednosti veće i jednake su vrednostima sa početka trudnoće.

Procenat LDL I subfrakcije koja je karakteristična za fenotip sa malim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti, opada tokom trudnoće i u trećem trimestru je statistički značajno manji u poređenju sa prvim trimestrom, a ostaje statistički značajno manji i nakon porođaja. Ovaj rezultat je praćen statistički značajno većim procentom udela LDL III B subfrakcije (male, guste LDL čestice) u trećem trimestru, kao i nakon porođaja. Nije uočena statistički značajna razlika u raspodeli LDL IVA i LDL IVB subfrakcije. Raspodela LDL subfrakcija tokom trudnoće i nakon porođaja prikazana je na Slici 11.



Slika11. Subfrakcije LDL čestica tokom trudnoće i nakon porođaja

4.4.2. PROMENE U VELIČINI HDL ČESTICA I RASPODELA HDL SUBFRAKCIJA TOKOM NORMALNE TRUDNOĆE

U cilju daljeg ispitivanja promene lipidnih parametara tokom nekomplikovane trudnoće, ispitivana je promena veličine HDL čestica, kao i promena raspodele HDL subfrakcija. Kolmogorov-Smirnov analiza je pokazala da ispitivani parametri slede normalnu raspodelu posle logaritmovanja, pa su vrednosti prikazane kao geometrijske srednje vrednosti i 95% intervali pouzdanosti. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 11.

Tabela 11. Veličina HDL čestica i raspodela HDL subfrakcija tokom trudnoće

Parametar	I Trimestar	II Timestar	III Timestar	38. nedelja trudnoće	Posle porođaja
Dominantan HDL dijametar, nm	10,72 (10,48 -10,96)	10,69 (10,47-10,92)	10,78 (10,58-10,99)	10,62 (10,30-10,94)	9,62 (9,25-9,99)*
% HDL subfrakcije					
HDL 2b	49,7 (47,0-52,3)	48,9 (45,9-52,0)	48,5 (46,0-50,9)	51,7 (48,5-54,8)	44,6 (41,9-47,4)*
HDL 2a	20,1 (18,3-22,0)	18,0 (16,4-19,6)*	17,5 (16,2-18,7)*	18,5 (16,7-20,3)	21,8 (20,5-23,0)
HDL 3a	16,8 (13,6-19,9)	16,2 (13,8-18,7)	15,9 (13,4-18,4)	15,6 (12,8-18,3)	16,7 (14,4-19,0)
HDL 3b	7,8 (5,6-10,6)	9,4 (7,1-11,8)	9,9 (7,5-12,3)*	8,2 (5,7-10,7)	8,9 (7,3-10,7)
HDL 3c	5,6 (4,8-6,4)	7,4 (6,1-8,7)*	8,3 (6,5-10,1)*	6,0 (4,9-7,2)	7,9 (6,5-9,3)*

*nivo značajnosti $p < 0.05$

Veličina HDL čestica se nije statistički značajno menjala tokom trudnoće ali je sedam nedelja nakon porođaja veličina HDL čestica statistički značajno manja u poređenju sa prvim trimestrom. Takođe, procenat udela HDL 2b subfrakcije nakon porođaja je statistički značajno manji u poređenju sa prvim trimestrom.

HDL 2a subfrakcija je statistički značajno manje zastupljena već u drugom trimestru u poređenju sa prvim, taj trend opadanja se nastavlja i u trećem trimestru, ali

raste nakon porođaja, pa nije uočena statistički značajana razlika u procentualnom udelu HDL 2a subfrakcije nakon porođaja i u prvom trimestru.

Što se tiče raspodele HDL 3 subfrakcija tokom trudnoće, zanimljivo je da tokom trudnoće zastupljenost HDL 3c subfrakcije postaje statistički značajno veća u odnosu na prvi trimestar i ostaje veća i sedam nedelja nakon trudnoće.

Nije uočena statistički značajna razlika u procentualnoj zastupljenosti HDL 3a subfrakcija između prvog trimestra i ostalih ispitivanih tačaka, a procentualna zastupljenost HDL 3b subfrakcije u trećem trimestru postaje statistički značajno veća u poređenju sa prvim trimestrom, ali nakon porođaja opada, pa nije uočena statistički značajna razlika između prvog trimestra i sedam nedelja nakon porođaja.

4.4.3. UNIVARIJANTNA LINEARNA REGRESIONA ANALIZA NEZAVISNOG UTICAJA VELIČINE LDL I HDL ČESTICA KAO I RASPODELA SUBFRAKCIJA LDL I HDL ČESTICA U 38. NEDELJI TRUDNOĆE NA ANTROPOMETRIJSKE MERE NOVOROĐENČADI

Jedan od ciljeva ove studije je utvrđivanje uticaja promene parametara lipidnog profila tokom trudnoće na ishod trudnoće. Za procenu nezavisnog uticaja veličine LDL i HDL čestica i raspodela njihovih subfrakcija na antropometrijske karakteristike novorođenčadi, primenjena je univarijantna linearna regresiona analiza. Antropometrijske veličine novorođenčadi (težina, dužina i obim glave) su obeležene kao nezavisne promenljive, a veličina LDL čestica, HDL čestica, kao i procenat raspodele subfrakcija u 38. nedelji trudnoće su obeleženi kao zavisne promenljive. Rezultati ove analize su prikazani u Tabeli 12.

Rezultati regresione analize su pokazali da je veći procentualni udeo LDL IV A subfrakcija u serumu trudnica povezan sa manjom dužinom novorođenčadi. Takođe, dužina pri rođenju je u pozitivnoj korelaciji sa procentualnim udelom LDL I subfrakcije u serumu majke u 38. nedelji trudnoće. Isti odnos je utvrđen i za obim glave novorođenčadi.

Visok procentualni udeo malih, gustih LDL čestica (LDL IV B) je povezan sa manjim obimom glave, a visok procentualni udeo većih LDL čestica (LDL I) je povezan sa većim obimom glave novorođenčadi. Visok procentualni udeo HDL 2a subfrakcije u

serumu trudnice u 38. nedelji trudnoće je u negativnoj korelaciji sa dužinom i obimom glave novorođenčadi.

Tabela 12. Univarijantna linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja veličine LDL i HDL čestica i raspodela subfrakcija LDL i HDL čestica u 38. nedelji trudnoće na antropometrijske karakteristike novorođenčadi (Pearson-ov koeficijent korelacije)

Parametar	Težina na rođenju, g	Dužina na rođenju, cm	Obim glave, cm
LDL dijametar, nm	-0.073	0.190	0.156
% LDL I	0.202	0.346*	0.324*
% LDL II	0.036	0.124	0.071
% LDL IIIA	-0.105	-0.262	-0.274
% LDL IIIB	0.012	0.075	-0.010
% LDL IVA	-0.104	-0.341*	-0.293
% LDL IVB	-0.344*	-0.450*	-0.383*
HDL dijametar, nm	-0.206	0.054	0.032
% HDL 2b	-0.004	0.079	0.017
% HDL 2a	-0.141	-0.321*	-0.318*
% HDL 3a	0.065	-0.008	0.256
% HDL 3b	0.083	0.176	0.080
% HDL 3c	-0.098	-0.060	-0.224

* nivo značajnosti $p < 0.05$

Rezultati ove statističke analize nisu pokazali postojanje značajne povezanosti veličine LDL i HDL čestica u 38. nedelji trudnoće sa antropometrijskim merama novorođenčadi.

4.4.4. MULTIPLA LINEARNA REGRESIONA ANALIZA NEZAVISNOG UTICAJA RASPODELA SUBFRAKCIJA LDL I HDL ČESTICA U 38. NEDELJI TRUDNOĆE NA ANTROPOMETRIJSKE MERE NOVOROĐENČADI

U cilju procene nezavisnog uticaja parametara koji su se pokazali kao značajni prediktori antropometrijskih mera novorođenčadi (procenat udela LDL I, LDL IV A, LDL IV B i HDL 2a) u univarijantnoj analizi, primenili smo multiplu linearnu regresionu analizu.

U ovoj analizi je izvršen adjustment (podešavanje) vrednosti ovih parametara za starost majke, procenat dobijanja na težini tokom trudnoće, i koncentracije holesterola, triglicerida, LDL-holesterola, HDL-holesterola, ApoAI i ApoB, kako bi se eliminisao njihov uticaj. Rezultati multivarijantne analize su prikazani u Tabeli 13.

Uticaj procentualnog udela LDL I i LDL IV A subfrakcija u serumu trudnica u 38. nedelji trudnoće na antropometrijske mere novorođenčadi je izgubio statističku značajnost u multiploj analizi. Znači, kada se uzmu u obzir starost majke, procenat dobijanja u težini trudnice kao i parametri lipidnog profila, nezavisni uticaj procentualnog udela LDL I i LDL IV A subfrakcija se gubi.

Tabela 13. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja raspodela subfrakcija LDL i HDL čestica u 38. nedelji trudnoće na antropometrijske karakteristike novorođenčadi

Parametar	Težina na rođenju, g		Dužina na rođenju, cm		Obim glave, cm	
	β	SE(β)	β	SE(β)	β	SE(β)
% LDL I	0,125	0,251	0.095	0.011	0.274	0.014
% LDL IVA	0,236	0,256	-0.101	0.037	0,336	0,015
% LDL IVB	-0.446	0.015*	-0.471	0.028*	-0.390	0.037*
% HDL 2a	0,236	0,395	-0.280	0.024	-0.426	0.030*

* nivo značajnosti $p < 0.05$

Procentualni udeo LDL IV B subfrakcije, međutim, ostaje nezavisno povezan sa dužinom novorođenčadi i obimom glave novorođenčadi i posle eliminisanja uticaja starosti trudnice, procenta dobijanja u težini trudnice kao i parametara lipidnog profila.

Što je procentualni udeo LDL IVB subfrakcije u serumu trudnice u 38. nedelji trudnoće veći, obim glave i dužina novorođenčadi su manje.

Takođe, procentualni udeo HDL 2a subfrakcije u serumu trudnica je ostao nezavisno povezan sa obimom glave novorođenčadi i posle adjustment analize.

4.5. REZULTATI ISPITIVANJA AKTIVNOSTI ENZIMA PON1

Vrednosti aktivnosti enzima PON1 prema paraoksonu i prema diazoksonu prikazani su u Tabeli 14. Rezultati su prikazani kao geometrijska sredina i 95% interval pouzdanosti.

Tabela 14. Vrednosti paraoksonazne (POX) i diazoksonazne aktivnosti (DZO)

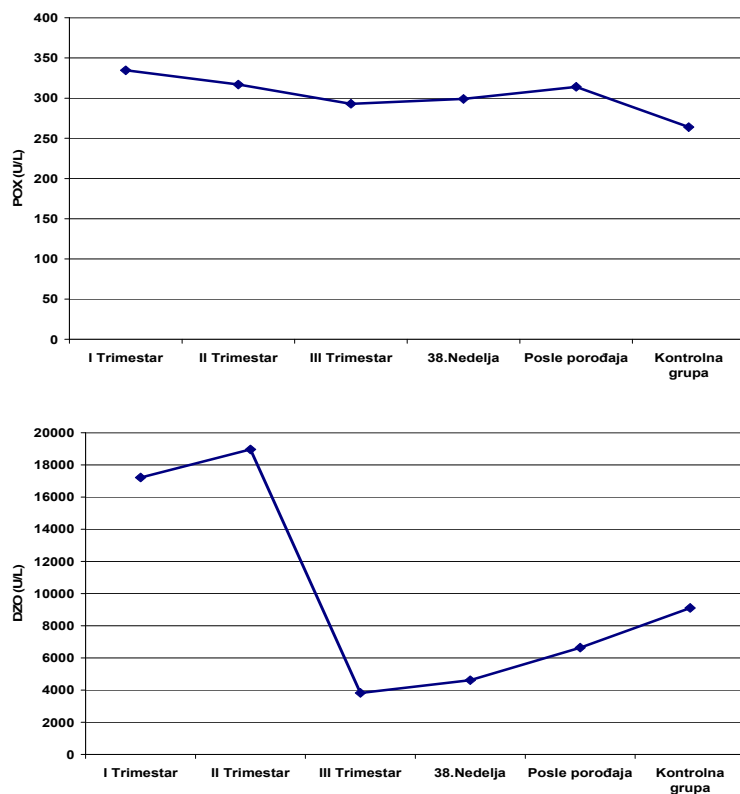
Parametar	POX (U/L)	DZO (U/L)
I Trimestar	334,6 (286,3 - 561,1)	17218 (15423,1 - 20667,2) ^b
II Trimestar	317,0 (221 - 540,3) ^a	18964 (14373,9 - 22408,4)
III Trimestar	293,0 (202,5 - 540,2) ^a	3828 (2814,9 - 5360,4) ^a
38. nedelja trudnoće	299,0 (202,5 - 540,2) ^a	4618 (3380,7 - 5466,7) ^a
Posle porođaja	314,1 (250,8 - 585,6) ^a	6642 (5742,7 - 8164,2) ^{a,b}
Kontrolna grupa	264,0 (211,1 - 330,2)	9109,3 (8148,2 - 10183,7)

a-statistički značajna razlika u odnosu na prvi trimestar; b- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu; nivo značajnosti $p < 0,05$

Aktivnost enzima PON1 određivana je preko brzine razgradnje veštačkih supstrata - paraoksona i diazoksona.

Aktivnost enzima PON1 prema supstratu paraoksonu značajno opada tokom trudnoće u poređenju sa prvim trimestrom.

Aktivnost enzima PON1 prema supstratu diazoksonu, ima izrazit i značajan pad u trećem trimestru, sa približnim vrednostima do porođaja, a nakon porođaja aktivnost je značajno niža u poređenju sa prvim trimestrom i u odnosu na kontrolnu grupu.



Slika 12. Aktivnost enzima PON1 prema supstratu paraoksonu (POX) i diazoksonu (DZO) tokom trudnoće i nakon porođaja

4.5.1. MULTIPLA LINEARNA REGRESIONA ANALIZA ZA ISPITIVANJE NEZAVISNOG UTICAJA ISPITIVANIH PARAMETARA NA DIAZOKSONAZNU AKTIVNOST U TREĆEM TRIMESTRU TRUDNOĆE

Kako je statistička analiza pokazala da diazoksonazna aktivnost značajno pada u trećem trimestru trudnoće, sledeći korak u ovoj studiji bio je ispitivanje nezavisnog uticaja parametara koji su pokazali značajnu korelaciju sa diazoksonaznom aktivnošću u trećem trimestru trudnoće, na ovaj pad aktivnosti enzima PON1. Diazoksonazna aktivnost je označena kao nezavisna promenljiva. Kao zavisne promenljive označili smo koncentraciju glukoze, ukupnog holesterola, triglicerida, LDL-holesterola, HDL-holesterola, ApoAI, ApoB, hsCRP i PAB. Ove promenljive su ušle u primarni regresioni model na osnovu vrednosti Spearman-ovog koeficijenta korelacije ($p < 0,1$).

Starost trudnice, pušački status pre trudnoće i upotreba antioksidantne

suplementacije mogu uticati na oksidativno - stresni status pa smo i ove kategoričke promenljive takođe uključili u primarni model. Multikolinearnost je ispitivana proverom vrednosti koeficijenta tolerancije i VIF-a (Variance Inflation Factor). Iz primarnog modela su isključene promenljive za koje je vrednost koeficijenta tolerancije bila manja od 0,1. Takođe, promenljive sa vrednostima VIF-a većim od 10 su isključene iz primarnog modela.

Posle korekcija vezanih za ispitivanje multikolinearnosti, starost trudnice, pušački status, upotreba antioksidantne suplementacije, koncentracija glukoze, hsCRP, triglicerida, ApoAI, HDL-holesterola i koncentracija PAB-a su ostali kao zavisne promenljive u modelu multiple linearne regresione analize. Rezultati ispitivanja prikazani su u Tabeli 15.

Tabela 15. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja nelipidnih, lipidnih i parametara oksidativno-stresnog statusa na diazoksonaznu aktivnost u trećem trimestru trudnoće

Parametar	DZO, U/L $R^2 = 0.526$, adjusted $R^2 = 0.373$		
	β	SE (β)	<i>p</i>
Starost trudnice, godine	0,168	99,298	0,274
Pušenje pre trudnoće	-0,505	819,407	<0,05
Antioksidantna suplementacija	-0,303	756,988	0,823
Trigliceridi, mmol/L	-0,248	636,713	0,163
HDL-holesterol, mmol/L	0,188	2138,01	0,591
ApoAI, g/L	0,248	1258,341	0,440
Glukoza, mmol/L	0,339	1013,529	<0,05
hsCRP, mg/L	-0,120	124,551	0,418
PAB, HK jedinice	-0,464	1,872	<0,001

Rezultati multiple linearne regresione analize su pokazali da su pušački status pre trudnoće, koncentracija glukoze i PAB nezavisno povezani sa padom diazoksonazne aktivnosti u trećem trimestru trudnoće. Naime, 37,3% pada aktivnosti enzima PON1 prema diazoksonu je uslovljeno povećanjem PAB-a, pušenjem majke pre trudnoće i promenom koncentracije glukoze.

4.5.2. MULTIPLA LINEARNA REGRESIONA ANALIZA ZA ISPITIVANJE NEZAVISNOG UTICAJA ISPITIVANIH PARAMETARA NA DIAZOKSONAZNU AKTIVNOST NAKON POROĐAJA

Da bi se ispitilo da li parametri koji su pokazali nezavistan uticaj na diazoksonaznu aktivnost u trećem trimestru trudnoće imaju uticaja i nakon porođaja, ponovo je primenjena multipla linerana regresiona analiza.

