



**DRŽAVNI UNIVERZITET U NOVOM PAZARU
DEPARTMAN ZA BIOMEDICINSKE NAUKE
STUDIJSKI PROGRAM BIOLOGIJA**

TANJA NOVAKOVIĆ

**OKSIDACIONI STATUS AMNIONSKE TEČNOSTI I
FETALNIH ĆELIJA KOD TRUDNICA SA
HIPOTIREOIDIZMOM I TROMBOFILIJOM**

Novi Pazar, 2018.



**DRŽAVNI UNIVERZITET U NOVOM PAZARU
DEPARTMAN ZA BIOMEDICINSKE NAUKE
STUDIJSKI PROGRAM BIOLOGIJA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**OKSIDACIONI STATUS AMNIONSKE TEČNOSTI I
FETALNIH ĆELIJA KOD TRUDNICA SA
HIPOTIREOIDIZMOM I TROMBOFILIJOM**

Mentori:


Prof. dr Nataša Đorđević

Prof. dr Zana Dolićanin

Kandidat:

Tanja Novaković

Novi Pazar, 2018.

	DRŽAVNI UNIVERZITET U NOVOM PAZARU DEPARTMAN ZA BIOMEDICINSKE NAUKE 36000 Novi Pazar, Vuka Karadžića bb	Datum i broj
	KLJUČNA DOKUMENTACIJA	

Redni broj, RBR:																
Identifikacioni broj, IBR:																
Tip dokumentacije, TD:	Monografska dokumentacija															
Tip zapisa, TZ:	Doktorska disertacija															
Vrsta rada, VR:	Doktorska disertacija															
Autor, AU:	Tanja Novaković															
Mentori, MN:	Prof. dr Nataša Đorđević i Prof. dr Zana Dolićanin															
Naslov rada, NR:	Oksidacioni status amnijske tečnosti i fetalnih ćelija kod trudnica sa hipotireoidizmom i trombofilijom															
Jezik publikacije, JP:	Srpski jezik															
Jezik izvoda, JI:	Srpski jezik															
Zemlja publikovanja, ZP:	Srbija															
Uže geografsko područje, UGP:	Novi Pazar															
Godina, GO:	2018. godina															
Izdavač, IZ:	Državni univerzitet u Novom Pazaru															
Mesto i adresa, MA:	Novi Pazar, Vuka Karadžića bb.															
Fizički opis rada, FO: (poglavlja/strana/citata/tabela/slika/grafika/prilog)	Strana 137, Poglavlja 7, Šema 4, Tabela 15, Grafikona 24, Slika 3, Citata 351.															
Naučna oblast, NO:	Biomedicinske nauke															
Predmetna odrednica/ključne reči, PO:	Subklinički hipotireoidizam, trombofilija, oksidacioni stres, amnijska tečnost, ćelije amnijske tečnosti.															
UDK:																
Čuva se, ČU:	Arhiva															
Važna napomena, VN:																
Izvod, IZ:	Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju prve dokaze o prooksidacionim efektima majčinog subkliničkog hipotireoidizma i trombofilije na fetus i doprinose boljem razumevanju zdravstvenog i metaboličkog stanja fetusa u prvom tromesečju trudnoće. Takođe ukazuju na povezanost biomarkera oksidacionog stresa i oksidacionih oštećenja sa mogućim negativnim ishodom trudnoće, što je od velikog značaja za buduća istraživanja primene profilaktičke antioksidacione terapije i u menadžmentu trudnoće sa subkliničkim hipotireoidizmom i trombofilijom.															
Datum prihvatanja teme, DP:																
Datum odbrane, DO:																
Članovi komisije, KO:	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 20%;">Predsednik:</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Član, mentor:</td> <td>Prof. dr Nataša Đorđević</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Član, mentor:</td> <td>Prof. dr Zana Dolićanin</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Član:</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Član:</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	Predsednik:			Član, mentor:	Prof. dr Nataša Đorđević		Član, mentor:	Prof. dr Zana Dolićanin		Član:			Član:		
Predsednik:																
Član, mentor:	Prof. dr Nataša Đorđević															
Član, mentor:	Prof. dr Zana Dolićanin															
Član:																
Član:																

Posuećujem ocu

PREDGOVOR

Očuvanje i unapređenje reproduktivnog zdravlja žena i uspešnog završetka trudnoće su prioriteti svakog savremenog društva. Subklinički hipotireoidizam i trombofilija u trudnoći praćeni su visokim stepenom morbiditeta i mortaliteta majke i fetusa. Oksidacioni status, kao osnova za razvoj brojnih patofizioloških stanja, do sada nije ispitan u amnionskoj tečnosti i ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trombofilijom u toku prvog tromesečja trudnoće.

Istraživanja sprovedena u okviru ove doktorske disertacije baziraju se na činjenici da amnionska tečnost i ćelije amnionske tečnosti odražavaju metabolički i zdravstveni status fetusa, tako da dobijeni rezultati pružaju dragocene informacije o trudnoći i mogu biti važan biomarker u dijagnostici i menadžmentu trudnoće sa subkliničkim hipotireoidizmom i trombofilijom.

Neizmernu zahvalnost dugujem mentorici, dr Nataši Đorđević, vanrednom profesoru Državnog Univerziteta u Novom Pazaru, na izuzetnoj pomoći i podršci u toku izrade rada. Hvala na razumevanju, podršci i korisnim savetima tokom izrade ove doktorske disertacije.

Poštovanje i zahvalnost dugujem mentorici, dr Zani Dolićanin, vanrednom profesoru Državnog Univerziteta u Novom Pazaru, na razumevanju i podršci za ovaj naučni rad.

Zahvaljujem se studentima doktorskih studija biologije, Mairi Leković, Nerkezi Dračković i Nihadu Granici na pomoći u realizaciji ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se mojoj majci na razumevanju, podršci i strpljenju.

Posebno se zahvaljujem mojoj Jovani i suprugu, koji su me bodrili i bili uz mene i u najtežim trenucima.

Tanja Novaković

SKRAĆENICE

Anti TG Ab - (*Antithyroglobulin antibodies*) antitireoglobulinska antitela

Anti TPO - antiperoksidazna antitela

AOS - (*Antioxidative Defense System*) - antioksidacioni zaštitni sistem

APS - antifosfolipidni sindrom

AT III - antitrombin tri

cAMP - ciklični adenzin monofosfat

CAT - katalaza

cNOS - konstitutivna sintaza azot monoksida

CNS - centralni nervni sistem

CRP - C-reaktivni protein

Cyt-B - citohalazin B

DTNB - 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoična kiselina)

DVT - duboka venska tromboza

EDTA - etilendiaminotetrasirćetna kiselina

eNOS - endotelna sintaza azot monoksida

FMU - (*Fetus Mortus in Utero*) intrauterina smrt ploda

FT3 - slobodni trijodtironin

FT4 - slobodni tiroksin

g - gram

GR - glutation reduktaza

GSH - redukovani glutation

GSH-Px - glutation peroksidaza

GSSG - oksidovani glutation

GST - glutation-S- transferaza

H⁺ - vodonikov jon

H₂O₂ - vodonik peroksid

hCG - humani horionski gonadotropin

HCl - hlorovodonična kiselina

HRPO - horseradish peroksidaza

iNOS - inducibilna sintaza azot monoksida

iRNK - informaciona ribonukleinska kiselina

IUGR - intrauterini zastoj rasta
K₂CO₃ - kalijum karbonat
KOH - kalijum hidroksid
K-PO₄ - kalijum fosfat
LOOH - lipidni hidroperoksid
LPO - lipidni peroksidi
MCH - prosečna količina hemoglobina u eritrocitu
MCHC - prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitu
MCV - zapremina eritrocita
MDA - malonilaldehid
MTHFR - metilentetrahidrofolat reduktaza
Na₂CO₃ - natrijum karbonat
Na₂HPO₄ - natrijum hidrogen fosfat
NaCl - natrijum hlorid
NAD(H) - nikotinamid adenin dinukleotid (redukovana forma)
NAD⁺ - nikotinamid adenine dinukleotid
NADP(H) - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (redukovana forma)
NaOH - natrijum hidroksid
NBT - nitroblu-tetrazolijum
nNOS - neuralna sintaza azot monoksida
NO - azot monoksid
NO₂⁻ - nitriti
NOOO⁻ - peroksinitrit
O₂⁻ - superoksid anjon radikal
PAI-1 - plazminogen aktivator inhibitora 1
PAI-2 - plazminogen aktivator inhibitora 2
PCA - perhlorna kiselina
PGI₂ - prostaciklin
PRS - (*Phenol Red Solution*) - fenol crveno
RNS - (*Reactive Nitrogen Species*) - reaktivne vrste azota
ROS - (*Reactive Oxygen Species*) - reaktivne vrste kiseonika
RT3 - reverzni trijodtironin
s - sekunda

SH - sulfhidrilne grupe

SOD - superoksid dismutaza

SOD - superoksid dismutaza

T3 - trijod-tironin

T4 - tiroksin

TBA - (*Thyroxine-binding albumin*) tiroksin-vezujući albumin

TBA - tiobarbituratna kiselina

TBG - (*Thyroxine binding globulin*) tiroksin-vezujući globulin

TCA - trihlorsirćetna kiselina

TF - tkivni faktor (factor III; tkivni tromboplastin)

Tg - tireoglobulin

TRH - (*Thyrotropin releasing hormone*) tireotropin oslobađajući hormon

Tris - *Tris*(hidroksimetil)aminoetan

TsAb - tireostimulišuća antitela

TSH - tireostimulišući hormon

UPC - uteroplacentna cirkulacija

VTE - venski tromboembolizam

REZIME

Subklinički hipotireoidizam i trombofilija u trudnoći praćeni su visokim stepenom prenatalnog morbiditeta i mortaliteta fetusa. S obzirom da amnionska tečnost i ćelije amnionske tečnosti odražavaju zdravstveni i metabolički status fetusa, određivanje biomarkera oksidacionog stresa u amnionskoj tečnosti i ćelijama amnionske tečnosti može pružiti važne informacije o zdravlju, razvoju i sazrevanju fetusa tokom trudnoće. Cilj istraživanja ove doktorske disertacije zasniva se na ispitivanju efekata majčinog subkliničkog hipotireoidizma i trombofilije na redoks homeostazu amnionske tečnosti i ćelija amnionske tečnosti u prvom tromesečju trudnoće. Studijom su obuhvaćene tri grupe trudnica gestacijske starosti od 16 do 18 nedelja: 32 zdrave trudnice, 23 trudnice sa subkliničkim hipotireoidizmom i 23 trudnice sa naslednom trombofilijom. U amnionskoj tečnosti i ćelijama amnionske tečnosti određivane su koncentracije sledećih parametara oksidaciono-antioksidacionog sistema: superoksid anjon radikal (O_2^-), vodonik peroksid (H_2O_2), azot monoksid (NO), peroksinitrit ($ONOO^-$), lipidni peroksidi (LPO), redukovani glutation (GSH), oksidovani glutation (GSSG) i frekvencija mikronukleusa. Rezultati ove studije pokazuju da su koncentracije O_2^- i NO značajno veće, dok je koncentracija H_2O_2 značajno manja u amnionskoj tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom. Negativna korelacija pokazana je između koncentracije O_2^- u amnionskoj tečnosti sa *Apgar scor*-om i telesnom težinom novorođenčadi. U ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom značajno su veće koncentracije biomarkera oksidacionog stresa (O_2^- , NO i $ONOO^-$) i oksidacionog oštećenja (LPO i frekvencija mikronukleusa), dok su koncentracije H_2O_2 i GSSG manje u poređenju sa zdravim trudnicama. Takođe je pokazano da su biomarkeri oksidacionog stresa u pozitivnoj korelaciji sa LPO i frekvencom mikronukleusa u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom. Kod trudnica sa trombofilijom, rezultati ispitivanja pokazuju da su koncentracije O_2^- , NO, $ONOO^-$ i LPO značajno povećane, dok su koncentracije H_2O_2 , GSH i GSSG značajno smanjene u ćelijama amnionske tečnosti. U amnionskoj tečnosti trudnica sa trombofilijom pokazana je povećana koncentracija GSSG. Majčin subklinički hipotireoidizam indukuje oksidacioni stres i oksidaciona oštećenja lipida i DNK molekula u amnionskoj tečnosti i fetalnim ćelijama u toku prvog tromesečja trudnoće. Trombofilija majke deluje prooksidaciono i indukuje povećanje biomarkera oksidacionog stresa i oksidacionog oštećenja lipida u fetalnim ćelijama. Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju prve dokaze o prooksidacionim efektima majčinog subkliničkog hipotireoidizma i trombofilije na fetus i doprinose boljem razumevanju zdravstvenog i metaboličkog stanja fetusa u prvom tromesečju trudnoće. Takođe ukazuju na povezanost biomarkera oksidacionog stresa i oksidacionih oštećenja sa mogućim negativnim ishodom trudnoće, što je od velikog značaja za buduća istraživanja primene profilaktičke antioksidacione terapije i u menadžmentu trudnoće sa subkliničkim hipotireoidizmom i trombofilijom.

ABSTRACT

Subclinical hypothyroidism and thrombophilia in pregnancy are followed by a high prenatal morbidity and mortality. Considering that amniotic fluid and amniotic fluid cells reflect fetal health and status of metabolism, the determination of oxidative stress biomarkers in amniotic fluid and amniotic fluid cells can provide important information about health, development and mature of fetus during pregnancy. The aim of this doctoral thesis is to test the effects of maternal subclinical hypothyroidism and thrombophilia on the redox homeostasis of amniotic fluid and amniotic fluid cells in the first trimester of pregnancy. The study included three groups of pregnant women gestational age from 16 to 18 weeks: 32 healthy pregnant women, 23 pregnant women with subclinical hypothyroidism and 23 pregnant women with hereditary thrombophilia. In amniotic fluid and amniotic fluid cells, concentrations of the following parameters of the oxidative-antioxidative system were determined: superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), nitric oxide (NO), peroxynitrite ($ONOO^-$), lipid peroxides (LPO), reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), and micronucleus frequency. The results of this study show that the concentrations of $O_2^{\cdot-}$ and NO are significantly higher, while the concentration of H_2O_2 is significantly lower in the amniotic fluid of pregnant women with subclinical hypothyroidism. Negative correlation was shown between the concentration of $O_2^{\cdot-}$ in amniotic fluid with *Apgar score* values and body weight of newborns. Significantly higher concentrations of oxidative stress biomarkers ($O_2^{\cdot-}$, NO and $ONOO^-$) and oxidative damage (LPO and micronucleus frequency), as well as significantly lower concentrations of H_2O_2 and GSSG are shown in amniotic fluids of pregnant women with subclinical hypothyroidism. It has also been shown that oxidative stress biomarkers positively correlated with LPO and micronucleus frequency in amniotic fluid cells of pregnant women with subclinical hypothyroidism. The results of this study show that the concentrations of $O_2^{\cdot-}$, NO, $ONOO^-$ and LPO are significantly increased, while concentrations of H_2O_2 , GSH and GSSG are significantly lower in amniotic fluid cells of pregnant women with thrombophilia. In the amniotic fluid of pregnant women with thrombophilia, an increased concentration of GSSG has been shown. Maternal subclinical hypothyroidism induces oxidative stress and oxidative damage of lipids and DNA molecules in amniotic fluid and fetal cells during the first trimester of pregnancy. Thrombophilia of the mother acts prooxidatively and induces increased of oxidative stress biomarkers and oxidative damage of lipids in the fetal cells. The results of the research within this doctoral thesis are the first evidence of the prooxidative effects of maternal subclinical hypothyroidism and thrombophilia on the fetus and contribute to a better understanding of the health and metabolic condition of the fetus in the first trimester of pregnancy. They also point to the correlation of biomarkers of oxidative stress and oxidative damage with a possible negative pregnancy outcome, which is of great importance for future researchs in the prophylactic antioxidant therapy application and in the management of pregnancy with subclinical hypothyroidism and thrombophilia.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. AMNIONSKA TEČNOST	1
1.1.1. Sastav amnijske tečnosti.....	2
1.2. TIREOIDNA ŽLEZDA	4
1.2.1. Anatomske i funkcionalne karakteristike tireoidne žlezde	4
1.2.2. Hormoni štitaste žlezde i njihova uloga	5
1.2.3. Funkcija tireoidne žlezde u trudnoći	8
1.3. Hipotireoidizam.....	11
1.3.1. Hipotireoidizam u trudnoći	12
1.4. HEMOSTAZA	15
1.4.1. Poremećaji koagulacije krvi.....	19
1.4.1.1. Tromboze	19
1.4.1.2. Trombofilija	19
1.4.2. Trombofilija u trudnoći	22
1.4.2.1. Genetski predisponirane trombofilije.....	24
1.4.2.2. Stečene trombofilije	29
1.5. OKSIDACIONI STRES.....	30
1.5.1. Reaktivne vrste kiseonika (ROS).....	32
1.5.1.1. Superoksid anjon radikal (O_2^-)	33
1.5.1.2. Vodonik peroksid (H_2O_2).....	34
1.5.1.3. Hidroksil radikal (OH^\cdot)	35
1.5.2. Azot monoksid i reaktivne vrste azota (RNS).....	36
1.5.2.1. Azot monoksid (NO).....	36
1.5.2.2. Peroksinitrit ($ONOO^-$).....	39
1.5.3. Lipidni peroksidi (LPO).....	41
1.5.4. Oksidaciona oštećenja DNK molekula	42
1.6. ANTIOKSIDACIONI ZAŠTITNI SISTEM (AOS)	45
1.6.1. Glutation (GSH).....	47
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	50
3. MATERIJAL I METODE	52
3.1. Pacijenti.....	52
3.2. Amniocenteza, izolovanje i kultivacija ćelija amnijske tečnosti.....	54
3.3. Micronucleus test u ćelijama amnijske tečnosti.....	55
3.4. Ekstrakcija iz amnijske tečnosti i ćelija amnijske tečnosti.....	56
3.4.1. Ekstrakcija uzoraka za određivanje koncentracija ROS i RNS	57
3.4.2. Ekstrakcija uzoraka za određivanje koncentracija LPO.....	58
3.4.3. Ekstrakcija uzoraka za određivanje koncentracija GSH i GSSG.....	59

3. 5. ANALITIČKE METODE	60
3.5.1. Određivanje koncentracija ROS i RNS.....	60
3.5.1.1. Određivanje koncentracije O_2^-	61
3.5.1.2. Određivanje koncentracije H_2O_2	61
3.5.1.3. Određivanje koncentracije NO_2^-	63
3.5.1.4. Određivanje koncentracije $ONOO^-$	65
3.5.2. Određivanje koncentracije LPO	65
3.5.3. Određivanje koncentracije GSH	66
3.5.4. Određivanje koncentracije GSSG	68
3.6. STATISTIČKA OBRADA I PRIKAZ REZULTATA.....	70
4. REZULTATI	71
4.1. Kliničke i hematološke karakteristike ispitivanih trudnica	71
4.2. Distribucija leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.....	73
4.2. Koncentracija ROS i RNS u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.....	80
4.3. Koncentracija GSH i GSSG u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.....	84
4.4. Koncentracija LPO u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.....	85
4.5. Koncentracija ROS i RNS u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.....	87
4.6. Koncentracija GSH i GSSG u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.....	90
4.7. Koncentracija LPO i frekvencija mikronukleusa u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom	91
4.8. Korelacijski odnosi koncentracije LPO i frekvencije mikronukleusa kod trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom	93
5. DISKUSIJA	95
5.1. Efekti majčinog subkliničkog hipotireoidizma na biomarkere oksidacionog stresa amnionske tečnosti i ćelija amnionske tečnosti	96
5.2. Efekti majčine trombofilije na biomarkere oksidacionog stresa amnionske tečnosti i ćelija amnionske tečnosti	103
6. ZAKLJUČCI	110
LITERATURA	113

Slike:

Slika 1. Binuklearne ćelije sa i bez mikronukleusa 44

Slika 2. Efekti majčinog subkliničkog hipotireoidizma na oksidacioni status amnionske tečnosti i ćelija amnionske tečnosti. 102

Slika 3. Efekti majčine trombofilije na oksidacioni status amnionske tečnosti i ćelija amnionske tečnosti. 108

Šeme:

Šema 1. Sinteza hormona tireoide žlezde. 6

Šema 2. Mehanizam koagulacije (Margetic, 2012). 17

Šema 3. Fibrinolitički put (Margetic, 2012). 18

Tabele:

Tabela 1. Reaktivne vrste kiseonika (Halliwell i Whiteman, 2004). 32

Tabela 2. Reaktivne vrste azota (Halliwell i Whiteman, 2004). 38

Tabela 3. Kliničke karakteristike zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom. 71

Tabela 4. Hematološke karakteristike zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom. 72

Tabela 5. Broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom. 73

Tabela 6. Broj pojedinih vrsta granulocita u perifernoj krvi zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom. 74

Tabela 7. Procentualna zastupljenost pojedinih vrsta granulocita u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom. 76

Tabela 8. Broj pojedinih vrsta agranulocita u perifernoj krvi zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom. 77

Tabela 9. Procentualna zastupljenost pojedinih vrsta agranulocita u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom. 79

Tabela 10. Koncentracija ROS i RNS u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom. 81

Tabela 11. Koncentracija redukovanog (GSH) i oksidovanog glutaciona (GSSG) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom. 84

Tabela 12. Koncentracija lipidnih peroksida (LPO) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.....	86
Tabela 13. Koncentracija ROS i RNS u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.	87
Tabela 14. Koncentracija redukovanog (GSH) i oksidovanog glutationa (GSSG) u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.	90
Tabela 15. Koncentracija lipidnih peroksida (LPO) i frekvencija mikronukleusa u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.	92

Grafikoni:

Grafikon 1. Broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.	74
Grafikon 2. Broj pojedinih vrsta granulocita u perifernoj krvi zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.	75
Grafikon 3. Broj pojedinih vrsta granulocita u perifernoj krvi zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.	75
Grafikon 4. Procentualna zastupljenost pojedinih vrsta granulocita u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.	76
Grafikon 5. Procentualna zastupljenost pojedinih vrsta granulocita u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.	77
Grafikon 6. Broj pojedinih vrsta agranulocita u perifernoj krvi zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.	78
Grafikon 7. Broj pojedinih vrsta agranulocita u perifernoj krvi zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.	78
Grafikon 8. Procentualna zastupljenost pojedinih vrsta agranulocita u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.	79
Grafikon 9. Procentualna zastupljenost pojedinih vrsta agranulocita u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.	80
Grafikon 10. Koncentracije superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) i vodonik peroksida (H_2O_2) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.	81
Grafikon 11. Koncentracije superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) i vodonik peroksida (H_2O_2) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.	82
Grafikon 12. Koncentracije azot monoksida (NO) i peroksinitrita ($ONOO^{\cdot}$) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.	83
Grafikon 13. Koncentracije azot monoksida (NO) i peroksinitrita ($ONOO^{\cdot}$) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.	83

Grafikon 14. Koncentracije redukovanog (GSH) i oksidovanog glutationa (GSSG) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.	84
Grafikon 15. Koncentracije redukovanog (GSH) i oksidovanog glutationa (GSSG) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.	85
Grafikon 16. Koncentracije lipidnih peroksida (LPO) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.	86
Grafikon 17. Koncentracije superoksid anjon radikala (O_2^-) i vodonik peroksida (H_2O_2) u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.	88
Grafikon 18. Koncentracije superoksid anjon radikala (O_2^-) i vodonik peroksida (H_2O_2) u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.	88
Grafikon 19. Koncentracije azot monoksida (NO) i peroksinitrita ($ONOO^-$) u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.	89
Grafikon 20. Koncentracije azot monoksida (NO) i peroksinitrita ($ONOO^-$) u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.	89
Grafikon 21. Koncentracije redukovanog (GSH) i oksidovanog glutationa (GSSG) u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.	90
Grafikon 22. Koncentracije redukovanog (GSH) i oksidovanog glutationa (GSSG) u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.	91
Grafikon 23. Koncentracija lipidnih peroksida (LPO) i frekvenca mikronukleusa u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.	92
Grafikon 24. Koncentracija lipidnih peroksida (LPO) i frekvenca mikronukleusa u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.	93

1. UVOD

Trudnoća je stanje fizioloških i metaboličkih promena u organizmu žene u cilju prilagođavanja potrebama rasta i razvoja fetusa. Tokom intrauterinog života, fetus je okružen amnionskom tečnošću, koja mu obezbeđuje mehaničku zaštitu i kretanje unutar materice, održavanje konstantne temperature, razmenu materija, pomoć u rastu, razvoju i sazrevanju, štiti ga od infekcija i prevremenih kontrakcija uterusa. Sastav amnionske tečnosti nije konstantan i menja se u zavisnosti od metaboličkog i zdravstvenog stanja, kako fetusa, tako i majke. S obzirom da sastav amnionske tečnosti odražava metabolički i zdravstveni status majke i fetusa, on daje dragocene informacije o trudnoći i može biti važan dijagnostički i prognostički biomarker (King, 2000; Butte, 2000; Yu, 2015).

1.1. AMNIONSKA TEČNOST

Implantacija oplođene jajne ćelije u zid materice praćena je serijom kontinuiranih fizioloških i metaboličkih promena u organizmu žene, a u cilju prilagođavanja potrebama rasta i razvoja fetusa, pripremi za porođaj i laktaciju (King, 2000; Butte, 2000). U prvim nedeljama trudnoće, nakon koncepcije, placenta je već formirana i počinje da luči hormone koji utiču na metabolizam svih hranljivih materija. 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 (King, 2000; Butte, 2000; Mshelia i Kullima, 2012). Kod trudnica se dešavaju manje ili veće promene svih žlezda sa unutrašnjim lučenjem. Hipofiza se uvećava, kao i lučenje hipofiznih hormona. Štitasta žlezda se takođe povećava, zahvaljujući hiperplaziji žlezdanog epitela i pojačanoj vaskularizaciji. Tireoidni status trudnice nije značajno

izmenjen i pored povećanja količine tiroksin-vezujućeg globulina i slobodnog trijod-tironina (FT3) i tiroksina (FT4), što je rezultat delovanja estrogena (*Plećaš i sar.*, 2006). Kako estrogeni odražavaju konstantnost tireoidnog statusa, između sedmog i osmog dana embrionalnog razvicia počinje stvaranje amnionske šupljine, koja je prema trofoblastu obložena amnioblastima, a na drugoj strani ćelijama ektoderma.

Unutrašnjost amnionske šupljine, uporedo sa njenim formiranjem, ispunjava se amnionskom tečnošću. Amnionska tečnost (plodova voda) se stvara iz plazme majke ekstraplacentalnom sekrecijom i transudacijom kroz amnionske opne i pupčanik. Podjednako i fetus doprinosi stvaranju amnionske tečnosti putem kože, traheobronhijalnog stabla i fetalnom mikcijom. Amnionska tečnost je sivo-beličasta, relativno bistra tečnost, slabo alkalne ili neutralne reakcije. U prvoj polovini trudnoće, amnionska tečnost ima skoro isti elektrolitski sastav kao majčina plazma. U drugoj polovini trudnoće, osmolarnost se progresivno smanjuje zbog velike količine fetalnog hipotoničnog urina koji ulazi u sastav amnionske tečnosti (*Dinulović*, 1996). Promena u osmolarnosti amnionske tečnosti paralelno je praćena smanjenjem koncentracije jona natrijuma (Na^+) i hlorida (Cl^-), dok vrednosti koncentracije kalijuma (K^+) ostaju nepromenjene tokom cele trudnoće (*Gillibrand*, 1969).

Krajem drugog i početkom trećeg meseca trudnoće, kada počinje prva ekskrecija fetalnog urina, povećava se količina amnionske tečnosti i iznosi između 45 ml i 80 ml (*Monie*, 1953). Najznačajnu ulogu u prometu vode i stvaranju amnionske tečnosti u prvoj polovini trudnoće ima koža. Sa razvojem trudnoće, udeo urina u stvaranju amnionske tečnosti se progresivno povećava, dok epitelijalna sekrecija i transudacija postaju zanemarljive. Resorpcija amnionske tečnosti velikim delom se vrši fetalnim gutanjem, tako da se u drugoj polovini trudnoće, na ovaj način eliminiše od 200 ml do 500 ml amnionske tečnosti dnevno (*Lotgering i Wallenburg*, 1986).

1.1.1. SASTAV AMNIONSKE TEČNOSTI

Sastav amnionske tečnosti je različit u toku trudnoće i zavisi od gestacijske starosti. Urinarni sastojci amnionske tečnosti, poreklom od fetusa, obuhvataju ureu,

kreatinin i mokraćnu kiselinu. Koncentracija uree i kreatinina se povećava tokom trudnoće, dok se koncentracija Na^+ smanjuje. Amnionska tečnost sadrži određene količine albumina i globulina koji potiču iz plazme majke, ploda i samog amnionskog omotača. U amnionskoj tečnosti se nalaze i iste amino-kiseline kao i u fetalnoj plazmi. Određivanje amino-kiselina *cystina* i *glycina* je od velikog značaja u antenatalnoj dijagnozi izvesnog broja metaboličkih poremećaja. U amnionskoj tečnosti se nalaze i glukoza, piruvati, laktati, kao i lipidi, čija koncentracija iznosi oko 3,33 mmol/L, od čega 0,83 mmol/L pripada fosfolipidima i to lecitinu (*Underwood i sar., 2005*). Koncentracija glukoze u amnionskoj tečnosti se tokom trudnoće smanjuje, izuzev kod trudnica sa *dijabetes mellitus*-om, kod kojih je koncentracija glukoze povećana. Amnionska tečnost sadrži imunoglobuline čije su koncentracije manje nego u serumu trudnice. Dominantan imunoglobulin u amnionskoj tečnosti je IgG i vodi poreklo iz majčinog seruma. Od imunoglobulina, u amnionskoj tečnosti prisutan je i IgA, koga produkuje fetus (*Harman, 2008*).

Amnionska tečnost sadrži i hormone kao što su: humani horionski gonadotropin (hCG), progesteron, estrogeni, kortizol, testosteron, dehidroepiandrosterone i njihove metabolite (pregnandiol, pregnantriol, ketosteroidi i oksosteroidi). Hormoni u amnionskoj tečnosti mogu da potiču od majke i/ili fetusa, u zavisnosti od prirode samog hormona. U amnionskoj tečnosti se mogu naći i tireostimulišući hormon (TSH), hormon rasta, melanocitostimulirajući hormon, prostaglandini, kateholamini, opioidne supstance, koje učestvuju u sekreciji nekih peptidnih hormona posteljice i renin, koji ima ulogu u regulaciji homeostaze Na^+ (*Underwood i sar., 2005; Harman, 2008*).

U periodu od 16. do 18. nedelje graviditeta, u amnionskoj tečnosti se pojavljuju ćelije amnionske tečnosti – amniocite. Ćelije amnionske tečnosti su heterogena populacija multipotentnih matičnih ćelija, izvedenih iz amnionske membrane, kože, digestivnog trakta, respiratornog trakta i uretre fetusa. Izoluju se iz amnionske tečnosti amniocentezom i koriste se za prenatalno dijagnostikovanje hromozomskih i genetskih aberacija. Pošto ćelije amnionske tečnosti potiču iz tkiva razvijajućeg embriona, odražavaju fetalno sazrevanje i metabolizam (*Yu, 2015*).

1.2. TIREOIDNA ŽLEZDA

1.2.1. ANATOMSKE I FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE TIREOIDNE ŽLEZDE

Tireoidna žlezda (*glandula thyreoidea*) ima značajnu ulogu u ukupnom funkcionisanju organizma, a posebno u razvoju brojnih tkiva i organa u toku intrauterinog života. To je prva žlezda sa unutrašnjim lučenjem koja nastaje tokom embrionalnog razvića. Embrionalni razvoj štitaste žlezde počinje pre razvoja ostalih endokrinih žlezda, odnosno oko 24. dana gestacije. Začetak folikuluskog epitela štitaste žlezde je tiroglosni kanal koji se razvija kao evaginacija endoderma primitivne bukofaringealne duplje. Uporedo sa razvojem srca, izdanak štitaste žlezde se postepeno spušta duž traheje i definitivnu lokalizaciju, u prednjem regionu vrata, dostiže oko 7. nedelje gestacije (*Fancy i Gallagher, 2010*).

Tireoidna žlezda je neparna žlezda oblika štita. Smeštena je u vratnom regionu, neposredno ispod grkljanja. Pričvršćena je za tireoidnu hrskavicu grkljanja i sastoji se od dva režnja, koji su međusobno povezani suženjem, odnosno istmusom (*isthmus*). Svaki režanj je podeljen na lobuse, koji sadrže od dvadeset do četrdeset folikula, tako da kod odrasle osobe njihov broj iznosi oko tri miliona. Režnjevi štitaste žlezde su konusnog oblika, ukupne zapremine od 15 g do 30 g. Štitasta žlezda je veoma dobro prokrvljena i ima relativan protok krvi oko 50 ml/minuti. Arterijska krv dospeva do tireoidne žlezde donjim i gornjim tireoidnim arterijama (*aa. thyreoidae inferiors et aa. thyreoidae superiors*). Gornje tireoidne vene se direktno ili indirektno (preko *truncus thyreolinguofacialis-a*) ulivaju u venu *jugularis internu* neposredno ispred i lateralno od gornje tireoidne arterije. Lateralne ili srednje vene polaze od anterolateralne ivice lobusa i ulivaju se direktno u jugularnu venu. Donje tireoidne vene polaze sa donjeg pola i istmusa preko nekoliko stabala, često formirajući splet. Ulivaju se u unutrašnju jugularnu venu, a ponekad, kada se spajaju u zajedničko stablo (*v. thyroidea impar*), u venu anonimu. Limfotok štitaste žlezde je usmeren ka dubokim limfnim žlezdama vrata (*Fancy i Gallagher, 2010*).

Folikul, kao osnovna funkcionalna jedinica tireoidne žlezde, formira se oko 10. nedelje gestacije i sadrži dva tipa epitelnih ćelija:

- folikularne (glavne),
- parafolikularne (C ćelije, svetle ćelije).

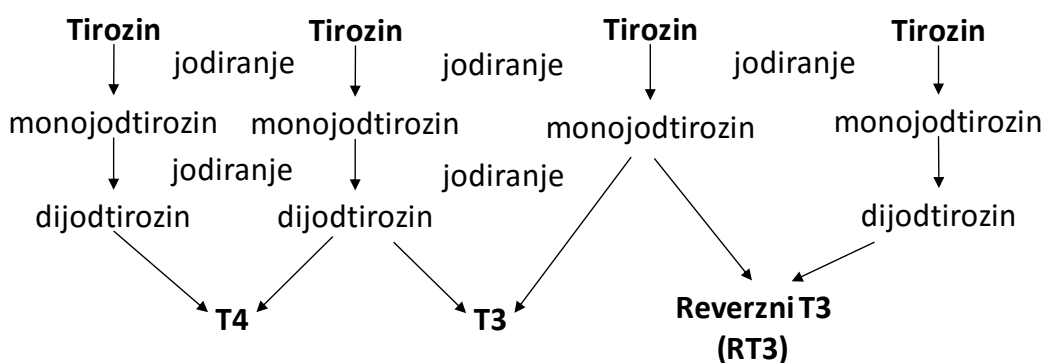
Folikularne ćelije su odgovorne za produkciju koloida (jod-tireoglobulina), za hvatanje i oksidaciju jodida i sintezu trijodotironina i tiroksina (*Fancy i Gallagher, 2010*). Parafolikularne ćelije tireoidne žlezde vode poreklo iz nervnog grebena, naseljavaju intersticijum žlezde i proizvode hormon kalcitonin, koji je odgovoran za održavanje homeostaze kalcijuma (*Van Vliet, 2007*).

Tireoidne ćelije (tireocite) imaju tri važne funkcije:

- sinteza tireoglobulina i njegova sekrecija u koloid,
- preuzimanje i transport jodida iz plazme u lumen folikula,
- preuzimanje tireoidnih hormona od tireoglobulina i njihovo prebacivanje u sistemsku cirkulaciju.

1.2.2. HORMONI ŠTITASTE ŽLEZDE I NJIHOVA ULOGA

Glavni hormoni tireoidne žlezde su tiroksin (T4) i trijodtironin (T3). Suština sinteze ovih hormona u tireoidnoj žlezdi zasniva se na vezivanju joda za aminokiselinu tirozin. Jod se unutar organizma tek posle konverzije u jodid apsorbuje pomoću jodne pumpe, čija je aktivnost pod uticajem tireostimulišućeg hormona adenohipofize. Epitelne ćelije tireoidne žlezde preuzimaju jodid iz plazme i transportuju ga nasuprot koncentracijskog gradijenta u središnji deo folikula, gde se jodid, uz pomoć enzima tireoidne peroksidaze, oksidiše u elementarni jod i time stiče sposobnost za vezivanje sa tirozinom. Epitelne ćelije štitaste žlezde stvaraju i tireoglobulin koji sekretuju u središnji deo folikula. Tirozin se prvo jodira u monojod-tirozin, a zatim u dijod-tirozin. Više dijod-tirozinskih jedinica udružuju se i formiraju molekul tiroksina. Udruživanjem jednog molekula dijod-tirozina sa jednim molekulom monojod-tirozina nastaje trijod-tironin. Svaki molekul tireoglobulina sadrži pet do šest molekula tiroksina, a po jedan molekul trijod-tironina dolazi u proseku na tri do četiri molekula tireoglobulina (*Šema 1*) (*Guyton, 1996*).



Šema 1. Sinteza hormona tireoide žlezde.

Tireoglobulin se ne oslobađa u krv, već se trijod-tironin i tiroksin otcepljuju sa molekula tireoglobulina i kao slobodni hormoni otpuštaju se u krv. Sa apikalne površine tireoidnih ćelija polaze nastavci koji obuhvataju delove koloida i formiraju pinocitozne vezikule, koje se spajaju sa lizozomima formirajući digestivne vezikule, u kojima je aktivan enzim proteinaza. Pod dejstvom proteinaze, tireoglobulin se razgrađuje i oslobađa tiroksin i trijod-tironin koji difundiraju kroz bazalni deo tireoidne ćelije i kroz bazalnu membranu dospevaju u krv. Od tireodnih hormona, koji se luče iz štitaste žlezde, više od 90% je tiroksin, a manje od 10% trijod-tironin. Tireodni hormoni se u plazmi brzo vezuju za albumine i globuline, kao što su tiroksin-vezujuć albumin (*thyroxine-binding albumin* - TBA) i tiroksin-vezujuć globulin (*thyroxine-binding globulin* - TBG) (Guyton, 1996).

Efekte, koje hormoni štitaste žleze ostvaruju u ciljnim ćelijama, prvenstveno zavise od prisustva tireoidnim hormonima kompatibilnih receptora. Receptori za tireoidne hormone se nalaze na nukleusu ćelije i služe za vezivanje trijod-tironina, ređe i za vezivanje tiroksina. Najveći deo nuklearnog i intracelularnog trijodtironina, naročito u moždanim ćelijama, potiče od lokalne konverzije tiroksina pomoću 5-dejodinaze. Ova konverzija teče prilično autonomno, zato što je homeostaza trijodtironina neophodna za pravilan razvoj CNS-a (Guyton, 1996).

Kontrola mehanizma sekrecije tireodnih hormona ostvaruje se posredstvom negativno povratne sprege i uključuje normalno funkcionisanje hipotalamusa i hipofize.

Hormon hipotalamusa tireotropni-oslobađajući hormon (*thyrotropin-releasing hormone* - TRH) stimuliše sekreciju tireostimulišućeg hormona iz adenohipofize. Tireostimulišuća hormona ubrzava aktivnost štitaste žlezde, tako što stimuliše preuzimanje joda iz cirkulacije i sintezu jodotironina (trijod-tironina i tiroksina), tireoglobulina u koloidu i endocitozu koloida (*Guyton, 1996*).

Delovanje tireodnih hormona se karakteriše aktivacijom genskih mehanizama za sintezu različitih vrsta intracelularnih proteina. Jednom vezani za svoje receptore u jedru, danima ili čak sedmicama ekspimiraju sopstveno delovanje (*Guyton, 1996*). Tireoidni hormoni regulišu ekspresiju mnogih gena koji su odgovorni za održavanje metaboličke homeostaze ćelije. Prolaze kroz plazma membranu i vezuju se za receptore u plazmi gradeći kompleks receptor-hormon. Ovaj receptor-hormon kompleks deluje kao transkripcioni faktor, koji se vezuje za regulatorne elemente gena, dovodeći obično do aktivacije gena, tj. transkripcije gena. Kao rezultat toga nastaje iRNK, koja se prevodi do citoplazmatskih ribozoma radi sinteze odgovarajućeg proteina. Proteini, nastali ekspresijom gena pod uticajem tireoidnih hormona, utiču na funkciju ćelije, njen rast i diferencijaciju (*Wilson i Foster, 2002*). Biološki efekti tireoidnih hormona zavise od njihovog afiniteta i sposobnosti vezivanja za receptore, kao i od koncentracije slobodnih hormona u plazmi. Fiziološka uloga tireoidnih hormona ogleda se u vremenskoj koordinaciji različitih razvojnih događaja, kroz specifične efekte na diferencijaciju, migraciju ćelija, gensku ekspresiju, kao i smrt ćelije (*Kohrle, 2000*).

Uloga tireoidnih hormona je višestruka:

1. Metabolička - povećanje bazalnog metabolizma, stvaranje toplote, sinteza belančevina, povećanje minutnog volumena srca, razgradnja holesterola i stimulacija hematopoeze;
2. Stimulišu rast i sazrevanje organizma kroz izgradnju koštane mase, rast kostiju u dužinu, stvaranje hormona rasta, razvoj CNS-a, tkiva i organa;
3. Regulišu funkcionisanje organizma: ciklus san i budnost, reakcije na nadražaje, učenje, pamćenje, glad (*Guyton, 1996*).

Tireoidna žlezda poseduje i sposobnost autoregulacije, koja se ogleda u kontroli preuzimanja joda i sintezi tireodnih hormona. Ukoliko je koncentracija jodida u cirkulaciji

visoka, u cilju održavanja funkcionalne homeostaze, može se zaustaviti sinteza hormona na određeno vreme. Kada je koncentracija jodida u cirkulaciji mala, smanjuje se sinteza hormona, a samim tim i njihova koncentracija u cirkulaciji smanjuje se ispod optimalne. Ovakvo stanje smanjene koncentracije tireodnih hormona u cirkulaciji dovodi do povećane sekrecije tireostimulišućeg hormona. Usled delovanja tireostimulišućeg hormona na tireoidnu žlezdu nastaje hipertrofija žlezde (gušavost), koja je praćena hipotireoidizmom i mentalnom tupošću. Smanjena funkcija tireoidne žlezde za vreme embriogeneze dovodi do razvoja mentalne retardacije (neonatalni kretenizam) (*Lauberg, 2008*). Klinički znaci kretenizma se ispoljavaju u vidu fizičkih malformacija (široko usađene oči, širok spljošten nos, protuzija jezika, retka kosa), usporenog rasta kostiju i odloženog sazrevanja skeleta, poremećenog razvoja sinapsi i defektne mijelinizacije, što sve rezultira fizičkom i mentalnom retardacijom (*Stanbury, 1980; Fancy i Gallagher, 2010*).

1.2.3. FUNKCIJA TIREOIDNE ŽLEZDE U TRUDNOĆI

U trudnoći dolazi do povećanja bazalnog metabolizma, kao odgovor na novonastale metaboličke zahteve, što je praćeno povećanom akumulacijom joda, hiperplazijom i pojačanom vaskularizacijom tireoidne žlezde. Na aktivnost tireoidne žlezde u trudnoći utiču estrogeni hormoni posredstvom povećanja koncentracije tiroksinvezujućeg globulina i hCG u serumu, kao i inteziteta glomerularne filtracije, što rezultira smanjenjem koncentracije joda u plazmi (*Ain i sar., 1987; Ballabio i sar., 1991; Yamazaki i sar., 1995*).

Serumski hCG je glikoprotein, koga produkuje placenta i maksimalnu vrednost koncentracije dostiže na kraju prvog trimestra graviditeta. Ovaj glikoprotein vezuje se za receptor tireostimulišućeg hormona na membrani tiroidnih ćelija, što rezultira povećanjem koncentracija trijod-tironina i tiroksina, kao i delimičnom redukcijom serumske koncentracije tireostimulišućeg hormona (*Hirsch i sar., 2010; Leug, 2012*). Povećane koncentracije serumskog hCG kod višeplođnih trudnoća indukuju veći stepen supresije tireostimulišućeg hormona. Kod blizanačkih trudnoća u odnosu na jednopodne trudnoće,

koncentracija tireostimulišućeg hormona majke u serumu je manja, a još manja kod trudnoća sa trojkama ili četvorkama (*Grun i sar.*, 1997). Rezultati studije *Lockwod i saradnika* (2009) pokazuju da kod trudnica sa visokim koncentracijama hCG (> 400,000 IU/L) i potpunom supresijom tireostimulišućeg hormona nisu uočeni klinički simptomi hipertireoidizma.

Koncentracija tiroksin-vezujućeg globulina dostiže maksimalnu koncentraciju u serumu trudnice oko 20. nedelje gestacije, nakon čega se održavaju visoke vrednosti koncentracija ovog proteina. Povećana vrednost tiroksin-vezujućeg globulina dovodi do povećanja koncentracija ukupnih hormona tireoidne žlezde. Ukupna koncentracija trijodtironina i tiroksina u trudnoći je 1.5 puta veća u odnosu na vrednosti van trudnoće. Između 5. i 6 nedelje gestacije uočava se aktivnost fetalne tireoidne žlezde, koja se ogleda u sintezi tireoglobulina i deponovanju veće količine joda iz plazme u koloid. Između 8. i 10. nedelje gestacije sazreva enzimski sistem (lizozomske proteaze), koji katališe oslobađanje jodtironina iz tireoglobulina u sistemsku cirkulaciju. Fetalna tireoidna žlezda razvija sposobnost koncentrisanja joda i sinteze hormona između 10. i 12. nedelje gestacije, dok sinteza fetalnog tireostimulišućeg hormona i tiroksin-vezujućeg globulina počinje oko 20. nedelje gestacije, povećava se sa napredovanjem graviditeta i dostiže maksimum u 28. nedelji. Nakon 28. nedelje gestacije, koncentracija fetalnog tireostimulišućeg hormona i tiroksin-vezujućeg globulina ostaje relativno visoka do termina porođaja. Fetus i posle početka produkcije fetalnih tireoidnih hormona nastavlja da se oslanja na tireoidne hormone majke, koji selektivno difunduju kroz placenta u toku graviditeta (*Henrichs i sar.*, 2010).