Tabela 16. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja nelipidnih, lipidnih i parametara oksidativno-stresnog statusa na diazoksonaznu aktivnost nakon porođaja

Parametar	DZO, U/L $R^2 = 0.442$; adjusted $R^2 = 0.403$		
	β	SE (β)	<i>p</i>
Pušenje pre trudnoće	-0,272	1055,41	0,144
Antioksidantna suplementacija	0,059	1114,49	0,759
Ukupan holesterol, mmol/L	-0,235	1258,93	0,852
Trigliceridi, mmol/L	-0,211	3140,39	0,715
HDL-holesterol, mmol/L	0,963	4514,23	0,092
LDL-holesterol, mmol/L	-0,171	2065,59	0,817
ApoAI, g/L	0,630	8695,09	0,211
ApoB, g/L	-0,257	15305,02	0,797
Glukoza, mmol/L	-0,098	1508,02	0,622
hsCRP, mg/L	-0,172	141,09	0,372
PAB, HK jedinice	0,174	3,926	0,360

Rezultati ove analize su prikazani u Tabeli 16. Diazoksonazna aktivnost je označena kao nezavisna promenljiva. Zavisne promenljive koje su ušle u primarni model bile su one koje su pokazale značajnu korelaciju sa diazoksonaznom aktivnosti nakon porođaja.

Ispitivana je multikolinearnost i nakon ove analize pušački status pre trudnoće, antioksidantna suplementacija, koncentracije triglicerida, ukupnog holesterola, HDL-holesterola, LDL-holesterola, ApoAI, ApoB, glukoze, hsCRP i PAB-a su ostale kao nezavisne promenljive u modelu multiple linearne regresione analize. Rezultati multiple regresione analize su pokazali da nijedna od ispitivanih promenljivih nije nezavisno povezana sa diazoksonaznom aktivnosti nakon porođaja.

4.6. REZULTATI ISPITIVANJA UTICAJA DEMOGRAFSKIH KARAKTERISTIKA TRUDNICA NA PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA, ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE, LIPIDNI STATUS I PON1 STATUS I AKTIVNOST

4.6.1. UTICAJ INDEKSA TELESNE MASE NA PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA TOKOM TRUDNOĆE

U cilju ispitivanja uticaja indeksa telesne mase (ITM) na oksidativno-stresni status tokom trudnoće, upoređivani su parametri oksidativnog stresa trudnica u grupama dobijenim podelom na osnovu kvartilnih vrednosti ITM-a.

Trudnice su podeljene u četiri grupe, a poređenje je vršeno i sa kontrolnom grupom. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti i standardne devijacije, ukoliko slede normalnu raspodelu i kao geometrisjke sredine i 95% interval pouzdanosti za vrednosti koje slede log-normalnu raspodelu. Primenjen je statistički test ANOVA sa Tukey's *post hoc* analizom. Rezultati su prikazani u Tabeli 17.

Rezultati statističke analize su pokazali da su koncentracije AOPP, TOS-a i PAB-a statistički značajno veće kod trudnica u odnosu na kontrolnu grupu, bez obzira na vrednost ITM, ali nema razlike između grupa trudnica sa različitim ITM.

Nema statistički značajne razlike u koncentracijama TBARS-a između kontrolne grupe i grupe trudnica različitih ITM, kao ni u vrednostima LOOH, izuzev između trudnica sa najvećim ITM i kontrolne grupe.

Tabela 17. Parametri oksidativnog stresa kod trudnica u zavisnosti od ITM-a

Parametri oksidativnog stresa	Kontrolna grupa ITM 21,9 ± 3,43	Trudnice				<i>p</i>
		ITM ≤ 21,2	21,2 < ITM ≤ 24,2	24,2 < ITM ≤ 27,3	ITM ≥ 27,4	
LOOH, μmol/L	8,1 ± 1,84	9,4 ± 1,71	8,9 ± 2,41	9,1 ± 2,53	10,2 ± 1,97 ^b	<0,05
TBARS, μmol/L	0,94 ± 0,82	1,05 ± 0,19	1,10 ± 0,38	1,13 ± 0,32	1,19 ± 0,22	0,245
AOPP, μmol/L	14,01 ± 2,64	17,7 ± 8,02 ^a	19,1 ± 6,75 ^a	20,83 ± 8,47 ^a	20,11 ± 7,73 ^a	<0,05
TOS, μmol/L	6,8 ± 0,64	13,1 ± 3,49 ^a	13,9 ± 4,39 ^a	14,3 ± 4,33 ^a	13,4 ± 3,91 ^a	<0,001
PAB, HK jedinice	66,4 (42,9 - 87,1)	133,9 ^a (120,3 - 149,2)	150,8 ^{a,b} (136,9 - 166,1)	142,7 ^a (126,1 - 156,1)	143,9 ^a (134,3 - 156,4)	<0,001

a- statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu; b- statistički značajna razlika u odnosu na grupu trudnica sa ITM ≤ 21.2

4.6.2. UTICAJ INDEKSA TELESNE MASE NA PARAMETRE ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE TOKOM TRUDNOĆE

Sledeći korak u ovoj studiji je bio ispitivanje uticaja ITM-a na parametre antioksidativne zaštite tokom trudnoće. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 18.

Podaci u tabeli su prikazani kao srednje vrednosti i standardne devijacije ukoliko slede normalnu raspodelu, a vrednosti paraoksonazne aktivnosti prema paraoksonu i diazoksonu kao supstratu su prikazane kao geometrijske sredine i 95% interval pouzdanosti pošto slede log-normalnu raspodelu.

Rezultati analize varijanse pokazuju da su vrednosti SOD statistički značajno veće u grupi trudnica sa najvišim ITM u odnosu na grupu trudnica sa najnižim ITM, ali ni u jednoj grupi trudnica nema razlike u odnosu na kontrolnu grupu.

Vrednosti TAS i SH-grupa, kao i aktivnost paraoksonaze prema supstratu paraoksonu (POX) nisu statistički značajno različite između trudnica različitog ITM, kao ni između trudnica i kontrolne grupe.

Aktivnost enzima paraoksonaze prema supstratu diazoksonu (DZO) značajno je niža u grupama trudnica sa ITM-om višim od 21,2.

Tabela 18. Parametri antioksidativne zaštite kod trudnica u zavisnosti od ITM

Parametar	Kontrolna grupa	Trudnice				<i>p</i>
	ITM 21,9 ± 3,43	ITM ≤ 21,2	21,2 < ITM ≤ 24,2	24,2 < ITM ≤ 27,3	ITM ≥ 27,4	
SOD, kU/L	109 ± 2,4	96 ± 6,8	109 ± 5,2	123 ± 11,1	123 ± 8,7*	<0,05
TAS, mmol/L	0,915 ± 0,151	1,13 ± 0,21	1,18 ± 0,15	1,20 ± 0,13	1,18 ± 0,21	0,254
SH-grupe, g/L	0,52 ± 0,10	0,47 ± 0,07	0,44 ± 0,09	0,48 ± 0,71	0,46 ± 0,08	0,240
POX, U/L	264,0 (211,1 - 330,2)	300,1 (247,1 - 364,4)	344,4 (284,8 - 416,4)	285,9 (223,7 - 365,4)	339,3 (251,1 - 449,7)	0,094
DZO, U/L	12418,3 (10258,2 - 15102,8)	16267,9 (14856,3 - 18259,6)	11584,9* (8562,7 - 13695,4)	10185,6* (7539,8 - 3985,7)	8903,2* (6259,4 - 10258,1)	<0,001

* Statistički značajno različito od grupe trudnica sa ITM ≤ 21.2

4.6.3. UTICAJ INDEKSA TELESNE MASE NA PARAMETRE LIPIDNOG STATUSA TOKOM TRUDNOĆE

Kako su prethodni rezultati ove studije pokazali da se parametri lipidnog profila statistički značajno menjaju tokom trudnoće, sa kulminacijom vrednosti u trećem trimestru trudnoće u poređenju sa prvim trimestrom, kao i u odnosu na kontrolnu grupu, nastavak ovog istraživanja je usmeren na procenu uticaja ITM na lipidni profil trudnica u trećem trimestru trudnoće.

Trudnice su podeljene u četiri grupe, na osnovu kvartilnih vrednosti ITM. Rezultati ove analize su prikazani u Tabeli 19. Podaci su prikazani kao srednje vrednosti i standardne devijacije, ukoliko slede normalnu raspodelu i poređeni su ANOVOM. Koncentracije triglicerida slede log-normalnu raspodelu, pa su ove vrednosti prikazane kao geometrijske sredine i 95% interval pouzdanosti.

Rezultati ovog ispitivanja su pokazali da su koncentracije ukupnog holesterola, triglicerida, LDL-holesterola i ApoB statistički značajno veće u grupi trudnica sa vrednostima $ITM \leq 24,2$ u odnosu na kontrolnu grupu, kao i u odnosu na grupu trudnica sa najmanjim ITM, sem holesterola koji u ovom slučaju, u poređenju sa najmanjim ITM pokazuje značajnu razliku u grupi ispitanica sa $ITM \leq 27,3$.

Nije uočena statistički značajna razlika u koncentraciji HDL-holesterola između trudnica različitog ITM, ali su vrednosti u svim grupama veće od kontrolne grupe.

Aterogeni indeks plazme (AIP) statistički značajno raste sa porastom ITM i to počev od grupe trudnica sa $ITM > 21,2$.

Tabela 19. Parametri lipidnog profila kod trudnica u zavisnosti od ITM-a

Parametar	Kontrolna grupa	Trudnice				<i>p</i>
	ITM 21,9 ± 3,43	ITM ≤ 21,2	21,2 < ITM ≤ 24,2	24,2 < ITM ≤ 27,3	ITM ≥ 27,4	
Ukupan holesterol, mmol/L	4,5 ± 0,71	5,13 ± 1,00	6,19 ± 1,16 ^a	6,63 ± 1,21 ^{a, b}	6,81 ± 1,14 ^{a, b}	<0,001
Trigliceridi, mmol/L	0,77 (0,36 - 1,02)	1,21 (1,08 - 1,36) ^a	1,80 (1,59 - 2,03) ^{a, b}	2,16 (1,89 - 2,47) ^{a, b}	2,41 (2,13 - 2,81) ^{a, b}	<0,001
HDL-holesterol, mmol/L	1,48 ± 0,30	2,06 ± 0,42 ^a	2,03 ± 0,55 ^a	2,05 ± 0,45 ^a	2,06 ± 0,51 ^a	0,992
LDL-holesterol, mmol/L	2,65 ± 0,66	2,66 ± 0,51	3,28 ± 0,97 ^{a, b}	3,52 ± 1,21 ^{a, b}	3,60 ± 1,07 ^{a, b}	<0,001
AIP	-0,271 [-0,396 - (-0,258)]	-0,263 [-0,313 - (-0,214)]	-0,139 ^{a, b} [-0,191 - (-0,087)]	0,069 ^{a, b} (0,008 - 0,13)	0,173 ^{a, b} (0,115 - 0,232)	<0,001
ApoAI, g/L	1,53 ± 0,18	1,58 ± 0,28	1,63 ± 0,32	1,70 ± 0,30	1,70 ± 0,32	0,199
ApoB, g/L	0,76 ± 0,15	0,71 ± 0,18	0,89 ± 0,20 ^{a, b}	0,98 ± 0,22 ^{a, b}	1,02 ± 0,19 ^{a, b}	<0,001

a-statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu grupu; b-statistički značajna razlika u odnosu na grupu trudnica sa ITM ≤ 21.2

4.6.4. SPEARMAN-OVA NEPARAMETARSKA KORELACIONA ANALIZA ZA UTVRĐIVANJE POSTOJANJA KORELACIJE IZMEĐU PARAMETARA LIPIDNOG PROFILA I OKSIDATIVNO-STRESNOG STATUSA SA DOBIJENOM TEŽINOM TOKOM TRUDNOĆE (%)

Rezultati ispitivanja uticaja ITM na parametre lipidnog profila i oksidativno-stresnog statusa su pokazali da ITM značajno utiče na promene ovih parametara tokom trudnoće.

Da bi se otklonio potencijalni uticaj ITM trudnica pre trudnoće na ispitivane parametre primenili smo Spearman-ovu neparametarsku korelacionu analizu kojom smo ispitivali samo postojanje veze parametara lipidnog profila i oksidativno-stresnog statusa sa dobijenom težinom tokom trudnoće koja je izražena u procentima u odnosu na težinu trudnica pre trudnoće. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 20.

Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza je pokazala pozitivnu korelaciju između procenta dobijanja na težini tokom trudnoće i koncentracije mokraćne kiseline, ukupnog holesterola, triglicerida, ApoAI, ApoB, TBARS, AOPP i SOD aktivnosti.

Takođe, dokazano je postojanje statistički značajne negativne korelacije između procenta dobijene težine tokom trudnoće i koncentracije TAS kao i diazoksonazne aktivnosti enzima PON1.

Tabela 20. Spearman-ova neparametarska korelacija između izračunatog procenta dobijanja na težini i parametara lipidnog profila i parametara oksidativno-stresnog statusa

Parametar	Sperman-ov koeficijent korelacije, ρ	p
Glukoza, mmol/L	0,031	0,685
hsCRP, mg/L	0,005	0,948
Mokraćna kiselina, $\mu\text{mol/L}$	0,546	<0,001
Ukupan holesterol, mmol/L	0,504	<0,001
Trigliceridi, mmol/L	0,709	<0,001
HDL-holesterol, mmol/L	0,020	0,798
LDL-holesterol, mmol/L	0,339	<0,001
ApoAI, g/L	0,199	<0,05
ApoB, g/L	0,616	<0,001
SOD, kU/L	0,374	<0,001
TAS, mmol/L	-0,400	<0,001
SH-grupe, g/L	0,127	0,098
LOOH, $\mu\text{mol/L}$	0,002	0,978
TBARS, $\mu\text{mol/L}$	0,225	<0,05
AOPP, $\mu\text{mol/L}$	0,290	<0,001
TOS, $\mu\text{mol/L}$	0,060	0,479
PAB, HK jedinice	0,257	0,658
DZO, U/L	-0,613	<0,001

4.6.5. MULTIPLA LINEARNA REGRESIONA ANALIZA ZA ISPITIVANJE NEZAVISNOG UTICAJA ISPITIVANIH PARAMETARA NA ATEROGENI INDEKS PLAZME

Kako su rezultati Spearman-ove korelacione analize pokazali značajnu povezanost procenta dobijanja na težini tokom trudnoće sa velikim brojem lipidnih parametara i parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, želeli smo da ispitamo potencijalno nezavisni uticaj procenta dobijanja na težini tokom trudnoće na promenu parametara lipidnog profila kod trudnica u trećem trimestru trudnoće.

Zato je prilikom formiranja modela za multiplu linearnu regresionu analizu, kao nezavisna promenljiva označen aterogeni indeks plazme (AIP), koji možda najbolje može da predstavi promenu lipidnih parametara tokom trudnoće ka aterogenom lipidnom profilu.

Na osnovu vrednosti Spearman-ovog koeficijenta korelacije ($p < 0,1$), koncentracija hsCRP, mokraćne kiseline, PAB i aktivnost enzima PON1 su u modelu označene kao nezavisne promenljive. Parametri lipidnog profila nisu ušli u model zbog postojanja multikolinearnosti. Takođe, u model su kao nezavisne promenljive ušle i kategoričke promenljive pušački status trudnice pre trudnoće i antioksidantna suplementacija, pošto mogu da utiču na AIP. Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 21.

Tabela 21. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na AIP

Parametar	AIP $R^2 = 0.384$; adjusted $R^2 = 0.355$		
	β	SE (β)	p
Dobijena težina, %	0,414	0,002	<0,001
Pušenje pre trudnoće	0,024	0,034	0,743
Antioksidantna suplementacija	0,048	0,032	0,472
Mokraćna kiselina, $\mu\text{mol/L}$	0,108	0,001	0,109
hsCRP, mg/L	0,094	0,004	0,151
PAB, HK jedinica	0,056	0,001	0,407
DZO, U/L	-0,201	0,001	<0,05

Rezultati multiple linearne regresione analize su pokazali da su procenat dobijanja na težini tokom trudnoće i paraoksonazna aktivnost nezavisno povezani sa porastom AIP tokom trudnoće. Tačnije, 35,5% porasta AIP tokom trudnoće se može objasniti smanjenjem paraoksonazne aktivnosti i povećanjem težine trudnice tokom normalne, nekomplikovane trudnoće.

4.6.6. MULTIPLA LINEARNA REGRESIONA ANALIZA ZA ISPITIVANJE NEZAVISNOG UTICAJA ISPITIVANIH PARAMETARA NA PARAOKSONAZNU AKTIVNOST

Prethodni rezultati studije ukazali su na značajan pad paraoksonazne aktivnosti (aktivnost enzima prema diazoksonu kao supstratu) u trećem trimestru trudnoće. Da bi se ispitaio nezavisni uticaj procenta dobijanja na težini na paraoksonaznu aktivnost primenjen je statistički test multiple linearne regresione analize.

Kao nezavisna promenljiva je označena paraoksonazna aktivnost, a kao zavisne one promenljive koje su bile u značajnoj korelaciji sa paraoksonaznom aktivnosti (Spearman-ov koeficijent korelacije $p < 0,1$). Ispitivanjem multikolinearnosti, koncentracija ukupnog holesterola je isključena iz modela. Rezultati su prikazani u Tabeli 22.

Tabela 22. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na paraoksonaznu aktivnost

Parametar	Aktivnost PON1 $R^2 = 0.426$; adjusted $R^2 = 0.397$		
	β	SE (β)	<i>p</i>
Dobijena težina (%)	-0,406	68,325	<0,001
Pušenje pre trudnoće	-0,131	106,517	0,056
Antioksidantna suplementacija	0,031	9,997	0,631
Trigliceridi, mmol/L	-0,290	795,586	<0,05
HDL-holesterol, mmol/L	-0,059	107,749	0,368
LDL-holesterol, mmol/L	-0,042	522,159	0,546
Mokraćna kiselina, $\mu\text{mol/L}$	-0,056	5,572	0,389
hsCRP, mg/L	-0,287	3,368	0,453
PAB, HK jedinica	0,023	3,308	0,724

Rezultati regresione analize su pokazali da se 39,7% promene paraoksonazne aktivnosti prema diazoksonu kao supstratu može objasniti porastom procenta dobijene težine tokom trudnoće i porastom koncentracije TG.

4.6.7. REZULTATI UTICAJA ANTIOKSIDANTNE SUPLEMENTACIJE TOKOM TRUDNOĆE I PUŠAČKIH NAVIKA TRUDNICA PRE TRUDNOĆE NA PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA, ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE, LIPIDNE PARAMETRE I AKTIVNOST ENZIMA PON1

U cilju preciznije procene lipidnog profila, parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite i aktivnosti enzima PON1 tokom nekomplikovane trudnoće, ispitali smo uticaj antioksidantne suplementacije tokom trudnoće na navedene parametre. Obzirom da su promene ispitivanih parametara najizraženije u trećem trimestru trudnoće, ispitivanje je usmereno upravo na taj period trudnoće. Rezultati su prikazani u Tabeli 23 kao srednja vrednost \pm SD za parametre sa normalnom raspodelom i kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti za parametre sa log-normalnom raspodelom.

Među trudnicama koje su uzimale vitamine bio je značajno veći procenat (62 %) onih koje su imale pušačke navike pre trudnoće. Rezultati ispitivanja su pokazali da ne postoji značajan uticaj antioksidantne suplementacije tokom trudnoće ni na jedan od ispitivanih parametara.

Rezultati ispitivanja uticaja pušačkih navika pre trudnoće na ispitivane parametre oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite, lipidnog profila i enzima PON1 prikazani su u Tabeli 24 kao srednja vrednost \pm SD za parametre sa normalnom raspodelom i kao geometrijska srednja vrednost i 95% interval pouzdanosti za parametre sa log-normalnom raspodelom.

Među trudnicama koje su pušile pre trudnoće značajno je veći broj onih koje su uzimale vitaminsku suplementaciju tokom trudnoće. Pušači su imali značajno veće dobijanje u težini u poređenju sa trudnicama koje nisu pušile. Takođe je među pušačima značajno veća koncentracija LDL-holesterola u poređenju sa nepušačima i značajno niža koncentracija triglicerida. Kod parametara oksidativnog stresa primećuje se značajno viša vrednost TBARS-a i TOS-a među pušačima, kao i značajno niža aktivnost PON1.

Tabela 23. Uticaj antioksidantne suplementacije na ispitivane parametre u trudnoći

Parametar	Bez antioksidantne terapije (N=22)	Sa antioksidantnom terapijom (N=21)	<i>P</i>
Starost, godine	30,1 ± 3,2	29,8 ± 4,1	0,906
Pušači, n (%)	8 (38%)	13 (62%)	<0,05
ITM, kg/m ²	26,6 ± 3,6	26,3 ± 3,4	0,711
Dobijanje u težini, %	23,2 ± 6,4	23,6 ± 8,4	0,803
SBP, mmHg	107 ± 10,1	108 ± 8,3	0,762
DBP, mmHg	69 ± 7,1	68 ± 6,9	0,915
Glukoza, mmol/L	4,4 ± 0,6	4,3 ± 0,4	0,727
Ukupan holesterol, mmol/L	6,7 ± 1,0	6,9 ± 1,1	0,447
LDL-holesterol, mmol/L	3,6 ± 1,0	3,7 ± 1,1	0,958
HDL-holesterol, mmol/L	1,9 ± 0,4	2,0 ± 0,5	0,690
Trigliceridi, mmol/L	2,4 (2,18 - 2,65)	2,7 (2,49 - 2,94)	0,112
ApoAI, g/L	1,6 ± 0,3	1,7 ± 0,3	0,788
ApoB, g/L	1,04 ± 0,18	1,07 ± 0,17	0,443
AIP	0,11 (0,021 - 0,140)	0,17 (0,100 - 0,218)	0,284
Mokraćna kiselina, μmol/L	235,9 ± 17,6	244,9 ± 13,4	0,368
hsCRP, mg/L	2,9 (2,26 - 3,75)	2,5 (1,79 - 3,39)	0,790
TBARS, μmol/L	1,9 ± 0,3	1,9 ± 0,1	0,979
LOOH, μmol/L	9,1 ± 2,6	9,5 ± 2,3	0,343
AOPP, μmol/L	22,4 ± 7,5	20,7 ± 6,8	0,270
PAB, HK jedinice	163,5 ± 31,8	163,4 ± 32,9	0,970
TOS, μmol/L	16,9 ± 5,9	17,6 ± 5,2	0,591
TAS, mmol/L	1,31 ± 0,16	1,28 ± 0,16	0,497
SOD, kU/L	147,9 ± 17,8	160,8 ± 17,9	0,128
SH-grupe, g/L	0,49 ± 0,07	0,48 ± 0,08	0,529
POX, U/L	257,0 (198,4 - 332,9)	334,0 (231,5 - 484,2)	0,239
DZO, U/L	5145 ± 3040	5186 ± 3479	0,955

Tabela 24. Uticaj pušačkih navika pre trudnoće na ispitivane parametre u trudnoći

Parametar	Nepušači (N=22)	Pušači (N=21)	<i>P</i>
Starost, godine	29,9 ± 3,8	30,1 ± 4,6	0,862
Uzimanje vitamina, n (%)	8 (38%)	13 (62%)	<0,05
ITM, kg/m ²	26,3 ± 4,1	26,5 ± 2,8	0,869
Dobijanje u težini, %	20,4 ± 6,6	26,5 ± 7,00	<0,001
SBP, mmHg	107 ± 8,4	108 ± 7,0	0,852
DBP, mmHg	69 ± 6,0	69 ± 7,0	0,902
Glukoza, mmol/L	4,3 ± 0,5	4,4 ± 0,44	0,539
Ukupan holesterol, mmol/L	7,0 ± 1,1	6,6 ± 1,1	0,057
LDL-holesterol, mmol/L	3,3 ± 1,0	3,9 ± 1,0	<0,05
HDL-holesterol, mmol/L	1,9 ± 0,5	2,0 ± 0,5	0,742
Trigliceridi, mmol/L	3,01 (2,377 - 3,825)	2,76 (2,53 - 3,027)	<0,05
ApoAI, g/L	1,6 ± 0,3	1,7 ± 0,2	0,090
ApoB, g/L	1,06 ± 0,18	1,03 ± 0,27	0,452
AIP	0,10 (-0,01 - 0,15)	0,18 (0,12 - 0,24)	0,183
Mokraćna kiselina, μmol/L	233,5 ± 45,4	247,1 ± 45,34	0,170
hsCRP, mg/L	2,38 (1,71 - 3,31)	3,01 (2,38 - 3,82)	0,240
TBARS, μmol/L	1,7 ± 0,8	2,3 ± 1,0	<0,05
LOOH, μmol/L	9,3 ± 2,7	3,4 ± 2,3	0,846
AOPP, μmol/L	21,6 ± 7,45	21,6 ± 7,0	0,971
PAB, HK jedinice	159,4 ± 34,6	167,7 ± 29,2	0,250
TOS, μmol/L	15,9 ± 5,4	18,9 ± 5,4	<0,05
TAS, mmol/L	1,28 ± 0,15	1,30 ± 0,18	0,571
SOD, kU/L	158,0 ± 11,16	150,3 ± 34,0	0,362
SH-grupe, g/L	0,49 ± 0,06	0,48 ± 0,08	0,849
POX, U/L	342,7 (231,5 - 507,3)	253,01 (201,0 - 318,5)	<0,05
DZO, U/L	5219 ± 2944	5107 ± 3577	0,877

Tabela 25. Spearman-ova neparametarska korelacija između TBARS i biohemijskih parametara i parametara oksidativnog statusa

Parametar	ρ	p
ITM, kg/m ²	0.710	<0.001
Dobijanje u težini, %	0.846	<0.001
Glukoza, mmol/L	0.146	0.278
Ukupan holesterol, mmol/L	0.082	0.546
LDL-holesterol, mmol/L	0.125	0.353
HDL-holesterol, mmol/L	0.058	0.671
Trigliceridi, mmol/L	0.415	<0.001
Apo AI, g/L	0.204	0.127
Apo B, g/L	0.171	0.205
AIP	0.206	0.125
Mokraćna kiselina, μ mol/L	0.257	0.056
hsCRP, mg/L	0.238	0.075
LOOH, μ mol/L	-0.056	0.678
AOPP, μ mol/L	0.120	0.375
PAB, HK units	0.417	<0.001
TOS, μ mol/L	0.739	<0.001
TAS, mmol/L	-0.468	<0.001
SOD, kU/L	0.314	<0.05
SH-grupe, g/L	-0.122	0.365
POX, U/L	-0.125	0.428
DZO, U/L	0.171	0.212

Obzirom na značajno više vrednosti TBARS kod trudnica sa pušačkim navikama pre trudnoće, primenili smo u daljoj analizi Spearman-ovu neparametarsku korelacionu analizu da bismo utvrdili postojanje korelacije između TBARS i ispitivanih parametara (Tabela 25). Analiza je pokazala značajnu pozitivnu korelaciju između TBARS i ITM,

dobijanja u težini, triglicerida, PAB i TOS, ali i sa SOD i značajnu negativnu korelaciju sa TAS.

U narednom koraku porimnili smo multiplu regresionu analizu da bismo ispitali uticaj dobijanja u težini, pušenja, vitaminske suplementacije, triglicerida, mokraćne kiseline, hs CRP, TAS i TOS kao nezavisnih varijabli na vrednost TBARS-a. Rezultati ispitivanja prikazani su u Tabeli 26.

Tabela 26. Multipla regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na vrednost TBARS

Parametar	TBARS		
	$R^2 = 0.814$; adjusted $R^2 = 0.813$		
	β	SE (β)	<i>P</i>
Dobijanje u težini, (%)	0.525	0.011	<0.05
Pušenje	0.110	0.124	0.116
Uzimanje vitamina	-0.064	0.112	0.306
Trigliceridi, mmol/L	0.014	0.087	0.848
Mokraćna kiselina, $\mu\text{mol/L}$	-0.131	0.002	0.145
hsCRP, mg/L	0.081	0.015	0.195
TOS, $\mu\text{mol/L}$	0.367	0.016	<0.05
TAS, mmol/L	-0.342	0.715	<0.05

Dobijanje u težini, TAS i TOS su nezavisne varijable koje pokazuju pozitivnu korelaciju sa koncentracijom TBARS, dok pušenje pre trudnoće i uzimanje suplementacije tokom trudnoće nisu pokazali uticaj na TBARS kao parametar oksidativnog stresa.

5. DISKUSIJA

5.1. BIOMARKERI OKSIDATIVNOG STRESA I ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE U TRUDNOĆI BEZ KOMPLIKACIJA

Slobodni kiseonikovi radikali (ROS) imaju značajnu ulogu kao signalni molekuli u fiziološkim reproduktivnim procesima, u održavanju normalnog toka trudnoće i razvoja fetusa, ali su odgovorni i za razvoj patofizioloških stanja i komplikacija u trudnoći. Istraživanja su pokazala da fiziološka trudnoća predstavlja izazov za sve organske sisteme žene zbog specifičnih zahteva razvoja fetusa i pripreme majke za predstojeći porođaj i laktaciju, što dovodi do niza metaboličkih promena, među kojima su i izmenjeni parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.

Prema istraživanjima, trudnoća je stanje intenzivnog oksidativnog stresa, ali i dalje u fiziološkim okvirima, uz istovremeno povećane parametre antioksidativne zaštite, tako da trudnoća kod zdravih žena sa očuvanom ravnotežom između ovih parametara prolazi bez komplikacija. Narušena ravnoteža sistema oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite vodi organizam u stanje oksidativnog stresa i posledično, kada je trudnoća u pitanju, nastajanju komplikacija u trudnoći, kao što je preeklampsija, gestacijski dijabetes, spontani pobačaj, prevremeni porođaj, intrauterini zastoj u rastu fetusa (IUGR), smrt fetusa (7-10).

Većina dosadašnjih studija bavila se ispitivanjem oksidativnog statusa u trudnoći praćenju komplikacijama, pre svega preeklampsijom i gestacijskim dijabetesom. Međutim, mali broj istraživanja se bavio analizom većeg broja parametara oksidativnog statusa kod zdravih trudnica, tako da je većina saznanja iz ove oblasti nastala kao rezultat istraživanja koja su sprovedena na životinjama.

Lipidna peroksidacija je oksidativni proces koji je konstantno prisutan u svim humanim ćelijama. Smatra se da uznapredovali i nekontrolisani proces ima značajnu ulogu u razvoju funkcionalnih i patoloških promena kod majke i fetusa (32), a stepen ovog oštećenja procenjuje se određivanjem ranih i kasnih produkata lipidne peroksidacije. Najveći broj studija koje su se bavile ispitivanjem lipidne peroksidacije kod trudnica rađen je kod trudnoća komplikovanih preeklampsijom i one su pokazale da

je ovo stanje praćeno značajnim rastom produkata lipidne peroksidacije u poređenju sa nekomplikovanim trudnoćama (34-37).

Istraživanje koje smo sprovedeli na našoj populaciji zdravih trudnica pokazalo je da među parametrima oksidativnog stresa koje smo određivali postoji znaćajan porast vrednosti lipidnih peroksida u prvom trimestru trudnoće u odnosu na kontrolnu grupu negravidnih žena, i taj rast se održava uz neznatne varijacije do kraja trudnoće (Tabela 6). Nakon porođaja vrednosti lipidnih hidroperoksida nemaju znaćajnu promenu u odnosu na početak trudnoće, odnosno i dalje su znaćajno više u odnosu na negravidne žene. Neke ranije studije su pokazale da vrednosti lipidnih hidroperoksida rastu u drugom trimestru trudnoće, a opadaju daljim razvojem trudnoće i nakon porođaja (51).

Određivanje TBARS prema pojedinim autorima daje bolji uvid u stepen lipidne peroksidacije nego pojedinaćno određivanje MDA, obzirom da obuhvata i MDA i druge srodne aldehide kao konaćne produkte lipidne peroksidacije (32, 122). U našoj studiji, trudnice tokom cele trudnoće nisu imale znaćajne promene vrednosti TBARS, ali posle porođaja su vrednosti znaćajno više i u odnosu na vrednost rane trudnoće u prvom trimestru i u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 6).

U nekim klinićkim studijama ispitivan je stepen lipidne peroksidacije kod trudnica pre i posle porođaja preko određivanja TBARS (122, 123). Rogers i saradnici (124) su pokazali veće vrednosti MDA u plazmi beba rođenih nekomplikovanim vaginalnim porođajem u odnosu na bebe rođene carskim rezom, a takođe i pozitivnu korelaciju između vrednosti MDA plazme majke i umbilikalne plazme bebe, što govori da spontani nekomplikovani vaginalni porođaj može povećati produkciju lipidnih peroksida kod novorođene bebe. Kada smo kod naših trudnica uporedili parametre oksidativnog stresa pre i posle porođaja utvrdili smo znaćajan porast TBARS sedam nedelja posle porođaja u odnosu na preporođajni period.

Lipidni hidroperoksidi nisu pokazali znaćajnu razliku između ove dve vremenske taćke, iako postoji blaži rast vrednosti posle porođaja, dok su produkti oksidacije proteina AOPP znaćajno niži. Na osnovu svega dobijenog možemo reći da tokom samog vaginalnog porođaja dolazi do pojaćanog oksidativnog stresa, koji je, kako navodi literatura fiziološki znaćajan za inicijaciju samog porođaja (50), ali je i uzrok lipidne peroksidacije, na koji zdrav organizam žene reaguje pokretanjem adekvatnog antioksidativnog odgovora.

Toescu i saradnici (38) pokazali su da vrednosti lipidnih peroksida rastu tokom nekomplikovane trudnoće u drugom i trećem trimestru i da te vrednosti osam nedelja nakon porođaja opadaju, ali još uvek ne dosežu vrednosti zdravih negravidnih žena. Ovo ispitivanje obuhvatilo je sedamnaest zdravih trudnica u longitudinalnoj studiji, što je značajno manji broj ispitanica u odnosu na našu studiju, a lipidni hidroperoksidi određivani su metodom sa ksilenol oranžom, što takođe treba uzeti u obzir ako rezultate poredimo sa našim istraživanjem. Patil i saradnici (29, 125) pokazali su da vrednosti TBARS značajno rastu tokom nekomplikovane trudnoće u poređenju sa kontrolnom grupom negravidnih žena i to povećanje je progresivno od prvog do trećeg trimestra. Studija je obuhvatila različite grupe zdravih trudnica koje su u odgovarajućim trimestrima dolazile na redovnu kontrolu, a rađena je na populaciji trudnica Indije. Druge studije koje su rađene van ove populacije pokazale su takođe slične vrednosti (126).

Oksidacija proteina koja nastaje kao posledica delovanja ROS dovodi do promene strukture i funkcije ovih jedinjenja sa posledičnim razvojem patofizioloških stanja, koja su, kada je trudnoća u pitanju uglavnom gestacijski dijabetes i preeklampsija (12). Oksidacija proteina se prati određivanjem nivoa AOPP, koji je relativno nov biomarker oksidativnog stresa. Kod zdravih trudnica sa nekomplikovanom trudnoćom koje smo ispitivali, značajno su više vrednosti ovog markera oksidacije proteina u drugom, trećem trimestru i neposredno pred porođaj u poređenju sa ranom trudnoćom prvog trimestra (Tabela 6). Posle porođaja vrednost AOPP značajno opada u odnosu na prvi trimestar i doseže vrednost približnu kontrolnoj grupi negravidnih žena.

Vrednost superoksid anjona, koji se i normalno stvara u raznim fiziološkim procesima, raste značajno u prvom trimestru trudnoće u poređenju sa kontrolnom grupom, da bi u trećem trimestru došlo do pada vrednosti ovog markera, sa daljim opadanjem nakon porođaja u poređenju sa prvim trimestrom.