Placenta je relativno nepropustljiva za tireoidne hormone majke, kao i za majčin tireostimulišuću hormon (*Speroff i sar.*, 1994). Enzim dejodinaza, koji ragrađuje trijodtironin i tiroksin sadržan je u placenti. Blagi transfer kroz placenta majčinog trijodtironina i tiroksina moguć je samo kada je nivo koncentracije ovih hormona vrlo visok u serumu majke (*Speroff i sar.*, 1994). U prvoj polovini trudnoće, kroz placenta prolazi tiroksin majke, a ne prolaze tireostimulišuću hormon i trijodtironin. Koncentracija tireoidnih hormona u amnionskoj tečnosti tokom prve polovine trudnoće se povećava progresivno sa napredovanjem graviditeta i dostiže maksimalnu vrednost između 25. i 30. nedelje gestacije.

U drugoj polovini trudnoće, koncentracija tiroksina se smanjuje u amnionskoj tečnosti, dok se koncentracije trijod-tironina i tireostimulišućeg hormona povećavaju (Girling,2006).

U toku gestacije, tireostimulišućí hormon i tiroksin pojavljuju se u amnionskoj tečnosti između 10. i 13. nedelje gestacije i imaju niske vrednosti koncentracije, sve do 20. nedelje gestacije, kada dolazi do povećanja koncentracija ovih hormona. Koncentracija tiroksina progresivno se povećava sa napredovanjem graviditeta i u terminu porođaja je iznad majčinih koncentracija. Koncentracija trijod-tironina u amnionskoj tečnosti povećava se sa napredovanjem trudnoće, ali je njena vrednost mala i ispod optimalnih u odnosu na odrasle. Koncentracije reverznog trijod-tironina u amnionskoj tečnosti premašuje vrednosti koncentracije u serumu kod odraslih. Koncentracija fetalnog trijod-tironina i tiroksina u serumu dostiže nivo odraslog do 36. nedelje gestacije, dok je koncentracija fetalnog tireostimulišućeg hormona veća nego u serumu odraslog (Speroff, 2004). Koncentracija reverznog trijod-tironina u amnionskoj tečnosti je takođe povećana i dostiže maksimalnu vrednost između 17. i 20. nedelje gestacije. Reverzni trijod-tironin je metabolički neaktivna forma hormona, koja se stvara procesom alfamonodejodinacije tiroksina (Speroff i sar., 1994).

Koncentracije tireoidnih hormona u serumu fetusa podležu promenama nakon rođenja. U serumu fetusa, trideset minuta nakon rođenja, koncentracija tireostimulišućeg hormona dostiže maksimalnu vrednost, dok od 48 do 72 sata od rođenja dolazi do smanjenja bazalnih vrednosti koncentracija ovog hormona. Koncentracija trijod-tironina dostiže maksimalnu vrednost u toku prvih 24 sata nakon rođenja. Maksimalne vrednosti koncentracije, tiroksin dostiže od 24 do 48 sata nakon porođaja. Povećanje koncentracije trijod-tironina nakon rođenja ne zavisi od vrednosti koncentracije tireostimulišućeg hormona. Visoke vrednosti koncentracije reverznog trijod-tironina perzistiraju od 3 do 5 dana posle rođenja. Nakon ovog perioda, koncentracija reverznog trijod-tironina se smanjuje i dostiže normalne vrednosti u 2. nedelji života novorođenčeta (Speroff, 2004).

Antitela tiroidne žlezde koja deluju na receptore za tireostimulišućí hormon na površini tiroidnih folikularnih ćelija kod trudnica sa autoimunskim hipertireoidizmom, mogu da prođu kroz placentu i u oko 1% slučajeva da dovedu do fetalne tireotoksikoze. Lekovi koji se koriste u terapiji majčinog hipertireoidizma, kao što su propiltiouracil,

tiamazol i kalijum-jodid takođe prolaze kroz placentu i mogu da utiču na funkciju fetalne tireoidne žlezde.

Značajan uticaj na funkciju tireoidne žlezde fetusa imaju promene hormonskog statusa majke u toku trudnoće. Poremećaj funkcije tireoidne žlezde majke ima važan uticaj na tok i ishod trudnoće, kao i na rast i razvoj fetusa i novorođenčeta.

1.3. HIPOTIREOIDIZAM

Hipotireoidizam je klinički sindrom koji se karakteriše nedostatkom ili neadekvatnim delovanjem tireodnih hormona. Hipotireoidizam se klinički manifestuje smanjenim vrednostima koncentracije slobodnog tiroksina i povećanim vrednostima koncentracije tireostimulišućeg hormona u odnosu na referentne vrednosti koncentracija ovih hormona u serumu.

Hipotireoidizam se prema poreklu deli na:

- primarni - koji nastaje zbog insuficijencije tiroidnih hormona,
- centralni – koji nastaje zbog insuficijencije hormona hipofize (sekundarni) ili hormona hipotalamusa (tercijerni) i
- periferni – koji nastaje zbog rezistencije tkiva na tireoidne hormone.

Na osnovu kliničke manifestacije, hipotireoidizam može biti subklinički i klinički. Subklinički hipotireoidizam se karakteriše referentnim vrednostima koncentracija tireodnih hormona (trijod-tironina i tiroksina) u serumu i povećanom serumskom koncentracijom tireostimulišućeg hormona. Prevalenca subkliničkog hipotireoidizma u opštoj populaciji je od 1% do 20%. Osobe sa ovim poremećajem imaju nejasne kliničke znake hipotireoidizma, što bi odgovaralo inicijalnoj fazi bolesti (*Cooper i Biondl, 2012*). Etiologija subkliničkog hipotireoidizma je ista kao i kod kliničkog hipotireoidizma (*Schoenmakers i sar., 2015; Hennessey i Espailat, 2015*).

Najčešći simptomi hipotireoidizma su slabost, zamor, intolerancija na hladnoću, povećanje telesne težine i somnolencija, koja je praćena psihološkim simptomima

depresije (neraspoloženje, slabost, usporen misaoni tok, oslabljena memorija). Hipotireoidizam je udružen sa redukcijom centralne serotoninergičke funkcije i sa povećanom incidencom od razvoja depresije. *Cleare i saradnici* (1996) su pokazali da je koncentracija tireostimulišućeg hormona u serumu u pozitivnoj korelaciji sa simptomima depresije, a u negativnoj korelaciji sa kortizolskim odgovorom. Ova otkrića podržavaju hipotezu da je centralna serotoninergička transmisija pogođena hipotireoidizmom. Podaci iz literature pokazuju da 5-15% depresivnih pacijenata ima hipotireoidizam (*Haggerty i Prange*, 1995).

Jedan od uzroka subkličičkog hipotireodizma su Hašimotov tireoditis (autoimunska zapaljenje tireoidne žlezde) i njegove varijante, subakutni granulomatozni tireoditis i idiopatski miksedem. Kod pacijenata sa Hašimoto tireoditisom mogu biti prisutna i druga autoimunska oboljenja (vitiligo, sistemski eritemski lupus, miastenia gravis, perniciozna anemija i dijabetes) (*Kronenberg i sar.*, 2008; *Speroff*, 2004). Primarni hipotireodizam može biti posledica operativnog tretmana Gravesove bolesti, kao i posledica radioablativne terapije (*Fernandez i sar.*, 2014). Hemoterapija takođe može dovesti do razvoja hipotireoidizma. Primena tamoksifena u terapiji žena obolelih od karcinoma dojke povećava rizik za nastanak autoimunog tireoiditisa (*Silver i sar.*, 2016). Kod 35-40% pacijenata sa dijabetesom tipa 1 razvija se autoimuni poremećaj tireoidne žlezde (*Matejkova-Běhanová i sar.*, 2002; *Chubb i sar.*, 2005).

Trudnoća indukuje regresiju Hašimoto tireoiditisa. Međutim, kod 30-50% žena nakon porođaja dolazi do razvoja postpartalne tireoidne disfunkciju (*Galofre i sar.*, 2010). Postpartalni tireoditis je definisan kao abnormalni nivo koncentracije tireostimulišućeg hormona u prvih 12. meseci postpartuma u odsustvu tireoidnih antitela (*Muller i sar.*, 2001). Kod 95% pacijentkinja sa Hašimotovom bolešću prisutna su tireoidna antimikrozomalna antitela (TAMAb), dok su kod polovine pacijentkinja prisutna antitireoglobulinska antitela (TgAb).

1.3.1. HIPOTIREOIDIZAM U TRUDNOĆI

Poremećaji funkcije štitaste žlezde ubrajaju se u jedan od najčešćih poremećaja u toku prvog trimestra graviditeta i imaju važan uticaj na tok i ishod

trudnoće. Disfunkcija štitaste žlezde u trudnoći, kao što je hipotireoidizam, čest je problem koji komplikuje približno 3-5% svih trudnoća.

Optimalna koncentracija majčinih tireoidnih hormona je veoma važna, kako za zdravlje majke, tako i za rast, razvoj i sazrevanje fetusa. Majčini tireoidni hormoni imaju značajnu ulogu u ranoj trudnoći, koja se zasniva na održavanju ravnoteže u inflamatornom odgovoru majke kako bi se sprečilo imunsko odbacivanje fetusa i omogućila normalna implantacija embriona (*Stagnaro-Green i sar., 2005*). Tireoidni hormoni i receptori za tireoidne hormone prisutni su u mozgu embriona od 8. nedelje gestacije. S obzirom da u ovom periodu gestacije nije uspostavljena funkcija tireoidne žlezde fetusa, tireoidni hormoni u mozgu fetusa su majčinog porekla (*Kennedy i sar., 2010*).

Hipotireoidizam u trudnoći je ozbiljno stanje koje može dovesti do morbiditeta i mortaliteta fetusa. Uglavnom je ovo oboljenje u trudnoći uzrokovano bolešću tireoidne žlezde ili postupkom koji dovodi do razaranja žlezdanog parenhima i/ili poremećajima sinteze i sekrecije tireoidnih hormona (*Braverman i Utiger, 2005*). Izražen hipotireoidizam majke u toku prvog i drugog tromesečja trudnoće dovodi do razvoja trajnih neuroloških oštećenja fetusa. Hipotireoidizam majke, nastao u toku trećeg tromesečja trudnoće, izaziva manje ozbiljne posledice po zdravstveni status fetus (*Liebrant i sar., 2006; Glinoe i Abalovich, 2007; Develhar i sar., 2007; Henrich i sar., 2010*).

Nelečeni hipotireoidizam majke udružen je sa opstetričkim komplikacijama i kod majke i kod fetusa (*Pop i sar., 1999; Haddow i sar., 1999; Allan i sar., 2000*). Majke sa hipotireoidizmom u trudnoći češće imaju anemiju, gestacijski dijabetes, gestacijsku hipertenziju, preeklampsiju, abrupciju placente i postpartalnu hemoragiju (*Idris i sar., 2005; LaFranchi i sar., 2005; Stagnaro-Green i sar., 2005; Wilson i sar., 2012*). Češći su spontani pobačaji, fetalna i neonatalna smrt i prevremeni porođaji. Učestalost spontanih pobačaja kod trudnica obolelih od hipotireoidizma varira od 10 do 20%, dok kod trudnica sa neregulisanim hipotireoidizmom u prvom tromesečju trudnoće dostiže vrednost i do 50% (*Davis i Leveno, 1988; Poppe i Glinoe, 2003; Anselmo i sar., 2004*).

Smanjena funkcija tireoidne žlezde u trudnoći češće se manifestuje kao subklinički hipotireoidizam nego kao klinički hipotireoidizam. Učestalost razvoja subkliničkog hipotireoidizma u prvom tromesečju trudnoće je različita u pojedinim regionima sveta i kreće se od 0.25% do 14.9%. Subklinički hipotireoidizam u prvom tromesečju trudnoće

dijagnostikuje se na osnovu povećanih vrednosti koncentracije tireostimulišućeg hormona i referentnih vrednosti koncentracija trijod-tironina i tiroksina (*Chang i Pearce, 2013; Rao i Patibandla, 2016*).

Terapijski tretman subkličkog hipotireoidizma u prvom tromesečju trudnoće u značajnoj meri smanjuje učestalost prevremenih porođaja, hipertenzije, preeklampsije i drugih opstetičkih i neonatalnih komplikacija, što doprinosi poboljšanju perinatalnog ishoda i postnatalne adaptacije novorođenčadi (*Tan i sar., 2006; Negro i sar., 2010*). U terapiji subkličkog hipotireoidizma u trudnoći primenjuje se Euthyrox i Letrox (*levothyroxine*), u dozama koje koncentraciju tireostimulišućeg hormona u serumu održavaju u optimalnim vrednostima, do 2.5 mIU/L (*Negro i sar., 2006*).

Subklički hipotireoidizam u trudnoći može biti i posledica autoimunih oboljenja tireoidne žlezde majke. U ovom slučaju, subklički hipotireoidizam u trudnoći praćen je visokim stepenom razvoja mentalnog i somatskog morbiditeta i mortaliteta novorođenčadi, a ishod trudnoće je u korelaciji sa intenzitetom autoimunskog procesa, prvenstveno u toku prvog tromesečja trudnoće (*Glinoeer, 2003*). Veoma su brojne i učestale komplikacije poput spontanih pobačaja, prevremenih porođaja, intrauterinog zastoja u rastu ploda (IUGR) i intrauterine smrti ploda. Subklički hipotireoidizam u trudnoći indukovano autoimunim oboljenjima tireoidne žlezde majke često je komplikovan gestacijskim dijabetesom i hipertenzijom (*Marqusee i sar., 1997; Pearce i sar., 2003; Poppe i Glinoeer, 2003; Anselmo i sar., 2004; Negro i sar., 2006*).

Hipotireoidizam u trudnoći često je udružen sa drugim patološkim stanjima majke, poput dijabetesa, hipertenzije i preeklampsije. *Smallridge i saradnici* (2001) navode da se gestacijski dijabetes češće javlja kod trudnica obolelih od hipotireoidizma. Prema rezultatima *Gudović i saradnika* (2013), kod 40%, trudnica sa hipotireoidizmom dijagnostikovano je i gestacijski dijabetes. Nelečeni subklički hipotireoidizam kod trudnica sa dijabetesom može uticati na kontrolu glikemije i metabolizam lipida (*Ivanišević i sar., 2012*), a udružen je sa povećanim rizikom od spontanog pobačaja, abrupcije placente i prevremenog porođaja. Iz dijabetičnih trudnoća sa hipotireoidizmom češće se rađaju makrozomna novorođenčad (plod krupan za gestacijsku dob) ili hipotrofična novorođenčad (plod mali za gestacijsku dob) (*Stotland i sar., 2004*).

Literaturni podaci ukazuju na korelaciju tireoidnog statusa majke sa neurološkim i

psihološkim razvojem fetusa i zdravstvenim statusom deteta posle rođenja (*Danforth i sar.*, 2003). Deca rođena iz trudnoće sa majčnim hipotireoidizmom karakterišu se porođajnim distresom, malom težinom na rođenju, kongenitalnim malformacijama i usporenim psihomotornim razvojem nakon rođenja (*Poppe i Glinoeer*, 2003; *Kooistra i sar.*, 2006).

1.4. HEMOSTAZA

U održavanju homeostaze organizma važnu ulogu ima mehanizam hemostaze (*Colman i sar.*, 2006). Pod hemostazom se podrazumeva održavanje tečnog stanja krvi u cilju njenog normalnog protoka kroz cirkulaciju i sprečavanja gubitka krvi u slučaju povrede krvnog suda posredstvom formiranja krvnog ugruška. U fiziološkim uslovima, hemostaza se održava ravnotežom između prokoagulantnih i antikoagulantnih faktora. Glavne komponente hemostaznog sistema su: endotel krvnih sudova, trombociti, proteini koagulacione kaskade, kao i inhibitori koagulacije i sistem fibrinolize (*Colman i sar.*, 2006).

Vaskularni endotel predstavlja granicu između tkiva i krvi. Ima značajnu ulogu u zaštiti od vaskularnih povreda i održavanju krvi u tečnom stanju (*Wu i Thiagarajan*, 1996). U fiziološkim uslovima, endotel je tromborezistentan, tj. ne reaguje sa trombocitima niti sa faktorima koagulacije. Endotel takođe obezbeđuje fiziološku barijeru između trombocita i trombogenih struktura, koje su smeštene subendotelno. Čelije endotela odbijaju trombocite negativnim naelektrisanjem, a takođe sintetišu azot monoksid (NO) i prostaciklin-2 (PGI₂), koji su snažni inhibitori adhezije i agregacije trombocita. Azot monoksid i PGI₂ takođe deluju i vazodilatatorno, tako da dovode do povećanja protoka krvi i smanjenja nagomilavanja trombocita i faktora koagulacije (*Weiss i sar.*, 1979; *Verhamme i sar.*, 2006). U slučaju povrede krvnog suda, nakon lokalne vazokonstrukcije glatke muskulature na mestu oštećenja, ćelije endotela započinju sintezu hemostatskih faktora (tkivni faktor i fon Vilebrandov faktor) koji omogućavaju dalje formiranje krvnog ugruška (*Hoffman i sar.*, 2001; *Hoffman i sar.*, 2005). Posle povrede,

trombociti se vezuju za subendotel putem adhezivnih proteina, koji se takođe sintetišu u endotelu (*Hoffman i sar.*, 2001).

Trombociti nastaju od prekursorskih ćelija kostne srži, megakariocita (*George*, 2000; *De Botton i sar.*, 2002). U cirkulaciji su prisutni u neaktivnom obliku, u vidu pojedinačnih ćelija, i kao takve ne adheriraju na neoštećeni vaskularni endotel. U slučaju povrede krvnog suda, trombociti započinju adheziju na mestu povrede, posredstvom receptorskih kontakata sa von Willebrandovim faktorom, fibrinogenom i fibronektinom (*McMichael*, 2012). Nakon toga sledi aktivacija trombocita i sekrecija faktora iz trombocitnih granula, koji omogućavaju dalju agregaciju trombocita i formiranje trombocitnog ugruška, kao i pokretanje koagulacione kaskade (*Macfarlane*, 1964).

Za zaustavljanje krvarenja neophodna je aktivacija sistema koagulacije na mestu povrede krvnog suda i stvaranje fibrina koji stabilizuje trombocitni ugrušak (*Colman i sar.*, 2006). Klasična teorija koagulacije, podrazumevala je interakciju četiri faktora: protrombina, jona kalcijuma (Ca^{2+}), fibrinogena u plazmi i trombokinaze na membrani trombocita i leukocita (*Beck*, 1977). Dve nezavisne grupe naučnika su 1964. godine opisale novi model koagulacije:

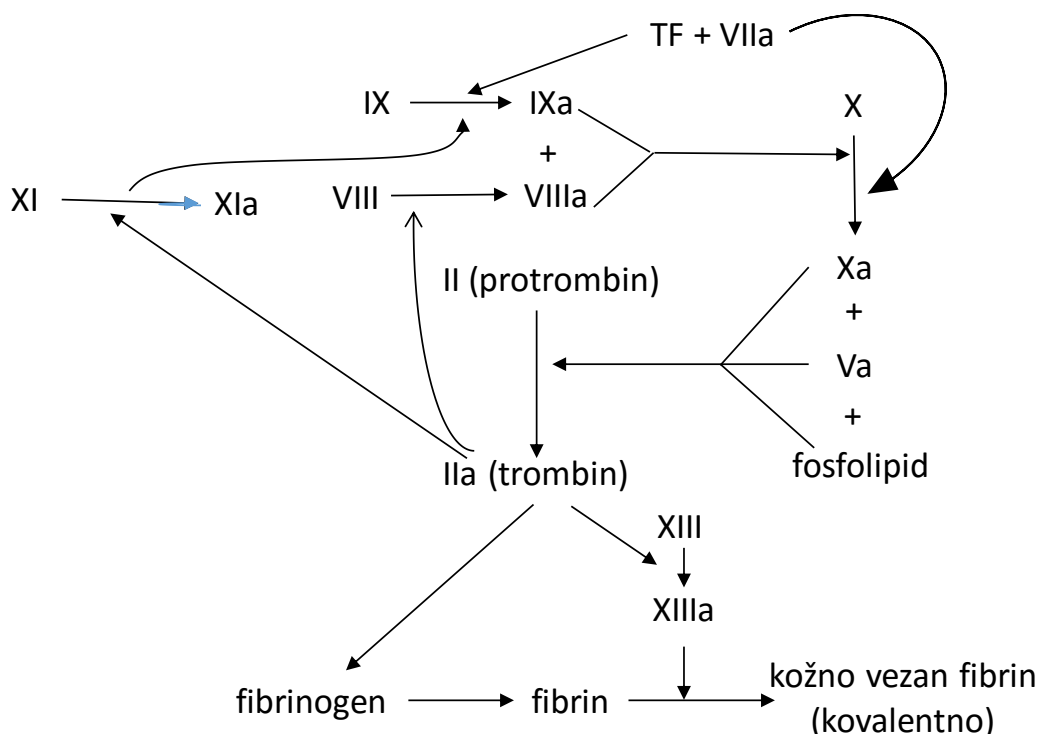
I. model “vodopada” kako su ga nazvali *Davie i Ratnoff* i

II. model “kaskade” kako ga je nazvao *Macfarlane*.

Oba modela opisuju proces koagulacije kao seriju proteolitičkih reakcija, u kojima se prethodno aktivirani faktor koagulacije aktivira sledećim u nizu i tako dolazi do stvaranja trombina, koji stimuliše prevođenja fibrinogena u fibrin i stvaranja krvnog ugruška (*Šema 2*). Trombin je centralni regulatorni molekul procesa koagulacije, koji pored prevođenja fibrinogena u fibrin, mehanizmima pozitivne i negativne povratne sprege reguliše čitav proces koagulacije i omogućava normalno odvijanje hemostaze (*Crawley i sar.*, 2007).

U proces hemostaze uključeni su i inhibitori koagulacije, koji specifično inhibiraju aktivirane faktore koagulacije dospеле u plazmu ili na površinu membrane neoštećenih ćelija endotela. Najznačajniji inhibitori koagulacije su antitrombin, protein C, protein S, trombomodulin, inhibitor puta tkivnog faktora (TFPI), C1 inhibitor, α 1-proteazni inhibitor, α 2-makroglobulin, heparin kofaktor II i drugi (*Whinna i sar.*, 1993). Inhibitor puta tkivnog

faktora je serinska proteaza i u cirkulaciji je vezan za lipoproteine, od kojih se oslobađa stvaranjem trombina. Drugi inhibitor je antitrombin III, plazmatski glikoprotein koji neutralizuje trombin. Treći tip inhibicije procesa koagulacije je sistem proteina C, koji se aktivira nakon vezivanja trombina za trombomodulin na površini ćelija endotela (*Whinna i sar.*, 1993).

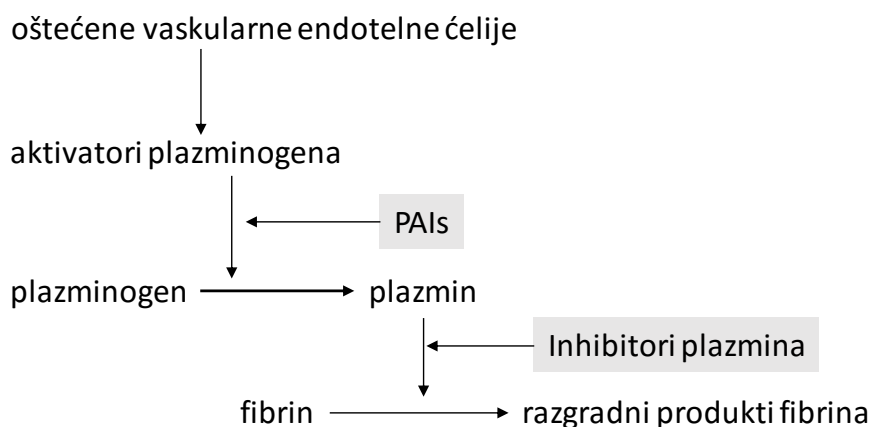


Šema 2. *Mehanizam koagulacije (Margetic, 2012).*

(Faktor IX - antihemofilijski globulin B; Faktor X - Stjurart-Proverov faktor; Faktor VII - stabilni faktor; Faktor XIII - faktor stabilizacije fibrina; Faktor V - proakcelerin; Faktor XI - prekursor tromboplastina plazme; Faktor VIII - antihemofilijski globulin A).

Razgradnja krvnog ugruška dešava se ubrzo nakon njegovog formiranja, kao deo procesa hemostaze i naziva se fibrinoliza. Kao i u slučaju formiranja ugruška, njegova razgradnja podrazumeva niz koraka koje kontrolišu aktivatori i inhibitori koagulacije, pri čemu se formira fibrinolitička kaskada. Glavni proenzim fibrinolitičkog procesa je plazminogen, koji je u krvi prisutan u neaktivnoj formi. Delovanjem aktivatora plazminogena on se prevodi u aktivnu formu, plazmin. Plazmin vrši digestiju fibrinskih

lanaca, pri čemu nastaju solubilni fibrinski degradacioni proizvodi (Šema 3). Aktivnost plazmina regulisana je inhibitorima fibrinolize, među kojima su najznačajniji inhibitori aktivatora plazminogena (inhibitor aktivatora plazminogena 1-PAI-1 i inhibitor aktivatora plazminogena 2 - PAI-2) i α 2-antiplazmin (Degen, 2001).



Šema 3. Fibrinolitički put (Margetic, 2012).

(PAIs - inhibitori aktivatora plazminogena)

Poremećaji hemostaze javljaju se u slučaju nedostatka ili poremećene funkcije jednog ili više faktora koji učestvuju u ovom procesu (Rashe, 2001). U slučaju poremećene hemostaze, dolazi do odstupanja od hemostazne ravnoteže u smeru hipokoagulacije ili hiperkoagulacije, što rezultira krvarenjem (hemoragijom) ili začepljenjem krvnog suda (trombozom). Hiperkoagulacija se javlja usled povećanja nivoa koagulacionih faktora i/ili smanjenog nivoa prirodnih inhibitora koagulacije i faktora fibrinolitičkog sistema (Rashe, 2001).

Hormonske promene koje prate trudnoću, indukuju fiziološke izmene u sistemu koagulacije, u smislu porasta trombogenosti, koja je naročito karakteristična za peripartalni period (Szecsi i sar., 2010). Promene u sistemu koagulacije u toku trudnoće karakterišu se povećanjem vrednosti koncentracija faktora VII, faktora VIII, faktora X, Von Wilenbadovog faktora i fibrinogena u perifernoj krvi, kao i intezivnijim stvaranjem fibrina (Szecsi i sar., 2010). Koncentracija inhibitora tkivnog faktora minimalno se povećava, dok se vrednost koncentracije proteina C ne menja. Povećava se rezistencija na

aktivirani protein C i smanjuje se aktivnost proteina S, uključenog u drugi i treći tip inhibicije procesa koagulacije (*Lykke i sar.*, 2010).

1.4.1. POREMEĆAJI KOAGULACIJE KRVI

1.4.1.1. Tromboze

Tromboze predstavljaju patofiziološko stanje koje se karakteriše formiranjem tromba (krvnog ugruška) koji može da začepi krvni sud. Tromb u uslovima tromboze nastaje kao posledica poremećene ravnoteže između faktora uključenih u održavanje hemostaze: endotel krvnih sudova, trombociti, koagulacioni i fibrinolitički sistem. Zbog razlika između arterijskog i venskog krvotoka, tromboze se dele na arterijske i venske. U arterijskim trombozama stvara se tromb koji je bogat trombocitima, sa manjim udelom fibrina, dok se u venskim tromboza stvara tromb bogat fibrinom i eritrocitima (*Elezović*, 2000). Najčešće posledice arterijskih tromboza su infarkt miokarda i moždani udar, dok su kod venskih tromboza najčešće manifestacije tromboze dubokih vena i plućni embolizam, koji mogu da se manifestuju i kao venski tromboembolizam. Venski tromboembolizam javlja se kod 1 osobe na 1000, na godišnjem nivou i najčešći je uzrok smrti kod trudnica, porodilja i hospitalizovanih pacijenata (*Elezović*, 2000).

Tromboze su multifaktorijalno oboljenje koje nastaje usled većeg broja stečenih i naslednih faktora. Najčešći stečeni faktori za arterijske tromboze su: pušenje, dijabetes, gojaznost i hiperholesterolemija. Faktori rizika nastanka venskih tromboza su hirurške intervencije, traume, imobilizacija, maligniteti, imunizacija, trudnoća i puerperijum (*Elezović*, 2000; *Marz i sar.*, 2000).

1.4.1.2. Trombofilija

Trombofilija nastaje kao rezultat kompleksne interakcije između negenetičkih i genetičkih faktora rizika, koji hemostaznu ravnotežu pomeraju u smeru hiperkoagulacije,

što rezultira nastankom arterijskih i venskih tromboza. Trombofilije mogu biti urođene (nasledne) i stečene. Pod urođenim trombofilijama smatraju se genetski determinisane abnormalnosti hemostatskih mehanizama, koje povećavaju sklonost ka nastanku tromboza (Lykke i sar., 2012). Urođene trombofilije su prisutne u 15% opšte populacije i kod 50% trudnica sa dubokom venskom trombozom (Lykke i sar., 2012).

U poslednjih pedeset godina opisan je veći broj mutacija koje povećavaju rizik za nastanak tromboza. Ove mutacije podeljene su u tri grupe:

1. mutacije u genima koji kodiraju inhibitore koagulacije, što dovodi do smanjene inhibicije koagulacije,
2. mutacije u genima koji kodiraju prokoagulantne faktore, što dovodi do povećane sinteze ovih faktora ili smanjene inhibicije,
3. mutacije u genima koji kodiraju faktore fibrinolitičkog sistema, usled čega dolazi do poremećenog funkcionisanja fibrinolize (Đorđević i sar., 2014).

Prvi nasledni poremećaj mehanizma koagulacije, koji je doveden u vezu sa trombofilijom, zasnivao se na deficijenciji antitrombina (AT), a opisan je od strane Egeberga (1965). Do deficijencije antitrombina dolazi usled mutacija u genu *SERPINC1*. Osamdesetih godina prošlog veka opisane su mutacije koje dovode do deficijencije proteina S i proteina C (Griffin i sar., 1981; Comp i Esmon, 1984). Do deficijencije proteina C dolazi usled mutacija u genu *PROC*, koji kodira protein C, dok se deficijencija proteina S javlja usled mutacija u *PROS1* genu. Otkriće rezistencije na aktivirani protein C (APC) od strane Dalbaka i saradnika (1993) i mutacije G1691A u genu za faktor V (FV Leiden mutacija) od strane Bertine i saradnika (1994), predstavljaju prekretnicu u istraživanju naslednih osnova trombofilije. Mutacija FV Leiden dovodi do zamene aminokiseline arginina, aminokiselinom glutaminom na poziciji 506 (Gln506) u proteinu. Faktor V Gln506 se normalno aktivira trombinom, ali je njegova inaktivacija aktiviranim proteinom C otežana, što dovodi do produženog prokoagulantnog delovanja (Bertina i sar., 1994; Kalafatis i sar., 1994). Produženo delovanje aktiviranog Faktora V dovodi do poremećene hemostazne ravnoteže i pomeranja ka hiperkoagulantnom stanju. Mutacija FV Leiden je najučestalija mutacija kod pacijenata sa trombofilijom, dok je druga po učestalosti genska varijanta u 3' nekodirajućem regionu gena za protrombin (FII

G20210A) (Poort *i sar.*, 1996). Učestalost genske varijante FII G20210A u opštoj populaciji iznosi 1-6%, dok je kod pacijenata sa trombofilijom učestalost 6-18%. Mutacija FV Leiden i FII G20210A varijanta su prisutne kod više od dve trećine pacijenata sa trombofilijom (Marz *i sar.*, 2000).

Među genskim varijantama koje dovode do poremećaja fibrinolitičkog sistema, najveći značaj ima 4G/5G varijanta u promotoru PAI-1 gena, koja indukuje povećanje ekspresije PAI-1 proteina, a samim tim i povećanu inhibiciju fibrinolize, što u krajnjoj liniji rezultira hiperkoagulacijom (Burzotta *i sar.*, 1998).

Razvoj novih tehnologija, poput DNK sekvenciranja, omogućio je analizu velikog broja gena i identifikaciju novih potencijalnih faktora rizika kod pacijenata sa trombofilijom. Velika GWAS studija (*Genome-Wide Association Study*), koja je obuhvatila analizu 317 000 SNPova (*Single Nucleotide Polymorphisms*) kod 453 pacijenata sa venskim tromboembolizmom pokazala je jasnu udruženost samo tri genske varijante: jedne u genu za faktor V i dve u genima koji determinišu ABO krvni sistem. Prema ovoj studiji, FV Leiden mutacija predstavlja najveći rizik za venski tromboembolizam, dok krvne grupe O i A2 (homozigoti za A krvnu grupu) predstavljaju manje faktore rizika. Druge detektovane varijante mutacija nisu pokazale statistički značajno veću učestalost kod pacijenata sa trombozama (Trégouët *i sar.*, 2009).

S obzirom da su tromboze multifaktorijalno oboljenje, od velikog je značaja ispitati uticaj prisustva dve ili više genskih varijanti, njihove međusobne interakcije, kao i interakcije genskih varijanti sa sredinskim faktorima. Pacijenti koji su kombinovani heterozigoti za FV Leiden mutaciju i FII G20210A imaju 2,6 puta veći rizik za nastanak tromboza nego nosioci samo FV Leiden mutacije (De Stefano *i sar.*, 2001). Iako je opisan veliki broj genskih varijanti, u dijagnostici trombofilije najčešće se koristi utvrđivanje prisustva deficita antitrombina (AT), deficita proteina C i proteina S, mutacija FV Leiden, mutacija protrombina (FII G20210A), mutacija gena za enzim metilentetrahidrofolat reduktazu C677T (MTHFR) i mutacija inhibitora plazminogen aktivatora (PAI-1) (Franchini, 2014).

1.4.2. TROMBOFILIJU U TRUDNOĆI

Trudnoća je sama po sebi hiperkoagulabilno stanje, koje se karakteriše povećanom sintezom i koncentracijom fibrinogena, povećanjem koncentracije mnogih faktora koagulacije i PAI-1, a smanjenjem koncentracije proteina S, pojavom rezistencije na aktivirani protein C i smanjenjem procesa fibrinolize. Sve ukupno navedeno povećava rizik od nastanka venskog tromboembolizma i embolije pluća u toku trudnoće (James, 2011). Do promena hemostatskog sistema u trudnoći, u smeru hiperkoagulabilnosti, dolazi usled hormonskih promena u trudnoći. Venske tromboembolije su jedan od vodećih uzroka mortaliteta majke, sa učestalošću od 0.76 do 1.72 na 100 000 trudnoća, što je četiri puta više nego kod žena koje nisu trudne (Sparić i sar., 2013). Sam reproduktivni uspeh umnogome zavisi od adekvatne materinsko-fetalne cirkulacije. Proces intravaskularne koagulacije na nivou uterusu i placente može biti značajan faktor ponovljenih gubitaka ploda, intrauterine smrti ploda, intrauterinog zastoja u rastu i razvoju ploda, preeklampsije i abrupcije placente (Lykke, 2012). Nastanak krvnih ugrušaka u samom plodu zavisi od interakcije koagulacijskih faktora koje proizvodi embrion, odnosno fetus i koagulacijskih faktora iz majčine krvi, koji mogu da prođu kroz placentalnu barijeru. Smatra se da je raniji gubitak ploda (od 12 do 14 nedelje gestacije) povezan sa majčinom trombofilijom, koja može biti u osnovi promena ključnih procesa implantacije oplođenog jajeta i razvoja placente. Postojanje nasledne ili stečene predispozicije majke za razvoj trombofilije može u najranijem periodu placentacije da dovede do neadekvatne placentacije i pojave mikrotromba u posteljničnim krvnim sudovima (Habibovic i sar., 2011).

U zdravoj trudnoći, trofoblasti vrše invaziju spiralnih arterija uterusu, koje usled toga gube mišićni sloj i postaju šire, što omogućava maksimalni protok krvi kroz placentu (Rodger i sar., 2014). U patološkim uslovima placentacije ne dolazi do invazije spiralnih arterija uterusu trofoblastima, a samim tim ni do povećanja lumena ovih krvnih sudova (Rodger i sar., 2014). Literaturni podaci pokazuju da su endotelijalna disfunkcija, vazokonstrikcija, placentalna ishemija i povećana koagulabilnost udružene sa abnormalnim razvojem posteljice, neadekvatnom feto-materinskom cirkulacijom i smanjenjem placentalne perfuzije (Lykke i sar., 2012). Trombotska priroda vaskularnih

lezija u placenti i povišen rizik za nastanak tromboze kod trudnica sa trombofilijom ukazuju na vezu između urođene i stečene trombofilije sa komplikacijama u trudnoći. Sekundarna tromboza, nastala usled hiperkoagulabilnosti krvi majke, može izazvati neadekvatnu perfuziju interviloznih prostora, preeklampsiju, infarkte posteljice, IUGR, abrupciju i intrauterinu smrt ploda (*Rodger i sar.*, 2014). Neadekvatna placentacija i patološke promene na sitnim krvnim sudovima placente mogu narušiti permeabilnost fetomaterinske membrane u interviloznim prostorima placente, koja je neophodna za normalan tok trudnoće i razvoj ploda (*Gris i sar.*, 2004).

Značajnu ulogu u procesu implantacije i placentacije ima hemostatski sistem majke. Implantacija oplođene jajne ćelije u deciduu je prvi kontakt između fetusa, posteljice i materinske cirkulacije. Taj kontakt je ključan za razvoj uspešne trudnoće. Protrombotske promene i tromboza mogu oštetiti taj proces i izazvati rani pobačaj (*Many i sar.*, 2001). Rezultati studije *Rodgera i saradnika* (2014) pokazuju značajno povećanje sincicijalnih čvorova i hipervaskularnih resica kod trudnica sa mutacijom FV Leiden, usled čega je kod ovih trudnica mnogo češća placentalna hipoksija i loša placentalna vaskularizacija.

Abrupcija placente predstavlja svako delimično ili potpuno odlublivanje normalno usađene placente (*Mitić*, 2008). To je akutna i jedna od najtežih komplikacija koja istovremeno ugrožava zdravlje i život kako majke, tako i fetusa. Incidenca abrupcije placente se kreće od 4.9 do 12.9 na 1000 porođaja i predstavlja po učestalosti drugi uzrok perinatalne smrti. Abrupciju placente mogu izazvati udarac, pad, hipertenzija, eklampsija, trombofilija (*Mitić*, 2008). Trombofilija povećava rizik za nastanak abrupcije placente. Posledice abrupcije placente mogu dovesti do pojave: diseminovane intravaskularne koagulopatije, insuficijencije bubrega kao i do vitalne ugroženosti trudnice, narušavanja zdravlja fetusa, prevremenog porođaja i male telesne težine novorođenčeta (*Knoebbl*, 2008; *Habibović i sar.*, 2011).

Intrauterina smrt ploda (*Fetus Mortus in Utero* - FMU) definiše se kao odsustvo srčane radnje ploda nakon 26. nedelje gestacije, odnosno kod ploda čija je telesna težina iznad 1000 grama (*Kim i sar.*, 2014). U kontrolisanoj prospektivnoj studiji, *Preston i saradnici* (1996) su uočili da trudnice koje imaju više od jedne trombofilije imaju veću šansu za intrauterinu smrt ploda (14.4%).

Venski tromboembolizam (VTE) u trudnoći se javlja sa učestalošću od 1 na 1000

porođaja (*Gohil i sar.*, 2009). U odnosu na period van trudnoće, trudnice imaju 4-5 puta povećan rizik za tromboembolijske komplikacije (*Gohil i sar.*, 2009). U Sjedinjenim Američkim Državama, venski tromboembolizam, uključujući i emboliju pluća, uzrok je 9% svih materinskih smrtnosti (*Gohil i sar.*, 2009). Oko 50% svih trudnica sa VTE ima neku od urođenih trombofilija (*Heit i sar.*, 2005, *Robertson i sar.*, 2006). Rizik za VTE je veći u trećem tromesečju graviditeta i nakon porođaja. Šest nedelja nakon porođaja, rizik za nastanak VTE je 20 puta veći nego u toku trudnoće (*Jacobsen i sar.*, 2008).

1.4.2.1. Genetski predisponirane trombofilije

S obzirom da se u osnovi različitih trombofilija nalaze mutacije gena, moguće je utvrditi prisustvo dve ili više mutacija kod jedne trudnice sa trombofilijom. Kod trudnica sa trombofilijom, sem udruženog postojanja dve mutacije gena, mogu istovremeno biti izraženi i stečeni faktori rizika. Najčešća klinička manifestacija urođene trombofilije je venski tromboembolizam, koji se obično ispoljava kao tromboza dubokih vene ili kao plućni embolizam. Urođena trombofilija se često prvi put manifestuje u trudnoći (*Rodger i sar.*, 2014). S obzirom da je trudnoća stanje hiperkoagulabilnosti, u kombinaciji sa urođenom ili stečenom trombofilijom dovodi do komplikacija u trudnoći, kao što su ponovljeni spontani pobačaji tokom prvog i drugog tromesečja trudnoće, intrauterina smrt ploda, preeklampsija, težak zastoj u rastu ploda i abrupcija placente (*Rodger i sar.*, 2014).

Deficit antitrombina III (AT III)

Antitrombin III je najznačajniji prirodni inhibitor koagulacije. On je glikoprotein koji se sintetise u jetri, molekulske mase 58 200 daltona. Deficit antitrombina III može biti urođeni ili stečeni poremećaj. Urođeni deficit AT III se nasleđuje autozomno dominantno i u populaciji se javlja u formi heterozigota (*Di Minno i sar.*, 2014). Homozigotni nosioci mutacija nisu kompatibilni sa životom. Deficit AT III klinički se manifestuje trombozom dubokih vena donjih ekstremiteta, a druga, ređa lokalizacija je tromboza vena male

karlice. Stečeni poremećaj deficita AT III može biti: posledica oboljenja jetre, zbog poremećene sinteze AT III u jetri, kod nefrotskog sindroma; zbog pojačanog izlučivanja AT III iz organizma; zbog malignih oboljenja hematopoetskog sistema; zbog diseminovane intravaskularne koagulacije kao posledica infekcije; posledica uzimanja oralnih kontraceptiva; posledica terapije estrogenima (*James i sar.*, 2014). Antitrombin III je primarni inhibitor trombina, ali i nekih drugih faktora koagulacije. Pored toga, AT III sporo i ireverzibilno inhibira i vrlo male količine plazmina. Deficit AT III je najređa i najtrombogenija trombofilija sa učestalošću od 1 na 5000 osoba (*James i sar.*, 2014).

Postoje dva tipa deficita AT III. Tip I deficita AT III je najznačajniji i odlikuje se se smanjenom koncentracijom antitrombina (< 50%) u krvi. Vrednosti AT III se menjaju tokom trudnoće. Referentne vrednosti koncentracije AT III za prvo tromesečje trudnoće iznose od 89% do 114%; za drugo tromesečje od 88% do 112%; za treće tromesečje od 82 do 116% (*Abbasi-Ghanavati i sar.*, 2009). Kod II tipa deficita AT III, vrednosti koncentracije AT III su referentne ali je smanjena njegova aktivnost (*Gerhard i sar.*, 2000).

Antitrombin III je substrat za vezivanje heparina, koji njegovu aktivnost povećava 1000 puta. U odsustvu AT III, heparin ne može da deluje (*James i sar.*, 2014). Deficit AT III ima najveći rizik od svih trombofilija za razvoj venskog tromboembolizma u trudnoći. Venski tromboembolizam se najčešće javlja u puerperijumu i može se manifestovati plućnom embolijom. Sve trudnice koje pre trudnoće nisu imale VTE, imaju rizik od 33% za razvoj VTE u trudnoći (*Kovac i sar.*, 2011). Rizik za recidiv VTE u trudnoći je 49% (*Kovac i sar.*, 2011). U odnosu na druge urođene trombofilije, trudnice sa deficitom AT III imaju blago povećan rizik za intrauterinu smrt ploda (5.2%) i spontane pobačaje (1.7%) (*Kovac i sar.*, 2011).

Mutacija faktora V Leiden (FV G1691A)

Mutacija faktora V Leiden je autozomno dominantno hemostatsko oboljenje (*Spina i sar.*, 2000). Ovaj poremećaj nastaje zbog zamene guanina 1691 sa adeninom (G1691A) u genu za faktor V (FV). Novonastali gen kodira sintezu FV tip Leiden u kome

je arginin 506 (Arg506) zamenjen glutaminom (Gln506), pa kao posledica toga faktor V postaje otporan na delovanje aktiviranog proteina C. Faktor V Leiden je najčešća trombofilija u našoj populaciji, a njena učestalost je oko 5% (*Spina i sar.*, 2000). Duboka venska tromboza je najčešća komplikacija venskog tromboembolizma, koja najčešće zahvata donje ekstremitete. Mutacija FV Leiden je prisutna kod 15-50% pacijenata sa venskom trombozom. Žene koje su heterozigoti za ovu mutaciju najčešće nemaju simptome trombofilije van trudnoće. U trudnoći je kod njih rizik za nastanak duboke venske tromboze povećan 3 do 7 puta (*Spina i sar.*, 2000). Kod trudnica koje su homozigoti za ovu mutaciju, rizik za nastanak duboke venske tromboze je veći za 80 do 90 puta u odnosu na trudnice koje nisu nosioci ove mutacije (*Spina i sar.*, 2000). U trudnoći je kod nosioca ove mutacije 2 do 3 puta povećan rizik za komplikacije u trudnoći i nastanak intrauterine smrti ploda, preeklampsije, intrauterinog zastoja u rastu ploda i abrupcije placente (*Dorđević i sar.*, 2005).

Rezultati meta analize *Rey i saradnika* (2003) pokazuju da trudnice sa FV Leiden mutacijom imaju značajno veći rizik za ponovljene spontane pobačaje tokom prvog tromesečja trudnoće, kao i za gubitak ploda tokom drugog i trećeg tromesečja trudnoće. Rezultati dobijeni u manjoj prospektivnoj studiji pokazuju da je kod trudnica, heterozigotnih nosilaca za ovu mutaciju, incidenca spontanih pobačaja 11%, dok je kod trudnica bez mutacije 4.2% (*Murphy i sar.*, 2000). *Howley i saradnici* (2005) su pokazali da FV Leiden mutacija kod trudnica povećava rizik 3 do 4 puta za intrauterin zastoje u rastu ploda.

Mutacija FII G20210A

Uz FV Leiden mutaciju, G20210A mutacija u genu za protrombin (FII), predstavlja najčešći genetički faktor rizika za nastanak venskih tromboza. *Poort i saradnici* (1996) su prvi opisali tačkastu mutaciju gena za protrombin, koja se karakteriše zamenom guanina u adenzin na poziciji 20210. Usled ove zamene povećava se ekspresija gena za protrombin, što se manifestuje povećanom koncentracijom protrombina u krvi (*Lykke i sar.*, 2012). Zastupljenost ove mutacije u heterozigotnom stanju iznosi oko

2% u opštoj populaciji, 6% kod osoba sa venskom trombozom i 18% kod pacijenata koji imaju pozitivnu porodičnu anamnezu. Heterozigotni nosioci G20210A mutacije imaju od 3 do 6 puta veći rizik za nastanak tromboze, pogotovo tromboze cerebralnih vena (*Colman i sar.*, 2006). S obzirom na malu učestalost homozigota u opštoj populaciji, ne postoje tačni podaci o riziku za razvoj duboke venske tromboze kod homozigota za G20210A mutaciju (*Colman i sar.*, 2006; *Heit*, 2012). Ukoliko je mutacija prisutna u kombinaciji sa FV Leiden mutacijom, rizik za vensku trombozu se povećava do 40 puta. Kod žena koje uzimaju oralnu kontracepciju, rizik za vensku trombozu se povećava do 60 puta. Povišen protrombin u cirkulaciji smanjuje fibrinolizu i snižava nivo trombin-aktivirajućeg inhibitora koji inhibira fibrinolizu (*Heit*, 2012).

Trudnice sa mutacijom FII imaju veći rizik za nastanak komplikacija u trudnoći kao što su: rani pobačaji, ponovljeni pobačaji i iznenadna intrauterina smrt ploda u trećem trimestru trudnoće (*Ho i sar.*, 2006; *Rodger i sar.*, 2014).

Deficit proteina C

Protein C je vitamin K-zavisni protein koji se sintetise u jetri i njegova sinteza je pod kontrolom gena na 2 hromozomu (2q15-16) (*Knoebl*, 2008). Ovaj protein ima ulogu u zaustavljanju procesa koagulacije i stimulaciji procesa fibrinolize (*Mitić*, 2008). Deficit proteina C se javlja kod 1 na 250 do 500 zdravih osoba. Kod pacijenata sa trombozom, učestalost deficita proteina C je od 2 do 8% (*Francis*, 2003).

Deficit proteina C nasleđuje se autozomno dominantno. Pacijenti koji su rođeni kao homozigoti za deficit proteina C imaju težak oblik tromboze poznat kao *purpura fulminans*, koja se manifestuje u najranijem uzrastu (*Guyton i Hall*, 2000). Deficit proteina C klinički se manifestuje kao tromboza dubokih vena donjih ekstremiteta. Plućnu tromboemboliju ima 40% ljudi u opštoj populaciji sa deficitom proteina C. Normalna koncentracija proteina C kod odraslih je od 70 do 130%, a kod novorođenčadi od 20 do 40%. Postavljanje dijagnoze deficita proteina C može biti otežano prisustvom drugih kliničkih stanja, kao što su oboljenja jetre, deficit vitamina K i akutni respiratorni distress sindrom. Trudnice sa deficitom proteina C imaju veći rizik za nastanak komplikacija u

trudnoći kao što su: ponovljeni pobačaji u drugom tromesečju trudnoće usled tromboze krvnih sudova placente i insuficijencije placentarne cirkulacije; intrauterin zastoj u rastu fetusa; iznenadna intrauterina smrt ploda; preeklampsija i prevremeni porođaj (*Brener i sar.*, 1997; *Brener i Blumenfeld*, 1997).

Deficit proteina S

Deficit proteina S je retka trombofilija sa učestalošću od 1 na 500 do 1 na 3000 ljudi (*Knoebl*, 2008). Ovaj deficit se nasleđuje autozomno dominantno, a mutacija u formi homozigota izaziva *purpuru fulminans* (*Marlar i Gausman*, 2011). Protein S je vitamin K-zavisni prirodni antikoagulantni protein. Ima ulogu kofaktora u procesu aktivacije faktora koagulacije V i VII od strane proteina C. Do sada su opisana tri tipa deficita proteina S:

- Tip I je kvantitativni deficit proteina S uzrokovan genskom abnormalnošću koja izaziva smanjenu produkciju strukturno normalnog proteina. U tom slučaju smanjene su koncentracije ukupnog i slobodnog proteina S.
- Tip II je funkcionalni deficit proteina S, koji postaje evidentan tek kod postojanja rezistencije na aktivirani protein C.
- Tip III se karakteriše smanjenom koncentracijom slobodnog proteina S, dok je vrednost ukupnog proteina S normalna (*Knoebl*, 2008). Trudnice sa ovom trombofilijom su heterozigoti za ovu mutaciju i imaju veliki rizik za razvoj venskog tromboembolizma (*Greer*, 2003).

Mutacija MTHFR C677T

Mutacija MTHFR C677T dovodi do sinteze termolabilnog oblika proteina i njegove manje enzimske aktivnosti, usled čega je smanjena konverzija homocisteina u metionin (*Fodinger i sar.*, 2000). Kod homozigotnih nosilaca mutacije MTHFR C677T, koji unose manju količinu folne kiseline, može da se razvije hiperhomocisteinemija i

povećava se mogućnost za nastanak tromba. Primenom folne kiseline i vitamina B6 i B12 mogu se smanjiti rizici za nastanak dubokih venskih tromboza i komplikacije u trudnoći (*El-Samak i sar.*, 2004). Mutacija MTHFR C677T je sa velikom učestalošću prisutna u populaciji (30-50% heterozigotnih nosilaca i oko 9-12% homozigotnih nosilaca) (*El-Samak i sar.*, 2004).

Mutacija inhibitora plazminogen aktivatora – PAI 1

Inhibitor plazminogen aktivatora PAI je glikoprotein i glavni inhibitor fibrinolize, koga proizvode vaskularni endotel, glatke mišićne ćelije, monociti i trombociti (*Mosesson i sar.*, 2008). Normalna trudnoća se karakteriše smanjenom fibrinolizom, što je posledica povećane koncentracije inhibitora fibrinolize, pre svega PAI-1 (*Mosesson i sar.*, 2008). Ovaj inhibitor inhibira tkivni plazminogen aktivator i urokinazni plazminogen aktivator, usled čega se smanjuje pretvaranje plazminogena u plazmin (*Floridon i sar.*, 2000). Uloga plazmina je da razgrađuje fibrin i ugruške (*Mosesson i sar.*, 2008).

Polimorfizam 4G podrazumeva deleciju ostatka guanina lociranog na promotor gena za PAI-1 na hromozomu 7q (*Kathiresan i sar.*, 2005). Ovaj polimorfizam ne utiče na strukturu i funkciju gena, ali povećava njegovu ekspresiju što dovodi do porasta nivoa PAI-1 u cirkulaciji (*Kathiresan i sar.*, 2005).

Pokazano je da je mutacija PAI 4G/4G bila značajno učestalija kod trudnica sa komplikacijama u trudnoći (32%) u odnosu na zdrave trudnice (19%) (*Glueck i sar.*, 2001). *Wiwantki* (2006) je uočio da mutacija PAI-1 4G/5G značajno povećava rizik za nastanak preeklampsije. Heterozigotna mutacija PAI je češće udružena sa heterozigotnom FV Leiden mutacijom (*Glueck i sar.*, 2001).

1.4.2.2. Stečene trombofilije

Stečene trombofilije predstavljaju stanje stečene hiperkoagulabilnosti različite etiologije. Najčešća stečena trombofilija je antifosfolipidni sindrom (APS). Antifosfolipidni sindrom podrazumeva prisustvo barem jednog od kliničkih i

laboratorijskih znakova. Klinički znakovi su: ponovljene tromboze; jedan ili više gubitaka trudnoće nakon desete nedelje graviditeta; jedan ili više porođaja pre 34. nedelje graviditeta indukovanih preeklampsijom, eklampsijom ili placentnalnom insuficijencijom; tri ili više spontanih pobačaja pre 10. nedelje graviditeta, koji nisu praćeni hormonskim ili anatomskim anomalijama majke niti prisustvom strukturnih ili numeričkih hromozomskih aberacija. Laboratorijski znakovi su: pozitivan lupus antikoagulans (LAC) u dva merenja sa razmakom od 12. nedelja između merenja; prisustvo povišenih vrednosti antikardiolipinskih (ACA) i anti-beta2-glikoproteinskih antitela (antiβ2GP-1) IgG i IgM. U odnosu na kliničku sliku razlikuju se primarni i sekundarni APS. Primarni APS nastaje kao izolovan fenomen bez jasnih kliničkih znakova neke druge bolesti i javlja se u 50% slučajeva. Sekundarni APS je udružen sa različitim patološkim oboljenjima. Najčešća oboljenja sa kojima je udružen APS su autoimunske bolesti, kao što su: sistemski eritemski lupus, reumatoidni artritis, sistemska skleroza, psorijatični artritis, vaskulitis i dr. (*Husar i Delmiš, 2008; Lykke i sar., 2012; Fatemeh i sar., 2013*).

Klinička manifestacija trombofilije u trudnoći može biti i posledica udruženog delovanja naslednih i stečenih poremećaja faktora VIII, hiperhomocisteinemije i rezistencije na aktivirani protein C (*Husar i Delmiš, 2008*).

1.5. OKSIDACIONI STRES

Oksidacioni stres predstavlja poremećaj ravnoteže oksidaciono-redukcionih procesa u ćeliji, a nastaje zbog prekomernog stvaranja slobodnih radikala i/ili smanjenog antioksidacionog zaštitnog kapaciteta ćelije. Slobodni radikali ili reaktivne vrste su atomi, molekuli ili joni koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u spoljašnjem elektronskom omotaču (*Gilbert, 2000*). Zbog nesparenih elektrona veoma su nestabilni i veoma reaktivni. Usled težnje da postignu elektronsku stabilnost, slobodni radikali reaguju sa susednim molekulima i oksiduju ih. Ove reakcije rezultiraju strukturnim i funkcionalnim oštećenjima biomolekula i/ili promenom signalne transdukcije i ekspresije gena, što vodi ka razvoju brojnih patoloških procesa u organizmu (*Halliwell, 1994*). U

zavisnosti od vrste atoma ili molekula od koga nastaju, razlikuje se više vrsta slobodnih radikala: reaktivne vrste kiseonika (*Reactive Oxygen Species* - ROS), reaktivne vrste azota (*Reactive Nitrogen Species* - RNS), reaktivne vrste hlora (*Reactive Chlorine Species* - RCS), reaktivne vrste broma (*Reactive Bromine Species* - RBS) i reaktivne vrste sumpora (*Reactive Sulfur Species* - RSS) (*Halliwell i Gutteridge, 2007*).

Najznačajnije vrste slobodnih radikala u živim sistemima su reaktivne vrste kiseonika i reaktivne vrste azota. Reaktivne vrste kiseonika i reaktivne vrste azota, stvaraju se u ćeliji tokom normalnih metaboličkih procesa biosinteze, biodegradacije i biotransformacije. Ukoliko je produkcija reaktivnih vrsta kiseonika i reaktivnih vrsta azota nekontrolisana i premašuje antioksidacioni kapacitet ćelije, dolazi do razvoja oksidacionog stresa u ćeliji. U uslovima oksidacionog stresa dolazi do oksidacije membranskih lipida, ćelijskih proteina i DNK. Interakcija reaktivnih vrsta kiseonika i reaktivnih vrsta azota sa strukturnim komponentama ćelije može da dovede do formiranja novih citotoksičnih reaktivnih vrsta, pa čak i do ćelijske smrti (*Halliwell i Gutteridge, 1985*).

U stanju povećane produkcije reaktivnih vrsta kiseonika i azota aktiviraju se zaštitni antioksidacioni mehanizmi ćelije. Sistem zaštite od oksidacionih oštećenja sastoji se od primarne i sekundarne antioksidacione zaštite (*Cadenas, 1989*). Primarna antioksidaciona zaštita obuhvata enzimske i neenzimske komponente antioksidacionog zaštitnog sistema (AOS), koje su aktivne u uslovima normalne i povećane produkcije reaktivnih vrsta kiseonika i reaktivnih vrsta azota. Sekundarna antioksidaciona zaštita obuhvata protein specifične oksidoreduktaze (tiol-transferaza, protein-ADP-ribozil-transferaza, ATP i Ca^{2+} nezavisna proteaza), koje učestvuju u popravci oksidacionih oštećenja biomolekula (*Štajn i sar., 2007*).

Produkovane u fiziološkim uslovima, reaktivne vrste kiseonika i reaktivne vrste azota ostvaruju brojne fiziološke uloge u međućelijskoj komunikaciji, normalnom rastu ćelija, u apoptozi i ćelijskom starenju, u sintezi esencijalnih bioloških jedinjenja, u indukciji migracije leukocita i antimikrobnoj aktivnosti fagocita itd. Pored mitohondrija, značajni izvori reaktivnih vrsta kiseonika u ćeliji su peroksizomi, mikrozomi, endoplazmatični retikulum i ćelijska membrana. Reaktivne vrste kiseonika se proizvode u gotovo svim ćelijama organizma delovanjem nefagocitne izoforme NADPH oksidaze (*Dröge, 2002; Halliwell, 2006*).

1.5.1. Reaktivne vrste kiseonika (ROS)

U ćelijama aerobnih organizama, u toku metaboličkih procesa, najveći deo molekuskog kiseonika se redukuje do vode. Na unutrašnjoj membrani mitohondrija, u procesu oksidativne fosforilacije, svaki molekul kiseonika veže 4 elektrona:



Tokom ovog procesa na svakih 25 molekula kiseonika, koji se redukuju u normalnom metabolizmu, stvara se jedan slobodni radikal (*Banerjee i sar., 2003*). Reaktivne vrste kiseonika predstavljaju klasu slobodno radikalskih i neradikalskih reaktivnih vrsta kiseonika (Tabela 1) (*Halliwell i Whiteman, 2004*).

Tabela 1. Reaktivne vrste kiseonika (*Halliwell i Whiteman, 2004*).

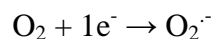
Slobodni radikali	Neradikalske reaktivne vrste
Superoksid anjon radikal (O_2^-)	Hidrogen peroksid (H_2O_2)
Hidroksil radikal (OH^\cdot)	Singlet kiseonik (O_2^1)
Hidroperoksil radikal (HO_2^\cdot)	Peroksinitrit (ONOO^-)
Peroksil radikal (RO_2^\cdot)	Peroksinitritna kiselina (ONOOH)
Alkoksil radikal (RO^\cdot)	Organski peroksidi (ROOH)
Karbonantni radikal (CO_3^-)	Hipohlorna kiselina (HOCl)
Ugljen dioksid (CO_2^-)	Hipobromna kiselina (HOBr)
	Ozon (O_3)

Izvori nastanka ROS mogu biti endogenog (ksantin-oksidaza, oksidaze, makrofage) ili egzogenog porekla (radioaktivno zračenje, duvanski dim, lekovi, pesticidi). Od reaktivnih oblika kiseonika najznačajniji su: superoksid anjon radikal, hidroksil radikal i vodonik peroksid (*Halliwell, 2001*).

Značajni izvori ROS u ćeliji su, pored mitohondrija, peroksizomi, mikrozomi, endoplazmatični retikulum i ćelijska membrana (Dröge, 2002; Halliwell, 2006). U skoro svim ćelijama, delovanjem nefagocitne izoforme NADPH oksidaze, produkuju se ROS. Reaktivne vrste kiseonika imaju značajnu ulogu kao regulatorni posrednici u procesima signalizacije u različitim ćelijama, kao što su: fibroblasti, endotelne ćelije, miocite, tireoidne ćelije, vaskularne glatke mišićne ćelije. Važnu ulogu ROS imaju u procesu aktivacije imunskog odgovora i regrutovanju ćelija imunskog sistema (Gordon, 2003).

1.5.1.1. Superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$)

Superoksid anjon radikal nastaje jednoelektronskom redukcijom molekuskog kiseonika.



Glavno mesto stvaranja $O_2^{\cdot-}$ u ćeliji su kompleks I (NADH dehidrogenaza) i kompleks III (citohrom *c* reduktaza) respiratornog lanca mitohondrija. Kompleks I je multiproteinski kompleks, koji oksiduje NADH koristeći koenzim Q kao akceptor elektrona, dok kompleks III oksiduje koenzim Q, a kao akceptor elektrona koristi citohrom *c*. Tokom ovih reakcija dolazi do nastanka $O_2^{\cdot-}$. Delovanjem kompleksa I, stvoreni $O_2^{\cdot-}$ dospeva isključivo u matriks mitohondrija, dok pod dejstvom kompleksa III nastali $O_2^{\cdot-}$ dospeva i u matriks mitohondrija i u citosol ćelije (Andreyev *i sar.*, 2005).

Određene količine $O_2^{\cdot-}$ nastaju i pod dejstvom enzimskih sistema, kao što su peroksizomalna ksantin-oksidaza i membranski vezana NADPH-oksidaza (Buonocore *i sar.*, 2010). NAD(P)H oksidaza koristi NADH i NADPH kao kofaktore (Griendling *i sar.*, 2000). Optimalnom aktivnošću produkuje fiziološke koncentracije $O_2^{\cdot-}$, koje imaju značajnu ulogu u kontroli ventilacije, produkciji eritropoetina, relaksaciji glatke muskulature, signalnoj transdukciji preko membranskih receptora i aktivaciji imunoloških funkcija (Dröge, 2002; Dumitru *i sar.*, 2007).

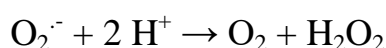
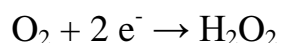
Drugi izvori $O_2^{\cdot-}$ u ćelijama su ksantin dehidrogenaza i njegoa modifikovana forma ksantin oksidaza (Meneshian *i Bulkley*, 2002). Kao akceptor elektrona, ksantin

dehidrogenaza koristi NAD^+ , dok ksantin oksidaza redukuje kiseonik do O_2^- . Povećana aktivnost ovog enzima nastaje u uslovima hipoksije, ishemije i inflamacije (Granger, 1988). Kod inflamacije, bakterijskih infekcija i u tumorskim ćelijama, interleukini stimulišu aktivnost fagocita koji proizvode veliku količinu O_2^- preko fagocitne izoforme NADPH oksidaze (Griendling i sar., 2000, Dröge, 2002). Superoksid anjon radikal nastaje i pri autooksidaciji flavina, pterina, kateholamina, kao i delovanjem spoljašnjih agenasa, poput zračenja i citostatika (Fang i sar., 2002).

Superoksid anjon radikal po hemijskom sastavu predstavlja slabu kiselinu, a pravac reaktivnosti zavisi od toga da li se reakcija odvija u vodenoj sredini ili u organskom medijumu, u kojem je stabilniji. Ovaj radikal retko sam izaziva veća oštećenja ćelija, jer ne prolazi kroz lipide ćelijske membrane. Međutim, brzo dismutira delovanjem enzima superoksid dismutaze, pri čemu nastaje H_2O_2 , koji u prisustvu jona gvožđa (Fe^{2+}) i jona bakra (Cu^{2+}) daje visoko reaktivni hidroksil radikal (OH^\cdot), koji lako difunduje do drugih struktura u ćeliji i oštećuje ih (Liu i Hotchkiss, 1995; Hensley i sar., 1996; Gebicki, 1997; Dröge, 2002).

1.5.1.2. Vodonik peroksid (H_2O_2)

Vodonik peroksid je najstabilniji međuproizvod redukcije kiseonika jer nema nesparenih elektrona (Halliwell, 2000). Nastaje direktno dvoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika, jednoelektronskom redukcijom superoksid anjon radikala ili njegovom konverzijom u reakciji katalizovanoj superoksid dismutazom. Delovanjem enzima katalaze ili glutacion peroksidaze redukuje se do vode (Halliwell, 2000; Dröge, 2002).



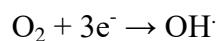
U fiziološkim uslovima H_2O_2 se sintetise u peroksizomima, mitohondrijama, mikrozomima, endoplazmatičnom retikulumu i ćelijskoj membrani (Halliwell, 2000).

S obzirom da peroksizomi produkuju najveće količine H₂O₂, karakterišu se i visokom aktivnošću katalaze, koja štiti ćelije od oksidacionog oštećenja posredovanog H₂O₂ (Halliwell, 2000). Vodonik peroksid ima značajnu ulogu u međućelijskom prenosu signala posredstvom aktivacije EFG-receptornog, tirozin kinaznog, insulin-receptor kinaznog i protein kinaznog transkripcionog sistema (Dröge, 2002). Ekstracelularno oslobođen H₂O₂ deluje baktericidno i učestvuje u aktiviranju antigen indukovano imunog odgovara (Storz i sar., 1990).

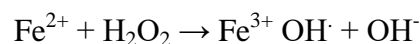
Štetno delovanje H₂O₂ ispoljava na nivou ćelijske membrane i unutarćelijskih struktura, gde indukuje lipidnu peroksidaciju i disfunkciju mitohondrija (Caro i Cederbaum, 2006; Ricci i sar., 2008). Vodonik peroksid prolazi kroz membranu jedra i oštećuje DNK molekul (Halliwell, 2000; Dröge, 2002). U Fentonovoj reakciji, H₂O₂ u prisustvu jona metala gvožđa (Fe²⁺) i/ili jona bakra (Cu⁺) formira visokotoksični hidroksi radikal OH[·] (Dröge, 2002; Valko i sar., 2007). U prisustvu metala može da reaguje i sa O₂^{·-} (Haber-Weiss-ova reakcija), pri čemu takođe nastaje OH[·] (Dröge, 2002; Halliwell i Gutteridge, 2006).

1.5.1.3. Hidroksil radikal (OH[·])

U procesu ćelijskog metabolizma OH[·] nastaje troelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika:



U uslovima oksidacionog stresa, može nastati iz H₂O₂ u prisustvu jona metala gvožđa (Fe²⁺) i/ili jona bakra (Cu⁺) (Fentonova reakcija). Takođe, može nastati i u Haber-Weiss-ovoj reakciji H₂O₂ i O₂^{·-} (Dröge, 2002; Halliwell i Gutteridge, 2006).



Hidroksil radikal je izuzetno reaktivan i ima poluživot od oko 10⁻⁹ sekundi, što ga čini sposobnim za brzu reakciju sa gotovo svim ćelijskim organskim molekulima.

Toksični efekti OH[•] u ćeliji zasnivaju se na njegovoj sposobnosti da oksiduje masne kiseline i pokrene lančanu reakciju lipidne peroksidacije u ćelijskim membranama, pri čemu nastaju lipidni hidroperoksidi, koji dovode do destrukcije i disfunkcije ćelijske membrane. Pokretanjem lančanih reakcija u interakciji sa ćelijskim biomolekulima, indukuje stvaranje različito reaktivnih sekundarnih slobodnih radikala (*Dröge, 2002; Halliwell i Gutteridge, 2006*).

Štetni efekti OH[•] u ćeliji mogu da se preveniraju aktivnošću katalaze i glutation peroksidaze, ali i aktivnošću superoksid dismutaze, koja onemogućava *Haber-Weiss*-ovu reakciju (*Halliwell i Gutteridge, 2006*).

1.5.2. AZOT MONOKSID I REAKTIVNE VRSTE AZOTA (RNS)

1.5.2.1. Azot monoksid (NO)

Azot monoksid (*Nitric Oxide* - NO) je bezbojan gas na sobnoj temperaturi i pri normalnom atmosferskom pritisku, sa maksimalnom rastvorljivošću sličnom kao i kod kiseonika. U organizmu učestvuje u regulaciji mnogih ćelijskih funkcija. Azot monoksid je mali, nepolaran, visoko difuzibilan signalni molekul, koji pripada grupi slobodnih radikala jer ima jedan nespareni elektron (*Ignarro, 2000*).

Azot monoksid se sintetiše iz aminokiseline L-arginina u prisustvu O₂ i NADPH, delovanjem enzima sintaza azot monoksida (*Nitric Oxide Synthase* - NOS). Postoje tri izoforme enzima NOS: neuralna (nNOS; tip I) (*Bredt i sar., 1991*), inducibilna (iNOS; tip II) (*Xie i sar., 1992*) i endotelna (eNOS; tip III) (*Lamas i sar., 1992*). U zavisnosti od toga da li NOS katalizuju produkciju malih ili velikih količina NO, razlikujuse se dve funkcionalne klase: konstitutivna NOS (cNOS), kojoj pripadaju nNOS i eNOS, a karakterišu se konstantnom produkcijom malih količina NO i inducibilna NOS (iNOS), čija se aktivnost indukuje inflamatornim faktorima, a katališe produkciju velikih količina NO (i do 1000 puta većih u odnosu na cNOS) (*Stuehr, 1999*).

Aktivnost cNOS je zavisna od intraćelijske koncentracije Ca²⁺. Neuralna NOS

aktivna je samo u ćelijama mozga i perifernog nervnog sistema, dok je eNOS aktivna samo u ćelijama endotela. Aktivnost iNOS može biti indukovana u fibroblastima, epitelu, hepatocitima, hondrocitima, kardiomiocitima, makrofagima, endotelnim i glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova (Wang i sar., 1999). Ekspresija iNOS regulisana je na transkripcionom i posttranslacionom nivou signalnim inflamatornim molekulima (Mac Micing i sar., 1997). Aktivnost NOS, zavisi od raspoloživosti arginina, njegovog transporta i potrošnje unutar ćelije (Wu i sar., 1998; El-Gayar i sar., 2003).

Azot monoksid je uključen u različite fiziološke i patofiziološke procese u organizmu. U fiziološkim uslovima se primarno sintetiše u endotelnim ćelijama krvnih sudova, centralnom i perifernom nervnom sistemu. U uslovima inflamacije produkuju ga ćelije imunskog sistema (Lipton, 1999; Moncada i Higgs, 2006).

Azot monoksid je otkriven kao faktor relaksacije krvnih sudova poreklom iz endotela (Murad i sar., 1987; Ignaro i sar., 1988; Furchgott i Vanhoutte, 1989; Moncada i Higgs, 2006). Ima važnu fiziološku ulogu u održavanju krvnog pritiska, inhibiciji adhezije leukocita, agregaciji i adheziji trombocita, u regulaciji ekspresije inhibitora aktivatora plazminogena 1 (PAI-1), kao i u ulozi signalnog molekula u centralnom i perifernom nervnom sistemu (Lipton, 1999; Moncada i Higgs, 2006). Značajna produkcija NO se zapaža u jetri, posebno u uslovima endotoksičnog i hemoragijskog šoka, hepatitisa ili sepse. Azot monoksid ima značajnu ulogu u funkcionisanju imunskog sistema, razvoju inflamacije, nastanku bola, indukciji oštećenja pojedinih tkiva, inhibiciji sekrecije insulina i indukciji apoptoze (Lipton, 1999; Moncada i Higgs, 2006). Utiče na funkciju mitohondrija kroz interakciju sa citohrom *c* oksidazom, što rezultira pokretanjem brojnih intraćelijskih događaja uključujući i stvaranje ROS (Kozlov i sar., 1999; Larsen i sar., 2007; Shiva i sar., 2007; van Faassen i sar., 2009).

Mehanizam delovanja i bioreaktivnost NO

Azot monoksid kao veoma reaktivni slobodni radikal ima kratak poluživot (10^{-9} sekundi) i brzo reaguje sa drugim molekulima (Alderton i sar., 2001; Nathan i Xie, 1994; Albrecht i sar., 2003). Može delovati unutar ćelije u kojoj je sintetisan ili difunduje u susedne ćelije, gde stupa u interakciju sa brojnim ciljnim molekulima, poput kiseonika,

drugih slobodnih radikala, proteina sa tiol-grupom i metalima (Nathan, 1992). Svoje biološke efekte, NO ostvaruje na dva različita načina:

- I posredstvom aktivacije guanilat ciklaze, koja stimuliše produkciju cikličnog guanozin monofosfata (cGMP), koji zatim aktivira protein kinazu G (PKG) i fosfodiesteraze regulisane cGMP-om, čijim delovanjem se smanjuje intraceljska koncentracija Ca^{2+} (Ignarro i sar., 1988; Mizuno i sar., 2008; Ding i sar., 2009).
- II posredstvom aktivacije adenilat ciklaze, koja stimuliše produkciju cikličnog adenozin monofosfata (cAMP) (Villa-Petrof i sar., 1999).

Biodostupnost NO je od ključnog značaja za ostvarivanje njegovih bioloških funkcija unutar živih sistema. Kiseonik i ROS brzo reaguju sa NO pri čemu se formiraju reaktivne vrste azota (RNS) (Tabela 2). Formiranjem RNS dolazi do smanjenja biodostupnosti NO, kao i do nastanka veoma toksičnih reaktivnih vrsta, koje mogu narušiti strukturu i funkciju biomolekula.

Tabela 2. *Reaktivne vrste azota (Halliwell i Whiteman, 2004).*

Slobodni radikali	Neradikalske reaktivne vrste
Azot monoksid ($NO\cdot$)	Azotna kiselina (HNO_2)
Azot dioksid ($NO_2\cdot$)	Nitrozil katjon (NO^+)
	Nitroksil anjon (NO^-)
	Dinitro tetraoksid (N_2O_4)
	Dinitro trioksid (N_2O_3)
	Peroksinitrit ($ONOO^-$)
	Peroksinitritna kiselina ($ONOOH$)
	Nitronium (nitril) katjon (NO_2^+)
	Alkil peroksinitrit ($ROONO$)
	Nitril (nitronium) hlorid (NO_2Cl)

Reaktivne vrste azota mogu da oksiduju, nitriraju i nitroziluju lipide, protein i DNK uzrokujući destrukciju i disfunkciju ovih molekula. U uslovima oksidacionog stresa,

povećana produkcija ROS indukuje smanjenje biodostupnosti NO i formiranje RNS. Brojne patofiziološke promene, kao što su kod kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, inflamacije i kancerogeneze, rezultat su citotoksičnog delovanja RNS i smanjene biodostupnosti NO (*Chazotte-Aubert i sar.*, 1999).

Azot monoksid može da postoji u tri redoks forme: kao slobodni radikal ($\text{NO}\cdot$); nitrozil katjon (NO^+), koji nastaje jednoelektronskom oksidacijom $\text{NO}\cdot$; nitroksil anjon (NO), koji nastaje jednoelektronskom redukcijom $\text{NO}\cdot$ (*Stamler i sar.*, 1992; *Wink i sar.*, 1994). Interakcija NO sa kiseonikom rezultira nastankom nitrita (NO_2^-) (*Wink i sar.*, 1994). Nitriti u aerobnim uslovima reaguju sa kiseonikom i formiraju azot-dioksid radikal ($\text{NO}_2\cdot$), koji je u ravnoteži sa visoko reaktivnim dinitro trioksidom (N_2O_3) i dinitro tetroksidom (N_2O_4). S-nitrozotoli (RSNO) nastaju nitrozacijom cistenil ostataka proteina (S-nitrozacija) dinitro trioksidima (*Stamler i sar.*, 1992). Funkcionišu kao skladišta bioaktivnog NO i imaju važnu ulogu u zaštiti NO od inaktivacije. U fiziološkim uslovima prisutni su u plazmi i ćelijama (*Rassaf i sar.*, 2002). U plazmi, u uslovima oksidacionog stresa formiraju se S- nitrozoalbumini, koji štite NO od aktivacije ROS (*Stamler i sar.*, 1992). Najveća količina biološki aktivnog NO sadržana je u obliku S-nitrozotiola unutar bioloških sistema (*Lima i sar.*, 2010)

Intracelularni NO u malim koncentracijama funkcioniše kao antioksidans i može da prekine lančanu reakciju lipidne peroksidacije. Azot monoksid sa lipidnim radikalima ($\text{L}\cdot$, $\text{LO}\cdot$, $\text{LOO}\cdot$), formira manje reaktivne produkte koji sadrže azot (LONO , LOONO) (*Padmaja i Huie*, 1993). Ovi produkti mogu da se hidrolizuju do LOOH i NO_2^- , čime se umanjuje hemotaksija inflamatornih ćelija (*Boger i sar.*, 1998; *Wink i sar.*, 1994). Zahvaljujući sposobnosti NO da reaguje sa metalnim kompleksima, NO može da inhibira Fenton-ovu reakciju i na taj način spreči formiranje veoma toksičnog $\text{OH}\cdot$ (*Kanner i sar.*, 1991).

1.5.2.2. Peroksinitrit ($\text{ONOO}\cdot$)

Peroksinitrit ($\text{ONOO}\cdot$) je veoma reaktivno i toksično jedinjenje, koje nastaje u reakciji NO i O_2^- (*Fukuto, 1995; Kelm, 1999*). Aktivnost enzima superoksid dismutaze, kao

i reakcija NO sa hem-sadržavajućim jedinjenjima mogu da limitiraju sintezu ONOO⁻ (Traylor i Sharma, 1992). Međutim, kada se NO produkuje u velikim količinama nadmašuje aktivnost superoksid dizmutaze u kompeticiji za O₂⁻ (Wink i Mitchell, 1998; Wolin, 2000).

Peroksinitrit se u biološkim sistemima, pod fiziološkim uslovima primarno nalazi u stabilnom anjonskom obliku (ONOO⁻), dok je 20% u obliku nestabilne peroksinitritne kiseline (ONOOH), koja deluje kao jak oksidans (Radi i sar., 1991; Koppenol i sar., 1992).

Peroksinitrit nema direktnu ulogu u ćelijskoj signalizaciji, ali indirektno, oksidativnom modifikacijom proteina uključenih u signalni put, može da utiče na proces signalizacije (Saran i Bors, 1994; Pacher i sar., 2007). Razlaganjem ONOO⁻ produkuju se OH⁻ i NO₂⁺, koji u međusobnoj interakciji formiraju nitate (Pryor i Squadrito, 1995).

Peroksinitrit reaguje sa različitim biološkim molekulima, kao što su slobodni tioli, lipidi, dezoksiriboza, guanin, metionin i fenoli, indukujući strukturne i funkcionalne promene u ovim molekulima, kao i lančanu reakciju lipidne peroksidacije (Radi i sar., 1991; Lubos i sar., 2008). Oksidacijom različitih klasa lipida (masne kiseline, neutralni lipidi, fosfolipidi, lipofilni antioksidansi i LDL), ONOO⁻ u procesu lipidne peroksidacije produkuje peroksil radikal i indukuje stvaranje konjugovanih diena, malondialdehida, lipidnih peroksida i hidroperoksida, F₂-izoprostana i produkte oksisterola (Radi i sar., 1991; Laskey i Mathews, 1996). Peroksinitrit remeti transport jona kroz ćelijsku membranu posredstvom inaktiviranja jonskih kanala (Na⁺-K⁺-ATP-aze); inhibira respiraciju u mitohondrijama i indukuje poremećaj procesa glikolize posredstvom inaktivacije gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (Bauer i sar., 1992; Hu i sar., 1994; Ishida i sar., 1996). Smanjuje koncentraciju GSH u ćeliji, tako što ga oksiduje do GSSG, čime značajno umanjuje ćelijski antioksidacioni kapacitet (Alvarez i Radi, 2003).

Mnoga patološka stanja, kao što su hipertenzija, hiperlipidemija, dijabetes, kancerogeneza, ateroskleroza, artritis i neurodegenerativne bolesti karakterišu se produkcijom velike količine ONOO⁻ (Moncada i Higgs, 2006).

1.5.3. LIPIDNI PEROKSIDI (LPO)

Lipidni peroksidi su produkti lančane reakcije lipidne peroksidacije, koja se zasniva na oksidaciji lipida i lipoproteina reaktivnim vrstama kiseonika i azota u uslovima oksidacionog stresa (*Halliwell i Gutteridge, 1999*). Inicijatori lipidne peroksidacije su ROS i RNS, a pre svega OH[·]. Reaktivne vrste kiseonika oksiduju masne kiseline pri čemu se formira lipidni hidroperoksid (LOOH), koji se u prisustvu Fe²⁺ i Cu⁺ razgrađuje do OH[·] i alkolski radikala (LO[·]) ili do peroksil radikala (LOO[·]). Radikali koji nastaju razlaganjem LOOH, stimulišu dalju inicijaciju i propagaciju lipidne peroksidacije. Na taj način, jednom pokrenut proces lipidne peroksidacije nastavlja se autokatalitički, tj. u vidu lančane reakcije. Prisustvo jona Fe²⁺ i Cu⁺ ubrzava proces lipidne peroksidacije, koji najčešće zahvata lipide ćelijskih membrana (fosfolipidi, glikolipidi i holesterol) (*Halliwell, 2006; Halliwell i Gutteridge, 2006*).

Oksidaciono oštećenje membranskih lipida rezultira strukturno-funkcionalnim promenama ćelijske membrane, koje se ogledaju u smanjenju hidrofobnosti lipidnog dvosloja i izmeni interakcije i afiniteta između proteina i lipida. Usled ovako narušene strukture i funkcije ćelijske membrane, dolazi do poremećaja homeostaze ćelije, što se odražava na vitalne i funkcionalne ćelijske procese, kao što su: proliferacija, diferencijacija, endocitoza, fagocitoza, transport jona, signalizacija, međućelijski kontakt (*Halliwell, 2006; Halliwell i Gutteridge, 2006*). Produkti lipidne peroksidacije, poput malodialdehida i 4-hidroksinonenala indukuju stvaranje mutagenih lezija na molekulu DNK (*Esterbauer i sar., 1991*). Brojne patofiziološke promene u tkivima su posledica procesa lipidne peroksidacije (ateroskleroza, kancerogeneza, ishemijsko/reperfuziona oštećenja, inflamatorni procesi i toksična oštećenja ksenobioticima) (*Dargel, 1992*).

U fiziološkim uslovima, proces lipidne peroksidacije je kontrolisan i deluje na strukturu i funkciju ćelije, tako što modifikuje propustljivost ćelijske membrane, intezitet metabolizma membranskih lipida i proteina, sintezu eikosanoida, proliferaciju ćelija i inicijaciju ćelijske smrti (*Gutteridge i Halliwell, 1990*).

Lipidna peroksidacija je proces reverzibilnog oštećenja ćelija i tkiva, što znači da se nastala oštećenja mogu delimično ili u potpunosti reparirati. Stepem reparacije ćelijskih struktura zahvaćenih procesom lipidne peroksidacije zavisi od odnosa prooksidacionih i

antioksidacionih komponenti unutar ćelije. Tri vrste enzima mogu da redukuju lipidne perokside i repariraju postojeće oštećenje, a to su: glutation peroksidaza (GSH-Px), fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza (PHGSH-Px) i selen zavisna glutation-S-transferaza (GST- α) (Ursini i Bindoli, 1987).

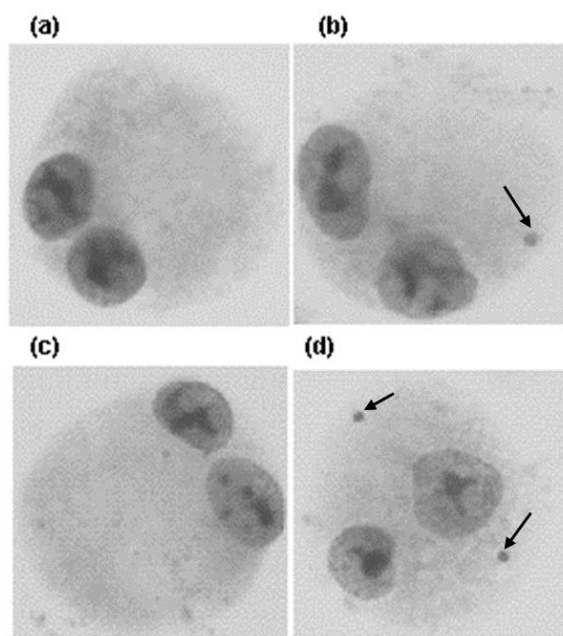
1.5.4. OKSIDACIONA OŠTEĆENJA DNK MOLEKULA

Oštećenje genoma predstavlja jedan od najznačajnijih uzroka degenerativnih i razvojnih bolesti. Oštećenje DNK molekula je od ključnog značaja za procese mutageneze, kancerogeneze i starenja. Hemijski događaji koji dovode do oštećenja DNK uključuju hidrolizu, izlaganje reaktivnim vrstama kiseonika i azota i drugim reaktivnim metabolitima. Nivo oksidacionog oštećenja molekula DNK kod ljudi je visok i iznosi 1.5×10^5 produkata oksidativnog oštećenja po ćeliji. Neki od najčešćih tipova oksidacionog oštećenja DNK molekula su: pojedinačne lezije azotnih baza, jednolančani prekidi molekula DNK, formiranje normalnih i oksidovanih abazičnih mesta, stvaranje intralančanih ukrštenih veza između susednih baza DNK, stvaranje ukrštenih veza DNK-protein, stvaranje nukleobaznih produkata u reakciji sa proizvodima lipidne peroksidacije, dvolančani prekidi u molekulu DNK (Gandhi i Gunjan, 2009). Od ROS najreaktivniji je OH, koji sa molekulom DNK reaguje četiri puta brže od ostalih reaktivnih vrsta kiseonika (Zimonjić i sar., 1990).

U svakoj ćeliji organizma stvara se na hiljade potencijalnih mutagenih oštećenja DNK, a urođeni reper-mehanizmi efikasno popravljaju ova oštećenja različitim putevima (Rao, 2009). Mehanizmi reparacije DNK uključuju: prepoznavanje deformacije heliksa DNK, popravku oštećenog dela DNK različitim mehanizmima (isecanjem nukleotida endonukleazom, isecanjem baza DNK glikozilazom, ispravke pogrešnog uparivanja baza, popravke u vezi sa transkripcijom), popunjavanje praznine u lancu DNK sintezom novog lanca uz pomoć DNK polimeraze na osnovu neoštećenog lanca DNK kao matrice i spajanje novosintetisanog lanca sa preostalim delom DNK pomoću DNK ligaze (Lieberman i sar., 2008; Rao, 2009)

U uslovima oksidacionog stresa može biti oštećena bilo koja komponenta DNK, tj. bilo koja azotna baza ili šećerno-fosfatni lanac. Identifikovano je oko 100 tipova mogućih oksidacionih oštećenja DNK molekula (*Halliwel i Guttridge, 1985*). Oksidacijom pirimidina i purina nastaju modifikovane baze u molekulu DNK, kao što su 5-OH citidin, hipoksantin, timin glikol. Oksidaciono izmenjene baze u molekulu DNK imaju potencijal da uspore ili zaustave transkripcioni proces, prouzorkuju greške pri replikaciji DNK i indukuju genomsku nestabilnost (*Rao, 2009*). Od različitih oštećenja DNK molekula, najopasniji su prekidi duplog heliksa DNK, koji nastaju kada se dva komplementarna lanca simultano prekinu na približno istim mestima. Ulazak ovako oštećene DNK u mitozu dovodi do defekata tokom segregacije hromozoma, kao što su zaostajanja hromozoma, hromozomska fragmentacija i stvaranje hromozomskih mostića (*Chow i Poon, 2010*). Ovi događaji mogu dovesti do nastanka hromozomskih aberacija. U cilju zaštite od ovakvih oštećenja, ćelija poseduje mehanizam za brzu i efikasnu detekciju DNK lezija, signalizaciju njihovog prisustva i sprovođenje reparacije oštećenog DNK molekula. Ukoliko se desi da se neki od prekida duplog heliksa DNK molekula ne poprave, dolazi do isecanja oštećenih fragmenata od kojih se formiraju mikronukleusi (*Rao, 2009 ; Fenech i sar., 2011*).

Ljudi su tokom života konstantno izloženi delovanju egzogenih i endogenih mutagena, koji u intereakciji sa molekulom DNK mogu indukovati genomsku nestabilnost, što vodi nastanku hromozomskih aberacija. Genomska nestabilnost indukovana delovanjem različitih endogenih i egzogenih faktora može dovesti do formiranja mikronukleusa. Mikronukleusi predstavljaju citoplazmatske hromatinske mase nalik malim jedrima, koji nastaju tokom metafaze/anafaze ćelijskog ciklusa. Delovanjem klastogenih agenasa, koji vrše prekide hromozoma, nastaju mikronukleusi, koji se sastoje od acentričnih fragmenata, dok delovanjem aneugenih agenasa, koji remete pravilnu segregaciju hromozma, nastaju mikronukleusi koji se sastoje od celih hromozoma (*Milošević-Dorđević, 2010; Veeracharari i sar., 2011*). Mikronukleus predstavlja deo hromatinskog materijala koji se ne inkorporira u jedro jedne od ćerki ćelija tokom ćelijske deobe i na stadijumu telofaze se eliminiše iz nukleusa (*Slika 1*).



Slika 1. Binuklearne ćelije sa i bez mikronukleusa

(a) binuklearna ćelija bez mikronukleusa, (b, c) binuklearne ćelije sa mikronukleusima različitih veličina, (d) binuklearna ćelija sa dva mikronukleusa

Prisustvo mikronukleusa u ćeliji je kvantitativni pokazatelj strukturnih i numeričkih aberacija hromozoma, a frekvencija mikronukleusa je direktno proporcionalna stepenu hromozomskih aberacija (Albertini i sar., 1996; Wagner i sar., 2011). Povećana frekvencija mikronukleusa kao biomarkera genetičke nestabilnosti prikazana je u autoimunskim, kardiovaskularnim i neurodegenerativnim bolestima, dijabetesu i karcinomu (Evans i Dizdaroglu, 2004; De Bont i van Larebeke, 2004; Halliwell i Gutteridge, 2007; Fenech i sar., 2011; Torres-Bugarin i sar., 2015). De Bont i van Larebeke (2004) su pokazali da su mikronukleusi osetljivi biomarkeri DNK oksidacionog oštećenja u ćeliji.