Serumske vrednosti totalnog oksidativnog statusa, TOS, čije su glavne komponente vodonik peroksid i lipidni hidroperoksidi, kod naših ispitanica beleže značajan porast u trećem trimestru u odnosu na početak trudnoće, a dalje prema kraju trudnoće te vrednosti opadaju i dalje se snižavaju u periodu od sedam nedelja posle porođaja.

Redoks balans (PAB) koji smo određivali pokazuje značajan rast vrednosti već u ranoj trudnoći prvog trimestra u poređenju sa kontrolnom grupom negravidnih žena, ali i tokom cele trudnoće u odnosu na prvi trimestar, da bi nakon porođaja ta vrednost bila značajno niža i u odnosu na prvi trimestar i u odnosu na tačku pred porođaj, što nesumnjivo pokazuje da je trudnoća stanje pojačanog i kontinuiranog oksidativnog stresa (Tabela 6).

Naše istraživanje pokazuje da tokom trudnoće koja protiče bez komplikacija postoji stanje pojačanog i kontinuiranog oksidativnog stresa posebno u drugom i trećem trimestru. Sam uzrok i mehanizmi nastanka oksidativnog stresa nisu poznati, a nastanku oksidativnog stresa u trudnoći, smatra se, značajno doprinosi i placenta. Razlika u rezultatima pojedinih parametara oksidativnog stresa koje smo ispitivali u poređenju sa drugim studijama mogu se objasniti različito dizajniranim studijama, razlikama u primenjenim metodama određivanja, varijaciji između laboratorija, kao i životnim navikama trudnica, ishrani i socio-ekonomskim uslovima života. Sve ovo dovodi do izvesne kontradiktornosti u rezultatima među pojedinim studijama, mada su sve one pokazale da zdrave žene odgovaraju na trudnoću povećanom produkcijom slobodnih radikala, ali i odgovarajućim antioksidativnim odgovorom.

Obzirom da se radi o zdravim trudnicama, koje su trudnoću donele do kraja bez komplikacija i rodile zdravu decu, očekujemo da je njihov antioksidativni potencijal očuvan i da adekvatno reaguje na uslove pojačanog oksidativnog stresa.

Kod naših ispitanica totalni antioksidativni status, TAS značajno raste u trećem trimestru u odnosu na prvi trimestar i taj rast se dalje nastavlja do kraja trudnoće, kao i sedam nedelja posle porođaja (Tabela 7). Toescu i saradnici su pokazali da TAS nakon početnog sniženja vrednosti u prvom trimestru, raste značajno tokom dalje trudnoće (38), a Hung i saradnici nalaze da TAS u poređenju sa negravidnim ženama ima niže vrednosti do 30 nedelje gestacije, kada počinje da raste do termina porođaja, i ostaje na sličnim vrednostima šest do osam nedelja posle porođaja (51). Glavni udeo TAS kod zdravih ispitanika čine sulfhidrilne grupe proteina (52,9%), mokraćna kiselina (33,1%), vitamin C (4,7%) i vitamin E (10%) (115), koji i pojedinačno predstavljaju značajne činioce antioksidativnog sistema organizma. Ispitivanja u trudnoćama komplikovanim preeklampsijom i gestacijskim dijabetesom pokazala su niže vrednosti TAS u poređenju sa nekomplikovanim trudnoćama (51, 54).

SH grupe naših ispitanica nakon početnog pada vrednosti u prvom trimestru u poređenju sa zdravim negravidnim ženama, značajno rastu u drugom i trećem trimestru trudnoće, da bi dalje opadale do termina porođaja. Nakon porođaja te vrednosti rastu, da bi sedam nedelja posle porođaja dosegle vrednost približnu u kontrolnoj grupi negravidnih žena (Tabela 7).

Mokraćna kiselina koju smo određivali u sastavu rutinskih biohemijskih parametara raste kontinuirano tokom čitave trudnoće, a taj rast vrednosti se nastavlja i nakon porođaja. Ovakvo kretanje vrednosti mokraćne kiseline je u fiziološkim okvirima i nastaje kao posledica kataboličkih procesa i povećanja serumske zalihe mokraćne kiseline.

Hung i saradnici (51) su pokazali da porođaj utiče na vrednost TAS, tako da je vrednost TAS viša kod žena koje su se porodile vaginalnim putem u poređenju sa ženama koje su porođene carskim rezom, a više vrednosti nađene su i u umbilikalnoj plazmi žena porođenih vaginalnim putem, ukazujući na višu vrednost TAS i u fetoplacentalnoj cirkulaciji. Druge pak studije pokazuju da su novorođenčad iz vaginalnog porođaja manje izložena oksidativnom stresu od onih rođenih carskim rezom (36, 127).

Interesantno je da su naše ispitanice počele trudnoću sa nižim vrednostima SOD enzima u odnosu na kontrolnu grupu negravidnih žena i ta vrednost dalje opada u drugom trimestru u poređenju sa prvim trimestrom (Tabela 7). Značajan rast aktivnosti ovog enzima, koji inače predstavlja prvu liniju odbrane od oksidativnog stresa, javlja se kod naših trudnica u trećem trimestru. Prema kraju trudnoće SOD pokazuje pad vrednosti, ali je i dalje značajno viša u odnosu na početak trudnoće, da bi nakon porođaja aktivnost enzima porasla značajno i u poređenju sa prvim trimestrom, ali i sa kontrolnom grupom negravidnih žena.

Rezultati drugih studija su i u ovom slučaju kontradiktorni. I dok jedni autori ukazuju na rast SOD tokom trudnoće (36), drugi ukazuju na pad vrednosti ovog enzima u trećem trimestru trudnoće (29). Interesantno je da svi ispitivani parametri antioksidativnog statusa pokazuju rast u trećem trimestru, sa tendencijom opadanja prema kraju trudnoće, da bi nakon porođaja ove vrednosti značajno porasle u odnosu na 38. nedelju trudnoće. Obzirom da je uočen rast antioksidativnih parametara nakon trudnoće, a u vezi prethodno navedenih rezultata ranijih studija koje su pokazale da

porodaj sam po sebi predstavlja stanje pojačanog oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije, poredili smo vrednosti antioksidativnih parametara pre porođaja i sedam nedelja posle porođaja (Tabela 7).

Naše ispitanice su rodile zdravu decu, odgovarajuće telesne težine, prosečne za donešenu novorođenčad (20) i odgovarajućeg visokog Apgar scora u prvom i petom minutu života (Tabela 3), što takođe ukazuje na očuvan antioksidativni potencijal ovih žena. Studije koje su ispitivale uticaj oksidativnog stresa na kvalitet fetusa i novorođenčadi, pokazale su lošije ishode trudnoće u slučajevima narušene ravnoteže oksidativnog i antioksidativnog sistema i povećanog oksidativnog stresa, koje se manifestuje niskom porođajnom težinom novorođenčadi, intrauterinim zastojem u rastu fetusa (IUGR) i prevremenim porođajem (20, 27, 53). Takva deca u odraslom dobu češće oboljevaju od hroničnih bolesti kao što su hipertenzija, metabolički sindrom, dijabetes melitus, kardiovaskularne bolesti (27, 128).

Pored dosadašnjih, često kontradiktornih saznanja, brojne studije su pokazale da je trudnoća nesumnjivo stanje povećanog oksidativnog stresa, ali i pojačane antioksidativne zaštite i postojanja ravnoteže ovih parametara, koje u slučaju narušene homeostaze dovode do komplikacija u trudnoći, među kojima je po svojoj kompleksnosti najznačajnija preeklampsija. U budućnosti je svakako značajno iznalaženje mogućnosti rutinske laboratorijske detekcije odgovarajućih markera oksidativnog stresa, posebno lipidne peroksidacije, i to u ranoj trudnoći, kako bi se mogao proceniti rizik za razvoj preeklampsije tokom trudnoće.

Među ispitivanim parametrima koje smo određivali u okviru naše studije, svakako se interesantnim pokazalo kontinuirano povećano kretanje vrednosti PAB. Takođe koristan parametar bi mogao biti TBARS, obzirom da je njegova vrednost tokom trudnoće prilično stabilna, a na početku fiziološke trudnoće se ne razlikuje bitno u odnosu na bazne vrednosti negravidnih žena, kao i LOOH koji je na početku trudnoće viši u odnosu na negravidne žene, a takođe pokazuje tokom dalje trudnoće izvesnu stabilnost. Koji od ovih parametara bi mogao da se iskoristi u rutinskom praćenju trudnoće ostaje da se utvrdi u daljim ispitivanjima.

5.2. LIPIDI I FRAKCIJE LIPIDA U TRUDNOĆI BEZ KOMPLIKACIJA

Izmenjen hormonski status tokom trudnoće, prvenstveno kontinuirani rast estradiola i insulinska rezistencija odgovorni su za specifično izmenjen lipidni status koji se kreće kod trudnica u pravcu hiperlipidemije i proaterogenog lipidnog profila. Hipertrigliceridemija potpomognuta povećanim stvaranjem trigliceridima bogatih čestica, kao i smanjenom lipolizom, glavna je karakteristika ove hiperlipidemije koja dovodi do akumulacije triglicerida, ne samo u VLDL česticama, već i u LDL i HDL lipoproteinskim česticama.

Naše istraživanje je pokazalo da tokom trudnoće postoji izmenjen lipidni profil u pravcu hiperlipidemije i proaterogenog lipidnog profila (Tabela 8). Ukupan holesterol i trigliceridi rastu već u ranoj trudnoći u poređenju sa vrednostima kontrolne grupe negravidnih žena, a dalje rastu značajno tokom cele trudnoće, tako da do kraja trudnoće holesterol poraste za oko 30%, a trigliceridi beleže rast do kraja trudnoće skoro tri puta, što je u skladu sa drugim studijama (72, 73, 129).

Posle porođaja vrednost holesterola ostaje i dalje povišena u odnosu na prvi trimestar, ali i u odnosu na kontrolnu grupu i prema našim rezultatima potreban je duži period od sedam nedelja da bi se te vrednosti izjednačile sa vrednostima negravidnih žena. Vrednosti triglicerida posle porođaja vraćaju se na vrednosti sa početka trudnoće, ali su ipak još uvek za oko 20% više u poređenju sa negravidnim ženama, te je i ovde potreban duži period od ispitivanog da bi se izjednačile sa vrednostima pre trudnoće.

Mankuta i saradnici (61) navode da vrednosti holesterola lagano opadaju u prvom trimestru, najverovatnije kao posledica smanjenog unosa hrane u tom periodu zbog prisutne mučnine i povraćanja, i da se, nakon očekivanog fiziološkog rasta tokom trudnoće, vraćaju na nivo pre trudnoće unutar jedne godine posle porođaja. Naše su trudnice, kako smo pomenuli, pokazale rast holesterola već u prvom trimestru. Gunderson i saradnici (73) navode da nakon porođaja trigliceridi opadaju rapidno, dok holesterol i LDL-holesterol ostaju povišeni, a HDL-holesterol je ispod vrednosti pre koncepcije ili rane trudnoće, što su pokazali i rezultati našeg istraživanja.

Vrednosti LDL- i HDL-holesterola takođe se menjaju tokom trudnoće, tako da LDL holesterol raste u drugom trimestru i dalje do kraja trudnoće, kada je vrednost viša za 30% u odnosu na početak trudnoće. Posle porođaja vrednost LDL-holesterola opada,

mada je ta vrednost još uvek viša u poređenju sa kontrolnom grupom negravidnih žena, tako da je i za ovaj parametar potreban duži period od ispitivanog da bi se vrednosti vratile na nivo kontrolne grupe. HDL-holesterol raste značajno već na početku trudnoće u poređenju sa vrednostima negravidnih žena i dalje se taj rast nastavlja do sredine trudnoće, a najviša je vrednost u drugom trimestru, kada počinje da opada sve do kraja trudnoće i nakon porođaja. Vrednosti ApoAI i ApoB tokom trudnoće i posle porođaja uglavnom prate vrednosti odgovarajućih lipidnih frakcija na koje su vezani. Povećanje vrednosti HDL-holesterola tokom trudnoće jeste specifičnost ove hiperholesterolemije koja se javlja u trudnoći i razlikuje je u odnosu na druge tipove hiperholesterolemija gde je HDL-holesterol obično snižen (70), što ukazuje na različite mehanizme delovanja hiperholesterolemije u razvoju ateroskleroze.

Naši rezultati slažu se sa rezultatima drugih studija, koje su dokumentovale rast vrednosti triglicerida, holesterola i LDL lipoproteinskih čestica tokom napredovanja trudnoće, dok je povećanje HDL lipoproteinskih čestica prisutno u ranijoj trudnoći (70-74, 129). Brizzi i saradnici (71) pokazali su značajan porast holesterola, triglicerida i LDL-a tokom trudnoće, a Saarelainen i saradnici (130) zabeležili su takođe značajan porast holesterola, triglicerida, LDL-a i HDL-a tokom trudnoće u poređenju sa negravidnim ženama.

Izmenjen lipidni profil neophodan je da bi se zadovoljile potrebe majke i fetusa tokom fiziološke trudnoće. Međutim, obzirom na karakteristike hiperlipidemije tokom trudnoće i činjenicu da do kraja trudnoće većina trudnica razvije lipidni profil koji se kod zdravih negravidnih žena može smatrati proaterogenim, postavlja se pitanje eventualnog uticaja trudnoće na razvoj ateroskleroze kod žena. Pojedine studije tvrde da trudnoća ima proaterogeni potencijal i da, ukoliko se ponavlja više puta tokom života, može dovesti do razvoja ateroskleroze i posledično razvoja kardiovaskularne bolesti u kasnijem životu (59-62,131). Drugi istraživači smatraju da trudnoća ipak nije proaterogena i da su svi ti procesi u trudnoći hormonski kontrolisani (82). Mankuta i saradnici (61) pokazali su da višebrojne trudnoće imaju kumulativni efekat na sniženje vrednosti HDL-a, što može uticati na razvoj kardiovaskularne bolesti u budućnosti.

Lipidni indeksi (Tabela 9), koji su definisani da bi se poboljšao prediktivni kapacitet lipidnog profila za razvoj kardiovaskularne bolesti, u našem istraživanju rastu tokom trudnoće što pokazuje kretanje lipidnog statusa ka proaterogenim

komponentama, sem indeksa ApoAI / ApoB koji opada tokom trudnoće, što je opet pokazatelj rasta komponenti LDL lipoproteina. Aterogeni indeks plazme (AIP) preko 0,5 predložen je kao cut-off vrednost koja ukazuje na aterogeni rizik (3, 132). Trudnice koje su bile obuhvaćene našom studijom imale su najvišu vrednost ovog indeksa u 38. nedelji trudnoće i iznosila je 0,2. Budući da su visoke vrednosti triglicerida povezane sa gestacijskim dijabetesom, a HDL-holesterol se ne menja značajno tokom trudnoće, čak i kod gestacijskog dijabetesa, smatra se da bi AIP mogao biti i dobar prediktor dijabetesa u trudnoći (56).

Lippi i saradnici (83) navode povećanje AIP i indeksa Hol/HDL-hol u drugoj polovini fiziološke trudnoće, ali i delimično balansiranje hiperlipidemije tokom trudnoće povećanjem vrednosti HDL. Jia i saradnici (80) u svojoj studiji konstatuju da su indeksi Hol/HDL-hol i TG/HDL-hol dobri pokazatelji distribucije HDL subklasa, odnosno njihov istovremeni porast pokazuje kretanje HDL subklasa prema manjim česticama, ali ukazuje i na slabost reversnog transporta holesterola.

Uzevši u obzir činjenicu da je trudnoća stanje povećanog oksidativnog stresa, kao i da je trudnoća stanje sa izmenjenim lipidnim profilom, postaje jasno da ove karakteristike trudnoće mogu dovesti do razvoja aterosklerotskih plakova i posledično razvoja kardiovaskularne bolesti. Međutim, s druge strane povećana je i vrednost HDL-a koji ima ateroprotektivno dejstvo, ali treba uzeti u obzir da usled pojačanog oksidativnog stresa može doći do oksidativne modifikacije i ovih molekula. Hipertrigliceridemija udružena sa endotelnom disfunkcijom smatra se da može imati značajnu ulogu u razvoju preeklampsije (3, 81-84).

Da bismo dalje ustanovili karakteristike hiperlipidemije u trudnoći i procenili njenu potencijalnu proaterogenost, odredili smo veličinu LDL i HDL čestica i distribuciju njihovih subklasa tokom ispitivanog perioda trudnoće i nakon porođaja (Tabela 10 i 11).

Naime, napredovanje trudnoće povezano je sa promenama u distribuciji LDL i HDL lipoproteinskih subklasa, a pravi mehanizam ovih varijacija još uvek nije jasan (70). Kod trudnica glavna komponenta LDL i HDL lipoproteina jesu trigliceridi. Povećanje koncentracije triglicerida u plazmi trudnica odgovara akumulaciji VLDL lipoproteina, kao posledica njihove povećane sinteze indukovane od strane estradiola s jedne strane, a sa druge, njihovog smanjenog uklanjanja iz cirkulacije zbog smanjene

aktivnosti enzima hepaticke lipaze (HL) i lipoproteinske lipaze (LPL). Ovakva visoka akumulacija VLDL čestica dovodi do prenosa triglicerida na LDL i HDL čestice u zamenu za holesterol estere, posredstvom enzima holesterol estar transportnog proteina (CETP), čija aktivnost tokom trudnoće raste. Konačni rezultat ovih pomenutih procesa jeste povećano stvaranje malih, gustih LDL i HDL čestica. Naši rezultati pokazuju da je redistribucija LDL i HDL subklasa prema malim gustim česticama povezana sa povećanjem koncentracije triglicerida na početku trudnoće, kao i njihovim daljim porastom tokom trudnoće, što je i ranije dokumentovano.

Predominacija malih gustih LDL i HDL čestica u plazmi, povezana je sa povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularne bolesti, dok su velike HDL čestice povezane sa smanjenjem tog rizika (21,78-81). Naše istraživanje je pokazalo da tokom trudnoće, kako ona napreduje, dolazi do preuređenosti LDL i HDL subklasa u pravcu manjih čestica i pokazalo se da je veličina LDL čestica značajno manja u trećem trimestru u odnosu na prvi trimestar (Tabela 10). Međutim, postojeći literaturni podaci koji se odnose na promenu lipoproteinskih subklasa tokom trudnoće, variraju među pojedinim studijama (63, 74, 133). Pokazano je da tokom trudnoće postoji predominacija malih gušćih LDL čestica, ali su rezultati koji se odnose na distribuciju subklasa unutar LDL oprečni.

Sattar i saradnici (133) u svom istraživanju odredili su tri LDL subklase (LDL I-III) kod deset trudnica, ali su ovi rezultati prilično neubedljivi. Kod četiri trudnice nije bilo promena u LDL subklasama tokom trudnoće, a kod ostalih ispitanica došlo je do pomeranja profila LDL subklasa prema manjim, gušćim LDL česticama. Winkler i saradnici (63) u svojoj studiji koju su sprovedeli kod trudnica, odredili su koncentraciju šest LDL subklasa i pronašli povećanje gušćih LDL čestica u prvom trimestru, ali i akumulaciju većih plutajućih LDL čestica u drugom i trećem trimestru trudnoće. Razlike u rezultatima među pojedinim studijama mogu se objasniti različitom metodologijom koja je korišćena pri određivanju subklasa lipoproteina.

U našoj studiji smo odredili subfrakcijski profil LDL-a određivanjem šest subklasa ovih lipoproteinskih čestica. Sprovedeno istraživanje je pokazalo da kod naših ispitanica postoji značajno smanjenje dijametra LDL čestica tokom trudnoće, tako da su one najmanje u 38. nedelji trudnoće pred porođaj, a takođe i smanjenje relativnog udela većih LDL I tokom trudnoće, uz istovremeno povećanje LDL II i IIIB subklasa.

Postporođajni profil LDL subklasa je poboljšán u poređenju sa rezultatima pre porođaja, budući da raste njihova prosečna veličina do veličine nađene u prvom trimestru, tako da se promena u veličini čestica tokom trudnoće može smatrati prolaznom. Međutim, posle porođaja značajno je niža zastupljenost najvećih LDL čestica klase I, a povećana je zastupljenost manjih i gušćih LDL III B čestica (Tabela 10). Silliman i saradnici (74) su takođe pokazali da su najmanje LDL čestice prisutne pre porođaja, ali i da je proces redistribucije LDL subklasa reverzan unutar šest nedelja posle porođaja. Istraživanja su takođe pokazala da stvaranje malih gustih čestica može dovesti do stvaranja i razvoja preeklampsije.

Za razliku od LDL lipoproteinskih čestica, distribucija HDL subklasa je manje istraživana. Subfrakcijski profil HDL-a određen je u našoj studiji određivanjem pet subfrakcija HDL-a (Tabela 11). Naše istraživanje je pokazalo da razvojem trudnoće ne dolazi do značajne promene u veličini HDL čestica, ali se posle porođaja beleži značajan pad veličine ovih čestica u poređenju sa veličinom u prvom trimestru. U relativnom udelu pojedinih subklasa postoji značajno povećanje zastupljenosti manjih gušćih HDL 3b i 3c čestica tokom trudnoće, uz istovremeno sniženje zastupljenosti veće HDL 2a subklase. Nakon porođaja, najveće čestice HDL 2b subklase podležu najvećoj redukciji zastupljenosti, koja pokazuje statistički značajnu razliku u poređenju sa prvim trimestrom, što je u skladu sa rezultatima istraživanja Alvarez-a i saradnika (134). Istovremeno, zastupljenost najmanjih HDL 3c subklasa koja značajno raste tokom trudnoće, zadržava visoku vrednost i nakon porođaja.

Alvarez i saradnici (134) su pokazali da je u trećem trimestru manja zastupljenost HDL 2a uz istovremeno povećanje HDL 3c subklasa. Suprotno ovome, Silliman i saradnici (74) su našli predominaciju HDL 2b subklasa tokom kasne trudnoće. Ovakvi različiti rezultati mogu se objasniti time što je distribucija veličine HDL čestica u trudnoći nezavisno regulisana od strane estrogena, odvojeno od drugih metaboličkih faktora, ali i različitim metodama primenjenim za određivanje subklasa LDL-a i HDL-a. Naše istraživanje je pokazalo da u 38. nedelji trudnoće postoji predominacija HDL 2b subklasa, ali da ne postoji značajna razlika u odnosu na prvi trimestar.

Na zastupljenost manjih i gušćih HDL čestica u periodu posle porođaja ukazuje i paralelni rast indeksa Hol/HDL-hol i TG/HDL-hol u tom periodu, koje smo ranije

pomenuli. CARDIA studija (135) pokazala je da za razliku od drugih, uglavnom reverzibilnih promena lipida nakon porođaja, vrednosti HDL lipoproteina nakon porođaja su niže u odnosu na bazne vrednosti pre trudnoće i potreban je duži period, koji može iznositi i nekoliko godina, da bi se te vrednosti izjednačile. Naše trudnice nemaju podatke o vrednosti HDL pre trudnoće, pa ne možemo precizirati ovaj odnos kod naših ispitanica, ali uzevši u obzir rezultate našeg ispitivanja u odnosu na kontrolnu grupu i literaturne podatke, možemo pretpostaviti da promene HDL subklasa u trudnoći i posle porođaja mogu u perspektivi imati negativan uticaj na kardiovaskularni sistem žena i njihovo zdravlje. Winkler i saradnici (63) mišljenja su da mehanizmi koji upravljaju aterogenim lipoproteinskim fenotipom i lipidnim metabolizmom u trudnoći nisu isti, te da u trudnoći postoji balans između potencijalno štetnih faktora, kao što je izmenjen lipidni metabolizam, i još nerazjašnjenih protektivnih mehanizama.

Izmenjen lipidni metabolizam u trudnoći u pravcu balansirane hiperlipidemije značajan je za zdrav razvoj fetusa i zdravlje novorođenčeta u daljem životu. Snižen nivo holesterola, triglicerida, LDL-a i HDL-a tokom trudnoće može dovesti do zastoja u rastu fetusa (IUGR) i smanjene telesne težine na porođaju (136-142). Istraživanja su pokazala da veličina novorođenčeta negativno korelira sa razvojem kardiovaskularne bolesti u kasnijem životu (137-139). Takođe, nebalansirana hiperlipidemija trudnice može dovesti do stvaranja prvih aterosklerotičnih promena u vidu stvaranja masnih pruga već u fetalnom dobu i posledično razvoja ateroskleroze u kasnijem životu odrasle osobe.

U toku našeg istraživanja, uzevši u obzir dosadašnja pomenuta saznanja, razmotrili smo kao značajan aspekt zdravog razvoja fetusa upravo distribuciju lipoproteina tokom trudnoće. Dobijeni rezultati pokazali su da pojedine subklase LDL i HDL lipoproteina u 38. nedelji trudnoće koreliraju sa dužinom, težinom i obimom glave novorođenčeta (Tabela 12).

Kao značajni prediktori antropometrijskih mera novorođenčeta pokazali su se procentualni udeli LDL I subklase, koja pokazuje pozitivnu korelaciju sa dužinom i obimom glave novorođenčeta, i procentualni udeo manjih, gušćih subklasa LDL IV A i IVB koje pokazuju negativnu korelaciju sa antropometrijskim karakteristikama novorođenčeta (Tabela 12). Analiza naših rezultata primenom multiple linearne regresione analize pokazala je nezavisnu negativnu asocijaciju između najmanjih LDL IVB partikula i svih ispitivanih parametara novorođenčeta (Tabela 13). Dakle, što je

procenat zastupljenosti LDL IVB subfrakcije u 38.nedelji trudnoće veći, težina, dužina i obim glave novorođenčeta su manji.

Takođe rezultati našeg istraživanja pokazali su negativnu korelaciju između većih HDL 2a partikula i obima glave novorođenčeta (Tabela 13). Istraživanja su pokazala da manja porođajna težina i manji obim glave novorođenčeta predstavljaju faktor rizika za razvoj kardiovaskularne bolesti u odraslom dobu takve osobe (139-142).

Sam mehanizam dejstva lipida na antropometrijske karakteristike novorođenčeta nije poznat, smatra se da su one prevashodno genetski determinisane, a metabolički uticaj lipida može se objasniti poremećajem reversnog transporta holesterola od strane HDL-a, što se može odraziti na razvoj fetusa.

5.3. AKTIVNOST I STATUS ENZIMA PARAOKSONAZA1 (PON1) TOKOM TRUDNOĆE BEZ KOMPLIKACIJA

Paraoksonaza1 (PON1) je enzim vezan za HDL čestice, deo je antioksidativnog kapaciteta organizma i igra značajnu ulogu u zaštiti fosfolipida LDL i HDL čestica od oksidacije. Humana PON1 pokazuje dva genetska polimorfizma, jedan na poziciji 55 gde je metionin (M) zamenjen leucinom (L), i jedan na poziciji 192, gde je glutamin (Q) zamenjen argininom (R). Polimorfizam utiče na hidrolitičku aktivnost PON1 izoenzima prema lipidnim peroksidima i smatra se da PON1-192 R alelna forma poseduje veći rizik za nastanak kardiovaskularne bolesti i prevremenog porođaja, značajno doprinoseći endotelijalnoj disfunkciji i nižim aktivnostima ovog enzima koje su nađene u stanjima udruženim sa oksidativnim stresom (102, 143).

Studije su pokazale (143-145) da povećani oksidativni stres i oksidativno modifikovane LDL čestice, dislipidemija i snižena aktivnost PON1 enzima, mogu izazvati oštećenje vaskularnog endotela i posledično niz patoloških stanja, kao i uzastopne neuspešne trudnoće.

Istraživanja PON1 koja su rađena kod zdravih trudnica pokazala su kontradiktorne rezultate vezane za promenu aktivnosti enzima tokom trudnoće, tako da pojedine studije ukazuju na povišenu aktivnosti tokom trudnoće, a druge na sniženu. Razlike u ovakvim rezultatima verovatno su i u ovom slučaju posledica različitog dizajna studije, različitih metodologija određivanja aktivnosti PON1, i svih drugih faktora uticaja koje smo ranije pomenuli kod određivanja parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.

Kod trudnica koje su bile uključene u našu studiju pokazalo se da aktivnost enzima PON1, koju smo određivali prema supstratu paraoksoanu, značajno opada tokom trudnoće u poređenju sa prvim trimestrom (Tabela 14). Nakon porođaja aktivnost enzima je i dalje je značajno niža u odnosu na ranu trudnoću prvog trimestra, ali je značajno viša u poređenju sa predporođajnom vrednošću u 38. nedelji trudnoće. Vrednosti u prvom trimestru i nakon porođaja nisu pokazale statistički značajnu razliku u odnosu na aktivnosti enzima u kontrolnoj grupi negravidnih žena.

Kada smo ispitali aktivnost enzima PON1 preko njegovog afiniteta prema supstratu diazoksonu, dobili smo značajnije izražene promene aktivnosti u ispitivanim

periodima trudnoće i nakon porođaja (Tabela 14). Naime, aktivnost enzima merena preko aktivnosti prema diazoksonu, pokazala je da u trećem trimestru dolazi do značajnog pada aktivnosti ($p < 0,05$) i da se taj pad nastavlja napredovanjem trudnoće. Nakon porođaja aktivnost enzima i dalje je značajno niža u poređenju sa prvim trimestrom, ali i značajno viša u poređenju sa aktivnošću pred porođaj.

Kada se izvrši poređenje sa kontrolnom grupom, zapaža se značajno povećanje aktivnosti PON1 (prema oba supstrata, ali izrazitije prema diazoksonu) početkom trudnoće, da bi nakon toga usledio pomenuti značajan pad aktivnosti, sa posleporođajnom vrednosti koja je značajno niža u poređenju sa vrednošću kontrolne grupe (Slika 10).

Rezultati istraživanja drugih studija su različiti jer su neke studije pokazale da aktivnost PON1 tokom trudnoće raste, a druge studije su pokazale da aktivnost opada. Naime, rezultati istraživanja Ferre i saradnika (96), kojim su obuhvaćene trudnice u longitudinalnoj studiji, došli su do zaključaka da tokom nekomplikovane trudnoće aktivnost PON1 opada. Ovakav pad aktivnosti PON1 tokom trudnoće, autori objašnjavaju oslabljenim antioksidativnim obrambenim sistemom tokom kasne trudnoće. Vlachos i sradnici (103) su takođe pokazali da tokom trudnoće dolazi do sniženja aktivnosti PON1, a nakon porođaja vrednosti su niže kod žena koje su se porodile hitnim carskim rezom ili nakon prolongiranog vaginalnog porođaja, što takođe upućuje na povezanost aktivnosti enzima i oksidativnog stresa. Nasuprot ovim istraživanjima, Roy i saradnici (146), kao i Carpintero i saradnici (147), u svojim istraživanjima su pokazali da su u trudnoći povećane aktivnosti PON1, ali su poređenja rađena u odnosu na kontrolnu grupu.

Istraživanje koje su sprovedi Huen i saradnici (13) u Meksičko-Američkoj populaciji trudnica, a koji su uzeli u obzir trudnice u dvadeset šestoj nedelji trudnoće, na porođaju i sedam godina posle porođaja, pokazalo je da je aktivnost PON1 viša u kasnoj trudnoći i na porođaju u poređenju sa vrednostima sedam godina posle kada nisu bile trudne. Ovi rezultati sugerišu da je to još jedan mehanizam kojim organizam održava oksidativni balans u kasnoj trudnoći, koju inače prati povećana produkcija slobodnih radikala. Obzirom da aktivnost PON1 opada sa godinama (12-14), ovaj podatak bi trebalo ipak uzeti u obzir pri konačnoj interpretaciji rezultata dobijenih u ovoj studiji.

Naši rezultati, može se reći, slažu se sa rezultatima dobijenim u ovim studijama, zavisno od toga koji period trudnoće se posmatra i da li se radi poređenje sa kontrolnom grupom. Interesantno je da kod naših trudnica trudnoća počinje rastom PON1 aktivnosti u odnosu na negravidne žene, ali kako trudnoća odmiče, dolazi do pada aktivnosti, koji je dramatičnije izražen preko diazoksonazne aktivnosti.

Značajan pad aktivnosti PON1 kod naših trudnica u trećem trimestru može se objasniti pojačanim oksidativnim stresom u uznapredovaloj trudnoći. Da bismo to proverili ispitali smo uticaj faktora koji mogu doprineti ili ukazuju na pojačani oksidativni stres u tom periodu trudnoće primenom multiple linerane regresione analize (Tabela 15). Rezultati su pokazali da pušački status trudnice pre trudnoće, koncentracija glukoze i PAB jesu nezavisno povezani sa padom diazoksonazne aktivnosti u trećem trimestru. Naime, 37,3% pada aktivnosti enzima PON1 prema diazoksonu je uslovljeno povećanjem PAB-a, pušenjem majke pre trudnoće i promenom koncentracije glukoze. Ovi ispitivani faktori nisu uticali na aktivnost PON1 posle porođaja (Tabela 16).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da pušenje, odnosno duvanski dim, koji je bogat prooksidativnim materijama izaziva smanjenje aktivnosti enzima PON1 (100, 148). Niže vrednosti PON1 nađene su i kod pacijenata obolelih od dijabetesa (148), a kombinacija sa pušenjem kod ovih pacijenata dalje snižava tu aktivnost. Iako su naše trudnice zdrave i završile su trudnoću bez komplikacija, možemo reći da snižena vrednost PON1 kod naših ispitanica, u kombinaciji sa rastućim parametrima oksidativnog stresa pokazanim kroz vrednosti PAB, ukazuju na to da je nekomplikovana trudnoća, a posebno treći trimestar trudnoće, stanje pojačanog oksidativnog stresa sa tendencijom iscrpljivanja antioksidativnog kapaciteta kroz sniženje aktivnosti PON1. Ovo stanje, kako smo videli, dalje se komplikuje pušačkim navikama i potencijalno hiperglikemijom.

Obzirom da niska aktivnost PON1, kao i povećanje parametara oksidativnog stresa predstavljaju faktore rizika za razvoj kardiovaskularne bolesti, može se reći da fiziološka trudnoća poseduje faktore rizika za razvoj kardiovaskularne bolesti, a ponavljanje većeg broja trudnoća tokom života sigurno doprinosi povećanju tog rizika.

5.4. UTICAJ DEMOGRAFSKIH KARAKTERISTIKA TRUDNICA NA PARAMETRE OKSIDATIVNOG STRESA, ANTIOKSIDATIVNE ZAŠTITE, LIPIDNI STATUS I AKTIVNOST PON1

Na oksidativni status u trudnoći, kao što smo ranije pomenuli, utiču i životne navike trudnica, kao što su pušenje, fizička aktivnost, izloženost zagađenju okoline, kao i socio-ekonomski uslovi života. Svakako je značajan i režim ishrane kojeg bi trudnice trebale da se pridržavaju, kako bi sebi i fetusu obezbedile dovoljnu količinu kvalitetnih proteina, ali i prirodnih antioksidanasa konzumacijom optimalne količine voća i povrća. Optimalna telesna težina trudnica, kako su dosadašnja ispitivanja pokazala, značajna je za dobar ishod trudnoće i optimalan razvoj fetusa.

Da bismo procenili uticaj telesne mase naših ispitanica na ispitivane parametre oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite, lipidni profil i aktivnost enzima PON1, nastavak našeg istraživanja usmerili smo na procenu uticaja ITM i dobijanja u težini tokom trudnoće na navedene parametre. Prethodna istraživanja su pokazala da je prekomerna težina povezana sa izmenjenim lipidnim profilom, povećanim oksidativnim stresom, i povećanom aktivacijom inflamatornih markera, što u trudnoći može dovesti do pojave već ranije pomenutih komplikacija (19).