Kod zdravih ljudi, mikronukleusi se konstantno formiraju delovanjem različitih endogenih i egzogenih genotoksičnih faktora. Normalna frekvencija mikronukleusa u limfocitima periferne krvi kod zdravih ljudi kreće se u opsegu od 0 do 12 mikronukleusa na 1000 binuklearnih ćelija (Kopjar i sar., 2010). Frekvencija mikronukleusa je različita u zavisnosti od pola, godina života, životnih navika, stepena izloženosti mutagenima, načina ishrane i zdravstvenog statusa organizma. Poznato je da sa starenjem dolazi do smanjene

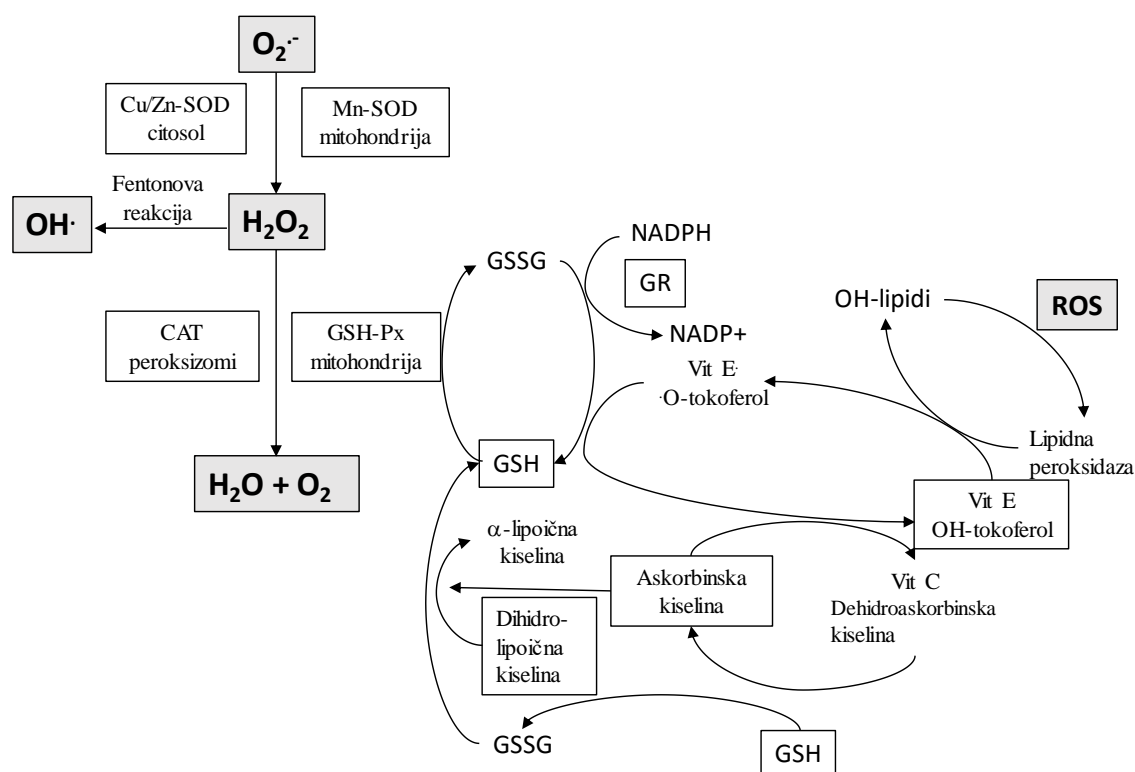
reparativne sposobnosti ćelija da reaguju na oštećenja DNK, što može dovesti do povećane učestalosti hromozomskih aberacija, a time i do povećane frekvence mikronukleusa, kako u limfocitima periferne krvi, tako i u ćelijama bukalne sluznice. Sa starenjem najčešće se gube polni hromozomi (kod žena X, kod muškaraca Y hromozom) od kojih se mogu formirati mikronukleusi (*Kopjar i sar.*, 2010). Visoke koncentracije mikronutrijenata (vitamin E, vitamin C, cink, retinol, folna kiselina, nikotinska kiselina, kalcijum, riboflavin, pantotenska kiselina i biotin) umanjuju frekvencu formiranja mikronukleusa. Razlog tome je što navedeni mikronutrijenti deluju kao kofaktori enzima ili ulaze u strukturu proteina koji su uključeni u sintezu i reparaciju DNK molekula (*Fenech*, 2010).

1.6. ANTIOKSIDACIONI ZAŠTITNI SISTEM (AOS)

Aerobni način života i povećanje potrošnje kiseonika tokom evolucije živih organizama praćeno je stvaranjem ROS i RNS. Kao produkti oksidacionog metabolizma u ćeliji, ROS i RNS, kada se proizvode u fiziološkim koncentracijama, imaju značajnu ulogu u signalizaciji, regulaciji bioloških procesa i imunskoj zaštiti organizma (*Dröge*, 2002; *Halliwell i Gutteridge*, 2006). Tokom evolucije, aerobni organizmi su uporedo sa prelaskom na mnogo efikasniji oksidativni metabolizam razvili i antioksidacioni zaštitni sistem (*Antioxidative Defense System* - AOS) (*Sies*, 1997; *Vertuani i sar.*, 2004). Uloga AOS je da koncentraciju ROS i RNS u ćeliji održava u fiziološkim granicama, kako bi se sprečila i ograničila oksidaciona oštećenja ćelijskih struktura. Komponente AOS imaju sposobnost i da repariraju oksidaciona oštećenja nastala unutar ćelija delovanjem ROS i RNS. Antioksidacioni zaštitni sistem čini svaka supstanca, koja kada je prisutna u malim koncentracijama u odnosu na oksidovani supstrat, može da spreči ili smanji oksidaciju supstrata. Supstance koje mogu da spreče ili smanje oksidaciju supstrata nazivaju se jednim imenom - antioksidansi (*Halliwell i Gutteridge*, 2006).

Antioksidacioni zaštitni sistem se, prema načinu delovanja deli na primarnu i sekundarnu antioksidacionu zaštitu. Prema prirodi komponenti AOS se deli na prirodnu i sintetičku antioksidacionu zaštitu. Primarna antioksidaciona zaštita obuhvata neenzimske i

enzimske komponente AOS (Halliwell i Gutteridge, 2006) (Šema 4). Sekundarna antioksidaciona zaštita obuhvata enzime, koji primarno imaju drugu ulogu unutar ćelije, ali mogu da deluju i kao reparatori oksidacionih oštećenja (protein-specifične oksidoreduktaze, tiol-reduktaze, protein-ADP-ribozil-transferaze, ATP Ca^{2+} -nezavisne proteaze) (Brigelius, 1985; Berger, 1985; Cadenas, 1989; Halliwell i Gutteridge, 2006). Sposobnost antioksidacionog delovanja imaju i melatonin, metalotioneini, poliamini, urati, flavonoidi, polifenoli, fitoestrogeni, estrogeni, rezveratrol, piruvat, α -ketoglutarat, melanin, dihidrolipoinna i lipoinna kiselina, karnozin, homokarnozin, taurin i anserin (Matés, 2000; Halliwell i Gutteridge, 2006).



Šema 4. Oksidaciono-antioksidacioni sistem ćelije (Halliwell i Gutteridge, 2006).

U neenzimske komponente AOS ubrajaju se različite hidrosolubilne i liposolubilne supstance. U hidrosolubilne neenzimske komponente AOS spadaju: vitamin C, glutation, metionin, cistein, albumin, bilirubin, biliverdin, mokraćna kiselina, transferin,

ceruloplazmin, histidin i feritin. Liposolubilne neenzimske komponente AOS su: vitamin A, β -karoten, vitamin E i koenzim Q (Halliwell i Gutteridge, 2006 ; Štajn i sar., 2007). U enzimске komponente AOS ubrajaju se:

- Bakar-cink zavisna superoksid dismutaza, mangan-zavisna superoksid dismutaza i ekstracelularna superoksid dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) - katalazuje dismutaciju dva molekula $O_2^{\cdot -}$ u H_2O_2 i molekulski kiseonik (Fridovich, 1995; Liochev i Fridovich, 2000),
- Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) - katalizuje redukciju H_2O_2 do vode i molekuskog kiseonika (Sichak i Dounce, 1986),
- Selen-zavisna i selen-nezavisna glutation peroksidaza (GSH-Px, EC 1.11.1.9) - katalizuju redukciju H_2O_2 do vode i redukciju organskih hidroperoksida do alkohola. Kao donor elektrona koriste GSH, koji se u toku reakcije oksiduje do GSSG (Stadtman, 1991),
- Glutation reduktaza (GR, EC 1.6.4.2) - katalizuje redukciju GSSG u GSH uz prisustvo NADPH kao redukujućeg kofaktora (Anderson i sar., 1997),
- Citosolna i membranski vezana glutation-S-transferaza (GST, EC 2.5.1.18) - katalizuju konjugaciju hidrofobnih i elektrofilnih ksenobiotika sa -SH grupama GSH, pri čemu se formiraju produkti rastvorljivi u vodi, koji mogu da se eliminišu iz organizma (Beutler i Eaton, 1992; Bolt, 1996).

1.6.1. GLUTATION (GSH)

Tripeptid glutation (γ -l-glutamyl-l-cisteinil-glicin) je niskomolekulsko tiolno jedinjenje. Sintetiše se iz glutamata, cisteina i glicina delovanjem γ -glutamylcistein-sintetaze (γ -GCS) i glutation sintetaze (GS) (Griffith, 1999). Sulfhidrilna grupa cisteina, koji ulazi u sastav GSH, ima sposobnost da se reverzibilno oksiduje. Zahvaljujući ovoj sposobnosti GSH deluje kao veoma potentan antioksidans i štiti ćeliju od oksidacionih i nitrozacionih oštećenja. Antioksidaciona svojstva GSH može ispoljiti direktno u brzom

reakciji sa ROS i RNS (*Meister, 1992*) i indirektno kao supstrat enzima GSH-Px (*Mates, 2000*). Kataličkim delovanjem enzima GST, GSH se konjuguje sa mnogim ksenobioticima i elektrofilnim molekulima, gradeći konjugate, koji se eliminišu iz ćelije (*Alary i sar., 2003; Ralat i sar., 2006*). Glutation ima značajnu ulogu u održavanju redukovanog oblika vitamina C i vitamina E u biološkim sistemima (*Forman i sar., 2009*). Takođe, učestvuje u popravci oksidacionih oštećenja molekula DNK i sprečava apoptozu izazvanu ROS i citokinima (*Kruidenier i Verspaget, 2002*). Sulfhidrilna grupa cisteina u molekulu GSH ima visok afinitet za metale, tako da GSH formira merkaptide sa nekoliko endogenih metala, kao što su živa, kadmijum, bakar, selen, hrom, olovo i cink (*Mates, 2000*).

Glutation je prisutan u svim ćelijama, u kojima se nalazi unutar citosola, mitohondrija, jedra i endoplazmatičnog retikuluma. Predstavlja najzastupljeniji intraćelijski slobodni tiol i ima značajnu ulogu u održavanju redoks homeostaze ćelije. Koncentracija GSH najveća je u jetri, a najmanja u plazmi (*Smith i sar., 1996; Schafer i Buettner, 2001*). Glutation se aktivno sintetise i sekretuje u bubregu, plućima i epitelu intestinalnog trakta. U uslovima oksidacionog stresa intenzivira se ekskrecija GSH iz jetre u perifernu krv (*Bellomo i sar., 1992*).

Glutation se iz ćelije transportuje delovanjem enzima γ -glutamil transpeptidaze i dipeptidaza, koji se nalaze na površini ćelije. Transport GSH iz ćelija, prvenstveno ćelija jetre je fiziološki važan mehanizam, naročito u uslovima oksidacionog stresa, kada dolazi do preraspodele GSH između organa (*Anderson i sar., 1980; Sies i Graf, 1985; Cao i sar., 2005*).

U toku direktnog ili indirektnog oksidacionog delovanja, GSH se oksiduje u glutation disulfid (GSSG). Za razliku od redukovane forme (GSH), koja je biološki aktivan oblik, oksidovana forma (GSSG) je potencijalno toksična za ćelije. Deo nastalog GSSG se ekskretuje iz ćelije, dok se delom unutar ćelije redukuje do GSH delovanjem enzima glutation reduktaze u NADPH-zavisnoj reakciji (*Huang i Huang, 2002*).



Oksidovani glutation u fiziološkim uslovima čini manje od 1% ukupnog GSH, ali u stanju oksidacionog stresa dolazi do povećanja njegove koncentracije (*Brigelius-Flohe,*

1999). Smanjene koncentracije GSH povezano je sa procesom starenja (*Samiec i sar.*, 1998). Osobe starosti između 20 i 39 godina imaju za 17% veće koncentracije GSH u krvi od osoba starosti od 60 do 79 godina. Smanjena koncentracija GSH je u vezi sa: patogenezom različitih bolesti jetre (alkoholna bolest jetre i nealkoholna ciroza jetre) (*Hadi i sar.*, 1999), pluća (astma, hronična opstruktivna bolest pluća, idiopatska fibroza pluća) (*Rahman i MacNee*, 2000), neurodegenerativnih bolesti (Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest) (*Schulz i sar.*, 2000).

Održavanje odnosa GSH/GSSG u korist GSH je veoma značajno za redoks homeostazu ćelije. U fiziološkim uslovima ovaj odnos je visok i više od 90% glutationa je u redukovanom obliku. U uslovima oksidacionog stresa dolazi do poremećaja odnosa GSH/GSSG u smislu favorizovanja GSSG. Visok odnos GSH/GSSG doprinosi regulaciji funkcije celularnih proteina, ćelijskog ciklusa, apoptoze, nekroze i signalizacije (*Pallardó i sar.*, 2008; *Yuan i Kaplowitz*, 2009). Koncentracija GSH u ćeliji se održava *de novo* sintezom, enzimskom redukcijom GSSG i ulaskom GSH u ćeliju (*Griffith*, 1999; *Schafer i Buettner*, 2001). Prema *Dickinson-u i Forman-u* (2002), GSH pored antioksidacionog delovanja, ima značajnu ulogu u regulaciji ciklusa NO, metaboličkim i biohemijskim reakcijama sinteze i reparacije DNK, metabolizmu gvožđa, regulaciji sinteze i degradacije proteina, regulaciji ćelijskog ciklusa i genskoj ekspresiji.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Subklinički hipotireoidizam i trombofilija u trudnoći praćeni su visokim stepenom morbiditeta i mortaliteta fetusa. Amnionska tečnost i ćelije amnionske tečnosti odražavaju metabolički i zdravstveni status fetusa, tako da pružaju dragocene informacije o trudnoći i mogu biti važan biomarker u dijagnostici i menadžmentu patoloških trudnoća. Redoks homeostaza amnionske tečnosti i ćelija amnionske tečnosti je od ključnog značaja za normalan razvoj fetusa i ishod trudnoće.

☞ Cilj istraživanja ove doktorske disertacije je da se ispituju efekti majčinog subkliničkog hipotireoidizma i trombofilije na redoks homeostazu amnionske tečnosti i ćelija amnionske tečnosti u prvom tromesečju trudnoće.

☞ Redoks homeostaza amnionske tečnosti ispitana je određivanjem koncentracija biomarkera oksidacionog stresa i oksidacionog oštećenja lipida, kao i njihovih korelacionih odnosa u amnionskoj tečnosti.

☞ U ćelijama amnionske tečnosti, redoks homeostaza je ispitana određivanjem koncentracija biomarkera oksidacionog stresa i oksidacionog oštećenja lipida i DNK, kao i njihovih korelacionih odnosa.

Kod ispitivanih trudnica određivani su sledeći parametri:

- U perifernoj krvi:
 - Broj leukocita
 - Broj pojedinih vrsta leukocita
 - Procentualna zastupljenost pojedinih vrsta leukocita

- Biomarkeri oksidacionog stresa u amnionskoj tečnosti:
 - Koncentracija superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$)
 - Koncentracija vodonik peroksida (H_2O_2)
 - Koncentracija azot monoksida (NO)
 - Koncentracija peroksinitrita ($ONOO^-$)
 - Koncentracija redukovanog glutationa (GSH)
 - Koncentracija oksidovanog glutationa (GSSG)

- Biomarkeri oksidacionog oštećenja u amnionskoj tečnosti:
 - Koncentracija lipidnih peroksida (LPO)

- Biomarkeri oksidacionog stresa u ćelijama amnionske tečnosti:
 - Koncentracija superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$)
 - Koncentracija vodonik peroksida (H_2O_2)
 - Koncentracija azot monoksida (NO)
 - Koncentracija peroksinitrita ($ONOO^-$)
 - Koncentracija redukovanog glutationa (GSH)
 - Koncentracija oksidovanog glutationa (GSSG)

- Biomarkeri oksidacionog oštećenja u ćelijama amnionske tečnosti:
 - Koncentracija lipidnih peroksida (LPO)
 - Frekvencija mikronukleusa

3. MATERIJAL I METODE

Istraživanjem u okviru ove doktorske disertacije obuhvaćene su zdrave trudnice, trudnice sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnice sa trombofilijom, kod kojih je postojala indikacija za amniocentezom u toku lečenja na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog Centra „Kragujevac” u Kragujevcu, u periodu od juna 2014. godine do juna 2015. godine.

Protokol istraživanja sproveden je u skladu sa zahtevima „Dobre Kliničke Prakse“ i odobren je od strane Etičkog Komiteta Kliničkog Centra „Kragujevac” u Kragujevcu, broj 01/10146. Sve ispitivane trudnice su nakon detaljnog upoznavanja sa ciljem i metodologijom istraživanja, dale pismeni pristanak za učešće u istraživanje. U periodu ispitivanja, kod trudnica nije bilo neželjenih događaja, negativnih efekata nito bilo kakvih drugih komplikacija uzrokovanih amniocentezom.

Eksperimentalna istraživanja sprovedena su na Odseku citogenetske dijagnostike Klinike za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra „Kragujevac“ u Kragujevcu i u Laboratoriji za biomedicinska istraživanja na Departmanu za biomedicinske nauke Državnog Univerziteta u Novom Pazaru.

3.1. PACIJENTI

Istraživanjem u okviru ove doktorske disertacije obuhvaćene su trudnice kod kojih je potvrđena indikacija za amniocentezu od strane Komisije Genetičkog savetovališta Klinike za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog Centra „Kragujevac”.

U okviru istraživanja bile su uključene tri grupe trudnica gestacijske starosti od 16 do 18 nedelja:

- *I kontrolna grupa*: 32 zdrave trudnice, kod kojih je amniocenteza indikovana

godinama života (> 35),

- *II trudnice sa subkliničkom hipotireozom*: 23 trudnica kod kojih je amniocenteza indicovana dijagnozom subkliničkog hipotireoidizma,
- *III trudnice sa trombofilijom*: 23 trudnice kod kojih je amniocenteza indicovana genetskom predispozicijom za trombofiliju.

Ispitivane trudnice su bile nepušači, bez genetičkih i hroničnih poremećaja, u opsegu normalne telesne težine pre trudnoće, koje su u prvom tromesečju trudnoće dobile manje od 2 kg na težini. Amniocenteza je sprovedena kod trudnica posle postavljanja dijagnoze, a pre primene terapije.

Subklinički hipotireoidizam je dijagnostikovao na osnovu povećane koncentracije tireostimulišućeg hormona (TSH) i referentnih vrednosti koncentracija slobodnog trijodtironina (FT3) i slobodnog tiroksina (FT4) u serumu trudnica. Nakon amniocenteze, trudnice sa subkliničkim hipotireoidizmom bile su na terapiji različitih doza *Euthyrox*-a (levotiroksin natrijum, proizvođač *Merck KGaA*, Nemačka), u zavisnosti od koncentracija hormona u serumu.

Trombofilija kod trudnica je dijagnostikovana na osnovu potvrđenih mutacija: FV Leiden (G1691A), FII (G20210A), MTHFR (C677T) i PAI-1, molekularno dijagnostičkim metodama. Nakon amniocenteze, trudnice sa trombofilijom bile su na terapiji različitih doza *Fraxiparin*-a (nadroparin-kalcijum, proizvođač *Aspen Notre Dame De Bondeville*, Francuska) ili *Clexan*-a (enoksaparin-natrijum, proizvođač *Sanofi Winthrop Industrie*, Francuska), u zavisnosti od vrste mutacije i njene prisutnosti u homozigotnoj ili heterozigotnoj formi.

U Centru za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog Centra „Kragujevac”, primenom standardnih kliničko-laboratorijskih metoda određeni su: broj leukocita (neutrofili, eozinofili, bazofili, limfociti, monociti), broj eritrocita, broj trombocita, hematokrit, koncentracija hemoglobina, zapremina eritrocita (MCV), prosečna količina hemoglobina u eritrocitima (MCH), prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC), koncentracija humanog horionskog gonadotropina (β -hCG), koncentracija C-reaktivnog proteina (CRP), protrombinsko vreme, koncentracije TSH, FT3 i FT4.

3.2. AMNIOCENTEZA, IZOLOVANJE I KULTIVACIJA ČELIJA AMNIONSKE TEČNOSTI

Za izolovanje i kultivaciju ćelija amnionske tečnosti korišćeni su materijali namenjeni za gajenje ćelijskih kultura, koji su nabavljani od firmi: *Thermo Fisher Scientific, USA*; *Sarstedt AG & Co, Germany*; *Sigma-Aldrich, USA* i *Merck KGaA, Darmstadt, Germany*.

Ispitivani uzorci amnionske tečnosti i ćelija amnionske tečnosti dobijeni su amniocentezom od trudnica gestacijske starosti od 16 do 18 nedelja. Amniocenteza je sprovedena od strane stručnog lica, specijaliste ginekologije i akušerstva uz upotrebu ultrazvuka. Uzorci dobijeni amniocentezom, u količini od oko 20 ml, podeljeni su u dve čiste epruvete po 10 ml i centrifugirani 20 minuta na 1800 obrtaja/minuti.

Nakon centrifugiranja, iz prve epruvete uklonjen je supernatant, a ćelijska suspenzija je resuspendovana u 5 ml kompletnog medijuma za kratkotrajno gajenje kultura ćelija amnionske tečnosti *Gibco® AmnioMAX™ - II Complete Medium*. Ćelijska suspenzija je prebačena u flask za kulturu ćelija T-25 i inkubirana je na +37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂ do postizanja konfluentnosti (14 dana). Medijum u kulturi ćelija menjan je na svaka dva dana. Sa zamenom medijuma uklanjane su i neadherentne fetalne ćelije amnionske tečnosti, čime su u kulturi selektovane adherentne i proliferativne ćelije amnionske tečnosti koje su formirale kolonije. U ovako selektovanoj ćelijskoj kulturi, nakon postizanja konfluentnosti, određivana je frekvencija mikronukleusa.

Supernatant amnionske tečnosti iz druge epruvete, nakon centrifugiranja, izdvajan je u čiste epruvete i uzorci su zamrzavani na -80 °C do budućih analiza. U uzorcima amnionske tečnosti određivane su koncentracije biomarkera oksidacionog stresa. Ćelijska suspenzija je nakon uklanjanja supernatanta ispirana dva puta sa po 3ml fosfatnog pufera (*Phosphate-buffered saline - PBS*) i centrifugirana po 5 minuta na 1200 obrtaja/minuti. Posle ispiranja, ćelije su resuspendovane u 1 ml medijuma za zamrzavanje (*freezing medium*: 8 ml kompletnog medijuma (*Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM + 10% Fetal Bovine Serum - FBS*) + 1 ml FBS + 1 ml dimetil sulfoxida - DMSO) i zamrzavane na -80 °C do budućih analiza. U uzorcima ćelija amnionske tečnosti određivane su koncentracije biomarkera oksidacionog stresa.

3.3. MICRONUCLEUS TEST U ČELIJAMA AMNIONSKE TEČNOSTI

Za utvrđivanje oksidacionih oštećenja DNK molekula u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkom hipotireozom i trudnica sa trombofilijom korišćen je citokinezis blok mikronukleus test, opisan od strane *Fenech i Morley* (1985). Metoda se zasniva na tretiranju kultivisanih ćelija pre prve mitoze citohalazinom-B, koji blokira citokinezu inhibicijom kretanja aktinskih filamenata kortikalnog regiona plazma membrane, uz istovremeno neometanu deobu nukleusa, što rezultira nastankom binuklearnih ćelija tj. ćelija sa udvojenim jedrom (*Carter*, 1967).

Nakon postizanja konfluentnosti, kulturama ćelija amnionske tečnosti dodat je rastvor citohalazina-B (*Merck KgaA, Germany*), u finalnoj koncentraciji od 4 µg/ml medijuma. Čelijska kultura je inkubirana 16 h na +37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5% CO₂. Nakon inkubacije, ćelije su odvajane od flaska 0,1% tripsinom, u trajanju od 2 do 3 minuta. Tripsinizacija je prekinuta dodavanjem 1 ml *Gibco® AmnioMAX™ - II Complete Medium (Thermo Fisher Scientific, USA)* i čelijska suspenzija je centrifugirana 10 minuta na 1000 obrtaja/minutu. Posle centrifugiranja, ćelije su najpre ispirane 0,9% NaCl, a zatim blago hipotoničnim 0,75% rastvorom KCl, uz naizmenično centrifugiranje po 10 minuta na 1000 obrtaja/minutu. Nakon ispiranja, vršena je fiksacija ćelija sveže pripremljenim rastvorom za fiksaciju (glacijalna sirćetna kiselina i metanol, u odnosu 1:3). Čelijski talog je resuspendovan u 3 ml rastvora za fiksaciju, inkubiran 15 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim centrifugiran 10 minuta na 1000 obrtaja/minute. Postupak je ponovljen dva puta. Po završenoj fiksaciji, supernatant je pažljivo odliven, a čelijski talog resuspendovan u 1 ml rastvora za fiksaciju i razliven na prethodno pripremljenom predmetnom staklu. Dobijeni preparat sušen je na vazduhu, a zatim bojen 4% rastvorom *Giemsa* boje (*Thermo Fisher Scientific, USA*) u fosfatnom puferu (pH 6,8), u trajanju od 10 minuta. Nakon bojenja, preparati su analizirani pod svetlosnim mikroskopom. Preparati su analizirani pod fiksiranim objektivom pri uvećanju x400, pomeranjem preparata u vidu meandra. U svakom vidnom polju brojane su binuklearne ćelije i mikronukleusi u njima. Frekvencija mikronukleusa izražena je na 1000 binuklearnih ćelija (broj mikronukleusa/1000 binuklearnih ćelija).

3.4. EKSTRAKCIJA IZ AMNIONSKE TEČNOSTI I ČELIJA AMNIONSKE TEČNOSTI

Sve hemikalije, korišćene za pravljenje rastvora i pufera, bile su analitičkog (*pro analysis*) stepena čistoće, proizvođača *Sigma-Aldrich (USA)* i *Merck KGaA (Darmstadt, Germany)*.

Uzorci za određivanje koncentracija biomarkera oksidacionog stresa ekstrahovani su iz amnionske tečnosti i lizata ćelija amnionske tečnosti. Ekstrakcija je sprovedena po istoj proceduri iz amnionske tečnosti i ćelija amnionske tečnosti, nakon specifične pripreme prethodno zamrznutih uzoraka.

Ekstrakcija uzoraka iz amnionske tečnosti

Uzorci amnionske tečnosti su postepeno odmrzavani na sobnoj temperaturi i centrifugirani 10 minuta na 3000 obrtaja/minutu. Supernatant amnionske tečnosti odliven je u čiste epruvete i sprovedena je ekstrakcija uzoraka za određivanje koncentracija ROS i RNS, LPO, GSH i GSSG.

Ekstrakcija uzoraka iz ćelija amnionske tečnosti

Uzorci ćelija amnionske tečnosti su odmrzavani na +37 °C, prebačeni u čiste epruvete uz dodatak 5 ml kompletnog medijuma (DMEM + 10% FBS) i centrifugirani 10 minuta na 3000 obrtaja/minutu. Nakon toga ćelije su ispirane u 3 ml PBS-a i centrifugirane 10 minuta na 3000 obrtaja/minutu. Postupak ispiranja je ponovljen tri puta, nakon čega su ćelije resuspendovane u 3 ml PBS-a, a zatim brojane. Nakon brojanja, sadržaj ćelijske suspenzije podeljen u dve epruvete. U prvu epruvetu je odvojeno 2 ml ćelijske suspenzije, koja je lizirana na ledu, serijom od po 3 sukcesivnih ultrazvučnih udara u trajanju od 10 s, ultrazvučnim sonifikatorom (*Ultra-Turrax homogenizer, IKA-Werke, Straufen, Germany*). Dobijeni lizati ćelija amnionske tečnosti centrifugirani su 30 minuta na 4000 obrtaja/minutu. Supernatant lizata ćelija amnionske tečnosti odliven je u čiste epruvete i sprovedena je ekstrakcija uzoraka za određivanje koncentracija ROS, RNS i LPO. U drugu epruvetu odvojen je 1 ml ćelijske suspenzije, iz koje su ekstrahovani uzorci za određivanje koncentracija GSH i GSSG.

Brojanje ćelija amnionske tečnosti

Za određivanje broja ćelija amnionske tečnosti vršeno je bojenje ćelija 0.4% rastvorom tripan plavog (*Trypan blue, Merck KGaA, Germany*). Membrana živih ćelija nepropustljiva je za tripan plavo, za razliku od mrtvih ćelija, koje zbog dezintegracije membrane, apsorbuju boju i jedra im se boje plavo. Pripremljena suspenzija ćelija amnionske tečnosti dobro je resuspendovana Pasterovom pipetom, a zatim je 10 μ l suspenzije dodato u 10 μ l tripan plavog i dobro promešano. Od obojene suspenzije ćelija, 10 μ l je ukapano uz ivicu pokrovnog stakla, prethodno prilepljenog dH₂O za ivice Neubauer-ove komore. Ćelije su brojane u 4 polja za brojanje leukocita pod invertnim mikroskopom (*XDS-3, Optica*) pri uvećanju x100. Ukupan broj ćelija amnionske tečnosti predstavlja srednju vrednost broja ćelija određenih u sva 4 polja. Broj ćelija amnionske tečnosti (broj ćelija uzorka) po ml izračunat je prema sledećem obrascu:

Ukupan broj ćelija amnionske tečnosti $\times 2 \times 10000 =$ Broj ćelija uzorka /ml,

gde je 2 razblaženje ćelija amnionske tečnosti tripan plavim.

Pri preračunavanju koncentracija biomarkera oksidacionog stresa uzet je u obzir broj ćelija uzorka za svaki ispitivani uzorak ćelija amnionske tečnosti.

3.4.1. Ekstrakcija uzoraka za određivanje koncentracija ROS i RNS

Sve hemikalije, korišćene za pravljenje rastvora i pufera, bile su analitičkog (*pro analysi*) stepena čistoće, proizvođača *Sigma-Aldrich (USA)* и *Merck KGaA (Darmstadt, Germany)*.

Reagensi:

- 3 M perhlorna kiselina (PCA)
- 20 mM etilendiaminotetrasirćetna kiselina (EDTA)
- 2 M kalijum karbonat (K₂CO₃)

Ekperimentalni postupak:

Uzorci za određivanje koncentracije ROS i RNS ekstrahovani su iz amnionske tečnosti i lizata ćelija amnionske tečnosti 3 M perhlornom kiselinom (PCA) i 20 mM rastvorom EDTA, u zapreminskom odnosu 1:½:2 (0.6 ml amnionske tečnosti/lizata + 0.3 ml 3 M PCA + 1.2 ml 20 mM EDTA). Ekstrakcija je vršena na ledu u trajanju od 15 minuta. Uzorci su po završenoj ekstrakciji centrifugirani 10 minuta na 4000 obrtaja/minutu, a dobijeni supernatant (~ 1 ml) izdvajan je u čiste epruvete i neutralisan (do pH 7.0) 2 M rastvorom K_2CO_3 (~ 200 μ l). U ovako pripremljenim ekstraktima amnionske tečnosti i ćelija amnionske tečnosti određivane su koncentracije O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- i $ONOO^-$.

3.4.2. Ekstrakcija uzoraka za određivanje koncentracija LPO

Sve hemikalije, korišćene za pravljenje rastvora i pufera, bile su analitičkog (*pro analysi*) stepena čistoće, proizvođača *Sigma-Aldrich (USA)* и *Merck KGaA (Darmstadt, Germany)*.

Rastvori:

- 28% trihlorsirćetna kiselina (TCA)
- 0.1 M natrijum-arsenit

Ekperimentalni postupak:

Lipidni peroksidi su ekstrahovani iz hemolizata 28% rastvorom trihlorsirćetne kiseline (TCA) u 0.1 M natrijum–arsenitu, u zapreminskom odnosu 2:1 (0.8 ml amnionske tečnosti/lizata + 0.4 ml 28% TCA u 0.1 M natrijum-arsenitu). Posle 15 minuta ekstrakcije na ledu, uzorci su centrifugirani 10 minuta na 4000 obrtaja/minutu. U dobijenom supernatantu određivana je koncentracija LPO u amnionskoj tečnosti i ćelijama amnionske tečnosti.

3.4.3. Ekstrakcija uzoraka za određivanje koncentracija GSH i GSSG

Sve hemikalije, korišćene za pravljenje rastvora i pufera, bile su analitičkog (*pro analysi*) stepena čistoće, proizvođača *Sigma-Aldrich (USA)* и *Merck KGaA (Darmstadt, Germany)*.

Rastvori:

- 0.1% EDTA
- rastvor za precipitaciju
- 2.25% sulfosalicilne kiseline
- 1 M 4-vinilpiridin

Ekperimentalni postupak:

Ekstrakcija uzoraka iz amnionske tečnosti

Ekstrat GSH dobijen je iz smeše iz amnionske tečnosti, 0.1 % rastvora EDTA i rastvora za precipitaciju (1.67 g metafosforne kiseline, 0.2 g EDTA i 30 g NaCl rastvorenog u 100 ml dH₂O) u zapreminskom odnosu 1:4:7½ (0.05 ml amnionske tečnosti + 0.2 ml 0.1% EDTA + 0.385 ml rastvora za precipitaciju). Uzorci su ekstrahovani na ledu 15 minuta, zatim centrifugirani 10 minuta na 4000 obrtaja/minutu. Od dobijenog ekstrakta GSH (~ 1 ml), odvojeno je 0.5 ml za određivanje koncentracije GSH.

Preostalih 0.5 ml upotrebljeno je za ekstrakciju GSSG 1 M rastvorom 4-vinilpiridina (54 µl 4-vinilpiridina + 446 µl etanola). U 0.5 ml ekstrakta GSH dodato je 10 µl 1 M 4-vinilpiridina, promešano i inkubirano 1 h na sobnoj temperaturi. U ovako pripremljenim ekstraktima amnionske tečnosti određivana je koncentracija GSSG.

Ekstrakcija uzoraka iz ćelija amnionske tečnosti

Suspenzija ćelija amnionske tečnosti u zapremini od 1 ml centrifugirana je 10 minuta na 3000 obrtaja/minutu. Ćelijski talog je resuspendovan u 1 ml 2.25% sulfosalicilne kiseline (+4 °C). Liziranje ćelija izvršeno je neizmeničnim hlađenjem uzorka na -20 °C u trajanju od 15 minuta, a zatim zagrevanjem na +37 °C u trajanju od po 15

minuta. Čitav postupak hlađenja i zagrevanja uzorka sproveden je tri puta. Nakon liziranja uzorci su centrifugirani 30 minuta na 4000 obrtaja/minutu. Od dobijenog supernatanta (~ 1 ml) odvojeno je 0.5 ml za određivanje koncentracije GSH u ćelijama amnionske tečnosti.

Preostalih 0.5 ml upotrebljeno je za ekstrakciju GSSG 1 M rastvorom 4-vinilpiridina. U 0.5 ml ekstrakta GSH dodato je 10 μ l 1 M 4-vinilpiridina, promešano i inkubirano 1 h na sobnoj temperaturi. U ovako pripremljenim ekstraktima ćelija amnionske tečnosti određivana je koncentracija GSSG.

3. 5. ANALITIČKE METODE

Sve hemikalije, korišćene za pravljenje rastvora i pufera, bile su analitičkog (*pro analysi*) stepena čistoće, proizvođača SIGMA (St. Louis, USA) и Merck (Darmstadt, Germany).

3.5.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJA ROS I RNS

Koncentracija ROS i RNS određivana je u prethodno pripremljenim ekstraktima amnionske tečnosti i ćelijama amnionske tečnosti na osnovu očitane apsorbance. Apsorbanca za uzorke amnionske tečnosti, kao i za O_2^- i $ONOO^-$ u uzorcima ćelija amnionske tečnosti određivana je spektrofotometrijski (*UV/VIS Spektrofotometar, Shimadzu UV-1800*). Koncentracije H_2O_2 i NO_2^- u ćelijama amnionske tečnosti određivane su na osnovu apsorbanci dobijenih merenjem na čitaču mikrotitar ploča (*Microplate reader, RT-6100, Rayto*). Razblaženja uzorka (Fd) u toku ekstrakcije i očitavanja absorbance uzeta su u obzir pri preračunavanju koncentracija.

Fd za amnionsku tečnost = (V ekstrakta/V amnionske tečnosti) x (V kivete/V ekstrakta)

Fd za ćelije amnionske tečnosti = (V ekstrakta/V lizata) x (V kivete/V ekstrakta)

3.5.1.1. Određivanje koncentracije O_2^-

Koncentracija O_2^- određena je metodom koja predstavlja test mere stvaranja O_2^- , a zasniva se na redukciji nitroblu-tetrazolijuma (NBT) do nitroblu-formazana u prisustvu O_2^- (Auclair i Voisin, 1985).

Rastvori:

- 50 mM Tris-HCl pufer (pH 8.6)
- 0.1 mM EDTA
- 0.1 mM NBT
- 0.1 mg/ml gelatin

Eksperimentalni postupak:

Absorbanca (A1) 0.95 ml reakcione smeše (50 mM Tris-HCl pufer (pH 8.6), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM NBT i 0.1 mg/ml gelatina) očitana je na 550 nm. Zatim je u 0.95 ml reakcione smeše dodato 0.05 ml ekstrakta. Nakon 3 - 5 minuta očitana je absorbanca (A2) na 550 nm. Na osnovu razlike u absorbancama ΔA ($A_2 - A_1$) i molarnog ekstincionog koeficijenta (F), koji za 1 $\mu\text{mol/ml}$ monoformazona iznosi 0.015 na 550 nm, izračunate su koncentracije O_2^- prema sledećem obrascu i izražene u nmol/ml amnionske tečnosti i nmol/ 10^6 ćelija amnionske tečnosti:

$$\text{nmol } O_2^-/\text{ml amnionske tečnosti} = (\Delta A/F \times Fd)/10^3$$

$$\text{nmol } O_2^-/10^6 \text{ ćelija amnionske tečnosti} = (\Delta A/F \times Fd)/10^3 \times 10^6/\text{broj ćelija uzorka}$$

3.5.1.2. Određivanje koncentracije H_2O_2

Metoda za određivanje koncentracije H_2O_2 zasniva se na oksidaciji fenol crvenog (*Phenol Red*) vodonik peroksidom u prisustvu enzima peroksidaze (*Horseradish*

Peroxidase - HRPO) kao katalizatora (*Pick u Keisari*, 1980).

Rastvori:

- 0.1 g/L fenol crveno (*phenol red solution*- PRS)
- 140 mM NaCl
- 10 mM K-PO₄ pufer (pH 7.0)
- 5.5 mM dekstroza
- 8.5 Jed./ml (50 µg/ml) HRPO
- 1 N NaOH
- Reakciona smeša: 0.28 mM Phenol red + peroksidaza rena-HRPO tip II (1 Jed./ml)

Eksperimentalni postupak:

Određivanje koncentracije H₂O₂ u amnionskoj tečnosti

U 1 ml rastvora fenol crvenog (*phenol red solution* - PRS), koji sadrži 140 mM NaCl, 10 mM K-PO₄ pufer (pH 7.0), 5.5 mM dekstrozu, 0.1 g/L fenol crvenog i 8.5 Jed./ml (50 µg/ml) HRPO, dodato je 0.1 ml ekstrakta. Reakciona smeša je mešana na vorteks mešalici i inkubirana 10 minuta na sobnoj temperaturi. Posle inkubiranja, kiselost reakcione smeše podešena je na oko 12.5 dodavanjem 0.02 ml 1 N NaOH, čime je reakcija oksidacije zaustavljena. Slepa proba i serija standardnih rastvora (C₁ - 2.5 nmol/ml, C₂ - 5 nmol/ml, C₃ - 10 nmol/ml, C₄ - 20 nmol/ml) prošli su kroz istu proceduru. Na osnovu absorbance očitane na 610 nm za standardne rastvore određen je ekstincioni koeficijent $F = (\Delta A_1 + \Delta A_2 + \Delta A_3 + \Delta A_4)/4$, gde je ΔA razlika absorbanci standardnog rastvora i absorbanci slepe probe. Na osnovu absorbance očitane na 610 nm i ekstincionog koeficijenta F za H₂O₂, određena je koncentracija H₂O₂ prema sledećem obrascu i izražena u nmol/ml amnionske tečnosti:

$$\text{nmol H}_2\text{O}_2/\text{ml amnionske tečnosti} = \Delta A/F \times F_d$$

Određivanje koncentracije H₂O₂ u ćelijama amnionske tečnosti

U 8 bunarića na mikrotitar ploči sa 96 otvora dodato je po 50 µl ekstrakta ćelija amnionske tečnosti od svakog uzorka i po 50 µl reakcione smeše. Mikrotitar ploča je

inkubirana 1 h na 37 °C. Ista procedura, na istoj mikrotitar ploči sprovedena je i za seriju standardnih rastvora (C1 - 1.56 μM, C2 - 3.13 μM, C3- 6.25 μM, C4 - 12.5 μM, C5 - 25 μM, C6 - 50 μM, C7 - 100 μM). Nakon inkubiranja u bunariće je dodato po 10 μl 1N NaOH i apsorbancija je očitana na 600 nm. Na osnovu očitane apsorbance za standardne rastvore izračunat je ekstinkcioni koeficijent $F = (abs1/C1 + abs2/C2 + abs3/C3 + abs4/C4 + abs5/C5 + abs6/C6 + abs7/C7)/n$, gde je n broj standardnih rastvora. Uzimajući u obzir očitane absorbance uzorka, ekstinkcioni koeficijent F i faktor razblaženja Fd, izračunate su koncentracije H₂O₂ prema sledećem obrascu i izražene u nmol/10⁶ ćelija amnionske tečnosti:

$$\text{nmol H}_2\text{O}_2/10^6 \text{ ćelija amnionske tečnosti} = (\Delta A/F \times Fd)/10^3 \times 10^6/\text{broj ćelija uzorka}$$

3.5.1.3. Određivanje koncentracije NO₂⁻

Koncentracija NO₂⁻, kao indikatora NO određena je po metodi *Green-a* i saradnika (1982). Metoda se zasniva na sposobnosti NO da se u aerobnom, vodenom rastvoru primarno oksiduje NO₂⁻ (*Ignarro i cap.*, 1993).

Rastvori:

- 0.5% EDTA
- sulfanilna kiselina
- koncentrovana HCl
- 1-naftilamin-hidrohlorid
- 2 M natrijum acetat
- sulfanilamidni reagens: 1% sulfanilamid u 5% fosfornoj kiselini

Ekperimentalni postupak:

Određivanje koncentracije NO₂⁻ u amnionskoj tečnosti

Reakcinoj smeši, koja sadrži 0.02 ml 0.5% rastvora EDTA i 0.02 ml rastvora sulfanilne kiseline (0.6 g sulfanilne kiseline rastvoreno je u 70 ml dH₂O uz zagrevanje; u

ohlađen rastvor dodato je 20 ml koncentrovane HCl i dopunjeno do 100 ml dH₂O), dodato je 0.5 ml ekstrakta. Posle mešanja na vorteks mešalici i inkubiranja 10 minuta na sobnoj temperaturi, smeši je dodato 0.02 ml rastvora 1-naftilamin-hidrohlorida (0.6 g naftilamina rastvoreno je u 50 ml dH₂O, dodat je 1 ml koncentrovane HCl i dopunjeno dH₂O do 100 ml) i 0.02 ml 2 M natrijum acetata. Poslednja dva rastvora dodata su brzo i absorbanca je merena na 520 nm. Slepa proba i serija standardnih rastvora (C₁ - 3 nmol/ml, C₂ - 6 nmol/ml, C₃ - 12 nmol/ml, C₄ - 24 nmol/ml, C₅ - 48 nmol/ml, C₆ - 72 nmol/ml) prošli su kroz istu proceduru. Na osnovu absorbance očitane na 520 nm za standardne rastvore određen je ekstincioni koeficijent $F = (\Delta A_1 + \Delta A_2 + \Delta A_3 + \Delta A_4 + \Delta A_5 + \Delta A_6)/6$, gde je ΔA absorbanca standardnog rastvora – absorbanca slepe probe. Uzimajući u obzir očitane absorbance uzorka, ekstincionog koeficijenta F i faktora razblaženja Fd izračunata je koncentracija NO₂⁻ prema sledećem obrascu i izražena u nmol/ml ćelija amnionske tečnosti:

$$\text{nmol NO}_2^-/\text{ml amnionske tečnosti} = \Delta A/F \times Fd$$

Određivanje koncentracije NO₂⁻ u ćelijama amnionske tečnosti

Na mikrotitar ploči sa 96 otvora, u 8 bunarića dodato je po 50 μl ekstrakta ćelija amnionske tečnosti od svakog uzorka. Na istoj mikrotitar ploči dodato je i po 50 μl serije standardnih rastvora (C1 - 1.56 μM, C2 - 3.13 μM, C3- 6.25 μM, C4 - 12.5 μM, C5 - 25 μM, C6 - 50 μM, C7 - 100 μM). Uzorcima je zatim dodato 50 μl sulfanilamidnog reagensa i vršeno je inkubiranje na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta. Nakon inkubiranja, uzorcima je dodato 50 μl NED i ponovo su inkubirani u mraku, na sobnoj temperaturi 10 minuta. Posle završene inkubacije očitana je apsorbance na 550 nm. Na osnovu očitane apsorbance za standardne rastvore izračunat je ekstincioni koeficijent $F = (\text{abs1}/C1 + \text{abs2}/C2 + \text{abs3}/C3 + \text{abs4}/C4 + \text{abs5}/C5 + \text{abs6}/C6 + \text{abs7}/C7)/n$, gde je n broj standardnih rastvora. Uzimajući u obzir očitane absorbance uzorka, ekstincioni koeficijent F i faktor razblaženja Fd, izračunate su koncentracije NO₂⁻ prema sledećem obrascu i izražene u nmol/10⁶ ćelija amnionske tečnosti:

$$\text{nmol NO}_2^-/10^6 \text{ ćelija amnionske tečnosti} = (\Delta A/F \times Fd)/10^3 \times 10^6/\text{broj ćelija uzorka}$$

3.5.1.4. Određivanje koncentracije ONOO⁻

Koncentracija ONOO⁻ određena je metodom po *Riordan-u i Vallee-u* (1972). Metoda se zasniva se na merenju 3-nitrotirozina, produkta nitracije tirozinskih ostataka peroksinitritom. Koncentracija nastalog 3-nitrotirozina indikator je koncentracije ONOO⁻ (*Nakazawa i sar.*, 2000).