Rezultati naše studije pokazuju da se AOPP i TOS ne menjaju značajno sa porastom ITM tokom same trudnoće (Tabela 17). Vrednosti PAB su značajno više u grupi ispitanica sa $21,2 < ITM < 24,2$ u poređenju sa grupom trudnica sa nižim ITM (Tabela 17) i održavaju se na približnoj vrednosti sa porastom ITM-a. Kada su u pitanju produkti lipidne peroksidacije, nije uočena značajna razlika u koncentracijama TBARS između kontrolne grupe i grupe trudnica različitih vrednosti ITM. Međutim, vrednosti LOOH su značajno više kod trudnica sa najvišim ITM ($ITM \geq 27,4$) u poređenju sa kontrolnom grupom, što pokazuje da prekomerna težina ili gojaznost mogu uticati na pojačanu lipidnu peroksidaciju (Tabela 17).

Kada su u pitanju parametri antioksidativne zaštite i njihova povezanost sa povećanjem ITM, rezultati našeg istraživanja pokazuju da se vrednosti TAS i SH ne menjaju značajno porastom ITM. Vrednosti SOD značajno rastu sa porastom ITM, tako da trudnice sa najvišim ITM ($ITM \geq 27,4$) imaju značajno više vrednosti u odnosu na one koje su imale $ITM \leq 21,9$ (Tabela 18), a taj porast aktivnosti je verovatno odgovor

antioksidativnog sistema zdravih trudnica na stanje izraženijeg oksidativnog stresa koji se javlja sa porastom ITM. Aktivnost enzima PON1 značajno pada sa porastom ITM u poređenju sa trudnicama sa najnižim ITM ($ITM \leq 21,2$), iako je u odnosu na negravidne žene njena aktivnost značajno veća. Ovakav pad aktivnosti PON1 koji prati porast ITM može se povezati sa rezultatima istraživanja koja su rađena kod osoba sa prekomernom težinom i koja su pokazala da takve osobe imaju niže aktivnosti PON1 (149, 150).

Rezultati ispitivanja uticaja ITM na izmenjeni lipidni profil trudnica u periodu trudnoće kada je on najviše izražen, a to je u trećem trimestru trudnoće (Tabela 19), pokazali su da lipidni parametri rastu sa porastom ITM. Statistički značajan porast pokazale su koncentracije holesterola, triglicerida, HDL-holesterola i ApoB u grupi trudnica sa $21,2 < ITM < 24,2$ u odnosu na kontrolnu grupu ($ITM = 21,9 \pm 3,4$), kao i u odnosu na grupu trudnica sa najmanjim ITM ($ITM \leq 21,9$). Vrednost HDL-holesterola ne menja se značajno sa porastom ITM, ali je veća kod trudnica u odnosu na negravidne žene. Takođe se pokazalo da aterogeni indeks plazme (AIP), značajno raste sa porastom ITM.

Da bi se otklonio potencijalni uticaj ITM trudnica pre trudnoće na parametre lipidnog profila i oksidativno-stresnog statusa, dalje ispitivanje smo usmerili na povezanost između ovih parametara i povećanja telesne mase u odnosu na telesnu masu pre trudnoće (povećanje izraženo u procentima). Primenom Spearman-ove regresione analize pokazalo se da postoji pozitivna korelacija između procenta povećanja telesne mase tokom trudnoće i koncentracije mokraćne kiseline, ukupnog holesterola, triglicerida, ApoAI, ApoB, TBARS, AOPP i aktivnosti SOD (Tabela 20). Takođe je dokazano postojanje značajne negativne korelacije između procenta povećanja telesne mase tokom trudnoće i koncentracije TAS, kao i diazoksonazne aktivnosti enzima PON1. Kao što smo već pomenuli, istraživanja drugih autora su takođe pokazala pad aktivnosti PON1 sa porastom telesne mase (149, 150).

Naše istraživanje potvrđuje da je dobijanje u težini tokom trudnoće povezano sa izmenjenim lipidnim profilom, povećanim oksidativnim stresom i smanjenim antioksidativnim potencijalom kroz sniženu aktivnost PON1. Ovi rezultati ukazuju na to da sam porast težine tokom trudnoće jeste faktor rizika iz kojeg proizlaze i drugi faktori rizika, što sve čini da trudnoća jeste potencijalno rizična za razvoj kardiovaskularne

bolesti u kasnijem životu žene. Takođe svi navedeni faktori predstavljaju faktore rizika za razvoj komplikacija u trudnoći, pre svega preeklampsije i dijabetesa.

Iako postoje nedoumice oko optimalne težine tokom trudnoće, preporučena težina u trudnoći ne bi trebala da iznosi više od dobijenih 10-12 kg tokom trudnoće (19). Ukoliko žene imaju pre trudnoće problem sa gojaznošću, rizik da će tokom trudnoće imati veću prekomernu težinu i razviti neku od komplikacija kao što je preeklampsija ili dijabetes kod ovih žena je više prisutan.

Obzirom da tokom trudnoće dolazi do promena parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, ispitali smo uticaj neenzimskih antioksidanasa, kroz upotrebu vitamina C i E, na oksidativni status kod trudnica. Rezultati našeg ispitivanja pokazali su da kod trudnica koje su uzimale vitaminske suplemente u primenjenoj dozi, ne postoji značajna promena u koncentraciji parametara oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite, a ni lipidnog profila (Tabela 23).

Rezultati istraživanja drugih studija su kontradiktorni. Dok jedne ukazuju na značajan doprinos vitamina, posebno vitamina C i vitamina E na antioksidativni status, druge isključuju taj uticaj i smatraju da je adekvatan režim ishrane bogat voćem i povrćem bogatim prirodnim antioksidansima dovoljan za zdravu trudnoću i pravilan razvoj fetusa (39-41). Primer značajnog uticaja vitamina C i E je studija koju su sprovedi Chappell i saradnici (151), u kojoj su pokazali da dnevne doze vitamina C od 1000 mg i vitamina E od 400 mg značajno redukuju rizik kod trudnica za razvoj preeklampsije. Pozitivan uticaj vitamina C i E na težinu i dužinu novorođenčeta pokazali su Lee i saradnici (152) i Rao i saradnici (153), a Min i saradnici smatraju da visoke doze vitamina C i E imaju protektivan uticaj na težinu novorođenčeta, čak i kod trudnica sa visoko rizičnim RR tipom PON1 genskog polimorfizma (99).

Trudnice koje su učestvovala u našoj studiji uzimale su male doze vitamina C (70 mg) i vitamina E (10 mg) u sastavu multivitaminskih preparata, koji su, obzirom da se radi o zdravim trudnicama, imali više ulogu dodatka ishrani, nego protektivnu ulogu, tako da primenjene doze nisu imale značajan uticaj na parametre oksidativnog stresa i antioksidativna zaštite. Prema tome, može se reći da je adekvatan režim ishrane kod zdravih trudnica dovoljan za očuvanje balansa oksidativnog statusa.

Poznato je da pušačke navike doprinose povećanom oksidativnom stresu, obzirom da katran i druga jedinjenja koja su sastavni deo duvanskog dima, predstavljaju

značajne prooksidanse. Te osobe imaju veću koncentraciju oksidativno modifikovanih lipida (44), a smatra se da sam nikotin stimuliše sekreciju kateholamina koja rezultuje lipolizom i povećanom koncentracijom slobodnih masnih kiselina, što dovodi do povećane koncentracije triglicerida i VLDL-a. Takođe, pušenje dovodi do povećanja koncentracije holesterola i LDL-a, uz smanjenje koncentracije HDL, što sve zajedno čini značajne faktore rizika za razvoj kardiovaskularne bolesti.

Među našim ispitanicama bilo je 22 žene (51%) koje su imale pušačke navike pre trudnoće, i kada smo ispitali uticaj pušenja na ispitivane parametre oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite i lipidne parametre, dobijeni rezultati su pokazali da je među pušačima značajno veća koncentracija LDL-holesterola u poređenju sa nepušačima (Tabela 24). Kada su u pitanju parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, trudnice sa pušačkim navikama pre trudnoće imale su značajno više vrednosti TBARS i TOS, kao i značajno nižu aktivnost PON1, što ukazuje da su ove trudnice u stanju povećanog oksidativnog stresa.

Ovi rezultati slažu se sa istraživanjem koje su sproveli Aycicek i saradnici (17), koji su pokazali da je vrednost TOS značajno veća kod aktivnih i pasivnih pušača nego u kontrolnoj grupi. U prethodnim studijama pokazano je takođe, da je koncentracija lipidnih peroksida veća kod trudnica koje su pušači nego kod nepušača (16, 17). Sem toga, trudnice pušači su značajno više dobijale u težini u poređenju sa trudnicama koje nisu pušile, što možemo objasniti time da pušenje smanjuje apetit, tako da sam prekid pušenja može izazvati suprotan efekat (45).

Da bismo utvrdili da li je pušenje nezavisni uzrok povećanja koncentracije TBARS primenili smo multiplu regresionu analizu u koju smo uključili pušenje i sve one parametre koji su pokazali značajnu Spearman-ovu korelaciju sa TBARS kao indikatorom oksidativnog stresa (Tabela 26). Analiza je međutim, pokazala da je upravo dobijanje u težini, a ne pušenje nezavisni pozitivni prediktor koncentracije TBARS. U ovoj analizi vitaminska suplementacija tokom trudnoće i pušačke navike pre trudnoće nisu pokazale značajan uticaj na vrednost TBARS.

Na ispitivane parametre oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite i lipidnog profila, svakako utiču već pomenuti socioekonomski uslovi života, kao i zagađenje okoline, tako da bi i ove faktore trebalo uzeti u obzir kod interpretacije rezultata studija koje su sprovedene u različitim krajevima sveta.

6. ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima studije, rezultati našeg istraživanja pokazali su da je fiziološka trudnoća bez komplikacija praćena povećanim oksidativnim stresom i odgovarajuće izmenjenim parametrima antioksidativnog sistema, izmenjenim parametrima lipidnog statusa u pravcu proaterogenog lipidnog profila, kao i smanjenom aktivnosti PON1. Povećanje telesne težine tokom trudnoće utiče na ispitivane parametre i dalje usmerava njihovo kretanje u pravcu koji može predstavljati povećani rizik za razvoj neke od komplikacija tokom trudnoće ili razvoj kardiovaskularne bolesti u kasnijem životu žene.

Iz dobijenih rezultata našeg istraživanja proizilaze sledeći zaključci:

1. Tokom fiziološke trudnoće bez komplikacija parametri oksidativnog stresa koje smo ispitivali pokazali su sledeće kretanje svojih vrednosti: LOOH, superoksid anjon i PAB značajno rastu već u ranoj trudnoći u odnosu na vrednosti negravidnih žena. Napredovanjem trudnoće vrednosti LOOH ne menjaju se značajno, superoksid anjon pokazuje blaže varijacije vrednosti sa početka trudnoće, dok PAB značajno raste tokom cele trudnoće. Posle porođaja vrednosti LOOH ostaju povišene u odnosu na vrednosti negravidnih žena, a vrednosti superoksid anjona i PAB opadaju do vrednosti koje se nalaze kod negravidnih ispitanica. Vrednosti TBARS ne menjaju se značajno kod trudnica u odnosu na negravidne žene, ni na početku trudnoće, ni dalje tokom trudnoće, ali značajno rastu posle porođaja. Vrednosti TOS značajno su više u trećem trimestru, ukazujući da je u ovom periodu trudnoće oksidativni stres najjače izražen.
2. Parametri antioksidativne zaštite SH i SOD opadaju sa početkom trudnoće u odnosu na stanje negravidnih žena, sa značajnim rastom u trećem trimestru, a dalje se taj rast nastavlja i nakon porođaja, kada su vrednosti više i u odnosu na početak trudnoće i u odnosu na negravidno stanje. Vrednosti TAS su takođe značajno veće u trećem trimestru, kao i posle porođaja u odnosu na vrednost sa početka trudnoće.

3. Povećanje parametara oksidativnog stresa u ranoj trudnoći i sniženje parametara antioksidativne zaštite u istom periodu trudnoće bez štetnog uticaja na tok i ishod trudnoće, ukazuje na postojanje drugih mehanizama koji štite organizam majke i fetus od ove narušene ravnoteže. Povećanje parametara oksidativnog stresa posle porođaja, kao i navedeni odgovarajući antioksidativni odgovor, ukazuje da je prirodni vaginalni porođaj praćen povećanim oksidativnim stresom.
4. Lipidni parametri tokom trudnoće rastu, a posle porođaja, iako dolazi do pada vrednosti, ostaju još uvek viši u odnosu na kontrolnu grupu. Holesterol i trigliceridi nakon porasta u ranoj trudnoći u odnosu na negravidne žene, dalje značajno rastu tokom cele trudnoće. HDL-holesterol dostiže maksimalnu vrednost u drugom trimestru i takav se održava do kraja trudnoće. Nakon porođaja HDL-holesterol opada do vrednosti koje odgovaraju negravidnim ženama. LDL-holesterol značajno raste tokom cele trudnoće, posle porođaja opada, ali je vrednost i dalje značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu. Vrednosti ApoAI i ApoB prate promene HDL- i LDL-holesterola. Izmenjen lipidni profil tokom trudnoće u pravcu hiperlipidemije ukazuje da trudnoća može imati proaterogeni potencijal. Specifičnost dislipidemije u trudnoći je porast HDL-a koji ima ateroprotektivno dejstvo.
5. Lipidni indeksi koji pokazuju međusobne odnose pojedinačnih lipidnih parametara rastu tokom trudnoće ukazujući na povećanje proaterogenih komponenti lipida.
6. Tokom fiziološke trudnoće bez komplikacija dolazi do remodeliranja LDL i HDL čestica čime one postaju manje i gušće. LDL čestice su najmanje u trećem trimestru i to u 38. nedelji trudnoće. Tokom trudnoće smanjuje se i relativni udeo većih LDL I subklasa, uz istovremeno povećanje LDL II i IIIB subklasa. Posle porođaja veličina LDL čestica vraća se na veličinu sa početka trudnoće, tako da se promena u veličini LDL čestica tokom trudnoće može smatrati prolaznom. Posle porođaja značajno je niža zastupljenost najvećih LDL čestica klase I, a povećana zastupljenost manjih i gušćih LDL III B čestica
7. Tokom trudnoće ne dolazi do značajne promene u veličini HDL čestica. U relativnom udelu pojedinih subklasa postoji značajno povećanje zastupljenosti

manjih gušćih HDL 3b i 3c čestica, uz istovremeno sniženje zastupljenosti veće HDL 2a subklase. Posle porođaja značajan je pad veličine ovih čestica u poređenju sa veličinom u prvom trimestru, a najveće čestice HDL 2b subklase podležu najvećoj redukciji zastupljenosti, u odnosu na prvi trimestar. Zastupljenost najmanjih HDL 3c subklasa značajno raste tokom trudnoće i zadržava visoku vrednost i nakon porođaja, tako da je smanjenje veličine HDL čestica posle porođaja, povezano sa većom zastupljenošću manjih gušćih HDL 3c subklasa i paralelno, smanjenjem zastupljenosti HDL 2b subklasa.

8. Posle porođaja potreban je duži period od ispitivanog od sedam nedelja da se sve komponente lipidnog profila vrata na nivo koji odgovara stanju pre trudnoće.
9. Pojedine subklase LDL i HDL lipoproteina u trudnoći koreliraju sa dužinom, težinom i obimom glave novorođenčeta. Značajni prediktori antropometrijskih mera novorođenčeta je procentualni udeo LDL I subklase, koja pokazuje pozitivnu korelaciju sa dužinom i obimom glave novorođenčeta, i procentualni udeo manjih, gušćih subklasa LDL IVA i IVB koje pokazuju negativnu korelaciju sa antropometrijskim karakteristikama novorođenčeta. Najmanja LDL IVB subklasa pokazuje nezavisnu negativnu asocijaciju sa svim ispitivanim parametrima novorođenčeta i što je procenat zastupljenosti LDL IVB subfrakcije veći, težina, dužina i obim glave novorođenčeta su manji. Takođe postoji negativna korelacija između većih HDL 2a čestica i obima glave novorođenčeta.
10. Aktivnost enzima PON1 raste na početku trudnoće u odnosu na negravidne žene, a u trećem trimestru i nakon porođaja je niža u poređenju sa istom grupom. Promene u aktivnosti jače su izražene prema supstratu diazoksonu. Tokom trudnoće aktivnost enzima opada dramatično u trećem trimestru. Nakon porođaja aktivnost PON1 raste u poređenju sa vrednošću pre porođaja.
11. Pušački status trudnice pre trudnoće, koncentracija glukoze i PAB su nezavisno povezani sa padom diazoksonazne aktivnosti PON1 u trećem trimestru. Pad aktivnosti PON1 u trećem trimestru povezan je sa izraženijim oksidativnim stresom u tom periodu trudnoće.
12. Viša vrednost ITM kod trudnica utiče na povećanje parametara oksidativnog stresa, povećanje aktivnosti enzima SOD i smanjenje aktivnosti enzima PON1.

Lipidni parametri, osim HDL-holesterola rastu sa porastom ITM tokom trudnoće.

13. Postoji pozitivna korelacija između procenta dobijanja u telesnoj masi tokom trudnoće i koncentracije mokraćne kiseline, ukupnog holesterola, triglicerida, ApoAI, ApoB, TBARS, AOPP i aktivnosti SOD. Postoji značajna negativna korelacija između procenta dobijene težine tokom trudnoće i koncentracije TAS, kao i diazoksonazne aktivnosti enzima PON1.
14. Trudnice koje su uzimale vitaminske suplemente u navedenim dozama tokom trudnoće nisu pokazale promene u svom lipidnom i oksidativnom statusu, kao ni promene u aktivnosti PON1.
15. Trudnice koje su imale pušačke navike pre trudnoće imale su više vrednosti LDL-holesterola, TBARS i TOS od trudnica koje nisu pušile. Kod ovih trudnica je procenat dobijene težine tokom trudnoće bio veći, što se pokazalo kao veći rizik za razvoj oksidativnog stresa, nego samo pušenje.