Rastvori:

- 1 M rastvor NaOH

Eksperimentalni postupak:

U 0.6 ml dH₂O dodato je 0.4 ml ekstrakta. Kiselost uzoraka je podešena 1 M rastvorom NaOH na pH 9, a zatim je očitana absorbanca na 428 nm. Slepa proba (1 ml dH₂O) prošla je kroz istu proceduru. Na osnovu vrednosti absorbance za uzorke i molarnog absorpcionog koeficijenta F za 3-nitrotirozin, koji iznosi 4200 mmol/ml na 428 nm, izračunate su koncentracije 3-nitrotirozina, indikatora koncentracija ONOO⁻, prema sledećim obrascima i izražene u nmol ONOO⁻/ml amnionske tečnosti i nmol ONOO⁻/10⁶ ćelija amnionske tečnosti:

$$\text{nmol ONOO}^{-}/\text{ml amnionske tečnosti} = \Delta A/F \times Fd \times 10^6$$

$$\text{nmol ONOO}^{-}/10^6 \text{ ćelija amnionske tečnosti} = (\Delta A/F \times Fd \times 10^6) \times 10^6/\text{broj ćelija uzorka}$$

3.5.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE LPO

Metoda za određivanje koncentracije LPO (*TBARS* analiza - *Thiobarbituric Acid Reactive Substances assay*) zasniva se na reakciji produkata lipidne peroksidacije (malonildialdehida - MDA) sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) (*Ohkawa i sar.*, 1979).

Koncentracija LPO određivana je u prethodno pripremljenim ekstraktima amnionske tečnosti i ćelijama amnionske tečnosti na osnovu spektrofotometrijski očitane

(UV/VIS Spektrofotometar, Shimadzu UV-1800). Razblaženja uzorka (Fd) u toku ekstrakcije i spektrofotometrijskog očitavanja uzeta su u obzir pri preračunavanju koncentracija.

$$\text{Fd za amnionsku tečnost} = (V \text{ ekstrakta}/V \text{ amnionske tečnosti}) \times (V \text{ kivete}/V \text{ ekstrakta})$$

$$\text{Fd za ćelije amnionske tečnosti} = (V \text{ ekstrakta}/V \text{ lizata}) \times (V \text{ kivete}/V \text{ ekstrakta})$$

Rastvori:

- 1% TBA (u 0.05 N rastvoru NaOH)

Eksperimentalni postupak:

U 0.2 ml 1% rastvora TBA u 0.05 N rastvoru NaOH, dodato je 0.8 ml ekstrakta. Reakciona smeša je mešana na vorteks mešalici i inkubirana 15 minuta u vodenom kupatilu na 100 °C. Ista procedura sprovedena je i za slepu probu (0.8 ml dH₂O + 0.2 ml 1% rastvora TBA u 0.05 N rastvoru NaOH). Na osnovu absorbance uzorka očitane na 530 nm i molarnog ekstincionog koeficijenta F, koji za 1 μmol malondialdehida iznosi 1,56 x 10⁵, izračunate su koncentracije LPO prema obrascu i izražene u nmol/ml amnionske tečnosti:

$$\text{nmol LPO/ml amnionske tečnosti} = (\Delta A/F \times Fd)/10^3$$

$$\text{nmol LPO}/10^6 \text{ ćelija amnionske tečnosti} = (\Delta A/F \times Fd)/10^3 \times 10^6/\text{broj ćelija uzorka}$$

3.5.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE GSH

U amnionskoj tečnosti i ćelijama amnionske tečnosti, koncentracije GSH određivane su po metodi *Beutler-a* (1975a), koja se zasniva na oksidaciji GSH 5.5-ditiobis-(2-nitrobenzoevom kiselinom).

Koncentracije GSH određivane su u prethodno pripremljenim ekstraktima amnionske tečnosti na osnovu spektrofotometrijski očitane apsorbance (UV/VIS

Spektrofotometar, Shimadzu UV-1800). Koncentracije GSH u ćelijama amnionske tečnosti određivane su na osnovu apsorbanci dobijenih merenjem na čitaču mikrotitar ploča (Microplate reader, RT-6100, Rayto).

Razblaženja uzorka (Fd) u toku ekstrakcije i očitavanja apsorbanci uzeta su u obzir pri preračunavanju koncentracija.

Fd za amnionsku tečnost = (V ekstrakta/V amnionske tečnosti) x (V kivete/V ekstrakta)

Fd za ćelije amnionske tečnosti = (V ekstrakta/V lizata) x (V kivete/V ekstrakta)

Rastvori:

- 0.2 M Na₂HPO₄ x 2 H₂O
- 0.04% 5.5-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina) (DTNB) u 1% rastvoru Na-citrata
- 0.3 M Na₂HPO₄

Ekperimentalni postupak:

Određivanje koncentracije GSH u amnionskoj tečnosti

U 0.3 ml ekstrakta dodato je 0.75 ml 0.2 M rastvora Na₂HPO₄ x 2 H₂O i 0.1 ml 0.04 % DTNB, rastvorenog u 1% rastvoru Na-citrata. Posle mešanja na vorteks mešalici i inkubiranja 10 minuta na sobnoj temperaturi, očitana je absorbanca na 412 nm. Isti postupak je sproveden za slepu probu i seriju standardnih rastvora GSH (C₁ - 15 μmol/ml, C₂ - 30 μmol/ml, C₃ - 45 μmol/ml, C₄ - 60 μmol/ml). Na osnovu absorbance očitane za standardne rastvore određen je ekstincioni koeficijent $F = (\Delta A_1 + \Delta A_2 + \Delta A_3 + \Delta A_4)/4$, gde je ΔA absorbanca standardnog rastvora – absorbanca slepe probe. Uzimajući u obzir vrednost absorbance očitne za uzorke, ekstincioni koeficijent F i faktor razblaženja Fd izračunate su koncentracije GSH i izražene u nmol/ml amnionske tečnosti:

$$\text{nmol GSH/ml amnionske tečnosti} = (\Delta A/F \times Fd)/10^3$$

Određivanje koncentracije GSH u ćelijama amnionske tečnosti

U 8 bunarića, na mikrotitar ploči sa 96 otvora, dodato je po 20 μl ekstrakta ćelija

amnionske tečnosti od svakog uzorka. Na istoj mikrotitar ploči dodato je i po 20 μl serije standardnih rastvora (C1 - 1.56 μM , C2 - 3.13 μM , C3- 6.25 μM , C4 - 12.5 μM , C5 - 25 μM , C6 - 50 μM , C7 - 100 μM). Uzorcima je zatim dodato 160 μl 0.3 M Na_2HPO_4 i 20 μl 0.04% DTNB u 1% Na-citratu. Mikrotitar ploča inkubirana je 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije očitana je apsorbance na 405 nm. Na osnovu očitane apsorbance za standardne rastvore izračunat je ekstinkcioni koeficijent $F = (\text{abs1}/C1 + \text{abs2}/C2 + \text{abs3}/C3 + \text{abs4}/C4 + \text{abs5}/C5 + \text{abs6}/C6 + \text{abs7}/C7)/n$, gde je n broj standardnih rastvora. Uzimajući u obzir očitane absorbance uzorka, ekstinkcioni koeficijent F i faktor razblaženja Fd, izračunate su koncentracije GSH prema sledećem obrascu i izražene u $\text{nmol}/10^6$ ćelija amnionske tečnosti:

$$\text{nmol GSH}/10^6 \text{ ćelija amnionske tečnosti} = (\Delta A/F \times Fd)/10^3 \times 10^6/\text{broj ćelija uzorka}$$

3.5.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE GSSG

Koncentracije GSSG u uzorcima amnionske tečnosti i u uzorcima ćelija amnionske tečnosti određene su po metodi *Beutler-a* (1975b). Metoda se zasniva na redukciji GSSG u GSH u prisustvu glutation reduktaze i NADPH kao kofaktora.

U prethodno pripremljenim ekstraktima amnionske tečnosti, koncentracije GSSG određivane su na osnovu spektrofotometrijski očitane apsorbance (*UV/VIS Spektrofotometar, Shimadzu UV-1800*). Koncentracije GSSG u ćelijama amnionske tečnosti određivane su na osnovu apsorbanci dobijenih merenjem na čitaču mikrotitar ploča (*Microplate reader, RT-6100, Rayto*).

Razblaženja uzorka (Fd) u toku ekstrakcije i očitavanja apsorbanci uzeta su u obzir pri preračunavanju koncentracija.

$$Fd \text{ za amnionsku tečnost} = (V \text{ ekstrakta}/V \text{ amnionske tečnosti}) \times (V \text{ kivete}/V \text{ ekstrakta})$$

$$Fd \text{ za ćelije amnionske tečnosti} = (V \text{ ekstrakta}/V \text{ lizata}) \times (V \text{ kivete}/V \text{ ekstrakta})$$

Rastvori:

- 1 M 4-vinilpiridin
- 1 M K-PO₄ pufer (pH 7.4)
- 12 mM NADPH (u 5% rastvoru NaHCO₃)
- glutation reduktaza (GR, 100 Jed./ml)
- Reakciona smeša: 0.2 mM NADPH + 1.5 mM DTNB (u 5% NaHCO₃) + 80 mM K-PO₄ pufer, pH= 7.4 + GR (1 Jed./ml)

Ekperimentalni postupak:

Određivanje koncentracije GSSG u amnionskoj tečnosti

U reakcionu smešu koja sadrži 0.08 ml 1M K-PO₄ pufera (pH 7.4), 0.01 ml 12 mM NADPH (rastvorenog u 5% rastvoru NaHCO₃) i 0.1 ml dH₂O, dodato je 0.8 ml GSSG ekstrakta i očitana absorbanca (A1) na 340 nm. Reakcinoj smeši je dodato 0.01 ml GR (100 Jed./ml). Posle inkubiranja 10 minuta na 25 °C, očitana je absorbanca (A2) na 340 nm. Isti postupak je sproveden i za slepu probu, koja umesto ekstrakta sadrži 0.8 ml dH₂O i 16 µl 1 M 4-vinilpiridina. Na osnovu razlike dobijenih absorbanci ΔA (A2 - A1) i molarnog ekstinkcionog koefcijenta F, koji za 1 nmol NADPH na 340 nm iznosi 6.22 izračunata je koncentracija GSSG prema sledećem obrascu i izražena u nmol/ml ćelija amnionske tečnosti:

$$\text{nmol GSH/ml amnionske tečnosti} = \Delta A / F \times Fd$$

Određivanje koncentracije GSSG u ćelijama amnionskoj tečnosti

Na mikrotitar ploči sa 96 otvora, u 8 bunarića dodato je po 50 µl ekstrakta ćelija amnionske tečnosti od svakog uzorka. Na istoj mikrotitar ploči dodato je i po 50 µl serije standardnih rastvora (C1 - 1.56 µM, C2 - 3.13 µM, C3- 6.25 µM, C4 - 12.5 µM, C5 - 25 µM, C6 - 50 µM, C7 - 100 µM). Očitana je apsorbance (A1) na 405 nm. Uzorcima je zatim dodato 100 µl reakcione smeše i inkubirani su na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta. Nakon inkubiranja očitana je apsorbance (A2) na 405 nm. Na osnovu očitanih absorbanci A1 i A2 izračunata je apsorbance ΔA (A2 - A1) za standardne rastvore i ispitivani uzorak. Na osnovu absorbance ΔA za standardne rastvore izračunat je

ekstinkcioni koeficijent $F = (\text{abs1}/C1 + \text{abs2}/C2 + \text{abs3}/C3 + \text{abs4}/C4 + \text{abs5}/C5 + \text{abs6}/C6 + \text{abs7}/C7)/n$, gde je n broj standardnih rastvora. Uzimajući u obzir absorbance uzorka ΔA , ekstinkcioni koeficijent F i faktor razblaženja F_d , izračunate su koncentracije GSSG prema sledećem obrascu i izražene u $\text{nmol}/10^6$ ćelija amnionske tečnosti:

$$\text{nmol GSSG}/10^6 \text{ ćelija amnionske tečnosti} = (\Delta A/F \times F_d)/10^3 \times 10^6/\text{broj ćelija uzorka}$$

3.6. STATISTIČKA OBRADA I PRIKAZ REZULTATA

Dobijeni podaci su analizirani softverskim paketom SPSS 21.0 za *Windows*. Rezultati su prikazani kao aritmetička sredina $\bar{X} \pm$ standardna greška (S.E.M). Podaci između ispitivanih grupa (zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom; zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom) analizirani su primenom nezavisnog t -testa. Pre primene t -testa normalna distribucija ispitivanih uzoraka pokazana je *Shapiro-Wilk*-ovim testom.

Korelacioni odnosi broja i procentualne zastupljenosti leukocita u perifernoj krvi majke sa frekvencijom mikronukleusa u ćelijama amnionske tečnosti, kao i korelacioni odnosi koncentracija komponenti oksidaciono-antioksidacionog sistema sa koncentracijom LPO i frekvencijom mikronukleusa u ispitivanim uzorcima testirani su primenom *Pearson* korelacionog testa. Prikazani su samo koeficijenti korelacije (r) koji imaju statističku značajnost. U svim primenjenim testovima kriterijum za statističku značajnost je $p \leq 0.05$. Rezultati su prikazani tabelarno i/ili grafički.

4. REZULTATI

4.1. Kliničke i hematološke karakteristike ispitivanih trudnica

U *Tabeli 3* prikazane su kliničke karakteristike zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom. Između ispitivanih grupa trudnica nije bilo statistički značajne razlike u godinama starosti i nedeljama gestacijske starosti. Trudnice sa trombofilijom imale su značajno manji broj porođaja i značajno veći broj spontanih pobačaja u odnosu na zdrave trudnice. Vrednosti *Apgar score* i težina novorođenčadi rođenih iz subkliničkog hipotireoidizma bile su značajno manje u odnosu na novorođenčad rođenih iz zdrave trudnoće.

Tabela 3. Kliničke karakteristike zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.

Kliničke karakteristike	Kontrola	Subklinički hipotireoidizam	Trombofilija
Starost trudnica (godine)	37.57 ± 0.34	37.50 ± 0.84	37.72 ± 0.50
Gestacijska starost (nedelje)	17.53 ± 0.07	17.44 ± 0.60	17.41 ± 0.09
Broj porođaja	0.94 ± 0.13	0.80 ± 0.20	0.44 ± 0.14*
Broj spontanih pobačaja	0.42 ± 0.15	0.30 ± 0.10	0.88 ± 0.19*
<i>Apgar score</i>	9.53 ± 0.16	9.11 ± 0.10*	9.25 ± 0.18
Težina novorođenčadi (g)	3526.84 ± 102.47	3216.67 ± 60.29*	3397.50 ± 109.87
Tiroidostimulišući hormon (TSH) (mIU/L)	1.59 ± 0.08	3.58 ± 0.20*	1.69 ± 0.11
Slobodni trijodtironin (FT3) (pmol/L)	5.69 ± 0.37	5.83 ± 0.41	4.96 ± 0.31
Slobodni tiroksin (FT4) (pmol/L)	15.01 ± 1.78	14.45 ± 1.94	16.21 ± 1.82

Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

U skladu sa definisanim kliničkim kriterijumima za dijagnostikovanje subkliničkog hipotireoidizma u trudnoći, kod trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom vrednosti TSH u serumu bile su veće (3.58 ± 0.20) u odnosu na referentne vrednosti za prvo tromesečje trudnoće, koje su u opsegu od 0.10 to 2.50 mIU/L. Koncentracija FT3 (5.83 ± 0.41) i FT4 (14.45 ± 1.94) u serumu trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom bile su u granicama referentnog opsega (referentne vrednosti za: FT3 - od 2.30 do 8.00 pmol/L; FT4 - od 12.00 do 20.00 pmol/L).

Tabela 4. Hematološke karakteristike zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.

Hematološki parametri	Kontrola	Subklinički hipotireoidizam	Trombofilija
Broj eritrocita ($\times 10^{12}/L$)	4.11 ± 0.45	$3.91 \pm 0.06^*$	3.98 ± 0.90
Hematokrit (%)	0.36 ± 0.004	0.35 ± 0.06	0.36 ± 0.03
Hemoglobin (g/L)	121.74 ± 1.27	$117.10 \pm 1.99^*$	120.77 ± 1.67
Zapremina eritrocita (MCV) (μm^3)	87.18 ± 0.78	89.43 ± 1.00	$91.25 \pm 0.84^*$
Prosečna količina hemoglobin u eritrocitima (MCH) (pg/ćeliji)	36.63 ± 6.95	30.17 ± 0.37	45.48 ± 14.92
Prosečna koncentracija hemoglobin u eritrocitima (MCHC) (g/L)	339.77 ± 2.55	337.79 ± 3.28	315.07 ± 18.06
Broj trombocita ($\times 10^9/L$)	230.57 ± 9.41	258.70 ± 14.49	230.39 ± 13.41
Protrombinsko vreme (PT) (s)	9.60 ± 0.13	9.60 ± 0.14	9.80 ± 0.17
Humani horionski gonadotropin (β -hCG) (U/L)	1.29 ± 0.80	1.60 ± 0.37	$2.13 \pm 0.93^*$
C-reaktivni protein (CRP) (mg/L)	3.65 ± 0.52	$4.80 \pm 0.71^*$	$4.65 \pm 0.80^*$

Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

U *Tabeli 4* prikazane su hematološke karakteristike zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom. U odnosu na zdrave trudnice, broj eritrocita i koncentracija hemoglobina bile su značajno manje u perifernoj krvi trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom, dok su kod trudnica sa trombofilijom pokazane veće vrednosti zapremine eritrocita (MCV). Vrednosti hematokrita, prosečne količine hemoglobina u eritrocitima, prosečne koncentracije hemoglobina u eritrocitima, broja trombocita i protrombinskog vremena nisu bile značajno različite između ispitivanih grupa trudnica. Kod trudnica sa trombofilijom pokazane su značajno veće vrednosti koncentracije humanog horionskog gonadotropina u odnosu na zdrave trudnice. Koncentracija C-reaktivnog proteina bila je značajno veća u serumu trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom u odnosu na zdrave trudnice, ali u opsegu referentnih vrednosti za trudnoću (do 10 mg/L).

4.2. Distribucija leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.

Broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom prikazan je u *Tabeli 5* i na *Grafikonu 1*. Na osnovu prikazanih rezultata, broj leukocita u perifernoj krvi ispitivanih trudnica nije bio značajno različit.

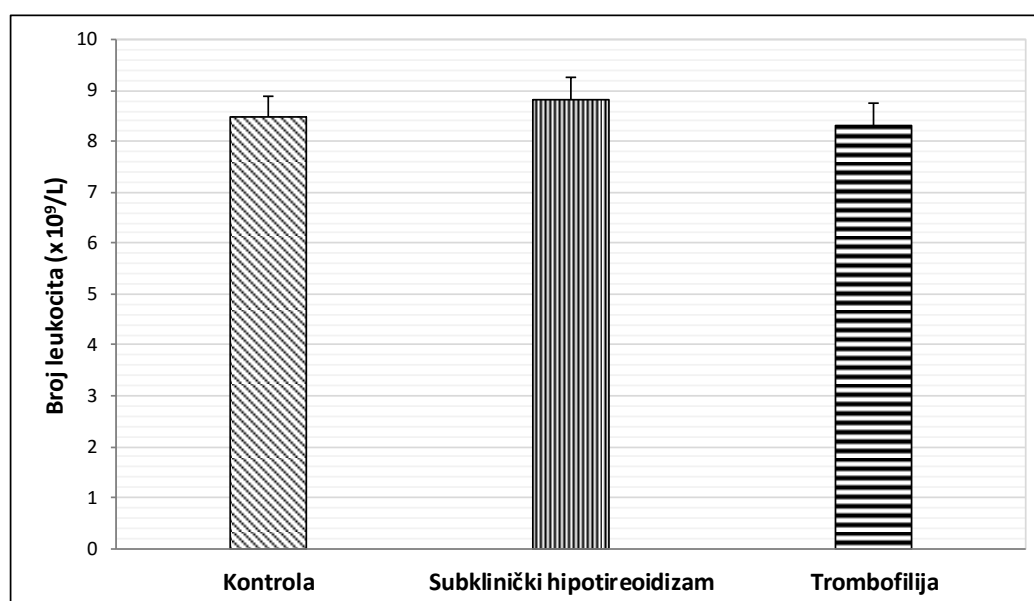
Tabela 5. Broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.

	Kontrola	Subklinički hipotireoidizam	Trombofilija
Broj leukocita (x 10 ⁹ /L)	8.47 ± 0.78	8.82 ± 0.81	8.33 ± 0.73

Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* p ≤ 0.05, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Grafikon 1. Broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

U Tabeli 6, na Grafikonu 2 i Grafikonu 3 prikazane su vrednosti broja pojedinih vrsta granulocita (neutrofila, eozinofila i bazofila) u perifernoj krvi zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom. U odnosu na zdrave trudnice, broj eozinofilnih granulocita je značajno veći u perifernoj krvi, kako kod trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom (Graf. 2), tako i kod trudnica sa trombofilijom (Graf. 3). U broju neutrofilnih i bazofilnih granulocita nije bilo značajne razlike između ispitivanih grupa trudnica.

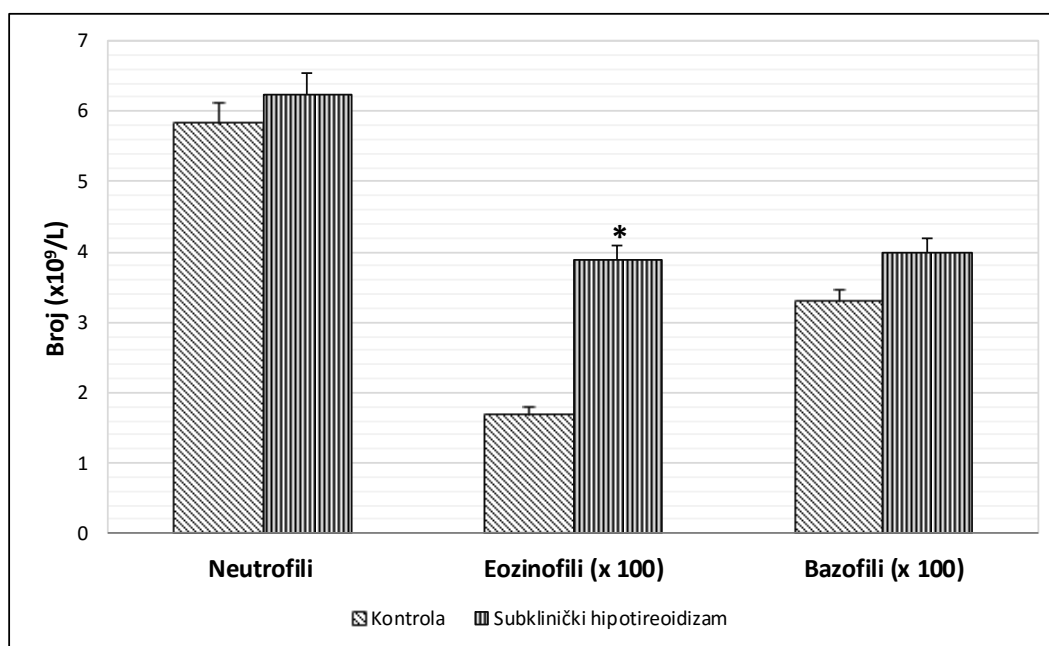
Tabela 6. Broj pojedinih vrsta granulocita u perifernoj krvi zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.

Granulociti	Kontrola	Subklinički hipotireoidizam	Trombofilija
Neutrofilni (x 10 ⁹ /L)	5.83 \pm 0.42	6.24 \pm 0.59	5.49 \pm 0.47
Eozinofili (x 10 ⁹ /L)	0.17 \pm 0.02	0.39 \pm 0.03*	0.54 \pm 0.04*
Bazofili (x 10 ⁹ /L)	0.033 \pm 0.004	0.040 \pm 0.003	0.038 \pm 0.002

Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

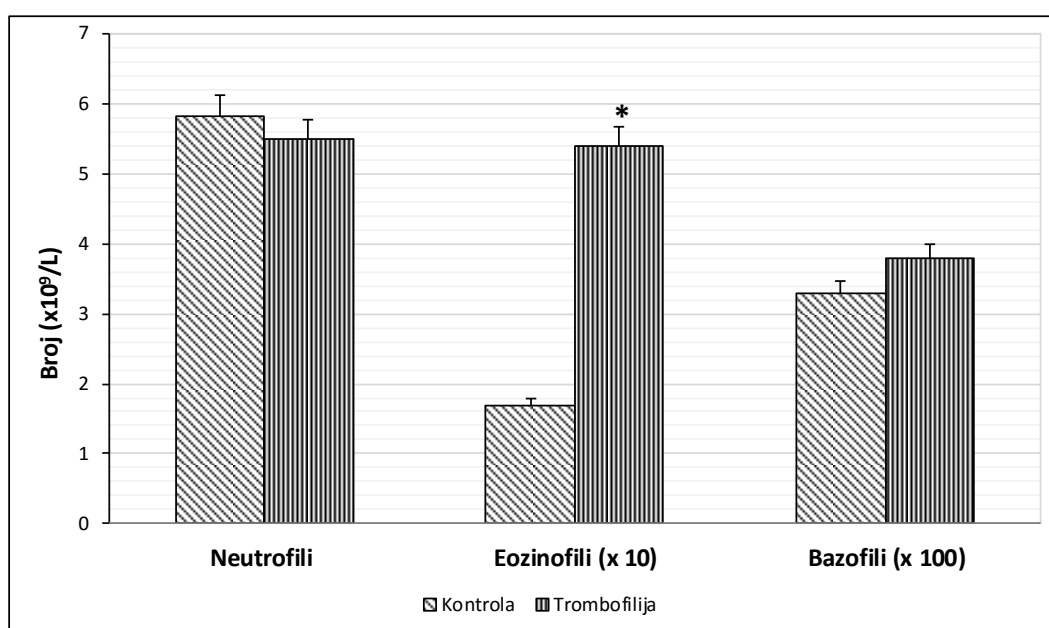
Grafikon 2. Broj pojedinih vrsta granulocita u perifernoj krvi zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Grafikon 3. Broj pojedinih vrsta granulocita u perifernoj krvi zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom..



Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Rezultati procentualne zastupljenosti pojedinih vrsta granulocita u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi trudnica (Tab. 7, Graf. 4 i Graf. 5) pokazuju da je kod trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom (Tab. 7, Graf. 4) i trudnica sa trombofilijom (Tab. 7, Graf. 5) statistički značajno zastupljeniji procenat eozinofilnih i bazofilnih granulocita u odnosu na ukupan broj leukocita.

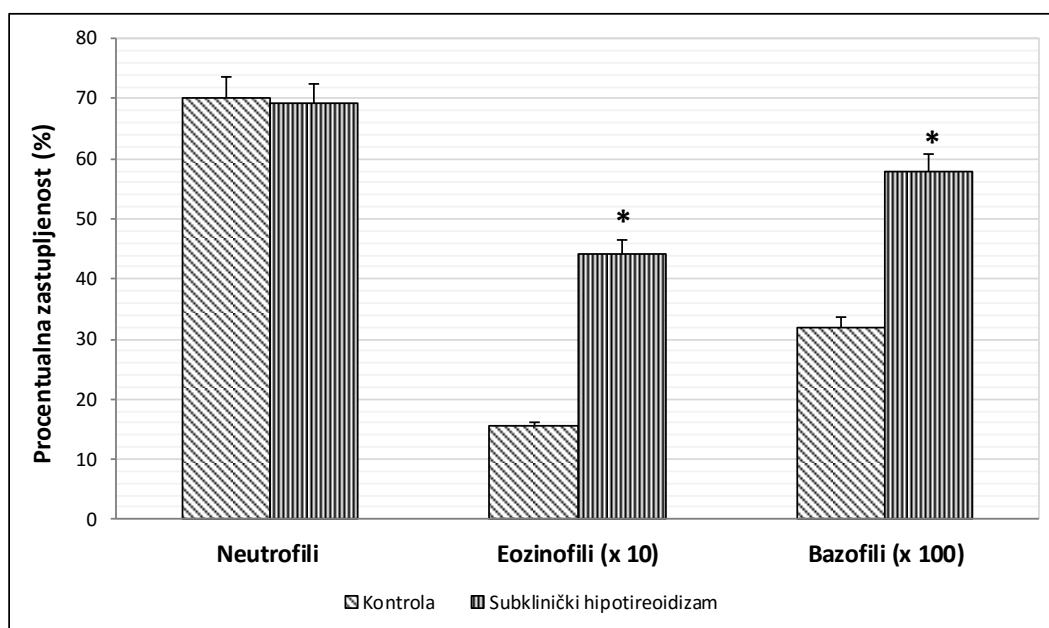
Tabela 7. Procentualna zastupljenost pojedinih vrsta granulocita u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.

	Kontrola	Subklinički hipotireoidizam	Trombofilija
Neutrofili (%)	70.19 ± 6.47	69.12 ± 6.32	67.28 ± 5.78
Eozinofili (%)	1.55 ± 0.14	4.43 ± 0.36*	6.51 ± 0.57*
Bazofili (%)	0.32 ± 0.02	0.58 ± 0.04*	0.59 ± 0.04*

Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Grafikon 4. Procentualna zastupljenost pojedinih vrsta granulocita u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.

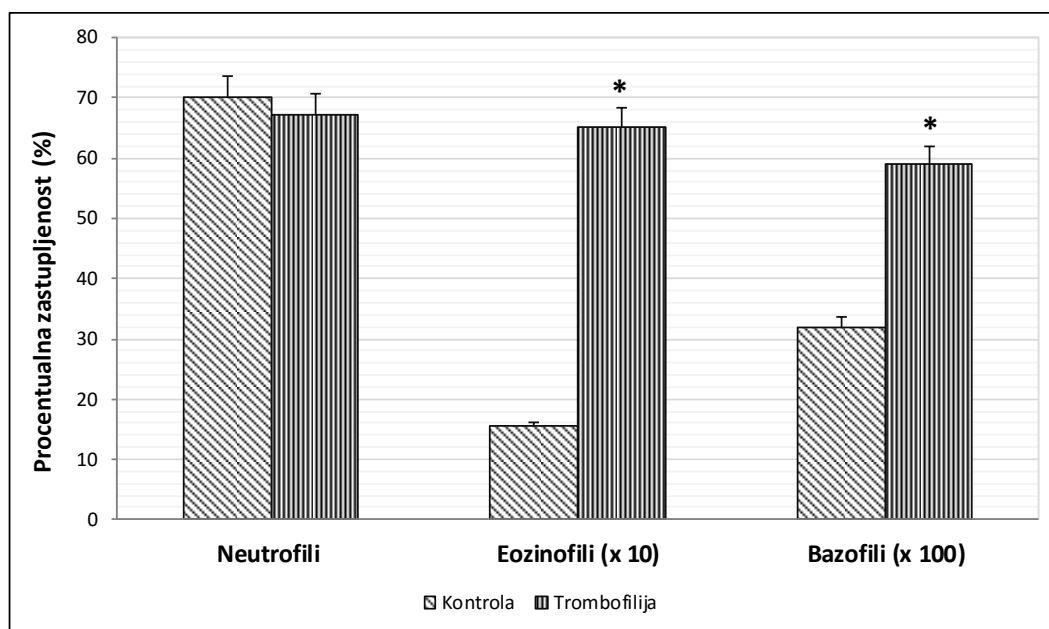


Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

U odnosu na zdrave trudnice, naročito je izražena razlika u procentualnoj zastupljenosti eozinofilnih granulocita u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi, koji je kod trudnica sa subkličičkim hipotireoidizmom veći za oko 2.8 puta, a kod trudnica sa trombofilijom oko 4.8 puta.

Grafikon 5. Procentualna zastupljenost pojedinih vrsta granulocita u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subkličički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Na osnovu rezultata prikazanih u *Tabeli 8* i na *Grafikonima 6* i *7*, broj monocita u perifernoj krvi je značajno veći kod trudnica sa trombofilijom u odnosu na zdrave trudnice (*Tab. 8* i *Graf. 7*). U broju limfocita u perifernoj krvi ispitivanih trudnica nije bilo značajnih razlika (*Tab. 8*, *Graf. 6* i *Graf. 7*).

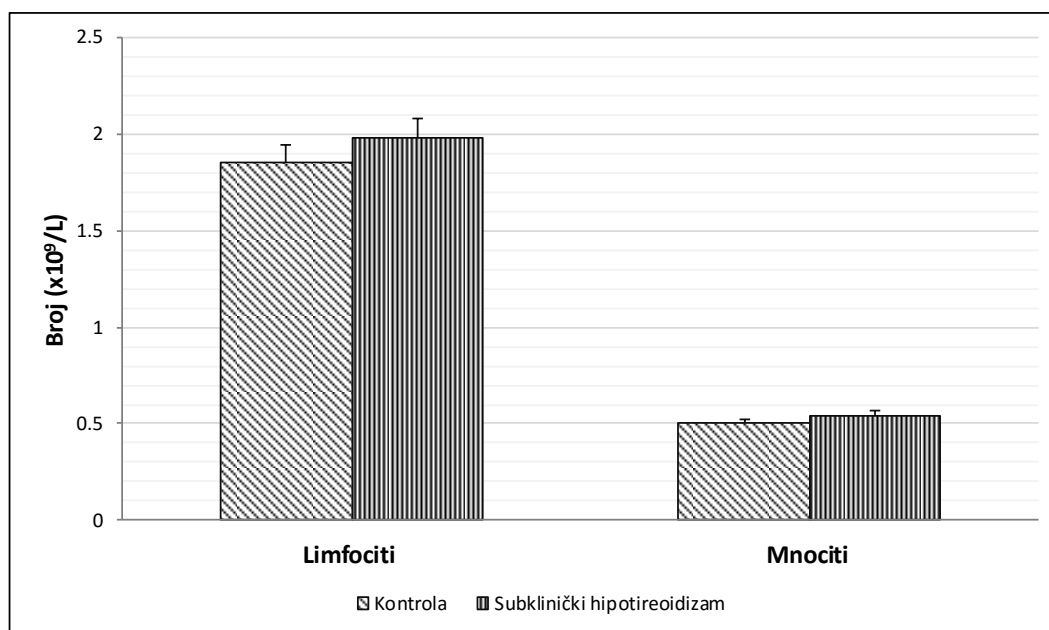
Tabela 8. Broj pojedinih vrsta agranulocita u perifernoj krvi zdravih trudnica, trudnica sa subkličičkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.

	Kontrola	Subkličički hipotireoidizam	Trombofilija
Limfociti ($\times 10^9/L$)	1.85 ± 0.09	1.98 ± 0.08	1.95 ± 0.01
Mnoci ($\times 10^9/L$)	0.50 ± 0.041	0.54 ± 0.042	$0.89 \pm 0.07^*$

Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.

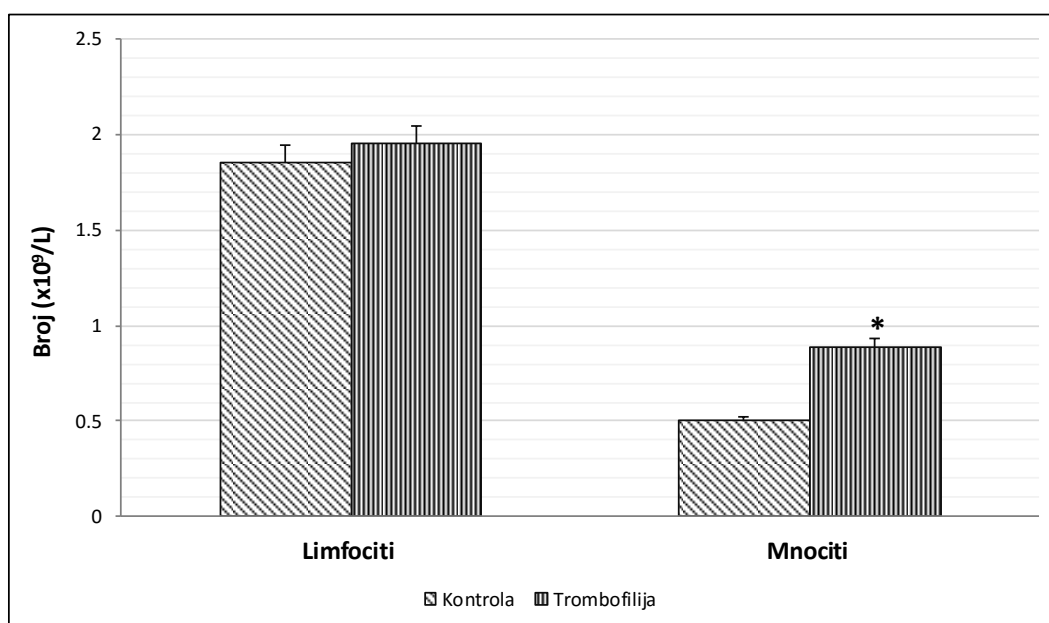
* $p \leq 0.05$, subkličički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Grafikon 6. Broj pojedinih vrsta agranulocita u perifernoj krvi zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.
* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Grafikon 7. Broj pojedinih vrsta agranulocita u perifernoj krvi zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.
* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

U Tabeli 9 i na Grafikonima 8 i 9 prikazani su rezultati procentualne zastupljenosti pojedinih vrsta agranulocita (limfocita i monocita) u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom. Između ispitivanih grupa trudnica nije utvrđena značajna razlika u procentualnoj zastupljenosti limfocita i monocita u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi.

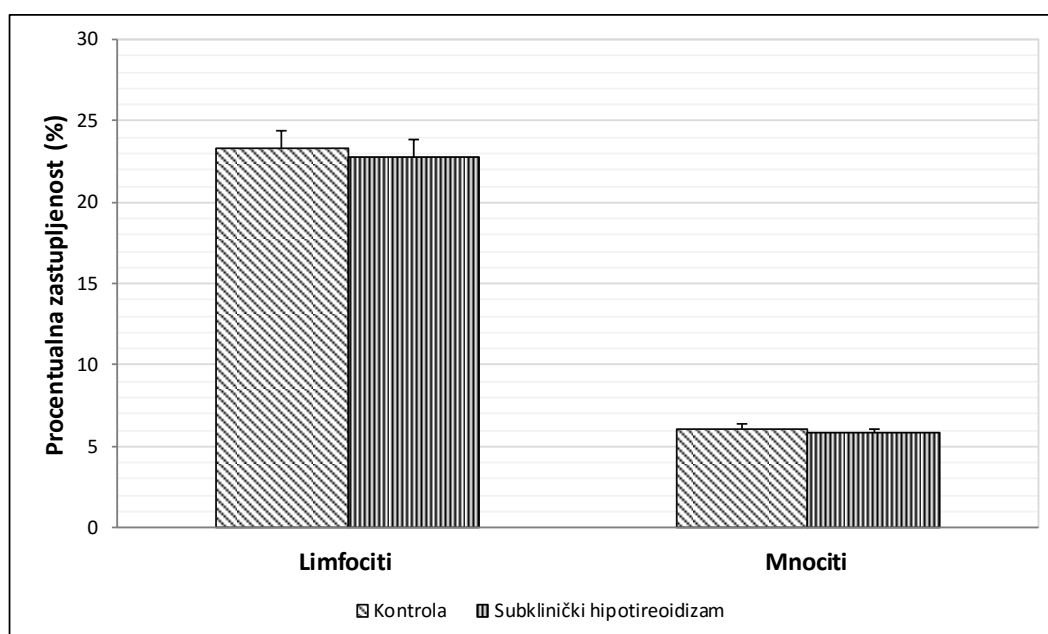
Tabela 9. Procentualna zastupljenost pojedinih vrsta agranulocita u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.

	Kontrola	Subklinički hipotireoidizam	Trombofilija
Limfociti (%)	23.29 ± 2.07	22.74 ± 2.19	23.68 ± 2.30
Mnocići (%)	6.06 ± 0.52	5.79 ± 0.46	5.90 ± 0.57

Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

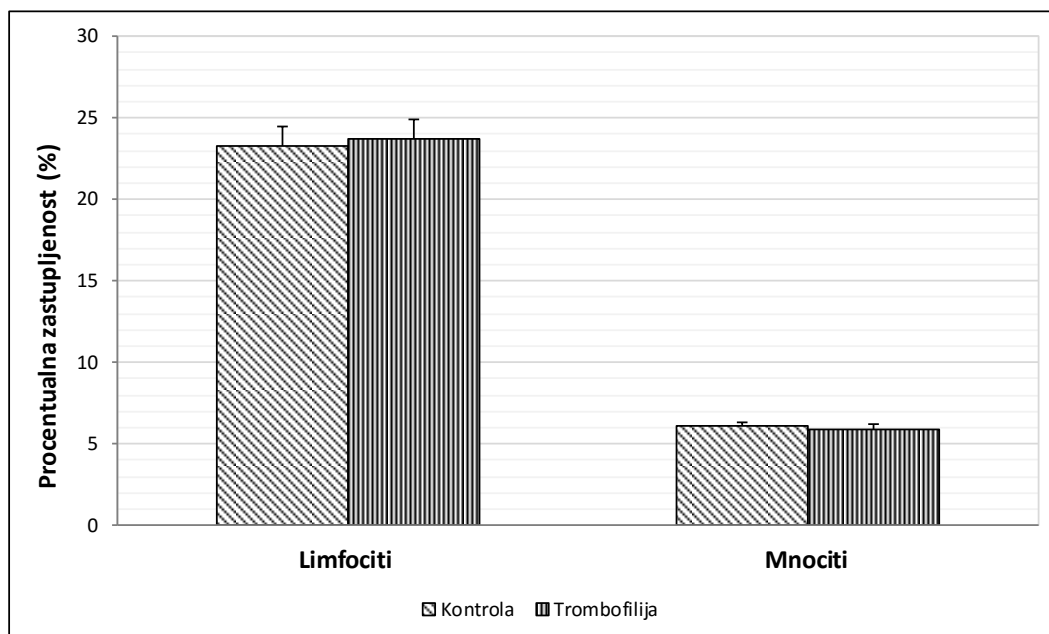
Grafikon 8. Procentualna zastupljenost pojedinih vrsta agranulocita u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Grafikon 9. Procentualna zastupljenost pojedinih vrsta agranulocita u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

4.3. Koncentracija ROS i RNS u amnijskoj tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom

Vrednosti koncentracija superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) i vodonik peroksida (H_2O_2) u amnijskoj tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom prikazane su u *Tabeli 10* i na *Grafikonima 10* i *11*. Dobijeni rezultati pokazuju da je u amnijskoj tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom u odnosu na zdrave trudnice koncentracija $O_2^{\cdot-}$ veća 2.6 puta (*Tab. 10* i *Graf. 10*). Koncentracija H_2O_2 u amnijskoj tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom je 1.44 puta manja od koncentracije u amnijskoj tečnosti zdravih trudnica (*Tab. 10* i *Graf. 10*). Između zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom nije pokazana razlika u koncentraciji $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 u amnijskoj tečnosti (*Tab. 10* i *Graf. 11*).

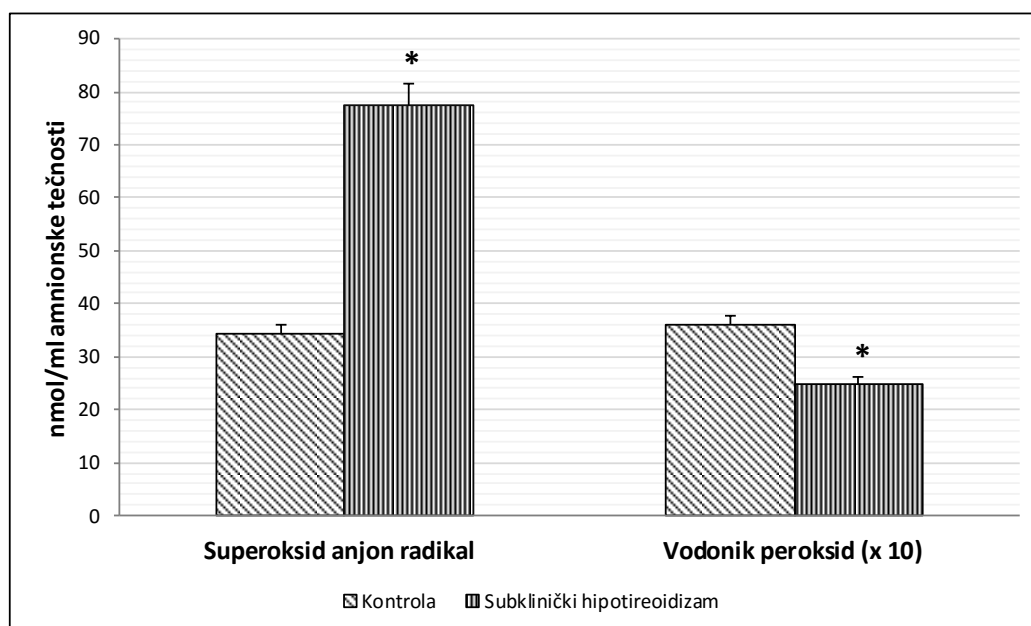
Tabela 10. Koncentracija ROS i RNS u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.