6.1. OPŠTI ZAKLJUČCI

Rezultati sprovedenog istraživanja su pokazali da, fiziološka trudnoća predstavlja stanje kompleksnih metaboličkih adaptacionih promena, koje su neophodne za dobar ishod trudnoće, koji uključuje zdravu trudnicu, donešenu trudnoću, prirodan nekomplikovan porođaj i zdravo novorođenče.

Rezultati našeg istraživanja su takođe pokazali da metaboličke promene uključuju izmenjen lipidni profil u pravcu hiperlipidemije, ali i specifičan porast HDL-holesterola, što je karakteristika fiziološke hiperlipidemije u trudnoći. Tokom trudnoće dolazi do remodeliranja LDL i HDL čestica u pravcu malih gustih čestica, što zajedno sa povećanim vrednostima holesterola, triglicerida i LDL-holesterola predstavlja jedan od faktora rizika koji vode oštećenju endotela, što je zajedničko i razvoju kardiovaskularne bolesti, ali i razvoju preeklampsije kao najznačajnije komplikacije tokom trudnoće.

Druga značajna karakteristika fiziološke trudnoće, što je naša studija i pokazala, jeste pojačano stvaranje parametara oksidativnog stresa, koji imaju značajnu ulogu u normalnom toku trudnoće i porođaja. Ovaj proces prati odgovarajući odgovor zdravog organizma stvaranjem antioksidativnih komponenti, pre svega enzima SOD koji predstavlja prvu liniju odbrane od oksidativnog stresa, a pojačano se stvara u trećem trimestru trudnoće u kojem je oksidativni stres najizraženiji.

Aktivnost enzima PON1 raste u stanju fiziološke trudnoće u poređenju sa negravidnim stanjem, ali tokom same trudnoće aktivnost značajno opada, posebno u trećem trimestru, što bi ukazivalo na oslabljen antioksidativni potencijal trudnica u tom periodu trudnoće. Međutim, pošto su trudnice u našoj studiji donele trudnoću do predviđenog termina porođaja i rodile zdravu decu, smatramo da postoji drugi mehanizam koji balansira ravnotežu oksidativnih parametara i time omogućava normalnu realizaciju trudnoće. Na taj način sam pad aktivnosti PON1 ne ugrožava majku i fetus od potencijalno lošeg dejstva oksidativnog stresa. Ako se uzme u obzir da tokom nekomplikovane trudnoće HDL-holesterol ne raste značajno posle drugog trimestra, pretpostavljamo da za optimalno održavanje ravnoteže oksidativnih parametara tokom trudnoće, ovaj enzim nije esencijalan. Telesna težina trudnica, pušačke navike, ishrana i način života značajno utiču na ispitivane parametre, a time i na ishod trudnoće.

Metaboličke promene koje smo ispitivali u našem istraživanju fiziološke nekomplikovane trudnoće u svojoj osnovi nose rizike za razvoj komplikacija u trudnoći i kardiovaskularne bolesti. Međutim, ove promene tokom trudnoće kod zdravih žena su pod kontrolom odgovarajućih mehanizama. Mehanizmi nastanka i delovanja ovakvih promena još uvek su dobrim delom nepoznati, tako da bi buduća istraživanja trebalo usmeriti u tom pravcu, kako bi sama fiziologija trudnoće postala jasnija, a time i mogućnost prevencije i delovanja kod patofizioloških trudnoća.

Rezultati naših istraživanja ukazuju na to da bi otkrivanje novih biomarkera i implementacija već postojećih u rutinsku laboratorijsku praksu trebalo da bude jedan od značajnih budućih koraka u istraživanju i razvoju laboratorijske dijagnostike u cilju što bolje prevencije, dijagnostike i lečenja komplikacija u trudnoći.

7. LITERATURA

1. King JC. Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1218S-1225S.
2. Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1256S-1261S.
3. Mshelia DS, Kullima AA. The importance of lipid and lipoprotein ratios in interpretations of hyperlipidaemia of pregnancy. In: Frank S, Kostner G, Editors, *Lipoproteins-role in health and diseases*, InTech, Croatia, 2012, p. 47-72.
4. Kharb S, Nanda S, Batra A. Relationship between cord blood atherogenic index and birth weight in preeclampsia. *Mediterr J Nutr Metab* 2013;6:59-61.
5. Fowler-Brown AG, De Boer IH, Catov JM, Carnethon MR, Kamineni A, Kuller LH, Siscovick DS, Mukamal KJ. Parity and the association with diabetes in older women. *Diabetes Care* 2010; 8 (33) 1778-1782.
6. Parikh NI, Cnattingius S, Dickman PW, Mittleman MA, Ludvigson JF, Ingelsson E. Parity and risk of later-life maternal cardiovascular disease. *Am Heart J* 2010;159:215-221.
7. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Res Clin Obstet and Gynaecol* 2011; 25:287-299.
8. Al-Gubory K, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Cell Biology* 2010;42: 1634-1650.
9. Siddiqui IA, Jaleel A, Tamimi W, Al Kadri HMF. Role of oxidative stressing the pathogenesis of preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2010;282:469-474.
10. Demirci O, Tugrul AS, Dolgun N, Sozen H, Eren S. Serum lipids level assessed in early pregnancy and risk of preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res* 2011. DOI10.1111/j.1447-0756.2011.01562.x
11. Abuhandan M, Cakmak A, Taskin A, Karakaya E, Kocyigit A, Kilic H. The effects of age on the paraoxonase and arylesterase activity of pregnant mothers and their infants. *J Clin Lab Anal* 2012; 26: 302-306.
12. Gelisgen R, Genc H, Kayali R, Oncul M, Benian A, Guralp O, Uludag S, Cakatay U, Albayrak M, Uzun H. Protein oxidation markers in women with and without

- gestational diabetes mellitus: A possible relation with paraoxonase activity. *Diabetes research and clinical practice* 2011;94:404-409.
13. Huen K, Harley K, Bradman A, Eskenazi B, Holland N. Longitudinal changes in PON1 enzymatic activities in Mexican-American mothers and children with different genotypes and haplotypes. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2010;244:181-189.
 14. Stockl D, Doring A, Thorand B, Heier M, Peters A, Lamina C, Kronenberg F, Meisinger C. Reproductive factors and its association with peripheral arterial disease in women aged 52-81 years: The KORA F4 study. *Atherosclerosis* 2013;228:224-229.
 15. Bizzon A, Milnerowicz-Nabzdyk E, Zalewska M, Zimmer M, Milnerowicz H. Changes in pro/antioxidant balance in smoking and non-smoking pregnant women with intrauterine growth restriction. *Reprod Toxicol* 2011;32:360-367.
 16. Chelchowska M, Ambroszkiewicz J, Gajewska J, Laskowska-klita T, Leibschang J. The effect of tobacco smoking during pregnancy on plasma oxidant and antioxidant status in mother and newborn. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;155:132-136.
 17. Aycicek A, Varma M, Ahmet K, Abdurrahim K, Erel O. Maternal active or passive smoking causes oxidative stress in placental tissue. *Eur J Pediatr* 2011;170:645-651.
 18. Roberts JM, Bodnar LM, Thelma EP, Powers RW. The role of obesity in preeclampsia. *Pregnancy hypertension: An international Journal of Women's Cardiovascular Health* 2011;1:6-16.
 19. Zavalza-Gomez AB. Obesity and oxidative stress: a direct link to preeclampsia?. *Arch Gynecol Obstet* 2011;283:415-422.
 20. Osorio JC, Cruz E, Milanes M, Ramirez Y, Sierra M, Cruz M, Sanfiel L. Influence of maternal redox status on birth weight. *Reprod Toxicol* 2011;31:35-40.
 21. Dobiasova M, Frochlich J. The plasma parameter $\log(\text{TG}/\text{HDL-C})$ as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FERHDL). *Clin Biochem* 2001;34:583-588.

22. Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B. Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol* 2002;156 (3):274-285.
23. Dumollard R, Carroll J, Duchen K, Campbell K, Swann K. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Cell Dev Biol* 2009;20:346-353.
24. Đorđević VB, Pavlović DD, Kocić GM. *Biohemija slobodnih radikala*. Medicinski fakultet Niš 2000.
25. Burton GJ, Hempstock J, Jauniaux E. Oxygen, early embryonic metabolism and free radical-mediated embryopathies. *Reproductive Biomedicine Online* 2002;6:84-96.
26. Kamath U, Rao G, Kamath SU, Rai L. Maternal and fetal indicators of oxidative stress during intrauterine growth retardation (IUGR). *Ind J Clin Biochem* 2006;21(1):111-115.
27. Sridhar MG, Setia S, John M, Bhat V, Nandeesh H, Sathiyapriya V. Oxidative stress varies with the mode of delivery in intrauterine growth retardation: Association with Apgare score. *Clin Biochem* 2007;40:688-691.
28. Sharma JB, Sharma A, Bahadur A, Vimala N, Satyam A, Mittal S. Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Int J Gynecol Obstet* 2006;94:23-27.
29. Patil SB, Kodliwadmath MV, Kodliwadmath SM. Study of oxidative stress and enzymatic antioxidants in normal pregnancy. *Ind J Clin Biochem* 2007;2(1):135-137.
30. Rodrigo R, Guichard C, Charles R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. *Clin Pharmacol* 2007;21:111-127.
31. Devasagayam TPA, Boloor KK, Ramasarma T. Methods for estimating lipid peroxidation: An analysis of merits and demerits. *Indian J Biochem Biophys* 2003;40:300-308.
32. Macekova D, Kovac G, Hinst J, Illek B, Pereckova J, Baraskova Z, Liska B. Lipid peroxidation and biochemical parameters in maternal pre-delivery and post-delivery plasma. *Biologia* 2010;65/1:170-174.
33. Takahashi M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J Reprod Dev* 2012;58:1-9.

34. Gohil JT, Patel PK, Priyanka G. Evaluation of oxidative stress and antioxidant defence in subject of preeclampsia. *Indian J Obstet Gynecol* 2011;61:638-640.
35. Raijmakers MTM, Roes EM, Poston L, Steegers EAP, Peters WHM. The transient increase of oxidative stress during normal pregnancy is higher and persists after delivery in women with pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol* 2007;doi:10.1016/j.ejogrb.2007.08.005
36. Saker M, Mokhtari NS, Merzouk SA, Merzouk H, Belarbi B, Narce M. Oxidant and antioxidant status in mothers and their newborns according to birthweight. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol* 2008;141:95-99.
37. Sugino N, Takiguchi S, Umekawa T, Heazell A, Caniggia I. Oxidative stress and pregnancy outcome: A workshop report. *Placenta* 2007;21(Suppl.A):48-50.
38. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol* 2002;57(5):609-613.
39. Mistry HD, Williams PJ. The importance of antioxidant micronutrients in pregnancy. *Oxid Med Cell Longev* 2011; doi:10.1155/2011/841749
40. Owens S, Fall CHD. Consequences of poor maternal micronutrition before and during early pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102:103-104.
41. Casanueva E, Viteri FE. Iron and oxidative stress in pregnancy. *J Nutr* 2003;133:1700S-1708S.
42. Orhon FS, Ulukol B, Kahya D, Cengiz B, Baskan S, Tezcan S. The influence of maternal smoking on maternal and newborn oxidant and antioxidant status. *Eur J Pediatr* 2009;168:975-981.
43. Lim R, Sobey CG. Maternal nicotine exposure and fetal programming of vascular oxidative stress in adult offspring. *Br J Pharmacol* 2011;164:1397-139.
44. Jeeyar.Hemalatha, WD Silvia. Evaluationof effect of smoking and hypertension on serum lipid profile and oxidative stress. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2011;289-291.
45. Cogsvell EM, Weisberg P, Spong C. Cigarette smoking, alcohol use and adverse pregnancy outcomes:implications for micronutrient supplementation. *J Nutr* 2003;133:S1722-31.
46. Elsayed MN, Bendich A. Dietary antioxidants: potential effect on oxidative products in cigarette smoke. *Nutr Res* 2001;21:551-567.

47. Abrams B, Altman SL, Pickett KE. Pregnancy weight gain: still controversial. *Am J Clin Nutr* 2000;71:1233S-1241S.
48. World Health Organization. WHO document. Measuring obesity-classification and description of antropometric data. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe;1998.
49. Chiba T, Omori A, Takahashi K, Tanaka K, Kudo K, Manabe M, et al. Correlations between the detection of stress-associated hormone/oxidative stress markers in umbilical cord blood and the physical condition of the mother and neonate. *Journal of Obst and Gynaecol Res* 2010;36:958-964.
50. Dennery P.A. Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Research (part C)* 2007;81:155-162.
51. Hung TH, Lo LM, Chiu TH, Yeh YL, Chen SF, Hsien TT. A longitudinal study of oxidative stress and antioxidant status in women with uncomplicated pregnancies through gestation. *Reproductive Sciences* 2010;doi 10.1177/1933719109359704
52. Hovdenak N, Haram K. Influence of mineral and vitamin supplements on pregnancy outcome. *Eur Jour Obstet Gynecol* 2012;164:127-132.
53. Kim YJ, Hong YC, Lee KH, Park HJ, Park EA, Moon HS, Ha EH. Oxidative stress in pregnant women and birth weight reduction. *Reprod Toxicol* 2005; 19:487-492.
54. Hsieh TT, Chen SF, Lo LM, Li MJ, Yeh YL, Hung TH. The association between maternal oxidative stress at mid-gestation and subsequent pregnancy complications. *Reprod Sci* 2012;19(5):505-512.
55. Min J, Kim YJ, Lee EH, Park H. Effect of oxidative stress on birth sizes: consideration of window from mid pregnancy to delivery. *Placenta* 2009;30:418-423.
56. Santos-Weiss ICR, Rea RR, Fadel-Picheth CMT, Rego FGM, Pedrosa FO, Gillery P, Souya EM, Picheth G. The plasma logarithm of the triglyceride / HDL-cholesterol ratio is a predictor of low risk gestational diabetes in early pregnancy. *Clin Chim Acta* 2013;418:1-4.

57. Kilby MD, Neary RH, Mackness MI, Durrington PN. Fetal and maternal lipoprotein metabolism in human pregnancy complicated by type I diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1736-1741.
58. Catov JM, Newman AB, Sutton-Tyrel K, Harris TB, Tylavsky F, Visser M, Ayonayon HN, Ness RB. Parity and cardiovascular disease risk among older women: how do pregnancy complications mediate the association? *Ann Epidemiol* 2008;18:873-879.
59. Humphries KH, Westendorp ICD, Bots ML, Spinelli JJ, Carere RG, Hofman A, Witteman JCM. Parity and carotid artery atherosclerosis in elderly women: The Rotterdam study. *Stroke* 2001;32:2259-2264.
60. Nicholson WK, Asao K, Brancati F, Coresh J, Pankow JS, Powe NR. Parity and risk of type 2 diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes care* 2006;29:2349-2354.
61. Mankuta D, Elami-Suzin M, Elhayani A, Vinker S. Lipid profile in consecutive pregnancies. *Lipids in Health and Disease* 2010;9:58-62.
62. Fowler-Brown AG, De Boer IH, Catov JM, Carnethon MR, Kamineni A, Kuller LH, Siscovick DS, Mukamal KJ. Parity and association with diabetes in older women. *Diabetes Care* 2010;33:1778-1782.
63. Winkler K, Wetzka B, Hoffmann MM, Friedrich I, Kinner M, Baumstark MW, Wieland H, Marz W, Zahradnik HP. Low density lipoprotein (LDL) subfraction during pregnancy: Accumulation of buoyant LDL with advancing gestation. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4543-4550.
64. Clausen T, Đurovic S, Henriksen T. Dyslipidemia in early second trimester is mainly a feature of women with early onset pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 2001;108:1081-1087.
65. Castela JE, Gago-Dominguez M. Risk factors for cardiovascular disease in women: Relationship to lipid peroxidation and oxidative stress. *Medical Hypotheses* 2008;71:39-44.
66. Samson CE, Galia ALB, Llave KIC, Zacarias MB, Mercado-Asis LB. Postprandial peaking and plateauing of triglycerides and VLDL in patients with underlying cardiovascular diseases despite treatment. *Int J Endocrinol Metab* 2012;10(4):587-593.

67. Mancini GBJ, Hegele RA, Leiter LA. Dyslipidemia. *Can J Diabetes* 2013; 37:S110-S116.
68. Stockl D, Doring A, Thorand B, Heier M, Peters A, Lamina C, Kronenberg F, Meisinger C. Reproductive factors and its association with peripheral arterial disease in women aged 52-81 years: The KORA F4 study. *Artherosclerosis* 2013;228:224-229.
69. Mayret-Mesquiti M, Perez-Mendez O, Rodriguez ME, Fortoul TI, Gorocica P, Bernal-Alcantara D, Montano LF, Vasquez NA. Hypertriglyceridemia is linked to reduced nitric oxide synthesis in women with hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 2007;26:423-431.
70. Okazaki M, Usui S, Tokunaga K, Nakajima Y, Takeichi S, Nakano T, Nakajima K. Hypertriglyceridemia in pregnancy does not contribute to the enhanced formation of remnant lipoprotein particles. *Clin Chim Acta* 2004;339:169-181.
71. Brizzi P, Tonolo G, Esposito F, Puddu L, Dessole S, Maioli M, Milia S. Lipoprotein metabolism during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:430-434.
72. Amundsen AL, Khoury J, Iversen PO, Bergei C, Ose L, Tonstad S, Retterstol K. Marked changes in plasma lipids and lipoproteins during pregnancy in women with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2006;189:451-457.
73. Gunderson EP, Lewis CE, Murtaugh MA, Quesenberry CP, West DS, Sidney S. Long-term plasma lipid changes associated with a first birth. The coronary artery risk development in young adults study. *Am J Epidemiol* 2004;159:1028-1039.
74. Silliman K, Shore V, Forte TM. Hypertriglyceridemia during late pregnancy is associated with the formation of small dense low-density lipoproteins and the presence of large buoyant high-density lipoproteins. *Metabolism* 1994;43(8):1035-1041.
75. Martin U, Davies C, Hayavi S, Hartland A, Dunne F. Is normal pregnancy atherogenic? *Clinical Science* 1999;96:421-425.
76. Rizzo M, Kotur-Stevuljević J, Bernies K, Spinass G, Rini GB, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V, Vekic J. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. *Translational Res* 2009;153(5):217-223.