	Kontrola	Subklinički hipotireoidizam	Trombofilija
Superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$) (nmol/ml amnionske tečnosti)	34.30 ± 3.30	77.64 ± 12.95*	35.17 ± 5.48
Vodonik peroksid (H_2O_2) (nmol/ml amnionske tečnosti)	3.61 ± 0.5	2.49 ± 0.23*	3.55 ± 0.32
Azot monoksid (NO) (nmol/ml amnionske tečnosti)	474.92 ± 18.49	542.14 ± 27.68*	498.30 ± 27.41
Peroksinitriti ($ONOO^{\cdot-}$) (nmol/ml amnionske tečnosti)	239.60 ± 3.30	240.89 ± 3.86	243.36 ± 3.11

Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

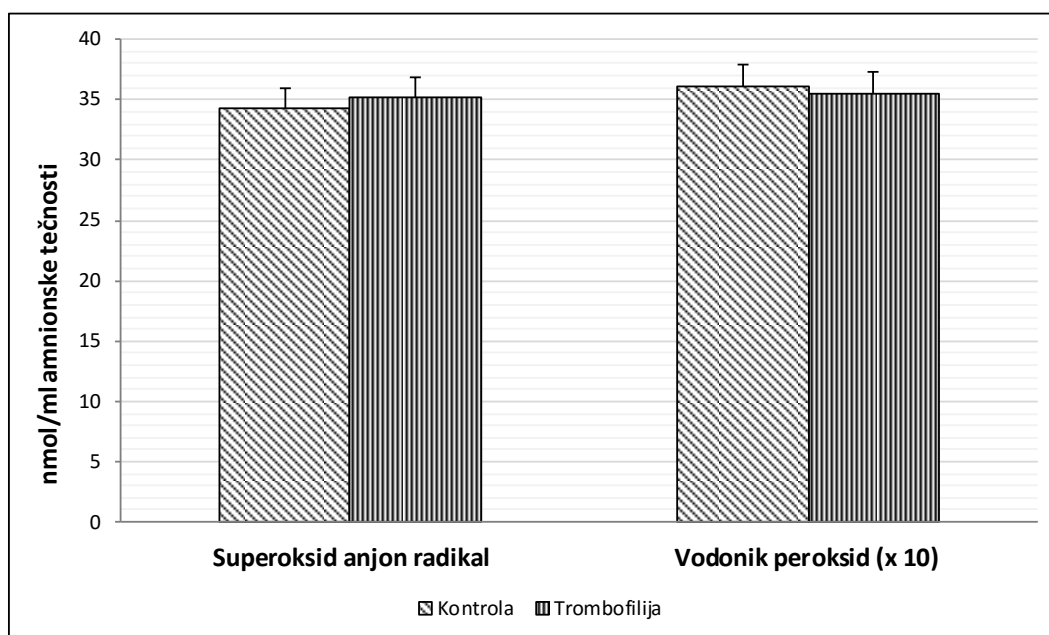
Grafikon 10. Koncentracije superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) i vodonik peroksida (H_2O_2) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Grafikon 11. Koncentracije superoksid anjon radikala (O_2^-) i vodonik peroksida (H_2O_2) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.



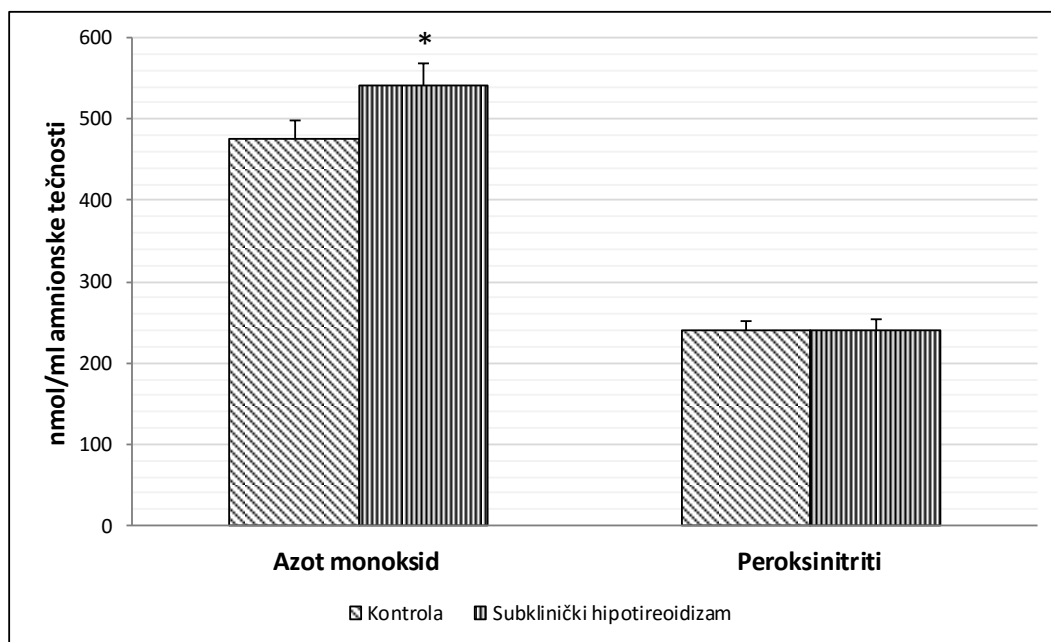
Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Koncentracija azot monoksida (NO) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom prikazana je u *Tabeli 10* i na *Grafikonima 12*. Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj studiji, koncentracija NO u amnionskoj tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom je za 1.1 put veća u odnosu na koncentraciju u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica. U *Tabeli 10* i na *Grafikonu 13* prikazane su vrednosti koncentracije NO u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom. Prema rezultatima ovog istraživanja, koncentracija NO u amnionskoj tečnosti trudnica sa trombofilijom nije značajno različita u odnosu na zdrave trudnice.

Vrednosti koncentracija peroksinitrita ($ONOO^-$) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom prikazane su u *Tabeli 10* i *Grafikonima 12* i *13*. Na osnovu prikazanih rezultata, koncentracija $ONOO^-$ u amnionskoj tečnosti nije značajno različita između ispitivanih grupa trudnica.

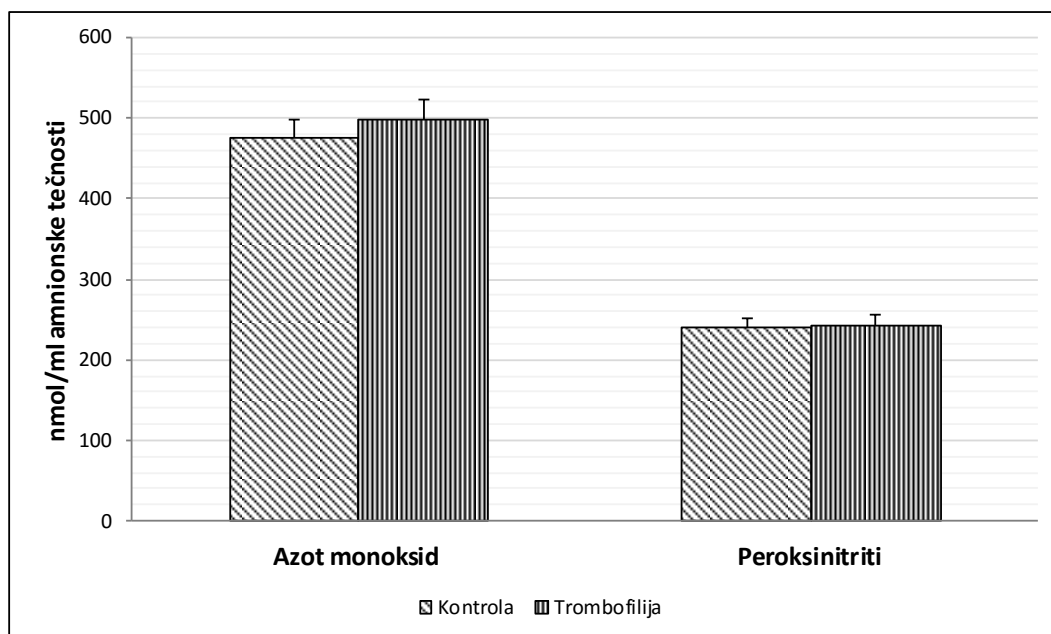
Grafikon 12. Koncentracije azot monoksida (NO) i peroksinitrita (ONOO⁻) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Grafikon 13. Koncentracije azot monoksida (NO) i peroksinitrita (ONOO⁻) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

4.4. Koncentracija GSH i GSSG u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom

Koncentracije redukovanog glutationa (GSH) i oksidovanog glutationa (GSSG) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom prikazane su u *Tabeli 11* i na *Grafikonima 14* i *15*.

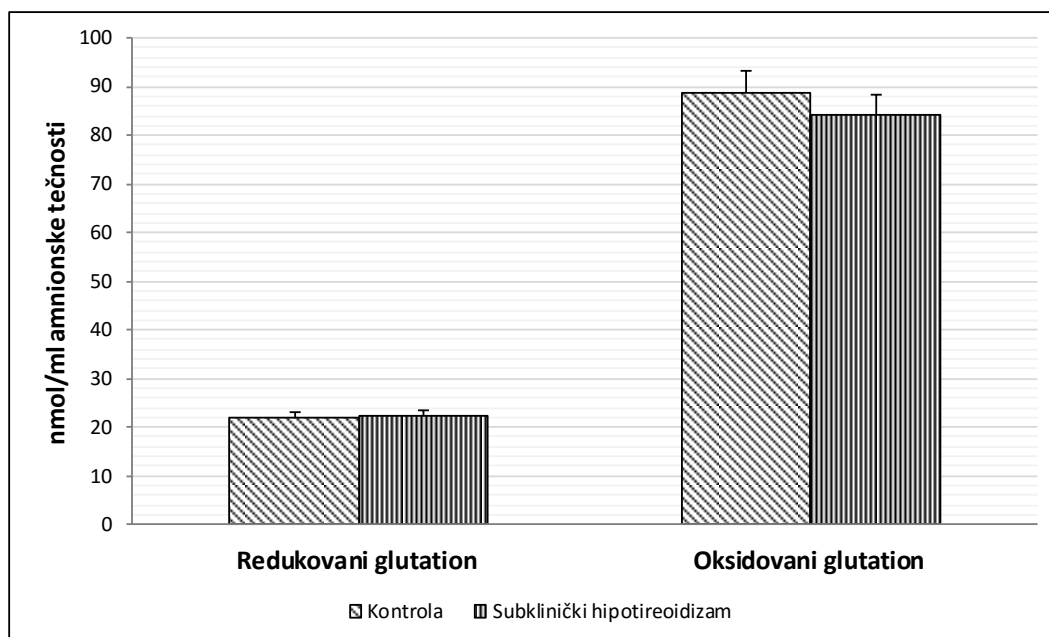
Tabela 11. Koncentracija redukovanog (GSH) i oksidovanog glutationa (GSSG) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.

	Kontrola	Subklinički hipotireoidizam	Trombofilija
Redukovani glutation (GSH) (nmol/ml amnionske tečnosti)	21.89 ± 0.28	22.43 ± 0.42	22.11 ± 0.25
Oksidovani glutation (GSSG) (nmol/ml amnionske tečnosti)	88.79 ± 19.75	84.26 ± 19.97	96.40 ± 6.43*

Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Grafikon 14. Koncentracije redukovanog (GSH) i oksidovanog glutationa (GSSG) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.

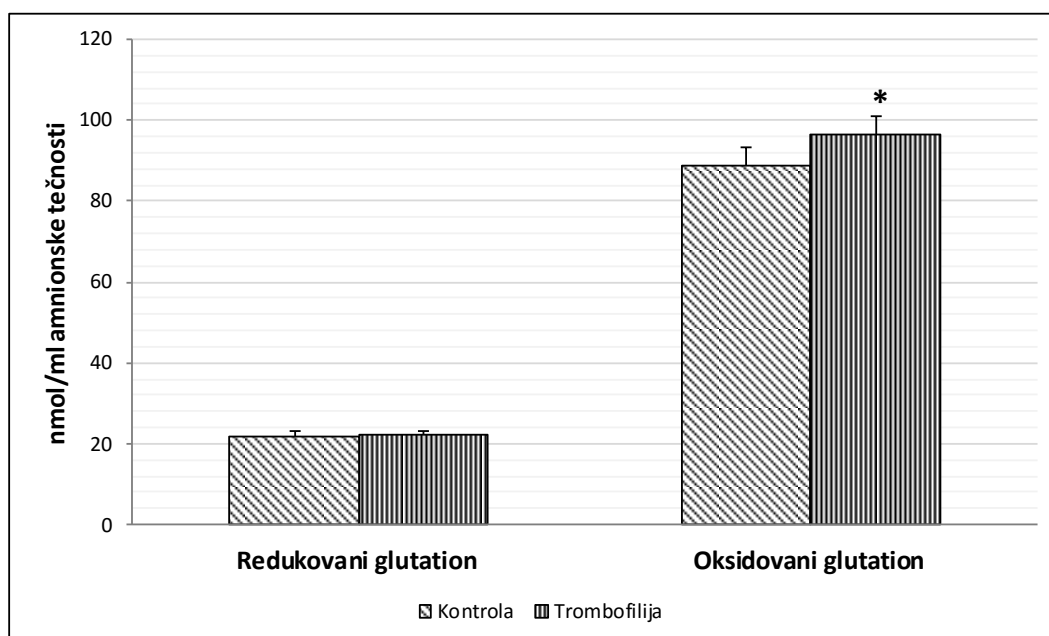


Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Između ispitivanih grupa trudnica nije pokazana značajna razlika u koncentraciji GSH u amnionskoj tečnosti. Povećana koncentracija GSSG (1.08 puta) u amnionskoj tečnosti, u odnosu na zdrave trudnice pokazana je kod trudnica sa trombofilijom (Tab. 11 i Graf. 15). Kod trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom u odnosu na zdrave trudnice, koncentracija GSSG u amnionskoj tečnosti nije značajno različita (Tab. 11 i Graf. 14).

Grafikon 15. Koncentracije redukovanog (GSH) i oksidovanog glutationa (GSSG) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

4.5. Koncentracija LPO u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom

Koncentracije lipidnih peroksida (LPO) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom prikazane su u Tabeli 12 i na Grafikonu 16. Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj studiji, koncentracija LPO u amnionskoj tečnosti nije bila značano različita između ispitivanih grupa trudnica.

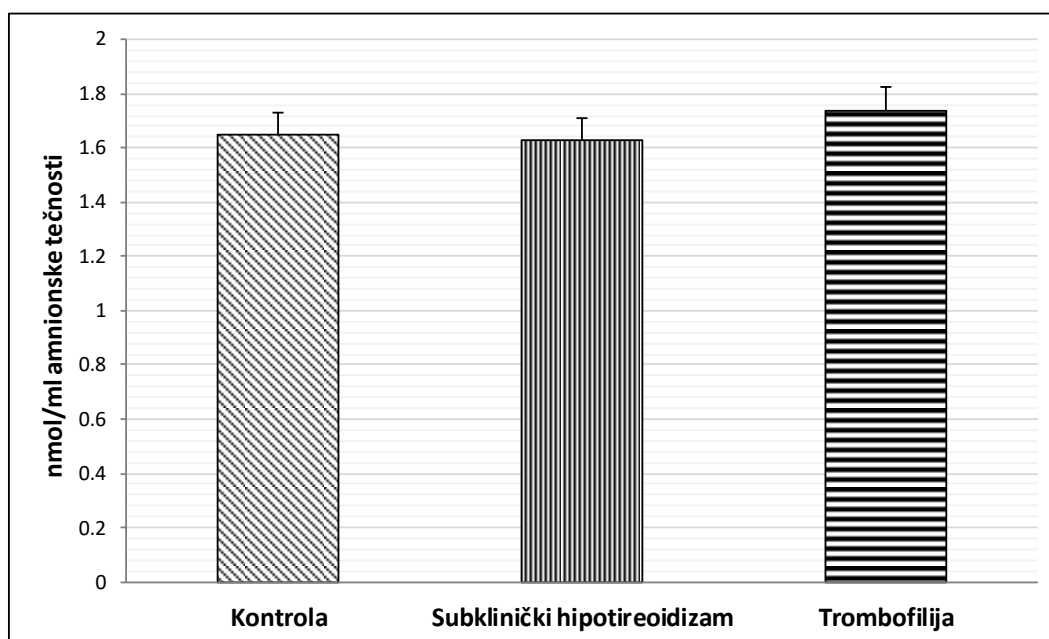
Tabela 12. Koncentracija lipidnih peroksida (LPO) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.

	Kontrola	Subklinički hipotireoidizam	Trombofilija
Lipidni peroksidi (LPO) (nmol/ml amnionske tečnosti)	1.65 ± 0.12	1.63 ± 0.07	1.74 ± 0.10

Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Grafikon 16. Koncentracije lipidnih peroksida (LPO) u amnionskoj tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

4.6. Koncentracija ROS i RNS u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom

U *Tabeli 13* i na *Grafikonu 17* prikazane su vrednosti koncentracija $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom. Na osnovu prikazanih rezultata, koncentracija $O_2^{\cdot-}$ je 2.12 puta veća, dok je koncentracija H_2O_2 manja 2.04 puta u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom u odnosu na zdrave trudnice. Vrednosti koncentracija $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom prikazane su u *Tabeli 13* i na *Grafikonu 18*. Dobijeni rezultati pokazuju da je u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa trombofilijom, koncentracija $O_2^{\cdot-}$ veća 1.75 puta, dok je koncentracija H_2O_2 manja 1.60 puta u odnosu na zdrave trudnice.

Razlike u koncentraciji NO i ONOO⁻ u ćelijama amnionske tečnosti između zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom prikazane su u *Tabeli 13* i na *Grafikonu 19*. U ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom značajno su veće koncentracije NO (1.30 puta) i ONOO⁻ (1.47 puta) u odnosu na zdrave trudnice. Kod trudnica sa trombofilijom u odnosu na zdrave trudnice, pokazane su značajno veće koncentracije NO (1.3 puta) i ONOO⁻ (1.35 puta) u ćelijama amnionske tečnosti (*Tab. 13* i *Graf. 20*).

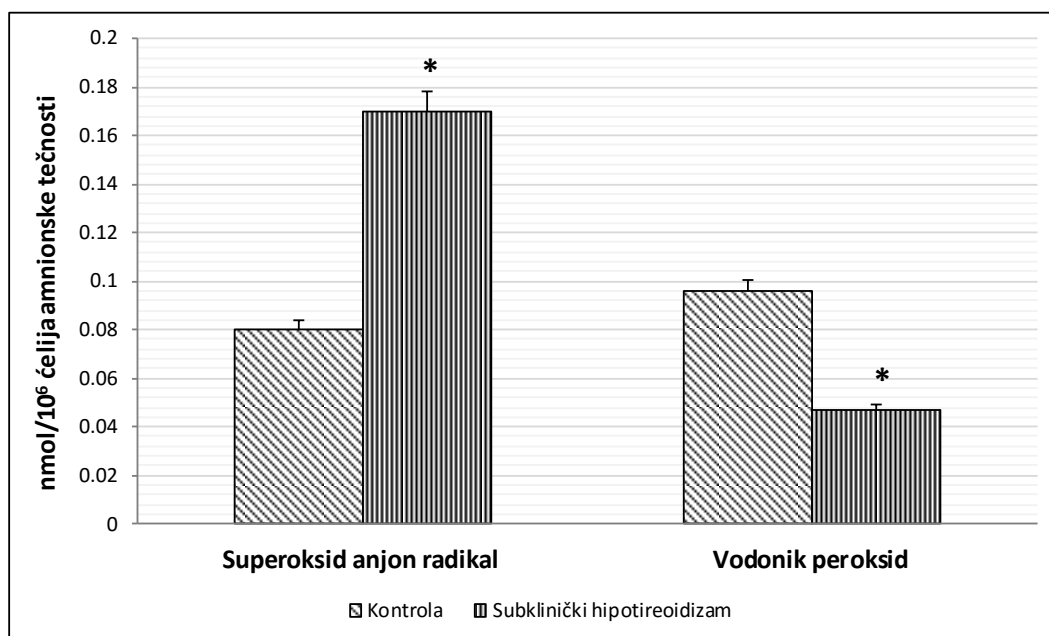
Tabela 13. Koncentracija ROS i RNS u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.

	Kontrola	Subklinički hipotireoidizam	Trombofilija
Superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$) (nmol/ 10^6 ćelija amnionske tečnosti)	0.08 ± 0.009	0.17 ± 0.03*	0.14 ± 0.03*
Vodonik peroksid (H_2O_2) (nmol/ 10^6 ćelija amnionske tečnosti)	0.096 ± 0.02	0.047 ± 0.007*	0.06 ± 0.007*
Azot monoksid (NO) (nmol/ 10^6 ćelija amnionske tečnosti)	4.60 ± 0.41	6.02 ± 0.64*	5.95 ± 0.46*
Peroksinitriti (ONOO⁻) (nmol/ 10^6 ćelija amnionske tečnosti)	36.56 ± 3.72	53.74 ± 6.17*	48.35 ± 4.63*

Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

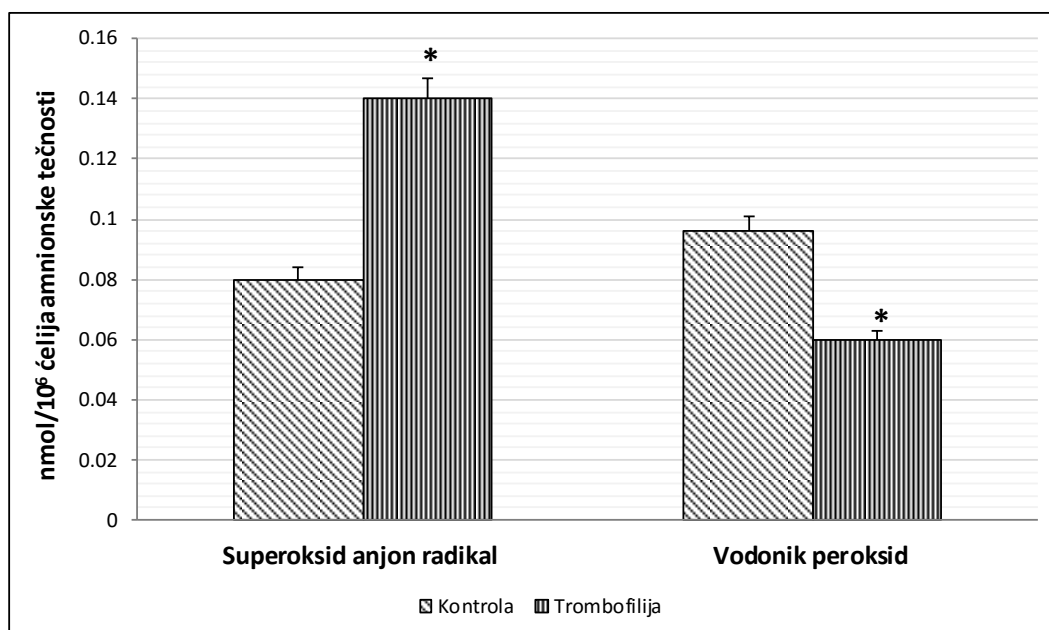
Grafikon 17. Koncentracije superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) i vodonik peroksida (H_2O_2) u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

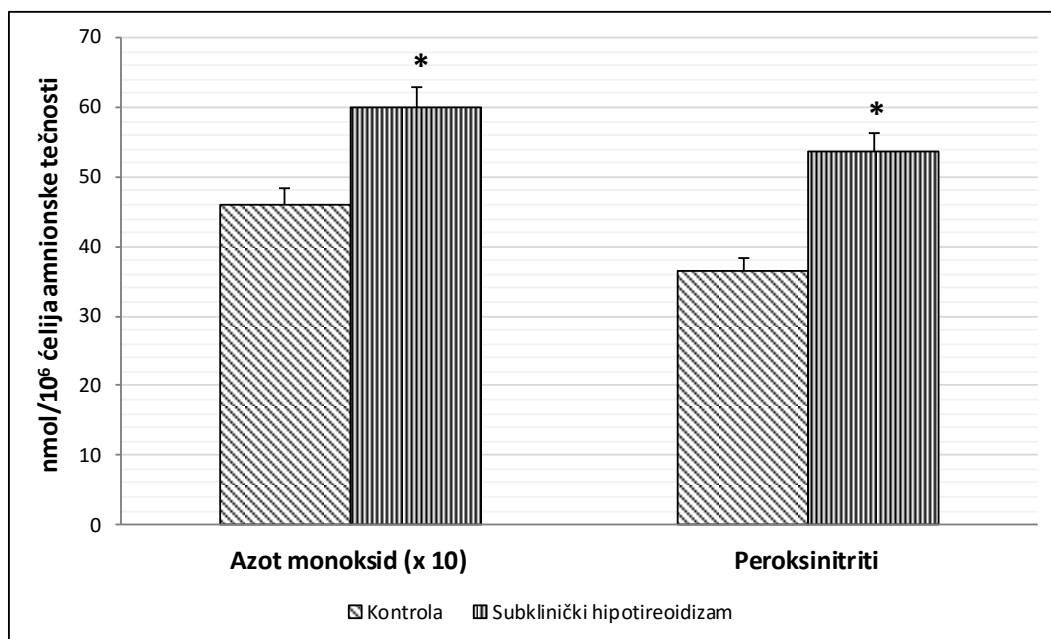
Grafikon 18. Koncentracije superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) i vodonik peroksida (H_2O_2) u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

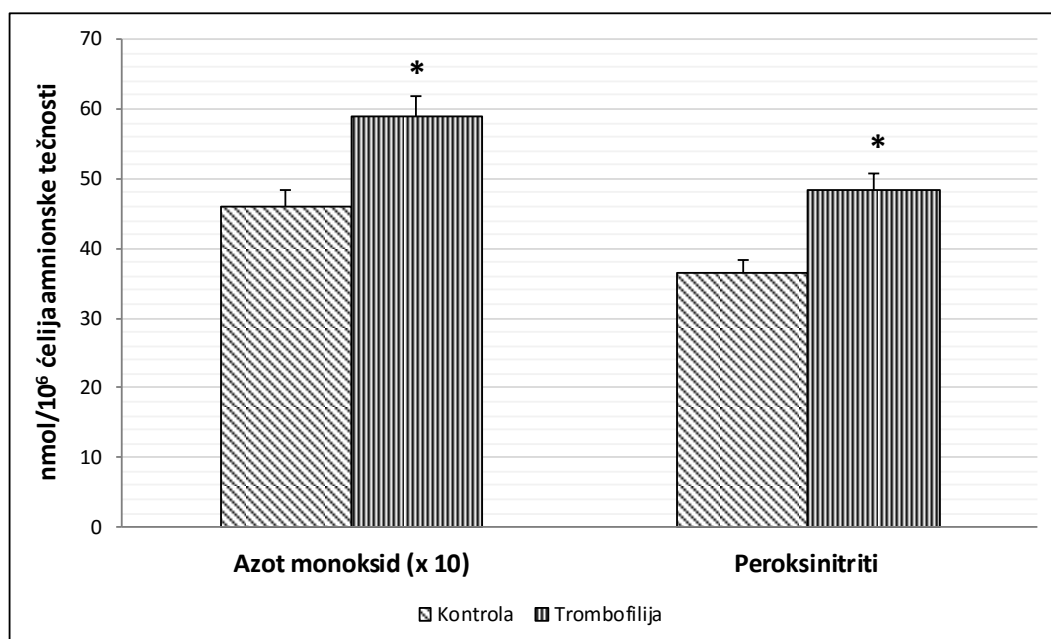
Grafikon 19. Koncentracije azot monoksida (NO) i peroksinitrita (ONOO⁻) u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Grafikon 20. Koncentracije azot monoksida (NO) i peroksinitrita (ONOO⁻) u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

4.7. Koncentracija GSH i GSSG u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom

Vrednosti koncentracija GSH i GSSG u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom prikazane su u Tabeli 14 i na Grafikonims 21 i 22.

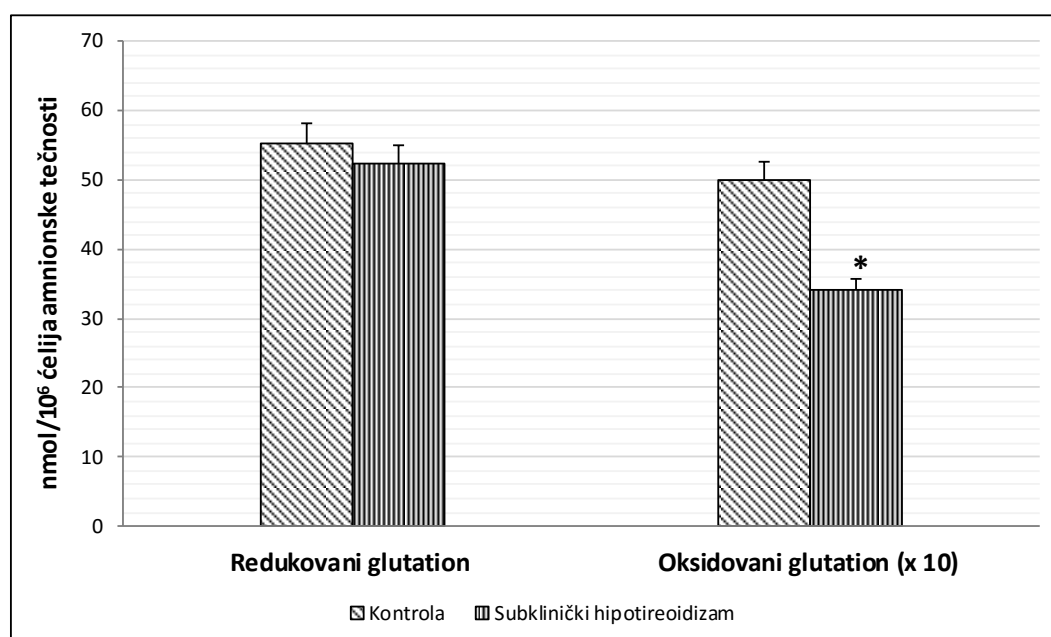
Tabela 14. Koncentracija redukovanog (GSH) i oksidovanog glutaciona (GSSG) u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.

	Kontrola	Subklinički hipotireoidizam	Trombofilija
Redukovani glutation (GSH) (nmol/10 ⁶ ćelija amnionske tečnosti)	55.32 ± 5.73	52.32 ± 4.79	41.39 ± 3.35*
Oksidovani glutation (GSSG) (nmol/10 ⁶ ćelija amnionske tečnosti)	5.01 ± 0.57	3.46 ± 1.67*	3.32 ± 0.43*

Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* p ≤ 0.05, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Grafikon 21. Koncentracije redukovanog (GSH) i oksidovanog glutaciona (GSSG) u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.

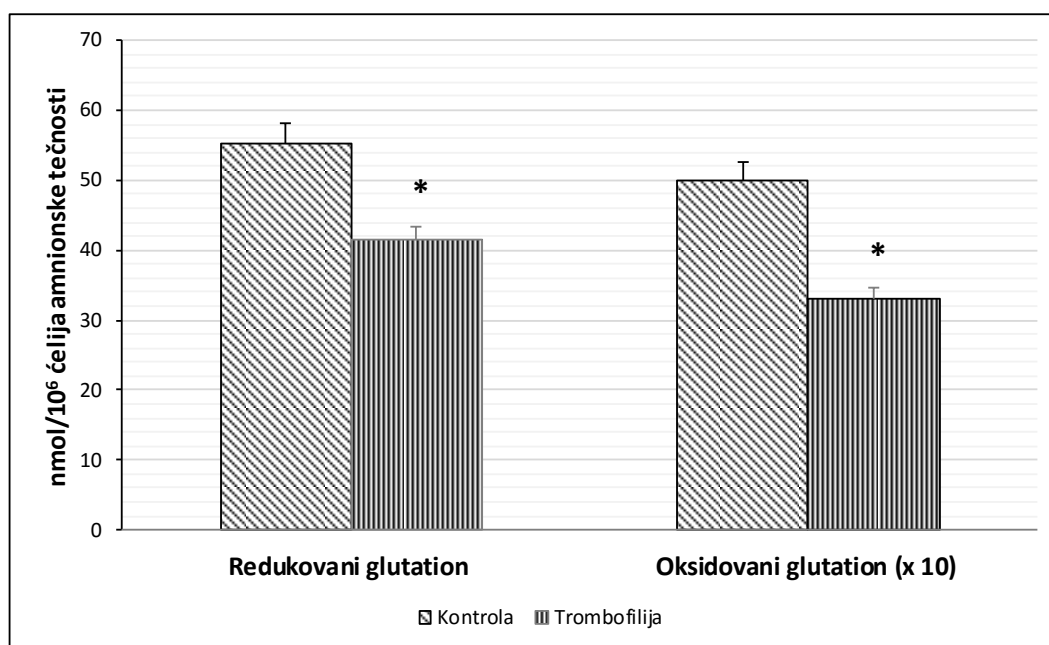


Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* p ≤ 0.05, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Na osnovu rezultata sprovedenih u ovoj studiji, u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom, koncentracija GSH nije značajno različita, dok je koncentracija GSSG značajno manja (1.44 puta) u odnosu na zdrave trudnice. U ćelijama amnionske tečnosti kod trudnica sa trombofilijom, pokazane su značajno manje koncentracije GSH (1.33 puta) i GSSG (1.50 puta) u odnosu na zdrave trudnice.

Grafikon 22. Koncentracije redukovanog (GSH) i oksidovanog glutatona (GSSG) u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

4.8. Koncentracija LPO i frekvencija mikronukleusa u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom

U Tabeli 15 i na Grafikonima 23 i 24 prikazani su rezultati koncentracije LPO i frekvencija mikronukleusa u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom. U poređenju sa zdravim trudnicama, u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom vrednosti koncentracije LPO veće su 1.30 puta, dok je frekvencija mikronukleusa veća 1.7

puta (Tab. 15 i Graf. 23).

Koncentracija LPO u ćelijama amnionske tečnosti kod trudnica sa trombofilijom značajno je veća u odnosu na koncentraciju LPO zdravih trudnica (1.80 puta). Između zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom nije pokazana značajna razlika u frekvenci mikronukleusa (Tab. 15 i Graf. 24).

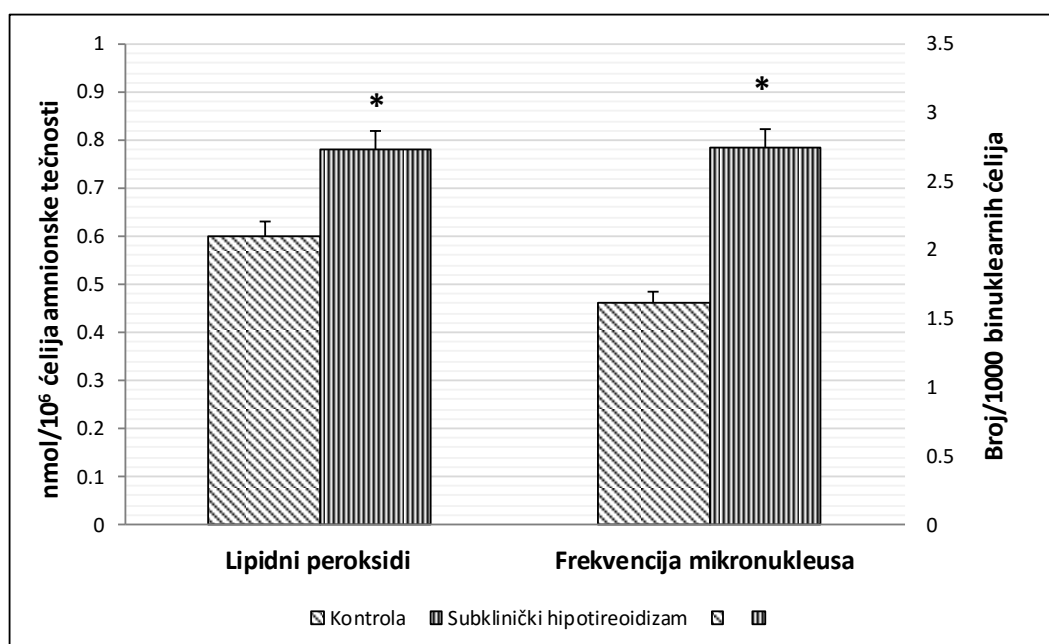
Tabela 15. Koncentracija lipidnih peroksida (LPO) i frekvencija mikronukleusa u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica, trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i trudnica sa trombofilijom.

	Kontrola	Subklinički hipotireoidizam	Trombofilija
Lipidni peroksidi (LPO) (nmol/10 ⁶ ćelija amnionske tečnosti)	0.60 ± 0.07	0.78 ± 0.13*	1.07 ± 0.26*
Frekvencija mikronukleusa (broj/1000 binuklearnih ćelija)	1.61 ± 0.015	2.75 ± 0.19*	1.88 ± 0.17

Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* p ≤ 0.05, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

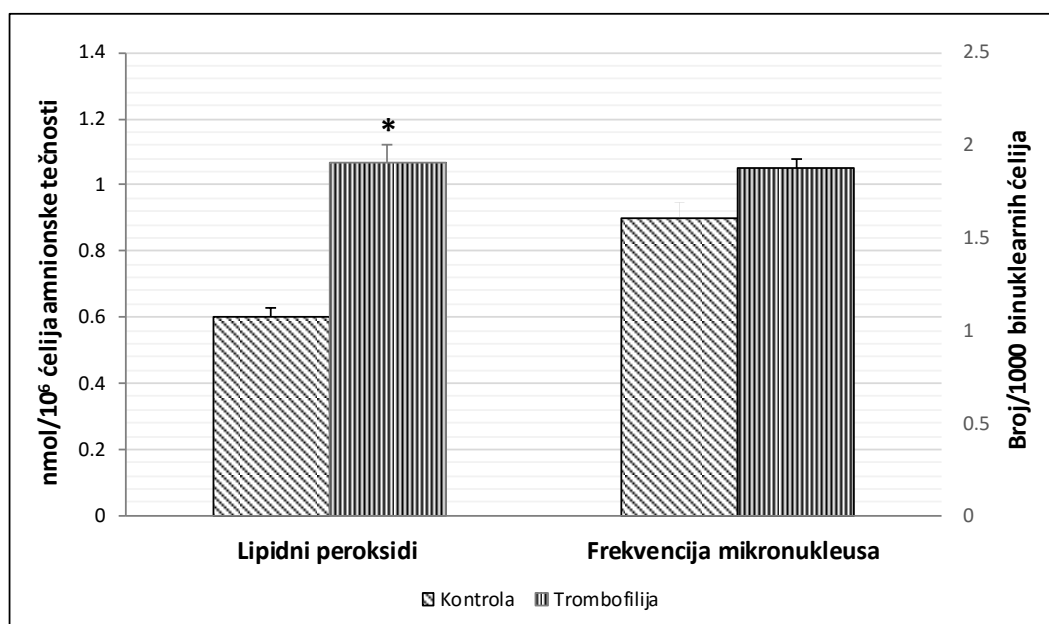
Grafikon 23. Koncentracija lipidnih peroksida (LPO) i frekvencija mikronukleusa u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost ± S.E.M.

* p ≤ 0.05, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

Grafikon 24. Koncentracija lipidnih peroksida (LPO) i frekvencija mikronukleusa u ćelijama amnionske tečnosti zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom.



Podaci predstavljaju srednju vrednost \pm S.E.M.

* $p \leq 0.05$, subklinički hipotireoidizam i trombofilija u odnosu na kontrolu.

4.9. Korelacijski odnosi koncentracije LPO i frekvence mikronukleusa kod trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom

Na osnovu rezultata ispitivanja korelacijskih odnosa koncentracija ROS i RNS u amnionskoj tečnosti pokazana je:

- negativna korelacija između manje telesne težine novorođenčadi i veće koncentracije O_2^- u amnionskoj tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom ($r = -0,835$; $p \leq 0,039$);
- negativna korelacija između veće koncentracije O_2^- u amnionskoj tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i nižim vrednostima *Apgar scoora* kod novorođenčadi ($r = -0,874$; $p \leq 0,041$).

Rezultati dobijeni ispitivanjem korelacijskih odnosa frekvence mikronukleusa u ćelijama amnionske tečnosti pokazuju:

- pozitivnu korelaciju između procentualne zastupljenosti eozinofilnih granulocita u perifernoj krvi trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i frekvence mikronukleusa u ćelijama amnionske tečnosti ($r = 0.915, p \leq 0.011$).
- pozitivnu korelaciju između procentualne zastupljenosti bazofilnih granulocita u perifernoj krvi trudnica subkliničkim hipotireoidizmom i frekvence mikronukleusa u ćelijama amnionske tečnosti ($r = 0,767, p \leq 0,044$).
- pozitivnu korelaciju između povećane koncentracije ONOO⁻ i frekvence mikronukleusa ($r = 0.673; p \leq 0.01$) u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoiditisom.

Ispitivanjem korelacijskih odnosa koncentracije LPO sa koncentracijama ROS i RNS u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoiditisom, dobijeni su rezultati koji pokazuju:

- pozitivnu korelaciju između povećane koncentracije LPO i povećane koncentracije O₂⁻ u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoiditisom ($r = 0,558; p \leq 0,04$);
pozitivnu korelaciju između povećane koncentracije LPO i povećane koncentracije NO u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoiditisom ($r = 0,685, p \leq 0,01$);
- pozitivnu korelaciju između povećane koncentracije LPO i povećane koncentracije ONOO⁻ u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoiditisom ($r = 0,685, p \leq 0,01; r = 775, p \leq 0,002$).

5. DISKUSIJA

Podaci u naučnoj literaturi pokazuju da se poremećaji oksidaciono-antioksidacionog metabolizma nalaze u osnovi patofiziologije mnogih reproduktivnih komplikacija, poput steriliteta, spontanih pobačaja, preeklampsije, intrauterinog zastoja u rastu fetusa i prevremenih porođaja (*Pereira i Martel, 2014; Turpin i sar., 2015; Duhig i sar., 2016; Sultana i sar., 2017*). Kod rastućeg fetusa, oksidacioni stres utiče na ekspresiju kompleksa gena uključenih u inflamaciju, koagulaciju, fibrinolizu, ćelijski ciklus i transdukciju signala, što može uticati na ishod trudnoće, zdravstveno stanje fetusa i adaptaciju novorođenčeta (*Wagenaar i sar., 2004*). Određivanje biomarkera oksidacionog stresa u kliničkoj praksi može biti od velikog značaja u profilaktičkoj terapiji antioksidansima i menadžmentu patologije u trudnoći.

Amnionska tečnost je biološka tečnost koja okružuje fetus tokom trudnoće. Sastoji se od brojnih biomolekula poreklom od fetusa i majke, kao što su: proteini, hormoni, prostaglandini, enzimi, elektroliti, nutrijenti, kreatinin, bilirubin itd. S obzirom da sastav amnionske tečnosti odražava metabolički i zdravstveni status majke i fetusa, može da pruži dragocene informacije o trudnoći i da bude važan dijagnostički biomarker (*Underwood i sar., 2005; Harman, 2008*).

Ćelije amnionske tečnosti su heterogena populacija multipotentnih matičnih ćelija, poreklom od amnionske membrane, kože, uretre, digestivnog i respiratornog trakta fetusa. Amniocentezom se izoluju iz amnionske tečnosti i koriste se za prenatalnu dijagnozu hromozomskih i genetskih abnormalnosti. S obzirom da ćelije amnionske tečnosti potiču iz tkiva rastućeg embriona, odražavaju stanje fetalnog sazrevanja i metabolizma (*Yu, 2015*).

Ova doktorska disertacija zasnovana je na hipotezi da su komplikacije i neželjeni ishodi trudnoće kod majki sa subkliničkim hipotireoidizmom i trombofilijom posledica poremećaja oksidaciono-antioksidacionog statusa fetus. U prilog hipotezi ispitivani su

efekti majčinog subkliničkog hipotireoidizma i trombofilije na oksidaciono-antioksidacioni status fetusa u prvom tromesečju trudnoće posredstvom određivanja biomarkera oksidacionog stresa i oksidacionih oštećenja lipida i DNK molekula u amnionskoj tečnosti i ćelijama amnionske tečnosti.

5.1. Efekti majčinog subkliničkog hipotireoidizma na biomarkere oksidacionog stresa amnionske tečnosti i ćelija amnionske tečnosti

Subklinički hipotireoidizam u trudnoći je praćen visokim stepenom morbiditeta i mortaliteta fetusa. Povezan je sa povećanim rizikom od intrauterinog zastoja u rastu, spontanog pobačaja, abrupcije placente, gestacijske hipertenzije, preeklampsije, male telesne težine na rođenju (< 2.500 g), prevremenog porođaja i fetalnog distresa (*Singh i sar.*, 2016; *Novaković i sar.*, 2017). Klinički se manifestuje povećanom koncentracijom tireostimulišućeg hormona i referentnim vrednostima koncentracije trijodtironina i tirozina u serumu. Hormoni tireoidne žlezde imaju značajnu ulogu u regulaciji broja i aktivnosti leukocita, koji su važni izvori reaktivnih vrsta kiseonika i azota (*Axelrod i Bergman*, 1951; *Mezosi i sar.*, 2005). Smanjena aktivnost hormona tireoidne žlezde može da utiče na metabolizam hemoglobina i diferencijaciju eritrocita. Često je anemija prvi znak hipotireoidizma (*Erdogan i sar.*, 2012).

Rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da su kod trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom u odnosu na zdrave trudnice, vrednosti ukupnog broj eritrocita i koncentracije hemoglobina značajno manje, ali u nivou referentnih vrednosti karakterističnih za trudnoću (*Tab. 4*). Zdrava trudnoća se karakteriše povećanjem broja eritrocita, ali istovremeno i smanjenjem zapremine eritrocita, što rezultira smanjenom koncentracijom hemoglobina. Ovakav vid anemije predstavlja fiziološko stanje karakteristično za zdravu trudnoću (*Chandra i sar.*, 2012). Takođe, povećane vrednosti koncentracije C-reaktivnog proteina kod trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom su u rang referentnih vrednosti za trudnoću (*Tab. 4*). U skladu sa kliničkim kriterijumima za dijagnostikovanje subkliničkog hipotireoidizma, vrednosti serumskih koncentracija TSH su značajno veće kod trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom u odnosu na zdrave trudnice (*Tab. 4*), ali i u odnosu na gornju granicu referentnih vrednosti koncentracije za ovaj hormon u trudnoći.

Hormoni tireoidne žlezde imaju značajnu ulogu u regulaciji funkcije imunskog sistema. Poremećaji sekrecije tireoidnih hormona odražavaju se i na imunski odgovor organizma (Armstrong i Klein, 2001). Rezultati istraživanja prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji pokazuju da se ukupan broj leukocita u perifernoj krvi trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom ne razlikuje značajno u odnosu na zdrave trudnice. Međutim broj eozinofilnih granulocita u ukupnom broju leukocita je značajno veći kod trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom (Tab. 6, Graf. 2). Takođe, pokazana je i veća procentualna zastupljenost eozinofilnih granulocita u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom (Tab. 7, Graf. 4).

Prema rezultatima istraživanja Jafarzadeh i saradnika (2010), hipotireoidizam se karakteriše povećanjem broja eozinofilnih granulocita. Poznato je da tireoidni hormoni regulišu humani hematopoetski sistem i da se difuzija eozinofilnih granulocita iz koštane srži stimuliše u uslovima hipotireoidizma (Axelrod i Bergman, 1951). Povećanje broja i procentualne zastupljenosti eozinofilnih granulocita u ukupnom broju leukocita u perifernoj krvi trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom može biti rezultata hipotireoidizmom indukovane difuzije eozinofilnih granulocita iz koštane srži. Hormoni tireoidne žlezde vrše depresivni efekat na diferencijaciju i broj bazofilnih granulocita u perifernoj krvi. Podaci u literaturi pokazuju da se broj bazofilnih granulocita ne menja u uslovima hipotireoidizma (Petrasch i sar., 1993). Rezultati ove doktorske disertacije, takođe pokazuju da nema razlike u broju bazofila između trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom i zdravih trudnica. Međutim, procentualna zastupljenost bazofilnih granulocita u odnosu na ukupan broj leukocita u perifernoj krvi trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom je značajno veća (Tab. 7, Graf. 4).

Eozinofilni i bazofilni granulociti su sposobni za oksidativno rasprskavanje posredstvom produkcije velikih količina ROS (DeChatelet i sar., 1977; Strenzke i sar., 2005), koje mogu da difunduju kroz placentu (Hu i sar., 2017). Hipotireoidizam u trudnoći se karakteriše i slabom utero-placentalnom cirkulacijom, što rezultira razvojem umerene i hronične hipoksije placente i fetusa (Tudosa i sar., 2010). U uslovima hipoksije, placenta generiše i oslobađa ROS (Guzy i Schumacker, 2006). Rezultati istraživanja sprovedenih u okviru ove studije pokazuju da je koncentracija O_2^- značajno veća u amnionskoj tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom u odnosu na zdrave trudnice (Tab. 10, Graf. 10). Povećana koncentracija O_2^- dovodi do razvoja oksidacionog stresa u amnionskoj

tečnosti, što posledično rezultira oštećenjem normalne funkcije amnionske tečnosti kroz promenu sadržaja i funkcije određenih molekula (Yin i sar., 2013). Luo i saradnici (2006) sugerišu da je prenatalni oksidacioni stres povezan sa malom težinom novorođenčadi. Visok nivo oksidacionog stresa može uticati na telesnu masu novorođenčadi direktno, posredstvom modulacije ekspresije gena, ili indirektno, posredstvom oksidacije biomolekula. Literaturni podaci pokazuju da se novorođenčad rođena iz majčinog hipotireoidizma karakterišu malom telesnom težinom i niskim vrednostima *Apgar scor-a* (Saki i sar., 2014; Maraka i sar., 2016).

Na osnovu rezultata prikazanog istraživanja, telesna težina i vrednosti *Apgar scora-a* novorođenčadi su značajno manje i u negativnoj su korelaciji sa povećanom koncentracijom O_2^- u amnionskoj tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom u toku prvog tromesečja trudnoće. To znači da su trudnice sa subkliničkim hipotireoidizmom, koje su imale povećanu koncentraciju O_2^- u amnionskoj tečnosti, rađale decu manje telesne težine i nižih vrednosti *Apgar scor-a* u odnosu na zdrave trudnice. Iako su vrednosti telesne težine i *Apgar scor-a* novorođenčadi iz subkliničkog hipotireoidizma manje, u granicama su referentnih vrednosti.

Superoksidni anjon radikal ima kratak poluživot i u fiziološkim uslovima se konvertuje u H_2O_2 delovanjem enzima superoksid dismutaze (SOD). Pasupathi i Latha (2008) su pokazali da je u uslovima hipotireoidizma smanjena aktivnost SOD, što rezultira akumulacijom O_2^- . Rezultati ove studije pokazuju da je koncentracija H_2O_2 značajno manja u amnionskoj tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom u odnosu na zdrave trudnice (Tab. 10, Graf. 10).

Na osnovu prikazanih rezultata u ovoj studiji i podataka iz literature, smanjena koncentracija H_2O_2 u amnionskoj tečnosti može biti rezultat smanjene aktivnosti SOD, koja proizvodi H_2O_2 dismutacijom O_2^- . Smanjenju konverzije O_2^- u H_2O_2 posredstvom delovanja SOD može doprineti i velika koncentracija NO. Azotni monoksid je jedini poznati molekul koji, kada se proizvodi u velikoj količini, ulazi u kompeticiju sa SOD za O_2^- (Sözmen i sar., 2000), sa kojim reaguje i formira veoma toksični ONOO⁻ (Wink i Mitchell, 1998).

Rezultati istraživanja sprovedenog u okviru ove doktorske disertacije pokazuju da je koncentracija nitrita (NO_2^-), metabolita NO, značajno veća u amnionskoj tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom u poređenju sa zdravim trudnicama (Tab. 10,

Graf. 12). U koncentraciji ONOO^- u amnionskoj tečnosti, između zdravih trudnica i trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom nije utvrđena razlika. Azot monoksid, proizveden od strane placente, ima važnu ulogu u održavanju trudnoće i početku porođaja. Određivanje koncentracije NO metabolita u amnionskoj tečnosti daje značajne informacije o stanju intrauterinog okruženja fetusa tokom trudnoće. Podaci u literaturi pokazuju da NO_2^- , metabolit NO, u amnionskoj tečnosti ima značajnu ulogu u održavanju relaksiranog stanja uterusa (*Morris i sar.*, 1995), u patogenezi amnionske infekcije i inflamacije (*Hsu i sar.*, 1997), kao i u održavanju adekvatne utero-placentalne perfuzije, koja pruža optimalni dotok krvi do fetusa (*Di Iorio i sar.*, 1997). Mnoge studije ukazuju na povećanu koncentraciju NO_2^- u amnionskoj tečnosti zdravih trudnoća, a naročito u amnionskoj tečnosti patoloških trudnoća. Povećana koncentracija NO_2^- u amnionskoj tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom može biti rezultat NO_2^- kompenzatorne vazodilatacijske funkcije, usled neadekvatne placentalne perfuzije indukovane hipotireoidizmom majke.

Takođe, povećana produkcija NO u uslovima oksidacionog stresa dovodi do brze interakcije NO i O_2^- , koja rezultira nastankom ONOO^- (*Wink i Mitchell*, 1998). Peroksinitrit je visoko toksičan molekul, koji vrši nitraciju biomolekula. Međutim, pri fiziološkom pH u vodenom rastvoru, ONOO^- može da se razloži na NO_2^- i nitrate (*Pfeiffer i sar.*, 1997) i na taj način doprinese povećanju koncentracije NO_2^- u amnionskoj tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.

U okviru sprovedenog istraživanja, koncentracije LPO, GSH i GSSG u amnionskoj tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom nisu značajno različite u odnosu na zdrave trudnice. Podaci u literaturi takođe pokazuju da se u uslovima hipotireoidizma ne menjaju koncentracije LPO, GSH i GSSG u serumu i tkivu (*Yilmaz i sar.*, 2003; *Dariyerli i sar.*, 2004; *Petrulea i sar.*, 2012).

Na osnovu gore diskutovanih rezultata dobijenih u ovoj studiji, možemo zaključiti da trudnice sa subkliničkim hipotireoidizmom imaju povećanu koncentraciju O_2^- u amnionskoj tečnosti, koji je delom poreklom od aktiviranih granulocita iz majčine periferne krvi, delom od produkcije iz hipotireoidizmom indukovane hipoksične placente, a delom od hipotireoidizmom smanjene aktivnosti SOD. Akumulirani O_2^- indukuje oksidacioni stres u amnionskoj tečnosti i može da prođe kroz ćelijsku membranu fetalnih ćelija (*Lynch i Fridovich*, 1978).

Rezultati dobijeni u okviru prikazanog istraživanja pokazuju da je u ćelijama

amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom u odnosu na zdrave trudnice, značajno povećana koncentracija O_2^- , dok je koncentracija H_2O_2 značajno manja (Tab 13, Graf. 17). U zdravoj trudnoći produkcija O_2^- povećava se napredovanjem gestacijske starosti. Povećana produkcija O_2^- , koja nastaje kao rezultat visokog nivoa majčinog metabolizma i placentalne mitohondrijalne aktivnosti, praćena je povećanjem kapaciteta antioksidacionog zaštitnog sistema (Myatt, 2010). U uslovima subkliničkog hipotireoidizma, povećana koncentracija TSH u serumu stimuliše produkciju O_2^- i indukuje smanjenje antioksidacionog zaštitnog kapaciteta ćelije (Yilmaz i sar., 2003; Haribabu i sar., 2013; Mancini i sar., 2016). Hipotireoidizmom indukovano smanjenje aktivnosti SOD (Pasupathi i Latha, 2008), takođe doprinosi akumulaciji O_2^- . Akumulirani O_2^- indukuje oksidacioni stres u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.

Rezultati sprovedenog istraživanja pokazuju da su koncentracije NO i ONOO⁻ značajno veće u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom u odnosu na zdrave trudnice (Tab.13, Graf. 19). Unutar ćelije, NO je veoma važan molekul glasnik i ima značajnu ulogu u signalizaciji i regulaciji brojnih fizioloških i patofizioloških procesa (Freeman, 2017). U trudnoći, placenta produkuje velike količine NO, koje obezbeđuju adekvatnu placentalnu perfuziju (Krause i sar., 2011). U trudnoći sa subkliničkim hipotireoidizmom, dodatnu produkciju NO stimuliše povećana koncentracija TSH (Bulboacă i sar., 2017). U uslovima oksidacionog stresa, kada je povećana produkcija NO, favorizuje se njegova reakcija sa O_2^- , pri čemu nastaje veoma toksičan ONOO⁻ (Wink i Mitchell, 1998). Povećana koncentracija ONOO⁻ u ćelijama amnionske tečnosti može indukovati nitrozacioni stres, koji vodi ka poremećaju signalizacije i funkcije ćelije. Ovi poremećaji unutar ćelije zasnivaju se na direktnom toksičnom delovanju ONOO⁻, koji indukuje aktivaciju signalnog puta apoptoze vodeći ka citotoksičnosti, ili indirektnim delovanjem zasnovanom na smanjenoj biodostupnosti NO. Sem toga, ONOO⁻ je sposoban da indukuje proces peroksidacije lipida i oštećenje DNK molekula u direktnoj interakciji sa biomolekulima ili posredstvom oslobađanja visoko reaktivnog OH[•] (Dröge, 2002; Halliwell i Gutteridge, 2007; Myatt, 2010). Hidroksilni radikal može da reaguje sa pojedinim komponentama DNK molekula i da oksiduje polinezasićene masne kiseline u biološkim membranama, što rezultira formiranjem oksidacionih oštećenja DNK i LPO (Halliwell i Gutteridge, 2007; Dizdaroglu i Jaruga,

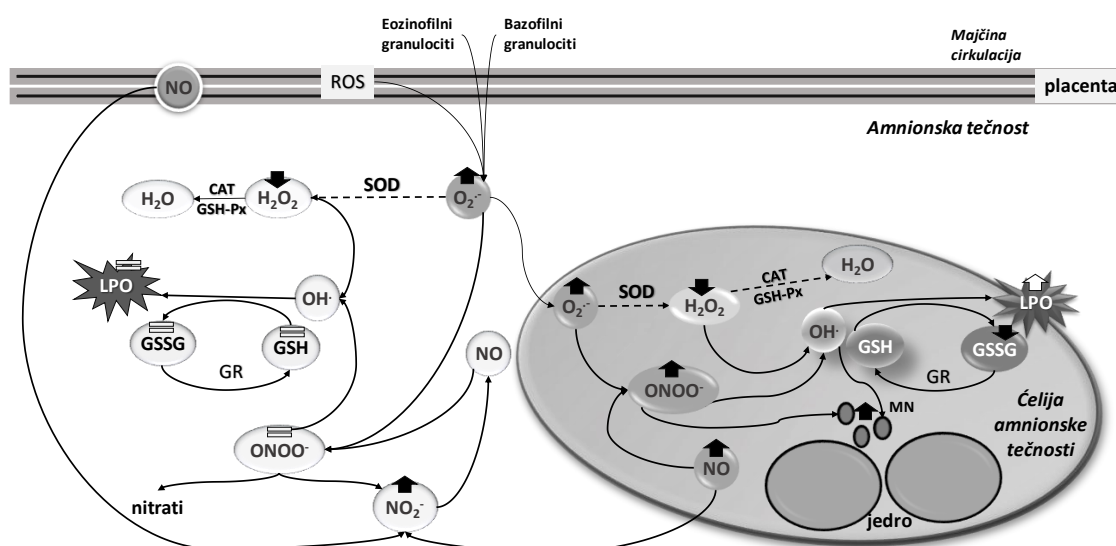
2012).

Rezultati ove studije pokazuju da je koncentracija LPO i frekvencija mikronukleusa, biomarkera oksidacionih oštećenja DNK molekula, značajno veća u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom u odnosu na zdrave trudnice (*Tab. 15, Graf. 23*). Takođe, pokazana je pozitivna korelacija između koncentracije LPO i biomarkera oksidacionog stresa, kao što su O_2^- , NO i $ONOO^-$ u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom. Prikazani rezultati u okviru ove studije pokazuju da majčin subklinički hipotireoidizam utiče na fetus posredstvom stimulacije formiranja $ONOO^-$, koji je sposoban za oksidaciono oštećenje membranskih lipida, lipoproteina i drugih biomolekula koji sadrže lipide, što dovodi do oštećenja strukture i funkcija ćelija (*Halliwell i Gutteridge, 2007*). *Ramandeep i saradnici* (2017) su pokazali su da povećana koncentracija LPO i smanjena aktivnost SOD u uslovima povećane koncentracije TSH, kao što je u subkliničkom hipotireoidizmu, mogu biti uključeni u incidencu spontanog pobačaja. Oksidaciona oštećenja DNK molekula nalaze se u osnovi patogeneze brojnih bolesti, poput kancera, starenja, upala, kardiovaskularnih i degenerativnih bolesti (*Evans, 2004*). U okviru ovog istraživanja pokazana je pozitivna korelacija između frekvencije mikronukleusa i koncentracije $ONOO^-$ u ćelijama amnionske tečnosti. Takođe pozitivna korelacija je pokazana i između frekvencije mikronukleusa u ćelijama amnionske tečnosti i procentualne zastupljenosti eozinofilnih i bazofilnih granulocita u perifernoj krvi majke. Eozinofilni i bazofilni granulociti su sposobni za oksidaciono rasprskavanje posredstvom egzogene produkcije velikih količina ROS (*DeChatelet i sar., 1977; Strenzke i sar., 2005*).

Reaktivne vrste kiseonika, proizvedene u velikoj količini od eozinofilnih i bazofilnih granulocita majke, mogu da pređu kroz placentu i indukuju genomsku nestabilnost, što posledično vodi stvaranju mikronukleusa (*Sprung i sar., 2015*) u ćelijama amnionske tečnosti. Dobijeni rezultati ukazuju na to da povećani procenat distribucije i aktivnosti eozinofilnih i bazofilnih granulocita kod trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom doprinosi stvaranju ROS i RNS, koji indukuju formiranje mikronukleusa u fetalnim ćelijama, što može uticati na normalan razvoj fetusa i uspešan završetak trudnoće.

Redukovani glutacion predstavlja prvu liniju antioksidacione odbrane ćelije od ROS i sposoban je da zaštiti biomolekule od oksidacionih oštećenja. Redukovani glutacion

svoju antioksidacionu ulogu ostvaruje u direktnoj i brznoj reakciji sa reaktivnim vrstama, pri čemu prelazi u oksidovanu formu - GSSG (Meister, 1992). U ovoj studiji dobijeni rezultati pokazuju da se koncentracija GSH ne razlikuje, dok je koncentracija GSSG značajno manja u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom (Tab. 14, Graf. 21). Redukovani glutation je biološki aktivan oblik za razliku od GSSG, koji je potencijalno citotoksičan i može izazvati ćelijsku apoptozu (Filomeni i sar., 2003). Oksidovani glutation se delom izlučuje iz ćelije, dok se delom unutar ćelija redukuje u GSH pomoću GR u reakciji zavisnoj od NADPH (Meister, 1992). Menendez i saradnici (1974) pokazali su da je aktivnost GR povećana u uslovima hipotireoidizma. Smanjena koncentracija GSSG u ćelijama amnionske tečnosti je rezultat povećane aktivnosti GR u uslovima subkliničkog hipotireoidizma. Redukcijom GSSG u aktivni oblik, obezbeđuju se optimalne koncentracije GSH, koji je sposoban da ograniči i umanjí oksidaciona oštećenja u ćelijama amnionske tečnosti.



Slika 2. Efekti majčinog subkliničkog hipotireoidizma na oksidacioni status amnionske tečnosti i ćelija amnionske tečnosti.

Trudnice sa subkliničkim hipotireoidizmom u odnosu na zdrave trudnice:

- ▲ Veće vrednosti koncentracije
- ▬ Nepromenjene vrednosti koncentracije
- ▼ Manje vrednosti koncentracije

Na osnovu rezultata prikazanih u okviru ove doktorske disertacije, u amnionskoj tečnosti i ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom povećane su koncentracije biomarkera oksidacionog stresa i oksidacionih oštećenja. Subklinički hipotireoidizam indukuje povećanje procentualne zastupljenosti eozinofilnih i bazofilnih granulocita, koji proizvode velike količine ROS. Reaktivne vrste kiseonika, pre svega O_2^- prolazi kroz placentu u amnionsku tečnost, odakle ulazi u ćelije amnionske tečnosti. Povećane vrednosti TSH stimulišu placentalnu produkciju dodatnih količina NO, koji brzo reaguje sa O_2^- gradeći toksični ONOO⁻. U amnionskoj tečnosti ONOO⁻ se razgrađuje i na taj način doprinosi povećanju koncentracije NO₂⁻. Unutar ćelija ONOO⁻, direktno ili posredstvom oslobađanja OH[•] indukuje oštećenje lipida i DNK molekula. Redukovani glutation je aktivno uključen u antioksidacionu odbranu od oksidacionog stresa u ćelijama amnionske tečnosti indukovanog subkliničkim hipotireoidizmom majke. Održavanjem visokog odnosa GSH/GSSG obezbeđuje se optimalna antioksidaciona zaštita prve linije, koja može da umanja ili ograniči oksidaciona oštećenja u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.

5.2. Efekti majčine trombofilije na biomarkere oksidacionog stresa amnionske tečnosti i ćelija amnionske tečnosti

Trombofilija u trudnoći nastaje kao rezultat kompleksne interakcije genetskih i stečenih faktora, koji povećavaju koagulabilnost krvi. Povezana je sa mnogim komplikacijama, kao što su teška preeklampsija, intrauterin zastoj u rastu fetusa, odlublјivanje placente, prevremeni porođaj i ponovljeni spontani pobačaji (*Kupferminc, 2005*). Hormonske promene i povećan pritisak na karlične vene tokom trudnoće dodatno doprinose povećanju koagulabilnosti krvi (*Bremme, 2003*). Kod trudnica sa trombofilijom, izmenjeni hemostatski uslovi u pravcu hiperkoagulacije, stimulišu formiranje mikrotrombova. Formirani mikrotrombovi mogu indukovati mehaničko oštećenje endotela i aktivaciju leukocita. Aktivirani leukociti su sposobni za produkciju velikih količina ROS i za pokretanje inflamatornog procesa (*DeChatelet i sar., 1977; Strenzke i sar., 2005; Esmon, 2013*). *Virstlein i saradnici (2014)* su pokazali da je koncentracija

proinflatornih faktora povećana u krvi pupčanika novorođenčadi majki sa trombofilijom. Produkcija velikih količina ROS od strane aktiviranih leukocita indukuje razvoj oksidacionog stresa. U uslovima oksidacionog stresa, pokreće se kaskada događaja koji rezultiraju vazokonstrikcijom, adhezijom leukocita, oksidacijom membranskih lipida, kao i dodatnom aktivacijom koagulacijske kaskade (Crimi i sar., 2007). Na taj način, u uslovima trombofilije, zbog povećane koagulabilnosti krvi formiraju se mikrotrombovi koji aktiviraju leukocite, a aktivirani leukociti dodatno povećavaju koagulabilnost krvi. Kod trudnica sa trombofilijom, u interviloznim prostorima placente formiraju se brojni mikrotrombovi, koji indukuju deponovanje fibrina u placenti, što u krajnjoj liniji rezultira nastankom infarkta placente. Usled infarkta, placenta se odlubljuje i dolazi do spontanog pobačaja (Kupferminc, 2005; James i sar., 2006).

Rezultati ove studije pokazuju da trudnice sa trombofilijom u poređenju sa zdravim trudnicama imaju manju incidencu uspešnog završetka trudnoće i značajno veću incidencu spontanih pobačaja od ukupnog broja trudnoća (Tab. 3). U trudnoći sa trombofilijom, povećava se stvaranje mikrotrombova u vaskulaturi placente, što rezultira placentalnim infarktom i nastankom hipoksičnog stanja (Kinzler i sar., 2009). Na ovakav način nastali uslovi, u krajnjoj liniji dovode do odlubljivanja placente i spontanog pobačaja.

Povećana koncentracija β -hCG u serumu trudnica ukazuje na ishemiju placente, što vodi ka mogućem placentalnim infarkt (Fox, 1970; Lieppman i sar., 1993). Prema rezultatima prikazanim u ovoj studiji, koncentracija β -hCG je značajno veća u serumu trudnica sa trombofilijom u odnosu na zdrave trudnice (Tab. 4). Na osnovu toga može se zaključiti da je kod trudnica sa trombofilijom placenta u ishemičnom stanju, što predstavlja opasnost od mogućeg spontanog pobačaja. Podaci u literaturi o koncentraciji β -hCG u serumu trudnica sa trombofilijom su kontradiktorni. Prema rezultatima Cıkmán i saradnika (2015), koncentracija β -hCG u serumu trudnica sa trombofilijom nije značajno različita u odnosu na zdrave trudnice, dok je prema rezultatima Karsli i saradnika (2014) značajno manja. Rezultati hematoloških karakteristika pokazuju da trudnice sa trombofilijom imaju značajno veće vrednosti zapremine eritrocita (MCV) (Tab.4) u odnosu na zdrave trudnice. Međutim, povećane vrednosti MCV kod trudnica sa trombofilijom su u opsegu referentnih vrednosti (80 - 100 μm^3).

Brojne studije pokazuju da je hemostaza usko povezana sa inflamatornim

procesom, sa kojim gradi začarani krug unutar koga se tromboze i inflamacija međusobno podstiču (Esmon, 2005; Granger i Senchenkov, 2010). Rezultati dobijeni u ovoj studiji pokazuju da ukupan broj leukocita nije značajno različit u perifernoj krvi trudnica sa trombofilijom u odnosu na zdrave trudnice (Tab. 5, Graf. 1). Iako ukupan broj leukocita nije značajno različit u perifernoj krvi trudnica sa trombofilijom, broj eozinofilnih granulocita (Tab. 6, Graf. 3) i monocita (Tab. 8, Graf. 6) je značajno veći u perifernoj krvi trudnica sa trombofilijom u odnosu na zdrave trudnice. Pored toga, pokazana je značajna razlika u procentualnoj zastupljenosti pojedinih vrsta leukocita u perifernoj krvi između zdravih trudnica i trudnica sa trombofilijom. Dobijeni rezultati pokazuju da je u perifernoj krvi trudnica sa trombofilijom značajno veća procentualna zastupljenost bazofilnih i eozinofilnih granulocita u odnosu na zdrave trudnice (Tab. 7; Graf. 4).

Hiperkoagulabilno stanje kod trudnica sa trombofilijom karakteriše se povećanom aktivnošću trombocita i povećanim intezitetom agregacije trombocita (Kupferminc, 2005). Aktivirani trombociti podležu degranulaciji i na svojoj površini ekspimiraju P-selektin, koji se vezuje za ligande na monocitima (Larsen i sar., 1989). Ova interakcija rezultira formiranjem agregata trombocit-leukocit, koji produkuje proinflamatorne, prokoagulantne, prooksidacione i mitogene supstance, koje mogu indukovati arterijsku trombozu (McGregor i sar., 2006). Lukanov i saradnici (2011) su pokazali da je koncentracija trombocit-leukocit agregata značajno veća kod trudnica sa trombofilijom. Povećan broj eozinofilnih granulocita povezan je sa visokim rizikom od nastanka tromboembolije kod trudnica sa trombofilijom. Tokom degranulacije, eozinofilni granulociti oslobađaju tkivni faktor, koji inicira kaskadnu koagulaciju, kao i glavni bazni protein, koji inhibira veoma potentni antikoagulantni trombomodulin i aktivira trombocite (Ames i sar., 2010). Glavni bazni protein, oslobođen degranulacijom eozinofilnih granulocita indukuje aktivaciju i povećanje broja bazofilnih granulocita. Bazofilni granulociti poseduju granule, koje sadrže histamin, faktor aktivacije trombocita, nekoliko citokina, proteolitičke enzime i bioaktivne proteoglikane (Janeway i sar., 2001).

Aktivirani eozinofilni i bazofilni granulociti, delovanjem ksantin oksidaze i NADPH oksidaze produkuju velike količine O_2^- i H_2O_2 (Halliwell i sar., 2000; Dröge, 2002), koji mogu da difunduju kroz placentu (Hu i sar., 2017). Rezultati prikazanog istraživanja pokazuju da u amnijskoj tečnosti trudnica sa trombofilijom koncentracije biomarkera oksidacionog stresa i oksidacionih oštećenja (O_2^- , H_2O_2 , NO, ONOO⁻ i LPO)

nisu značajno različite u odnosu na zdrave trudnice (*Tab.10, Graf. 11, Graf. 13, Tab 12, Graf. 16*).

Rezultati istraživanja *Pristov i saradnika* (2009) pokazuju da je u uslovima trombofilije, placenta izložena H_2O_2 posredovanom oksidacionom stresu, koji je indukovao protrombičnim stanjem majčine krvi. Takođe rezultati navedenih autora pokazuju da je aktivnost antioksidacionih enzima CAT i GSH-Px, koji neutrališu H_2O_2 , značajno povećana u placenti trudnica sa trombofilijom. *Pristov i saradnici* (2009) navode da povećana aktivnost antioksidacionih enzima CAT i GSH-Px u placenti trudnica sa trombofilijom predstavlja zaštitu fetusa od oksidacionih oštećenja. Međutim, rezultati ove doktorske disertacije pokazuju da su koncentracije O_2^- , NO, ONOO⁻ i LPO značajno povećane, dok je koncentracija H_2O_2 značajno manja u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa trombofilijom u odnosu na zdrave trudnice (*Tab. 13, Graf. 18, Graf. 20, Tab. 15, Graf. 24*).

U trudnoći sa napredovanjem graviditeta, usled povećanog metabolizma majke i povećane mitohondrijalne aktivnosti u placenti, povećava se produkcija O_2^- . U uslovima trombofilije, produkcija O_2^- je dodatno povećana od strane agregata trombocit-leukocit, (*McGregor i sar.*, 2006) i aktiviranih eozinofilnih i bazofilnih granulocita (*Halliwell i sar.*, 2000; *Dröge*, 2002) iz majčine periferne krvi. Superoksid anjon radikal može da prođe kroz placentu i membranu fetalnih ćelija, gde se akumulira (*Hu i sar.*, 2017). U fiziološkim uslovima, O_2^- se delovanjem antioksidacionog enzima SOD konvertuje u H_2O_2 (*Liochev i Fridovich*, 2000). Međutim, literaturni podaci pokazuju da se aktivnost SOD kod trudnica sa trombofilijom značajno ne menja (*Pristov i sar.*, 2009). Povećana koncentracija O_2^- u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa trombofilijom je rezultat povećane produkcije ovog radikala, koja nije praćena povećanjem aktivnosti SOD. U uslovima povećane produkcije, NO nadmašuje SOD u kompeticiji za O_2^- (*Sözmen i sar.*, 2000), sa kojim reaguje gradeći veoma toksični ONOO⁻ (*Wink i Mitchell*, 1998).

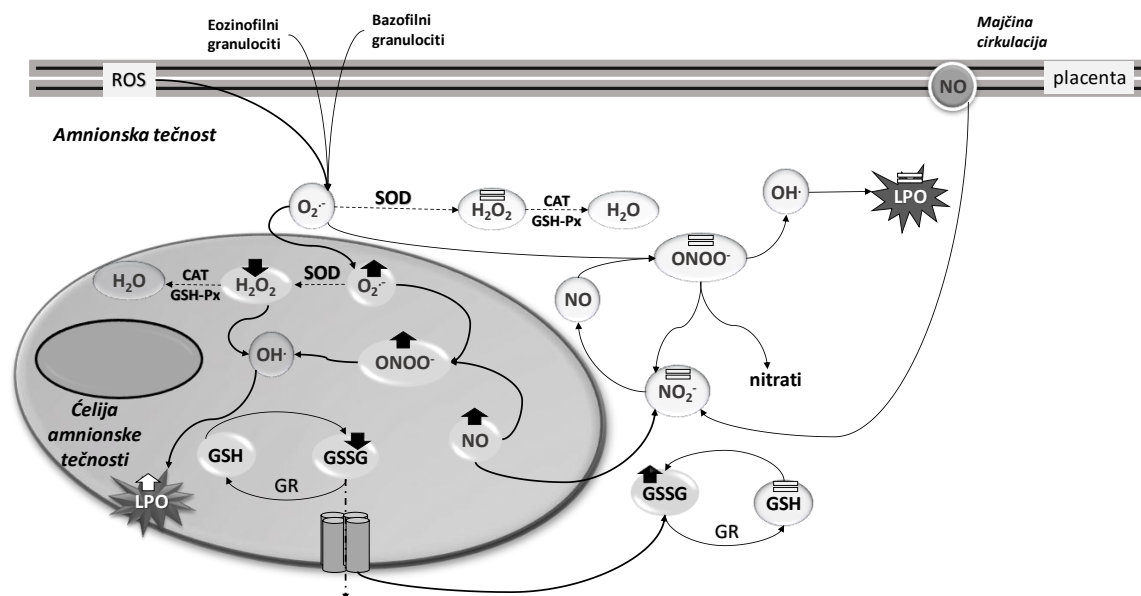
U uslovima placentalne ishemije povećava se koncentracija NO_2^- , metabolita NO, kao kompenzatorni odgovor u cilju poboljšanja fetoplacentalnog protokta krvi (*Lyall i sar.*, 1995). Nitriti preuzeti iz cirkulacije od strane ćelija, metabolišu se intacelularno do NO (*May i sar.*, 2000). Kod trudnica sa trombofilijom, ishemična placenta (*Kinzler i sar.*, 2009), kao kompenzaciju za oslabljeni fetoplacentalni protokta krvi, produkuje velike količine NO (*Krause i sar.*, 2011), koji posredstvom konverzije u NO_2^- , dospeva u ćelije

amnionske tečnosti, u kojima se akumulira. U ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa trombofilijom, u uslovima velike produkcije O_2^- i NO, favorizuje se njihova međusobna interakcija i formiranje ONOO⁻ (Wink i Mitchell, 1998). Peroksinitrit u direktnoj interakciji sa lipidima ili posredstvom oslobađanja visoko reaktivnog OH[·] indukuje proces lipidne peroksidacije (Dröge, 2002; Halliwell i Gutteridge, 2007; Myatt, 2010), što rezultira povećanjem koncentracije lipidnih peroksida u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa trombofilijom.

Trombofilijom indukovano povećanje aktivnosti CAT i GSH-Px menja (Pristov i sar., 2009) rezultira smanjenjem koncentracije H₂O₂ u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa trombofilijom.

Povećane koncentracije O_2^- i ONOO⁻ indukuju oksidacioni i nitrozacioni stres u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa trombofilijom. U ovako nastalim uslovima, aktivira se GSH, koji predstavlja prvu liniju antioksidacione odbrane i koji u reakciji redukcije reaktivnih vrsta prelazi u GSSG (Meister, 1992). U ovoj studiji je pokazano da su koncentracije GSH i GSSG značajno manje u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa trombofilijom u odnosu na zdrave trudnice (Tab. 14, Graf. 22). Smanjena koncentracija GSH u uslovima oksidacionog stresa ukazuje na njegovo „trošenje“ u redukciji reaktivnih vrsta. Na osnovu prikazanih rezultata, nivo produkcije ROS i RNS u ćelijama amnionske tečnosti je toliko intezivan kod trudnica sa trombofilijom, da *de novo* sinteza GSH ne može da održi njegovu intracelularnu koncentraciju u optimalnom nivou. Oksidacionim stresom indukovana potrošnja GSH i njegovo prevođenje u GSSG u toku antioksidacione aktivnosti, može da pokrene signalni put apoptoze (Filomeni i sar., 2003). Oksidovani glutation se delom uklanja iz ćelije posredstvom redukcije u NADPH-zavisnoj reakciji katalizovanoj enzimom antioksidacionog zaštitnog sistema GR (Meister, 1992), a delom se eliminiše iz ćelije pomoću transportera odgovornog za razvoj rezistencije na lekove (*Multidrug resistance-associated protein - MRP*) (Gordillo i sar., 2016). Prema rezultatima ove studije, u amnionskoj tečnosti trudnica sa trombofilijom u odnosu na zdrave trudnice, koncentracija GSH nije značajno različita, dok je koncentracija GSSG značajno veća (Tab. 11, Graf. 15). Na osnovu dobijenih rezultata, smanjena intracelularna koncentracija GSSG u uslovima potrošnje GSH i povećana ekstracelularna koncentracija GSSG pri nepromenjenim vrednostima koncentracije GSH, ukazuje da ćelije amnionske tečnosti trudnica sa trombofilijom ekskretuju GSSG putem MRP transportera. Na ovaj

način ćelije amnionske tečnosti se čuvaju od GSSG indukovane apoptoze (Filomeni i sar., 2003).



Slika 3. Efekti majčine trombofilije na oksidacioni status amnionske tečnosti i ćelija amnionske tečnosti.

Trudnice sa subkliničkim hipotireoidizmom u odnosu na zdrave trudnice:

- ▲ Veće vrednosti koncentracije
- ▬ Nepromenjene vrednosti koncentracije
- ▼ Manje vrednosti koncentracije

Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji, u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa trombofilijom povećane su koncentracije biomarkera oksidacionog stresa i oksidacionih oštećenja. Trombofilija u trudnoći praćena je povećanjem procentualne zastupljenosti eozinofilnih i bazofilnih granulocita, koji proizvode velike količine O_2^- i H_2O_2 , koje prolaze kroz placentu u amnionsku tečnost, odakle ulaze u ćelije amnionske tečnosti. Unutar ćelija, H_2O_2 se neutrališe delovanjem CAT i GSH-Px, čije su povećane aktivnosti indukovane trombofilijom. Superoksid anjon radikal reaguje sa NO, koji se proizvodi u uslovima trombofilije većim intenzitetom kao kompenzacioni odgovor

na oslabljen fetoplacentalni protok krvi. Peroksinitrit, nastao u reakciji $O_2^{\cdot -}$ i NO, direktnim delovanjem ili posredstvom oslobađanja OH \cdot , indukuje lipidnu peroksidaciju. Čelije amnionske tečnosti štite se od oksidacionog stresa indukovano trombofilijom majke pomoću GSH. Moguću GSSG indukovanu apoptozu izbegavaju transportom potencijalno toksičnog GSSG van ćelije, koji se akumulira u amnionskoj tečnosti.

6. ZAKLJUČCI

POJEDINAČNI ZAKLJUČCI

☞ Na osnovu rezultata istraživanja sprovedenih u ovoj doktorskoj disertaciji mogu se izvesti sledeći pojedinačni zaključci :

☞ Efekti majčinog subkliničkog hipotireoidizma na oksidacioni status amnionske tečnosti i ćelija amnionske tečnosti.

1. Kod trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom u odnosu na zdrave trudnice značajno je povećana procentualna zastupljenost bazofilnih i eozinofilnih granulocita u perifernoj krvi.
2. Ispitivanjem biomarkera oksidacionog stresa u amnionskoj tečnosti pokazano je da su koncentracije O_2^- i NO značajno veće, dok je koncentracija H_2O_2 značajno manja kod trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom u odnosu na zdrave trudnice. Takođe je pokazano da povećana koncentracija O_2^- u amnionskoj tečnosti negativno kolerila sa vrednostima *Apgar scor-a* i manjom telesnom težinom novorođenčadi rođenih iz subkliničkog hipotireoidizma.
3. Rezultati ispitivanja biomarkera oksidacionog stresa u ćelijama amnionske tečnosti pokazuju da su koncentracije O_2^- , NO i $ONOO^-$ značajno veće, dok je koncentracija H_2O_2 značajno manja kod trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom u odnosu na zdrave trudnice.
4. Koncentracije biomarkera oksidacionih oštećenja u ćelijama amnionske tečnosti (LPO i frekvenca mikronukleusa) su značajno veće kod trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom u odnosu na zdrave trudnice. U ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom pokazana je pozitivna korelacija

između povećane koncentracije LPO i povećane koncentracije biomarkera oksidacionog stresa (O_2^- , NO i $ONOO^-$), kao i između frekvence mikronukleusa i procentualne zastupljenosti eozinofilnih i bazofilnih granulocita i koncentracije $ONOO^-$.

5. Ispitivanjem antioksidacione zaštite u ćelijama amnionske tečnosti kod trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom, pokazana je manja koncentracija GSSG u odnosu na zdrave trudnice.

☞ Efekti majčine trombofilije na oksidacioni status amnionske tečnosti i ćelija amnionske tečnosti.

1. Kod trudnica sa trombofilijom u odnosu na zdrave trudnice značajno je povećana procentualna zastupljenost bazofilnih i eozinofilnih granulocita u perifernoj krvi.
2. Rezultati ispitivanja biomarkera oksidacionog stresa u amnionskoj tečnosti pokazuju da su koncentracije O_2^- , H_2O_2 , NO i $ONOO^-$ nisu značajno različite kod trudnica sa trombofilijom u odnosu na zdrave trudnice.
3. U amnionskoj tečnosti trudnica sa trombofilijom u odnosu na zdrave trudnice značajno je povećana koncentracija GSSG.
4. Ispitivanjem biomarkera oksidacionog stresa u ćelijama amnionske tečnosti pokazano je da su koncentracije O_2^- , NO i $ONOO^-$ značajno veće, dok je koncentracija H_2O_2 značajno manja kod trudnica sa trombofilijom u odnosu na zdrave trudnice.
5. Ispitivanjem biomarkera oksidacionog oštećenja u ćelijama amnionske tečnosti pokazano je da je koncentracija LPO značajno veća, dok frekvencija mikronukleusa nije značajno različita kod trudnica sa trombofilijom u odnosu na zdrave trudnice.
6. Koncentracije GSH i GSSG su značajno manje u ćelijama amnionske tečnosti trudnica sa trombofilijom u odnosu na zdrave trudnice.

OPŠTI ZAKLJUČAK

- ☞ Na osnovu sprovedenih istraživanja, opšti zaključak ove doktorske disertacije je sledeći:
- ☞ Majčin subklinički hipotireoidizam indukuje oksidacioni stres i oksidaciona oštećenja lipida u amnionskoj tečnosti i fetalnim ćelijama, kao i genetsku nestabilnost u fetalnim ćelijama u toku prvog tromesečja trudnoće. Subkliničkim hipotireoidizmom indukovani oksidacioni stres u amnionskoj tečnosti utiče na smanjene vrednosti *Apgar scor*-a i manju telesnu težinu novorođenčadi, koji sa genetskom nestabilnošću indukovane oksidacionim stresom mogu doprineti povećanju incidence od prenatalnog morbiditeta i mortaliteta fetusa kod trudnica sa subkliničkim hipotireoidizmom.
 - ☞ Trombofilija majke deluje prooksidaciono na ćelije fetusa u toku prvog tromesečja trudnoće. U ćelijama fetusa, majčina trombofilija indukuje povećanje biomarkera oksidacionog stresa i oksidacionog oštećenja lipida. Visok stepen rizika od oksidacionim stresom indukovane apoptoze fetalnih ćelija vodi prenatalnom morbiditetu i mortalitetu fetusa kod trudnica sa trombofilijom.
- ☞ Rezultati istraživanja u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju prve dokaze o prooksidacionim efektima majčinog subkliničkog hipotireoidizma i trombofilije na fetus i doprinose boljem razumevanju zdravstvenog i metaboličkog stanja fetusa u prvom tromesečju trudnoće. Takođe ukazuju na povezanost biomarkera oksidacionog stresa i oksidacionih oštećenja sa mogućim negativnim ishodom trudnoće, što je od velikog značaja za buduća istraživanja primene profilaktičke antioksidacione terapije i u menadžmentu trudnoće sa subkliničkim hipotireoidizmom i trombofilijom.



LITERATURA

1. Abbassi-Ghanavati M, Greer LG, Cunningham FG. Pregnancy and laboratory studies: a reference table for clinicians. *Obstet Gynecol.* 2009;114(6):1326-31.
2. Ain KB, Mori Y, Refetoff S. Reduced clearance rate of thyroxine-binding globulin (TBG) with increased sialylation: a mechanism for estrogen-induced elevation of serum TBG concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:689–96.
3. Alary J, Gueraud F, et al. Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: disposition and metabolic pathways. *Mol. Aspects Med.* 2003;24(4–5):177–187.
4. Albertini RJ, Nicklas JA, O’Neill JP. Future research directions for evaluating human genetic and cancer risk from environmental exposures. *Environ Health Persp* 1996;104(Suppl 3):503-10.
5. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003;199:8-17.
6. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001;357:593-615.
7. Allan WC, Haddow JE, Palomaki GE, et al. Maternal thyroid deficiency and pregnancy complications: implications for population screening. *J Med Screen* 2000;7:127–130.
8. Alvarez B, Radi R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. *Amino Acids.* 1991;25:295-311.
9. Ames PR, Margaglione M, Mackie S, Alves JD. Eosinophilia and thrombophilia in churg strauss syndrome: a clinical and pathogenetic overview. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2010;16:628-36.
10. Anderson, ME, Bridges RJ, Meister A. Direct evidence for interorgan transport of glutathione and that the non-filtration renal mechanism for glutathione utilization involves γ -glutamyl transpeptidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980; 96:848–853.
11. Anderson M, Prasad T, Stewart C. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.*1995;109:1247-1257.
12. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Moscow)* 2005;70:200-14.