77. Vanderjagt DJ, Patel RJ, El-Nafaty A, Melah GS, Crossey MJ, Glew RH. High-density lipoprotein and homocysteine levels correlate inversely in preeclamptic women in northern Nigeria. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83:536-542.
78. Tian L, Fu M. The relationship between high density lipoprotein subclass profile and plasma lipids concentrations. *Lipids Health Dis* 2010;17:109-118.
79. Yang Y, Yan B, Fu M, Xu Y, Tian Y. Relationship between plasma lipid concentrations and HDL subclasses. *Clin Chim Acta* 2005;354(1-2):49-58.
80. Jia L, Long S, Fu M, Yan B, Tian Y, Xu Y, Gou L. Relationship between total cholesterol / high-density lipoprotein cholesterol ratio, triglyceride / high-density lipoprotein cholesterol ratio, and high-density lipoprotein subclasses. *Metabolism* 2006;55(9):1141-1148.
81. Ogura K, Miyatake T, Fukui O, Nakamura T, Kameda T, Yoshino G. Low-density lipoprotein particle diameter in normal pregnancy and preeclampsia. *J Atheroscler Thromb* 2002;9:42-47.
82. Setareh A, Mitra MG, Sedigheh B, Shoaleh S, Vahid Y, Siroos S. Maternal plasma lipid concentrations in first trimester of pregnancy and risk of severe preeclampsia. *Pak J Med Sci* 2009;25(4):563-567.
83. Lippi G, Albiero A, Montagnana M, Salvagno G, Scevarolli S, Franchi M, Guidi GC. Lipid and lipoprotein profile in physiological pregnancy. *Clin Lab* 2007;53:173-177.
84. Ray JG, Diamond P, Singh G, Bell CM. Brief overview of maternal triglycerides as a risk factor for pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;113:379-386.
85. Gupta S, Arora S, Trivedi SS, Singh R. Dyslipidemia in pregnancy may contribute to increased risk of neural tube defects-a pilot study in north Indian population. *Ind J Clin Biochem* 2009;24(2):150-154.
86. Mohanty S, Nayak N, Nanda NN, Rao P. Serum lipids and malondialdehyde levels in primiparous patients with pregnancy induced hypertension. *Ind J Clin Biochem* 2006;21(1):189-192.
87. Matsunaga T, Hara A, Komoda T. Functional change in the HDL particle by oxidative modification and its contribution to atherogenesis. Dr Tsugikazu Komoda in *The HDL Handbook* 2010; Academic Press:215-241.

88. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. Medicinska Naklada 2011.
89. Wang M, Lang X, Zou L, Huang S, Xu Z. Four genetic polymorphisms of paraoxonase gene and risk of coronary heart disease: A meta-analysis based on 88 case-control studies. *Atherosclerosis* 2011;214:377-385.
90. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:412-419.
91. Costa LG, Li WF, Richter RJ, Shih DM, Lusic A, Furlong CE. The role of paraoxonase (PON1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism. *Chemico-Biological Interactions* 1999;119-120:429-438.
92. Demirdogen BC, Turkangolu A, Bek S, Sansigolu Y, Demirkaja S, Vural O, Arinc E, Adali O. Paraoxonase / arylesterase ratio, PON1 192Q/R polymorphism and PON1 status are associated with increased risk of ischemic stroke. *Clin Biochem* 2008;41:1-9.
93. Androutopoulos VP, Kanavouras K, Tsatsakis AM. Role of paraoxonase 1 (PON1) in organophosphate metabolism: Implications in neurodegenerative diseases. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 256:418-424.
94. Kotur-Stevuljević J. Polimorfizam paraoksonaze 1 kod pacijenata sa angiografski dokazanom koronarnom bolešću. Doktorska disertacija, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2007.
95. Dekin SP, Bioletto S, Bochaton-Piallat MC, James RW. HDL-associated paraoxonase-1 can redistribute to cell membranes and influence sensitivity to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2011;50:102-109.
96. Ferre N, Camps J, Fernandez-Ballart J, Arija V, Murphy MM, Marsillach J, Joven J. Longitudinal changes in serum paraoxonase-1 activity through normal pregnancy. *Clin Chem Lab Med* 2006;44(7):880-882.
97. Jarvik GP, Rozek LS, Brophy VK, Hatsukami TS, Richter RJ, Schellenberg GD, Furlong CE. Paraoxonase (PON1) phenotype is a better predictor of vascular disease than is PON1₁₉₂ or PON1₅₅ genotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2441-2447.

98. Vekić J, Kotur-Stevuljević J, Zeljković A, Stefanović A, Jelić-Ivanović Z, Spasić S, Spasojević-Kalimanovska V. Serum paraoxonase (PON1) and its interactions with HDL: Relationship between PON1 and Oxidative stress. Tsugikazu Komoda in *The HDL Handbook 2010*; Academic Press:77-97.
99. Min J, Park H, Park B, Kim YJ, Park J, Lee H, Ha E, Park EA, Hong YC. Paraoxonase gene polymorphism and vitamin levels during pregnancy: Relationship with maternal oxidative stress and neonatal birthweights. *Reprod Toxicol* 2006;22:418-424.
100. Jarvik GP, Tsai NT, McKInstry LA, Wani R, Brophy VH, Richter RJ, Schellenberg GD, Heagerty PJ, Hatsukami TS, Furlong CE. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1329-1333.
101. Kim Yj, Park H, Lee HY, Ahn Y, Ha EH, Suh Sh, Pang MG. Paraoxonase gene polymorphism, serum lipid, and oxidized low-density lipoprotein in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol* 2007;133:47-52.
102. Sarandol E, Safak O, Dirican M, Uncu G. Oxidizability of apolipoprotein B-containing lipoproteins and serum paraoxonase / arylesterase activities in preeclampsia. *Clin Biochem* 2004;37:990-996.
103. Vlachos GD, Bartzeliotou A, Schulpis KH, Partsinevelos GA, Lazaropoulou C, Papadima C, Papastamataki M, Antsaklis A, Papassotiriou I. Maternal-neonatal serum paraoxonase 1 activity in relation to the mode of delivery. *Clin Biochem* 2006,39:923-928.
104. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991;286:152-154.
105. Chen D, Hu Y, Chen C, et al. Polymorphisms of the paraoxonase gene and risk of preterm delivery. *Epidemiology* 2004;15(4):466-470.
106. Kumru S, Aydin S, Gursu MF, Ozean Z. Changes of serum paraoxonase (an HDL-cholesterol-associated lipophilic antioxidant) and arylesterase activities in severe preeclampsia women. *Eur J Obstet Gynecol* 2004;114:177-181.
107. Girotti MJ, Khan N, Mc Lellan BA. Early measurement of systemic lipid products in plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma* 1991;31:32-35.

108. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, editor. CRC Handbook of Methods for Oxygen radical Research. Boca Raton FL: CRC Press:1985.p. 123-132.
109. Gay CA, Gebicki JM. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by ferric-xylenol orange method. *Anal Biochem* 2002;30:65-74.
110. Witko-Sarsat V, Nguyen M, Capeillere-Blandin C, Nguyen AT, Zingraff J. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996;49:1304-13.
111. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005;38:1103-11.
112. Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clin Biochem* 2007;40:248-54.
113. Misra HP, Fridovich I. Chemistry and metabolism of substances of low molecular weight: the role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-5.
114. Ellman GI. Tissue sulfhydryl groups. *Arc Biochem Biophys* 1952; 82: 70-77.
115. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin biochem* 2004;37:277-285.
116. Richter RJ, Furlong CE. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 1999;9:745-753.
117. Richter RJ, Jampsa, Jarvik GP, Costa LG, Furlong CE. Determination of paraoxonase 1 status and genotypes at specific polymorphisms sites. In: Maines M, Costa LG, Reed DJ, Hodgson E, editors. *Current Protocols in Toxicology*. New York: John Wiley and Sons, 2004.
118. Rainwater DL, Moore PH, Gamboa IO. Improved method for making nondenaturing composite gradient gels for the electrophoretic separation of lipoproteins. *J Lipid Res* 2004;45:773-775.

119. Vekić J, Topić A, Zeljković A, Jelić- Ivanović Z, Spasojević-Kalimanovska V. LDL and HDL subclasses and their relationship with Framingham risk score in middle-aged Serbian population. *Clin Biochem* 2007;40:310-316.
120. Bland JM, Altman DG. Statistics notes: transformations, means and confidence intervals. *BMJ* 1996; 312: 1079-1080.
121. Adkins S, Gan KN, Mody M, LaDu BN. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase; glutamine or arginine at position 191, for respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 598-608.
122. Orhan H, Onderoglu L, Yucel A. Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 2003;267:189-195.
123. Nakai A, Oya A, Kobe H, Asakura H, Yokota A, Koshino T, Araki T. Changes in maternal lipid peroxidation levels and antioxidant enzymatic activities before and after delivery. *J Nippon Med Sch* 2000;67:434-439.
124. Rogers MS, Mongelli JM, Tsang KH, Wang CC, Law KP. Lipid peroxidation in cord blood at birth: the effect of labour. *Br J Obstet Gynecol* 1998;105:739-744.
125. Patil SB, Kodliwadmath MV, Kodliwadmath SM. Role of lipid peroxidation and enzymatic antioxidants in pregnancy induced hypertension. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2007;34:239-241.
126. Llurba E, Gratacos E, Gallan PM. A comprehensive study of oxidative stress and antioxidant status in preeclampsia and normal pregnancy. *Free Radic Biol Med* 2004;37:557-570.
127. Inanc F, Kilinc M, Kiran G. Relationship between oxidative stress in cord blood and route of delivery. *Fetal Diag Ther* 2005; 20:450-453.
128. Siddiqui IA, Jaleel A, Tamimi W, Al Kadri MF. Role of oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet* 2010;282:469-474.
129. Choi JW, Pai SH. Serum lipid concentrations change with serum alkaline phosphatase activity during pregnancy. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:422-428.
130. Saarelainen H, Laitinen T, Raitakari OT, Juonala M, Heiskanen N, Lyyra-Laitinen T, Viikari JS, Vannien E, Heinonen S. Pregnancy-related hyperlipidemia and endothelial function in healthy women. *Circ J* 2006;70:768-772.

131. Lawlor DA, Emberson JR, Ebrahim S, Whincup PH, Wannamethee SG, Walker M, Smith GD. Is the association between parity and coronary heart disease due to biological effects of pregnancy or adverse lifestyle risk factors associated with child-rearing?: Findings from British women's heart and health study and the British regional heart study. *Circulation* 2003;107:1260-1264.
132. Dobiasova M. Atherogeni index of plasma [log(triglycerides/HDL-cholesterol)]: Theoretical and practical implications. *Clin Chem* 2004;50:113-115.
133. Sattar N, Greer IA, Loudon J, Lindsay G, McConnel M, Shepherd J. Lipoprotein subfraction changes in normal pregnancy: Treshold effect of plasma triglyceride on appearance of small, dense low density lipoprotein. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2483-2491.
134. Alvarez J, Montelongo A, Iglesias A, Lasuncio'n MA, Herrera E. Longitudinal study on lipoprotein profile, high density lipoprotein subclass, and postheparin lipases during gestation in women. *J Lip Res* 1996;37: 299-308.
135. Lewis CE, Funkhouser E, Raczynski JM, Sidney S, Bild DE, Howard BV. Adverse effect of pregnancy on high density lipoprotein (HDL) cholesterol in young adult women. The CARDIA Study. *Am J Epidemiol* 1996;144:247-254.
136. Herrera E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine* 2000;19:43-55.
137. Catov JM, Roberta BN, Wellons MF, Jacobs DR, Roberts JM, Gunderson EP. Prepregnancy lipids related to preterm birth risk: The coronary artery risk development in young adults study. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:3711-3718.
138. Alkemade FE, Gittenberger-de Grot AC, Schiel AE, VanMunsteren JC, Hogers B, Van Vliet SJ, Poelmann RE, Havekes LM, Wilems van Dijnl K, DeRuiter MC. Intrauterine exposure to maternal atherosclerotic risk factors increases the susceptibility to atherosclerosis in adult life. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2228-2235.
139. Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJP. Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *BMJ* 2001;322:949-953.
140. Risnes KR, Nilsen TI, Romundstad PR, Vatten LJ. Head size at birth and long-term mortality from coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 2009; 38: 955-962.

141. Kramer MS, Kahn SR, Dahhou M, Otvos J, Genest J, Platt RW, Evans RW. Maternal lipids and small for gestational age birth at term. *J Pediatr* 2013;163:983-988.
142. Tuya C, Mutch WJ, Haggarty P, Campbell DM, Cumming A, Kelly K, Broom I, McNeill G. The influence of birth weight and genetic factors on lipid levels: a study in adult twins. *British J Nutr* 2006;95:504-510.
143. Toy H, Camuzcuoglu H, Celik H, Erel O, Aksoy N. Assessment of serum paraoxonase and arylesterase activities in early pregnancy failure. *Swiss Med Wkly* 2009;139:76-81.
144. Aviram M. Introduction to the serial review on paraoxonases, oxidative stress, and cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1301-1303.
145. Uzun H, Benian A, Madazli R, Topcuoglu MA, Aydin S, Al-bayrak M. Circulating oxidized low-density lipoprotein and paraoxonase activity in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2005;60:195-200.
146. Roy AC, Loke DF, Saha N, Viegas OA, Tay JS, Ratnam SS. Interrelationships of serum paraoxonase, serum lipids and apolipoproteins in normal pregnancy. A longitudinal study. *Gynecol Obstet Invest* 1994;38:10-13.
147. Carpintero A, Sanchez-Martin MM, Cabezas-Delamare MJ, Cabezas JA. Variation in serum arylesterase, β -glucuronidase, cathepsin L and plasminogen activators during pregnancy. *Clin Chim Acta* 1996;255:153-164.
148. Boemi M, Sirolla C, Cenerelli S, Fumelli P, James Rw. Smoking is associated with reduced serum levels of the antioxidant enzyme, paraoxonase, in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 2004;21:423-427.
149. Aydin S, Sahin I, Aydin S, Aksoy A, Citil C. The past and present of paraoxonase enzyme: its role in the cardiovascular system and some diseases. *J Med Biochem* 2012;31:161-173.
150. Korpacka MK, Patryn E, Hotowy K, Czapinska E, Majda J, Kustrzeba-Wojcicka I, Noczynska A, Gamian A. Paraoxonase-1 activity in overweight and obese children and adolescents: association with obesity-related inflammation and oxidative stress. *Adv Clin Exp Med* 2013;22:229-236.

151. Chappell LC, Seed PT, Briley A, Kelly FJ, Hunt BJ, Charnock-Jones DS. A longitudinal study of biochemical variables in woman at risk of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2002;187:127-136.
152. Lee BE, Hong YC, LeE KH. Influence of maternal serum levels of vitamin C and E during the second trimester on birth weight and length. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:1365-1371.
153. Rao S, Yajnik CS, Kanade A. Intake of micronutrient-rich foods in rural Indian mothers is associated with the size of their babies at birth. Pune maternal nutrition study. *J Nutr* 2001;131:1217-1224.

BIOGRAFIJA

Daniela Ardalić rođena je 1967.godine u Splitu, Republika Hrvatska. Diplomirala je 1992.godine na Farmaceutsko-biohemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Odsek medicinske biohemije i stekla zvanje dipl.inž.mediceinske biohemije.

Pripravnički staž završila je u Institutu za medicinsku biohemiju Kliničkog centra Srbije.

Specijalizaciju iz medicinske biohemije završila je 2001.godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od 1996 -2003.godine bila je zaposlena u Domu zdravlja Novi Beograd na poslovima medicinskog biohemičara, specijaliste medicinske biohemije i načelnika kliničko-biohemijske laboratorije.

Od 2003. godine zaposlena je u kliničko-biohemijskoj laboratoriji GAK "Narodni Front". Od 2007 – 2013. bila je načelnik Odeljenja laboratorijske dijagnostike GAK "Narodni Front".

Doktorske akademske studije iz Medicinske biohemije upisala je 2007.godine.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Даниела Ардалић _____

Број уписа 17/07 _____

Изјављујем

Да је докторска дисертација под насловом

“Показатељи оксидативног стреса, липидни профил и статус ензима параоксоназа 1 током трудноће без компликација и након порођаја“

- Резултат сопственог истраживачког рада,
- Да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- Да су резултати коректно наведени и
- Да нисам кршио / ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Београду, 21.08.2014. _____

Потпис докторанда

Daniela Adalić

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Даниела Ардалић

Број уписа 17/07

Студијски програм Докторске академске студије из медицинске биохемије

Наслов рада “Показатељи оксидативног стреса, липидни профил и статус ензима параоксоназа 1 током трудноће без компликација и након порођаја“

Ментор Др Славица Спасић, редовни професор у пензији, Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет

Потписани Даниела Ардалић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао / ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

У Београду, 21.08.2014.

Потпис докторанда

Daniela Arđalić

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

“Показатељи оксидативног стреса, липидни профил и статус ензима параоксоназа 1 током трудноће без компликација и након порођаја“ која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао / ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

У Београду, 21.08.2014.

Потпис докторанда

Đaniela Medović

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштење дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.