-
13. Anselmo J, Cao D, Karrison T, Weiss R, Refetoff S. Fetal loss associated with excess thyroid hormone exposure. *JAMA* 2004;292:691–695.
 14. Armstrong MD, Klein JR. Immune-endocrine interactions of the hypothalamus Pituitary–thyroid axis:interaction, communication and homeostasis. *Arch Immunol Ther Exp.* 2001;49:231-237.
 15. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction , in: R.A. Greenwald (Ed.). *Handbook of methods for oxygen radical research*, CRC Press, Boca Raton, 1985:123-132.
 16. Axelrod AR, Bergman L. The bone marrow in hyperthyroidism and hypothyroidism. *Blood.* 1951;6:436-453.
 17. Ballabio M, Poshychinda M, Ekins RP. Pregnancy-induced changes in thyroid function: role of human chorionic gonadotropin as putative regulator of maternal thyroid. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:824–831.
 18. Banerjee AK, Mandal A, Chanda D, Chakraborti S. Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Molecular and cellular biochemistry.* 2003;253(1-2):307-312.
 19. Bauer PH, Muller S, Puzicha M, Pippig S, Obermaier B, Helmreich EJ, Lohse MJ. Phosducin is a protein kinase A-regulated G-protein regulator. *Nature.*1992;358(6381):73-6.
 20. Beck EA. The chemistry of blood coagulation: a summary by Paul Morawitz (1905). *Thromb Haemost.* 1977;37(3):376-379.
 21. Bellomo G, Varietti M, Stivala L, Mirabelli F, Richelmi P, Orrenius S. Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.*1992;89(10):4412-6.
 22. Berger N. Poly (ADP-Ribose) in the Cellular Response to DNA Damage. *Radiation Research.* 1985;101:4-15.
 23. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature.* 1994;369:64-7.
 24. Beutler E. The preparation of red cells for assay. In: Beutler E, Ed, *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods.* 1975: 8-18.
 25. Beutler TM, Eaton DL. *Environ. Carcino. Ecotoxicol. Rev.* 1992: 181-203.
 26. Boger RH, Bode-Boger SM, Kienke S, Stan AC, Nafe R, Frolich JC. Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol – fed rabbits. *Atherosclerosis.* 1998;136:67-77.
 27. Bolt HM. Human GSH-transferase in risk assessment. *Biological Reactive Intermediates V.* 1996: 405-409.
-

-
28. Braverman LE, Kopp P, Utiger RD. Thyroid hormone synthesis: thyroid iodine metabolism. In Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.2005; 52-76.
 29. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*. 1991;351:714-718.
 30. Bremme KA. Haemostatic changes in pregnancy. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2003;16:153-168.
 31. Brenner B, Blumenfeld Z. Thrombophilia and fetal loss. *Blood Reviews*. 1997;11(2):72-79.
 32. Brenner B, Mandel H, Lanir N, Younis J, Rothbart H, Ohel G, Blumenfeld Z. Activated protein C resistance can be associated with recurrent fetal loss. *Br J Haematol* 1997;97:551-554.
 33. Brigelius R. Mixed disulfides: biological functions and increase in oxidative stress. In:Oxidative stress, Academic Press, Inc.London.1985:243-272.
 34. Brigelius-Flohe R. Tissue – specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*. 1998;27:951-965.
 35. Bulboacă AE, Bolboacă SD, Bulboacă AC, Prodan CI. Association between low thyroid-stimulating hormone, posterior cortical atrophy and nitro-oxidative stress in elderly patients with cognitive dysfunction, *Arch. Med. Sci*. 2017;13:1160-1167.
 36. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2010;15:186-190.
 37. Burzotta F, Di Castelnuovo A, Amore C, D'Orazio A, Di Bitondo R, Donati MB, Iacoviello L. 4G/5G promoter PAI-1 gene polymorphism is associated with plasmatic PAI-1 activity in Italians: a model of gene-environment interaction. *Thromb Haemost*. 1998;79:354-358.
 38. Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 2000;71:1256S-1261S.
 39. Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem*. 1989;58:79-110.
 40. Cao X, Kambe F, Lu X, Kobayashi N, Ohmori S, Seo H. Glutathionylation of to cysteine residues in paried domain regulates DNA binding activity of Pax-8. *J Biol Chem*. 2005;280(27):25901-25906.
 41. Caro AA, Cederbaum AI. Role of cytochrome P450 in phospholipase A2 and arachidonic acid-mediated cytotoxicity. *Free Radic.Biol.Med*. 2006;40:364-375.
 42. Carter SB. Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature*.1967; 213: 261-264.
-

-
43. Chandra S, Tripathi AK, Mishra S, Amzarul M, Vaish AK. Physiological changes in hematological parameters during pregnancy. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2012; 28:144-146.
 44. Chang DL, Pearce EN. Screening for maternal thyroid dysfunction in pregnancy: a review of the clinical evidence and current guidelines. *J. Thyroid. Res.* 2013;2013:851326.
 45. Chazotte-Aubert L, Oikawa S, Gilbert I, Bianchini F, Kawanishi S, Ohshima H. Cytotoxicity and site-specific DNA damage induced by nitric oxide (NO) in the presence of hydrogen peroxide. Implications for various pathophysiological conditions. *J.Biol.Chem.* 1999;274:20909-20915.
 46. Chow J, Poon RY. DNK damage and polyploidization. *Advances in experimental medicine and biology.* 2010;676:57-71.
 47. Chubb SAP, Daviš WA, Inman Z, Daviš TME. Prevalence and progression of subclinical hypothyroidism in women with type 2 diabetes: the Freemantle Diabetes Study. *Clin Endocrinol.* 2005;62:480–486.
 48. Cıkman MS, Seckin KD, Karşlı MF, Baser E, Cıkman DI, Cicek MN. The effect of inherited thrombophilia on second trimester combined aneuploidy screening test markers. *Arch Gynecol Obstet.* 2015;291:787-790.
 49. Cleare AJ, McGregor A, Chambers SM, Dawling S, O'Keane V. Thyroxine replacement increases central 5-HT activity and reduces depressive symptoms in hypothyroidism. *Neuroendocrinology.* 1996;64(1):65-69.
 50. Colman R, Marder V, Clowes A, George J, Goldhaber S. Hemostasis and thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
 51. Comp PC, Esmon CT. Recurrent venous thromboembolism in patients with a partial deficiency of protein S. *N Engl J Med* 1984;311:1525-1528.
 52. Cooper DS, Biondi B. Subclinical thyroid disease. *Lancet.*2012;379(9821):1142-54.
 53. Crawley JT, Zanardelli S, Chion CK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost.* 2007;5(1): 95-101.
 54. Crimi E, Ignarro LJ, Napoli C. Microcirculation and oxidative stress. *Free Rad Res.* 2007;41:1364-1375.
 55. Dahlbäck B, Carlsson M, Svensson PJ. Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C: prediction of a cofactor to activated protein C. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:1004-1008.
 56. Danforth DN, Gibbs RS. *Danforth's Obstetrics and gynecology.* 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003.
-

-
57. Dargel R. Lipid peroxidation a common pathogenic mechanism? *Exp. Toxicol. Path.* 1991;44:169-181.
 58. Dariyerli N, Toplan S, Akyolcu MC, Hatemi H, Yigit G. Erythrocyte osmotic fragility and oxidative stress in experimental hypothyroidism. *Endocrine*. 2004;25:1-5.
 59. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science*. 1964;145(3638):1310-1312.
 60. Davis LE, Leveno KJ. Hypothyroidism complicating pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1988;72:108-112.
 61. De Bont R., van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*. 2004;19:169-185.
 62. De Botton S, Sabri S, Daugas E, Zermati Y, Guidotti JE, Hermine O, Kroemer G, Vainchenker W, Debili N. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*. 2002;100:1310-1317.
 63. De Chatelet LR, Shirley PS, McPhail LC, Huntley CC, Muss HB, Bass DA. Oxidative metabolism of the human eosinophil. *Blood*. 1977;50:525-535.
 64. Degen JL. Genetic interactions between the coagulation and fibrinolytic systems. *Thromb Haemost* 2001;86:130-137.
 65. De Stefano V, Martinelli I, Mannucci PM, Paciaroni K, Rossi E, Chiusolo P, Casorelli I, Leone G. The risk of recurrent venous thromboembolism among heterozygous carriers of the G20210A prothrombin gene mutation. *Br J Haematol.* 2001;113:630-635.
 66. Develhar M, Ousman YH, Burman KD. Hypothyroidism. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007;36(3):595-615.
 67. Dickinson DA, Forman H. Cellular glutathione and thiol metabolism. *Biochemical Pharmacology*. 2002; 64(5-6):1019-26.
 68. Di Iorio R, Marinoni E, Coacci F, La Torre R, Cosmi EV. Amniotic fluid nitric oxide and uteroplacental blood flow in pregnancy complicated by intrauterine growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997;104:1134-1139.
 69. Di Minno MN, Dentali F, Lupoli R, Ageno W. Mild Antithrombin Deficiency and the Risk of Recurrent Venous Thromboembolism: A Prospective Cohort Study *Circulation*. 2014;129:497-503.
 70. Ding HL, Ryder JW, Stull JT, Kamm KE. Signaling processes for initiating smooth muscle contraction upon neural stimulation. *J Biol Chem.* 2009;284(23):15541-15548.
 71. Dinulović D. Opstetricija. Službeni list SRJ, Beograd, 1996.
-

-
72. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res.* 2012;46:382-419.
 73. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews.* 2002;82:47-95.
 74. Duhig K, Chappell LC, Shennan AH. Oxidative stress in pregnancy and reproduction. *Obstet Med.* 2016;9(3):113-116.
 75. Dumitru CA, Zhang Y, Li X, Gulbins E. Ceramide: a novel player in reactive oxygen species-induced signaling? *Antioxid. Redox. Signaling.* 2007;9:1535-1540.
 76. Djordjevic V, Pruner I, Radojkovic D. Molecular Basis of Thrombophilia. 2014;33: 22-27.
 77. Đorđević V, Rakićević Lj, Spasić M, Miljić P, Miković D, Kovač M, Radojković D. Mutacije FVLeiden, FII G20210A, i MTHFR C677T kao faktori za nastanak tromboze dubokih vena u toku trudnoće ili puerperijuma. *Vojnosanitetski pregl* 2005; 62(3):201-205.
 78. Egeberg O. Inherited antithrombin deficiency causing thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh.* 1965;13:516-530.
 79. Elezović I. Urođene i stečene trombofilije. *Bilten za transfuziologiju* 2000;16-25.
 80. El-Gayar S, Thüning-Nahler H, Pfeilschifter J, Rööllinghoff M, Bogdan C. Translational control of inducible nitric oxide synthase by Il-13 and arginine availability in inflammatory macrophages. *J Immunol.* 2003;171:4561-4568.
 81. El-Sammak M, Kandil M, El-Hifni S, Hosni R, Ragab M. Elevated plasma homocysteine is positively associated with age independent C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase gene in selected Egyptian subjects. *Int J Med Sci.* 2004;1(3):181-219.
 82. Erdogan M, Kösenli A, Ganidagli S, Kulaksizoglu M. Characteristics of anemia in subclinical and overt hypothyroid patients. *Endocr J.* 2012;59:213-220.
 83. Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol.* 2005;131:417-430.
 84. Esmon CT. Molecular circuits in thrombosis and inflammation. *Thromb Haemost.* 2013;109:416-420.
 85. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991;11(1):81-128.
 86. Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat. Res.* 2004;567:1-61.
-

-
87. Fancy T, Gallagher D 3rd, Hornig JD. Surgical anatomy of the thyroid and parathyroid glands. *Otolaryngol Clin North Am.* 2010;43:221-227.
 88. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* 2002; 18:872-879.
 89. Fatemeh M, Mirzaei M, Zohreh F. Association of hereditary thrombophilia with intrauterine growth restriction. *Iran J Reprod Med.* 2013;11:275-278.
 90. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res.* 1985;147(1-2):29-36.
 91. Fenech MF. Dietary reference values of individual micronutrients and nutriones for genome damage prevention: current status and a road map to the future. *Am J Clin Nutr.* 2010;91(5):1438S-1454S.
 92. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, Norppa H, Eastmond DA, Tucker JD, Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis.* 2011;26:125–132.
 93. Fernández SJ, Merlo SA, León JD, Ramos-Clemente RJI. Transitory hypothyroidism induced by tamoxifen. *Rev Clin Esp.* 2014;214(7):427-428.
 94. Filomeni G, Rotilio M, Ciriolo. Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway, *FASEB J.* 2003;17:64-66.
 95. Floridon C, Nielsen O, Hølund B, Sweep F, Sunde L, Thomsen SG, Teisner B. Does plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) control trophoblast invasion? A study of fetal and maternal tissue in intrauterine, tubal and molar pregnancies. *Placenta.* 2000;21(8):754-62.
 96. Födinger M, Hörl WH, Sunder-Plassmann G. Molecular biology of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase. *J Nephrol.* 2000;13(1):20-33.
 97. Forman JP, Stampfer MJ, Curhan GC. Diet and lifestyle risk factors associated with incident hypertension in women. *JAMA.* 2009 Jul 22;302(4):401-11.
 98. Fox H. Effect of hypoxia on trophoblast in organ culture. A morphologic and autoradiographic study. *Am J Obstet Gynecol.* 1970;107:1058-1064.
 99. Franchini M. The utility of thrombophilia testing. *Clin Chem Lab Med.* 2014;52(4):495-497.
 100. Francis JL. An algorithmic approach to laboratory diagnosis of thrombotic risk factors. *Laboratory Hematology.* 2003;9:82-83.
 101. Freeman B. Nitric oxide: biology and pathobiology, 3rd ed. Academic Press, 2017.
 102. Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:97-112.
-

-
103. Fukuto JM, Chandhuri G. Inhibition of Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthase: Potential Selective Inhibition. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*.1995;35:165-194.
 104. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989;3:2007-2018.
 105. Galofre JC, Haber RS, Mitchell AA, Pessah R, Davies TF. Increased postpartum thyroxine replacement in Hashimoto's thyroiditis. *Thyroid* 2010;20:901-908.
 106. Gandhi G, Gunjan Y. Exercise-Induced Genetic Damage: A Review. *International Journal Of Human Genetics*.2009;9(2): 69-96.
 107. Gebicki JM. Protein hydroperoxides as new reactive oxygen species. *Redox rep*.1997; 3(2):99-110.
 108. George JN. Platelets. *Lancet* 2000;355:1531-1539.
 109. Gerhard A, Scharf RE, Beckmann MW, Struve S, Bender HG, Pillny M. Prothrombin and factor V mutations in women with a history of thrombosis during pregnancy and the puerperium. *N Engl J Med*. 2000;342:374-380.
 110. Gilbert DL. Fifty years of radical ideas. *Ann NY Acad Sci*. 2000;899:1-14.
 111. Gillibrand PN. The rate of Water transfer from of the amniotic sac with advancing pregnancy. *J.Obstet.Gynec. Brit. Cwilt.* 1969;76:530-533.
 112. Girling JC. Thyroid disorders in pregnancy. *Current Obstetrics & Gynaecology* 2006;16:47-53.
 113. Glinoe D. Management of hypo-and hyperthyroidism during pregnancy. *Growth Horm IGF Res*. 2003;13(Suppl A):45-54.
 114. Glinoe D, Abalovich M. Unsolved questions in anaging hypothyroidism during pregnancy. *BMJ*. 2007;335:300-302.
 115. Glueck CJ, Kupferminc MJ, Fontaine RN, Wang P, Weksler BB, Eldor A. Genetic hypofibrinolysis in complicated pregnancies. *Obstet Gynecol*. 2001;97:44-48.
 116. Gohil R, Peck G, Sharma P. The genetics of venous thromboembolism. A meta-analysis involving approximately 120,000 cases and 180,000 controls. *Thromb Haemost*. 2009;102:360-370.
 117. Gordillo GM, Biswas A, Khanna S, Spieldenner JM, Pan X, Sen CK. Multidrug resistance-associated protein-1 (MRP-1)-dependent glutathione disulfide (GSSG) efflux as a critical survival factor for oxidant-enriched tumorigenic endothelial cells. *J. Biol. Chem*. 2016;291:10089-10103.
 118. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):23-35.
-

-
119. Granger DN, Senchenkova E. Inflammation and the Microcirculation. 1st ed. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences, 2010.
 120. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126(1):131-138.
 121. Greer IA. Inherited thrombophilia and venous thromboembolism. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2003;17(3):413-25.
 122. Griending KK, Sorescu D, Lasseque B, Ushio-Fukai M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.* 2000;20:2175-2183.
 123. Griffin JH, Evatt B, Zimmerman TS, Kleiss AJ, Wideman C. Deficiency of protein C in congenital thrombotic disease. *J Clin Invest.* 1981;68:1370-1373.
 124. Griffith OW. Biological and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free. Radic. Biol. Med.* 1999;27:922-935.
 125. Gris JC, Mercier E, Quéré I, Lavigne-Lissalde G, Cochery-Nouvellon E, Hoffet M, Ripart-Neveu S, Tailland ML, Dautat M, Marès P. Low molecular weight heparin versus low-dose aspirin in women with one fetal loss and a constitutional thrombophilic disorder. *Blood.* 2004;103:3695–3699.
 126. Grun JP, Meuris S, De Nayer P, Glinoeur D. The thyrotrophic role of human chorionic gonadotrophin (hCG) in the early stages of twin (versus single) pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1997;46(6):719-725.
 127. Gudović A, Spremović-Radjenović S, Lazović G, Marinković J, Glišić A, Milićević S. Maternal autoimmune thyroid disease and pregnancy complication. *Vojnosanitetski pregled.* 2009;8(67):617-621.
 128. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci.* 1990;15(4):129-35.
 129. Guyton AC. Endokrini sistem i reprodukcija. U: Medicinska fiziologija. Mujović M.V. Ed. Medicinska knjiga Beograd, 1996;823-829.
 130. Guyton AC, Hall EH. Text book of medical physiology. 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000; pp. 419-429.
 131. Guzy RD, Schumacker PT. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol.* 2006;91:807-819.
 132. Habibovic Z, Zeybek B, Sanhal C, Eroglu Z, Karaca E, Ulukus M. Effects of inherited thrombophilia in women with recurrent pregnancy loss. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2011;38:347–350.
-

-
133. Haddow JE, Palomaki GE, Allan WC, Williams JR, Knight GJ, Gagnon J, O'Heir CE, Mitchell ML, Hermos RJ, Waisbren SE, Faix JD, Klein RZ. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *N Engl J Med* 1999;341:549–555.
 134. Hadi YM, Kacmaz M, Oztruk SH. Antioxidant status of erythrocytes from patients with cirrhosis. *Hepato-Gastroenterol.* 1999;46:2460-2463.
 135. Haggerty JJ, Prange AJ. Borderline hypothyroidism and depression. *Annu Rev Med.* 1995;46:37-46.
 136. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* 1994;344:721-724.
 137. Halliwell B. Hydrogen peroxide in the human body. *Febs Letters.* 2000;486(1):10-13.
 138. Halliwell B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward. *Cardiovas Res.* 2000;47:410-418.
 139. Halliwell B. Free Radicals and other reactive species in Disease. *Encyclopedia of life sciences*, National University of Singapore, Singapore, 2001.
 140. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic life.* *Plant Physiology.* 2006;141:312-322.
 141. Halliwell B, Gutteridge JMC. Catalytic metal ions in human diseases. *Molec Aspects Med.* 1985;8:89-193.
 142. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press 1999; New York.
 143. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine* 3th edition. Clarendon Press Oxford, USA, 2006.
 144. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine* 4th edition. Oxford University Press Inc, New York, USA, 2007.
 145. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture : how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2):231-55.
 146. Haribabu A, Reddy VS, Pallavi Ch, Bitla AR, Sachan A, Pullaiah P, Suresh V , Rao PV, Suchitra MM. Evaluation of protein oxidation and its association with lipid peroxidation and thyrotropin levels in overt and subclinical hypothyroidism, *Endocrine.* 2013;44:152-157.
 147. Harman CR. Amniotic fluid abnormalities. *Semin Perinatol.* 2008;32(4):288–294.
 148. Heit JA, Kobbervig CE, James AH. Trends in the incidence of venous thromboembolism during pregnancy of postpartum: a 30-year population-based study. *Ann Intern Med.* 2005;143:697-706.
-

-
149. Heit JA. Predicting the risk of venous thromboembolism recurrence. *Am J Hematol.* 2012;87(1):63–67.
 150. Hennessey JV, Espaillet R. Diagnosis and Management of Subclinical Hypothyroidism in Elderly Adults: A Review of the Literature. *J Am Geriatr Soc.* 2015;63(8):1663-1673.
 151. Hensley K, Butterfield DA, Hall N, Cole P, Subramaniam R, Mark R, Mattson MP, Markesbery WR, Harris ME, Aksenov M, Aksenova M, Wu JF, Carney JM. Reactive oxygen species as casual agents in the neurotoxicity of the Alzheimers disease-associated amyloid beta peptide. *Ann.N.Y.Acad. Sci.* 1996; 786:120-134.
 152. Henrichs J, Bongers-Schokking JJ, Schenk JJ, Ghassabian A, Schmidt HG, Visser TJ, Hooijkaas H, de Muinck Keizer-Schrama SM, Hofman A, Jaddoe VV, Visser W, Steegers EA, Verhulst FC, de Rijke YB, Tiemeier H. Maternal thyroid function during early pregnancy and cognitive functioning in early childhood: the generation R study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2010;95:4227-4234.
 153. Hirsch D, Levy S, Tsvetov G, Weinstein R, Lifshitz A, Singer J, Shraga-Slutsky I, Grozinski-Glasberg S, Shimon I, Benbassat C. Impact of pregnancy on outcome and prognosis of survivors of papillary thyroid cancer. *Thyroid.* 2010;20:1179-1185.
 154. Ho WK, Hankey GJ, Quinlan DJ, Eikelboom JW. Risk of recurrent venous thromboembolism in patients with common thrombophilia: a systematic review. *Arch Intern Med.* 2006;166(7):729-736.
 155. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost.* 2001;85:958-965.
 156. Hoffman MM, Monroe DM. Rethinking the coagulation cascade. *Curr Hematol Rep.* 2005;4:391-396.
 157. Howley HE, Walker M, Rodger MA. A systematic review of the association between factor V Leiden or prothrombin gene variant and intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;192:694–708.
 158. Hsu CD, Aversa K, Meaddough E, Lee IS, Copel JA. Elevated amniotic fluid nitric oxide metabolites and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in pregnant women with intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;177:793-796.
 159. Hu B, Senatorov V, Mooney D. Lemniscal and non-lemniscal synaptic transmission in rat auditory thalamus. *J.Physiol.* 1994;479:217-231.
 160. Hu Y, Huang K, Sun Y, Wang J, Xu Y, Yan S, Zhu P, Tao F. Placenta response of inflammation and oxidative stress in low-risk term childbirth: the implication of delivery mode. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2017;17(1):407.
 161. Huang KP, Huang FL. Glutathionylation of proteins by glutathione disulfide S-oxide. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(5-6):1049-56.
-

-
162. Husar D, Đelmiš J. Thromboembolic disease in pregnancy. *Journal for gynaecology, perinatology, reproductive medicine and ultrasonic diagnostics*. 2008;2:77-82.
 163. Idris I, Srinivasan R, Simm A, Page RC. Maternal hypothyroidism in early and late gestation: effects on neonatal and obstetric outcome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2005; 63:560–565.
 164. Ignarro LJ. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. 1st Edition. Academic press, San Diego, California, USA, 2000.
 165. Ignarro LJ, Buga GM, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988; 246:218-26.
 166. Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, Rogers NE, Byrns RE. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(17):8103-8107.
 167. Ishida Y, Saito H, Ohta S, Hiei Y, Komari T, Kumashiro T. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat Biotechnol*. 1996;14(6):745-50.
 168. Ivanišević M, Orešković S, Juras J, Đelmiš J. Hypothyreosis in pregnant women. *Gynaecol Perinatol*. 2012;21(2):68-72.
 169. Jacobsen AF, Skjeldestad FE, Sandset PM. Incidence and risk patterns of venous thromboembolism in pregnancy and puerperium: a register-based case-control study. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;198:233–234.
 170. Jafarzadeh A, Poorgholami M, Izadi N, Nemati M, Rezayati M. Immunological and hematological changes in patients with hyperthyroidism or hypothyroidism. *Clin Invest Med*. 2010;33:271-279.
 171. James A. *Practice Bulletin*. 123: thromboembolism in pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2011; 118(3):718-729.
 172. James AH, Jamison MG, Brancizio LR, Myers ER. Venous thromboembolism during pregnancy and the postpartum period: incidence, risk factors, and mortality. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194:1311-1315.
 173. James AH, Rhea E, Thames B, Philipp C. Characterization of antithrombin levels in pregnancy. *Thrombosis Research*. 2014;134:648–651.
 174. Janeway AC Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik JM. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th ed. Garland Science, New York, 2001.
 175. Kalafatis M, Rand MD, Mann KG. The mechanism of inactivation of human factor V and human factor Va by activated protein C. *J Biol Chem*. 1994;269:31869-31880.
-

-
176. Kanner J, Harel S, Granit R. Nitric oxide as an antioxidant. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991; 289:130-136.
 177. Karsli MF, Baser E, Seckin KD, Yeral Mİ, Togrul C, et al. The impact of inherited thrombophilia on first trimester combined aneuploidy screening test parameters. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014;27:346-349.
 178. Kathiresan S, Gabriel SB, Yang Q, Lochner AL, Larson MG, Levy D, Tofler GH, Hirschhorn JN, O'Donnell CJ. Comprehensive survey of common genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus and relations to circulating plasminogen activator inhibitor-1 levels. *Circulation* 2005;112:1728–1735.
 179. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta.* 1999 ;1411(2-3):273-89.
 180. Kennedy RL, Malabu UH, Jarrod G, Nigam P, Kannank, Rane A. Thyroid function and pregnancy: before, during and beyond. *J Obstet Gynaecol .* 2010;30:774–783.
 181. Kim JJ, Choi YM, Lee SK, Yang KM, Paik EC, Jeong HJ, Jun JK, Han AR, Hong MA.. The PAI-1 4G/5G and ACE I/D polymorphisms and risk of recurrent pregnancy loss: a case-control study. *Am J Reprod Immunol.* 2014;72(6):571-576.
 182. King JC. Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1218S-1225S.
 183. Kinzler WL, Prasad V, Ananth CV. New Jersey-Placental Abruptio Study Investigators. The effect of maternal thrombophilia on placental abruptio: Histologic correlates. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009;22:243-248.
 184. Knoebl PN. Severe congenital protein C deficiency. The use of protein C concentrates (human) as replacement therapy for life-threatening blood-clotting complications. *Biologics.* 2008;2:285–296.
 185. Kohrle J. Thyroid hormone metabolism and action in the brain and pituitary. *Acta Med Austriaca.* 2000;27(1):1-7.
 186. Kooistra L, Crawford S, van Baar AL, Brouwers EP, Pop VJ. Neonatal effects of maternal hypothyroxinemia during early pregnancy. *Pediatrics.* 2006;117(1):161–167.
 187. Kopjar N , Kašuba V, Milić M, Rozgaj R, Želježić D, Gajski G, Mladinić M i Garaj Vrhovac V. Normalne i granične vrijednosti mikronukleus-testa na limfocitima periferne krvi u ispitanika opće populacije Republike Hrvatske. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2010;61:219-234.
 188. Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem. Res. Toxicol.* 1992;5:834-842.
-

-
189. Kovac M, Miković Z, Rakirević L, Srzentić S, Mandić V, Djordjević V, Radojković D. A successful outcome of pregnancy in a patient with congenital antithrombin deficiency. *Vojnosanit Pregl.* 2011;68(2):175-177.
 190. Kozlov AV, Staniek K, Nohl H. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett* 1999;454:127-130.
 191. Krause BJ, Hanson MA, Casanello P. Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta.* 2011;32:797-805.
 192. Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. *Williams textbook of endocrinology* Philadelphia: WB Saunders, 2008:299–320.
 193. Kruidenier L, Verspaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease-radicals or iridiculous. *Aliment. Pharmacol Ther.* 2002;16:1997-2015.
 194. Kupfermanc MJ. Thrombophilia and pregnancy. *Curr Pharm Des.* 2005;11:735-748.
 195. LaFranchi SH, Haddow JE, Hollowell JG. Is thyroid inadequacy during gestation a risk factor for adverse pregnancy and developmental outcomes? *Thyroid* 2005;15:60–71.
 196. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992;89:6348-6352.
 197. Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erban JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell.* 1989;59:305-312.
 198. Larsen FJ, Weitzberg E, Lundberg JO, Ekblom B. Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. *Acta Physiol (Oxf).* 2007;191(1):59-66.
 199. Laskey RE, Mathews WR. *Arch Biochem Biophys*, 1996;330:193-198.
 200. Laurberg PS. Hypothyroidism in pregnancy. *The thyroid and reproduction* Riga: Georg Thieme Verlag. 2008:96–103.
 201. Leung A.M. Thyroid-function in pregnancy. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 2012;26: 137-140.
 202. Lieberman M, Marks AD, Smith C. *Marksove osnove medicinske biohemije.* (D.Milić, M. Jovin-Oka, N.Oka, prev.) Beograd:Data status,2008.
 203. Liebrant CA, De Mol AC, Kempers MJ, Noordam C. Central congenital hypothyroidism due to Graves disease in the mother. *Ned Tijdschr Genees.* 2006; 150(41):2229-2232.
 204. Lieppman RE, Williams MA, Cheng EY, Resta R, Zingheim R, Hickok DE, Luthy DA.. An association between elevated levels of human chorionic gonadotropin in the
-

-
- midtrimester and adverse pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 1993;168:1852-1856.
205. Lima B, forrester MT, Hess DT, Stamler JS. S-nitrosylation in cardiovascular signaling. *Circ.Res.* 2010;106:633-646.
206. Lin RH, Hotchkiss JH. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutat. Res.* 1995; 339(2):73-89.
207. Liochev SI, Fridovich I. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase can act as a superoxide reductase and a superoxide oxidase. *J. Biol. Chem.* 2000;275:38482-38485.
208. Lipton P. Ischemia cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 1999; 79(4):1421-568.
209. Liu RH, Hotchkiss JH. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutat Res.* 1995;339(2):73-89.
210. Lockwood CM, Grenache DG, Gronowski AM. Serum human chorionic gonadotropin concentrations greater than 400,000IU/L are invariably associated with suppressed serum thyrotropin concentrations. *Thyroid.* 2009;19(8):863-868.
211. Lotgering FK, Wallenburg HCS. Mechanisms of production and clearance of amniotic fluid. *Semin. Perinatol.* 1986;10:94.
212. Lubos E, Handy DE, Loscalzo J. Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. *Front Biosci.* 2008;13:5323-44.
213. Lukanov TH, Veleva GL, Konova EI, Ivanov PD, Kovacheva KS, Stoykov DJ. Levels of platelet-leukocyte aggregates in women with both thrombophilia and recurrent pregnancy loss. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2011;17:181-187.
214. Luo ZC, Fraser WD, Julien P, Deal CL, Audibert F, Smith GN, Xiong X, Walker M.. Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress? *Med Hypotheses.* 2006;66:38-44.
215. Lyall F, Young A, Greer IA. Nitric oxide concentrations are increased in the fetoplacental circulation in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173(3):714-718.
216. Lykke J, Dideriksen K, Lidegaard O, Langhoff-Roos J. First-trimester vaginal bleeding and complications later in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2010; 115(5):935-44.
217. Lykke J, Bare LA, Olsen J, Lagier R, Arellano AR, Tong C, Paidas MJ, Langhoff-Roos J. Thrombophilias and adverse pregnancy outcomes: Results from the Danish National Birth Cohort. *J. Thromb. Haemost.* 2012;10:1320–1325.
218. Lynch RE, Fridovich I. Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. *J Biol Chem.* 1978;253:4697–4699.
-

-
219. Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature*. 1964;202:498-499.
 220. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide macrophage function. *Annual Rev Immunol*. 1997;15:323–350
 221. Mancini A, Di Segni C, Raimondo S, Olivieri G, Silvestrini A, Meucci E, Currò D. Thyroid hormones, oxidative stress, and inflammation. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:677154.
 222. Many A, Schreiber L, Rosner S, Lessing JB, Eldor A, Kupferminc MJ. Pathologic features of the placenta in women with severe pregnancy complications and thrombophilia. *Obstet Gynecol*. 2001;98:1041–1044.
 223. Many A, Elad R, Yaron Y, Eldor A, Lessing JB, Kupferminc MJ. Third-trimester unexplained intrauterine fetal death is associated with inherited thrombophilia. *Obstet Gynecol*. 2002;99(5):684-687.
 224. Maraka S, Ospina NM, O'Keeffe DT, Espinosa De Ycaza AE, Gionfriddo MR, Erwin PJ, Coddington CC 3rd, Stan MN, Murad MH, Montori VM. Subclinical Hypothyroidism in Pregnancy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Thyroid*. 2016;26:580-590.
 225. Margetic S. Inflammation and haemostasis. *Biochem Med*. 2012;22(1):49-62.
 226. Marlar RA, Gausman JN. Protein S abnormalities: a diagnostic nightmare. *Am J Hematol*. 2011;86(5):418-421.
 227. Marqusee E, Hill JA, Mandel SJ. Thyroiditis after pregnancy loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82(8):2455-2457.
 228. März W, Nauck M, Wieland H. The molecular mechanisms of inherited thrombophilia. *Z Kardiol*. 2000;89:575-586.
 229. Matejkova-Behanova M, Zamrazil V, Vondra K, Vrbikova J, Kucera P, Hill M, Andel M. Autoimmune thyroiditis in nonobese subjects with initial diagnosis of type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest*. 2002;25:779–784.
 230. Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*. 2000;153(1):83-104.
 231. May JM, Qu ZC, Xia L, Cobb CE. Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000;279:1946–1954.
 232. McGregor L, Martin J, McGregor JL. Platelet-leukocyte aggregates and derived microparticles in inflammation, vascular remodelling and thrombosis. *Front Biosci*. 2006;11:830-837.
 233. Meister A. Biosynthesis and function of glutathione, an essential biofactor. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. Spec No* 1992;1-6.
-

-
234. Meneshian A, Bulkley GB. The physiology of endothelial xantine oxidase: fromurate catabolism to reperfusion injuryto inflamatory signal transduction. *Microcirculation*.2002;9(3):161-75.
235. Milošević-Đorđević O. Principi kliničke citogenetike. Kragujevac: Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, 2010.
236. Mitić G. Nasledna trombofilija i trombozne komplikacije u trudnoći. Disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, 2008, str. 163.
237. Mizuno K, Tanaka M, Nozaki S, Mizuma H, Ataka S, Tahara T, Sugino t, Shirai T, Kajimoto Y, Kuratsune H, Kajimoto O, Watanabe Y. Antifatigue effects of coenzyme Q10 during physical fatuque. *Nutrition*. 2008; 24(4):293-9.
238. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*. 2006;147(1):S193-S201.
239. Monie IW. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 1953;66:616.
240. Morris NH, Carroll S, Nicolaidis KH, Steer PJ, Warren JB.. Exhaled nitric oxide concentration and amniotic fluid nitrite concentration during pregnancy. *Eur J Clin Invest*. 1995;25(2):138–141.
241. Mosesson MW, Siebenlist KR, Hernandez I, Lee KN, Christiansen VJ, McKee PA. Evidence that alpha2-antiplasmin becomes covalently ligated to plasma fibrinogen in the circulation: a new role for plasma factor XIII in fibrinolysis regulation. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1565–70.
242. Mshelia DS, Kullima AA. The Importance of Lipid and Lipoprotein Ratios in Interpretations of Hyperlipidaemia of Pregnancy. INTECH, 2012.
243. Muller AF, Drexhage HA, Berghout A. Postpartum thyroiditis in women of childbearing age: recent insights and consequences for antenatal and postnatal care. *Endocr. Rev.* 2001;22(5):605-630.
244. Murad E. Mossbauer spectra of nontronites: structural implications and characterization of associated Fe oxidas. *Z. Pflanzenernihr. Bodenk.*1987;150:279-285.
245. Murphy RP, Donoghue C, Nallen RJ. Prospective evaluation of the risk conferred by factor V Leiden and thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in pregnancy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2000;20:266–270.
246. Myatt L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta, *Placenta*. 2010;31:66-69.
247. Nathan CF. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992; 6:3051-3064.
-

-
248. Nathan CF, Xie Q. Nitric oxide synthase: Roles, tolls and controls. *Cell*. 1994;78: 915-918.
249. Negro R, Formoso G, Mangieri T, Pezzarossa A, Dazzi D, Hassan H. Levothyroxine treatment in euthyroid pregnant women with autoimmune thyroid disease: effects on obstetrical complications. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(7):2587-2589.
250. Negro R, Schwartz A, Gismondi R, Tinelli A, Mangieri T, Stagnaro-Green A. Increased pregnancy loss rate in thyroid antibody negative women with TSH levels between 2.5 and 5.0 in the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:E44–E48.
251. Negro R, Schwartz A, Gismondi R, Tinelli A, Mangieri T, Stagnaro-Green A. Universal screening versus case finding for detection and treatment of thyroid hormonal dysfunction during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(4):1699-1707.
252. Novakovic TR, Dolicanin ZC, Djordjevic NZ. Oxidative stress biomarkers in amniotic fluid of pregnant women with hypothyroidism, *J. Matern.-Fetal. Neonatal. Med*. 2017. doi.org/10.1080/14767058.2017.1400005.
253. Okhawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry*. 1979;95(2):351-358.
254. Pacher P, Beckman JS, Liandet L. Nitric oxide and peroxyntirite in health and disease. *Physiol Rev*. 2007;87(1):315-424.
255. Padmaja S, Huie RE. The reaction of nitric oxide with organic peroxy radicals. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;195(2):539-44.
256. Pallardó FV, Markovic J, Garcia J L, Viña J. Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Mol. Aspects Med*. 2009;30: 77–85.
257. Pasupathi P, Latha R. Free radical activity and antioxidant defence mechanisms in patients with hypothyroidism. *Thyroid Sci*. 2008;3:1- 6.
258. Pearce EN, Farwel AP, Braverman LE. Thyroiditis. *N Engl J Med*. 2003; 348(26):2646-2655.
259. Pereira AC, Martel F. Oxidative stress in pregnancy and fertility pathologies. *Cell Biol Toxicol*. 2014;30(5):301-312.
260. Petrasch SG, Mlynek-Kersjes ML, Haase R, Benker G, Olbricht T, Paar D, Reinwein D. Basophilic leukocytes in hypothyroidism. *Clin Investig*. 1993;71:27-30.
261. Petrulea M, Muresan A, Duncea I. Oxidative Stress and Antioxidant Status in Hypo- and Hyperthyroidism. In: Amr El-Missiry M, editor. *Antioxidant Enzyme*. InTech; 2012.
-

-
262. Pfeiffer S, Gorren AC, Schmidt K, Werner ER, Hansert B, Bohle DS, Mayer B.. Metabolic fate of peroxynitrite in aqueous solution. Reaction with nitric oxide and pH-dependent decomposition to nitrite and oxygen in a 2:1 stoichiometry. *J Biol Chem.* 1997;272:3465-3470.
263. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture, *J. Immunol. Methods.* 1980;38:161-170.
264. Plećaš D, Stanimirović b, Stanković A, Vasiljević M. *Ginekologija i akušerstvo. Udžbenik za studente medicine.* CIBID, 2006.
265. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 1996;88:3698-7033.
266. Pop VJ, Kuijpers JL, van Baar AL, Verkerk G, van Son MM, de Vijlder JJ, Vulsma T, Wiersinga WM, Drexhage HA, Vader HL. Low maternal free thyroxine concentrations during early pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1999;50:149–156.
267. Poppe K, Glinoeer D. Thyroid autoimmunity and hypothyroidism before and during pregnancy. *Hum Reprod Update.* 2003;9(2):149–161.
268. Preston FE, Rosendaal FR, Walker ID. Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia. *The Lancet.* 1996;348:913–916.
269. Pristov JB, Spasojevic I, Mikovic Z, Mandic V, Cerovic N, Spasic M. Antioxidative defense enzymes in placenta protect placenta and fetus in inherited thrombophilia from hydrogen peroxide. *Oxid Med Cell Longev.* 2009;2(1):14-18.
270. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am. J. Physiol.* 1995;268:L699-L722.
271. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 1991;266:4244-4250.
272. Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Resp J.* 2000;16:534-554.
273. Ralat LA, Colman RF. Identification of tyrosine 79 in the tocopherol binding site of glutathione S-transferase pi. *Biochemistry.* 2006;45(41):12491-9.
274. Ramandeep K,. Kapil G, Harkiran K. Correlation of enhanced oxidative stress with altered thyroid profile: Probable role in spontaneous abortion. *Int. J. Appl. Basic. Med. Res.* 2017;38:20-25.
-

-
275. Rao KS. Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. *Indian journal of biochemistry & biophysics*. 2009;46(1):9-15.
276. Rao S, Patibandla A. A Study to find out the prevalence of hypothyroidism among pregnant women visiting ESI hospital Sanathnagar Hyderabad. *Gynecol. Obstet. (Sunnyvale)*. 2016;6:363.
277. Rasche H. Haemostasis and thrombosis: an overview. *European Heart Journal. Supplements* 2001;3:3-7.
278. Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, Dejam A, Gharini P, Lauer T, Erckenbrecht J, Duschin A, Schulz R, Heusch G, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO: experimental and clinical Study on the fate of NO in human blood. *Circ. Res*. 2002;91:470-477.
279. Rey E, Kahn SR, David M, Shrier I. Thrombophilic disorders and fetal loss: ametaanalysis. *Lancet*. 2003;361:901–908.
280. Ricci C, Pastukh V, Leonard J, Turens J, Wilson G, Schaffer D, Schaffer SW. Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial-superoxide generation and apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;294(2):413-22.
281. Riordan JF, Vallee BL. Acetylation. *Methods Enzymol*. 1972;25:494-9.
282. Robertson O, Wu P, Langhorne. Thrombophilia in pregnancy: a systematic review. *British Journal of Haematology*. 2006;132(2):171–196.
283. Rodger MA, Walker MC, Smith GN. Is thrombophilia associated with placenta-mediated pregnancy complications? A prospective cohort study. *J Thromb Haemost*. 2014;12:469-478.
284. Saki F, Dabbaghmanesh MH, Ghaemi SZ, Forouhari S, Ranjbar Omrani G, Bakhshayeshkaram M. Thyroid function in pregnancy and its influences on maternal and fetal outcomes. *Int J Endocrinol Metab*. 2014;12:e19378.
285. Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW. Glutathione in human plasma: decline in association with ageing, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med*. 1998;1(24):699-704.
286. Saran M, Bors W. Signalling by O₂⁻ and NO: how far can either radical, or any specific reaction product, transmit a message under in vivo conditions? *Chem Biol Interact*. 1994;90(1):35-45.
287. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*. 2001;30:1191-1212.
-

-
288. Schoenmakers N, Alatzoglou KS, Chatterjee VK, Dattani MT. Recent advances in central congenital hypothyroidism. *J Endocrinol.* 2015;227(3):51-71.
289. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem.* 2000;267:4904-4911.
290. Sichak SP, Dounce AL. *Arch Biochem Biophys.* 1986;249:286.
291. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997 ;82(2):291-5.
292. Sies H, Graf P. Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopressin, phenylephrine and adrenaline. *Biochem. J.* 1985;226(2):545–549.
293. Shiva S, Sack MN, Greer JJ, Duranski M, Ringwood LA, Burwell L, Wang X, MacArthur PH, Shoja A, Raghavachari N, Calvert JW, Brookes PS, Lefer DJ, Gladwin MT.. Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via modulation of mitochondrial electron transfer. *J Exp Med.* 2007;204(9):2089-2102.
294. Silver AJ, Patel HN, Okwuosa T. Hypothyroid cardiomyopathy in a patient post-doxorubicin chemotherapy. *BMJ Case Rep.* 2016;2016.
295. Smallridge RC, Ladenson PW. Hypothyroidism in pregnancy: consequences et neonatal health. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:2349–2353.
296. Smith CL, Connelly OM, O Malley BW. Modulation of the ligand – independent activation of the human estrogen receptor by hormon and antihormone. *Proc Natl Acad SCI USA.* 1993;6120-6124.
297. Singh G, Kaul I, Singh A, Meinia SK. Maternal and fetal outcome in subclinical hypothyroidism in Jammu region, North India, *Int. J. Reprod. Contracept. Obstet. Gynecol.* 2016;5:2362-2366.
298. Sözmen EY, Kerry Z, Uysal F, Yetik M, Yasa L, Ustünes T. Onat, Antioxidant enzyme activities and total nitrite/nitrate levels in the collar model. Effect of nicardipine. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2000;38:21-25.
299. Sparić R, Lazović B, Mazić S, Đelić M, Agrirović A. Perotinizacija u ginekologiji i akušerstvu- pregled literature. *Med. Pregl.* 2013č LXVI; (7-8):307-310.
300. Speroff L, Glass HR, Kase NG, (eds). *Clinical gynecologic endocrinology and infertility.* 5th ed. Baltimore: Williams and Wilkins. 1994;667–684.
301. Speroff L. *Clinical gynecologic endocrinology.* New York: Lippincot, 2004.
302. Spina V, Aleandri V, Morini F. The impact of the Factor V Leiden mutation on pregnancy. *Human Reproduction.* 2000;6:301-306.
303. Sprung CN, Ivashkevich A, Forrester HB, Redon CE, Georgakilas A, Martin OA. Oxidative DNA damage caused by inflammation may link to stress-induced non-targeted effects. *Cancer Lett.* 2015;356:72-81.
-

-
304. Stadtman ER. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem.* 1991;266(4):2005-8.
305. Stagnaro-Green A, Chen X, Bogden JD, Davies TF, Scholl TO. The thyroid and pregnancy: a novel risk factor for very preterm delivery. *Thyroid.* 2005;15:351–357.
306. Stamler JS, Singel DJ, Loscaizo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* 1992; 258(5090):1898-902.
307. Stanbury DM, Wilmarth WK, Knalaf S, Po HN, Bzrd JE. Oxidation of thiocyninate and jodide by iridium (IV). *Chem Inform.* 1980; 11:48.
308. Storz G, Tartaglia LA, Ames BN, Oxy R. A transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science.* 1990; 248:189-194.
309. Stotland NE, Caughey AB, Breed EM, Escobar GJ. Risk factors and obstetric complications associated with macrosomia. *Int J Gynecol Obstet.* 2004;87:220–226.
310. Strenzke N, Grabbe J, Gibbs BF. Pharmacological studies on the role of reactive oxygen species in IgE-dependent histamine secretion from human basophils. *Inflamm Res.* 2005;54:11-12.
311. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1411(2-3):217-30
312. Sultana Z, Maiti K, Aitken J, Morris J, Dedman L, Smith R. Oxidative stress, placental ageing-related pathologies and adverse pregnancy outcomes. *Am J Reprod Immunol.* 2017;77(5). doi: 10.1111/aji.12653.
313. Szecsi P, Jorgensen M, Klajnbard, A, Andersen M, Colov N, Stender S. Haemostatic reference intervals in pregnancy. *Thromb. Haemost.* 2010;103:718–727.
314. Štajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS. Ekofiziologija i ekotoksikologija životinja. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevacu, 2007.
315. Tan TO, Cheng YW, Caughey AB. Are women who are treated for hypothyroidism at risk for pregnancy complications? *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194(5):e1–e3.
316. Torres-Bugarín O, Macriz Romero N, Ramos Ibarra ML, Flores-García A, Valdez Aburto P, Zavala-Cerna MG. Genotoxic effect in autoimmune diseases evaluated by the micronucleus test assay: our experience and literature review. *Biomed. Res. Int.* 2015;2015:194031.
317. Traylor TG, Sharma VS. *Biochemistry* 1992;31: 2847-2849.
318. Trégouët DA, Heath S, Saut N, Biron-Andreani C, Schved JF, Pernod G, Galan P, Drouet L, Zelenika D, Juhan-Vague I, Alessi MC, Tired L, Lathrop M, Emmerich J, Morange PE. Common susceptibility alleles are unlikely to contribute as strongly as the FV and ABO loci to VTE risk: results from a GWAS approach. *Blood.* 2009;113: 5298303.
-

-
319. Tudosa R, Vartej P, Horhoianu I, Ghica C, Mateescu S, Dumitrache I. Maternal and fetal complications of the hypothyroidism-related pregnancy. *Maedica (Buchar)*. 2010;5:116-123.
 320. Turpin CA, Sakyi SA, Owiredu WK, Ephraim RK, Anto EO. Association between adverse pregnancy outcome and imbalance in angiogenic regulators and oxidative stress biomarkers in gestational hypertension and preeclampsia. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2015;15:189.
 321. Underwood MA, Gilbert WM, Sherman MP. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J Perinatol*. 2005;25(5):341–348.
 322. Ursini F, Bindoli A. The role of selenium proxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem. Phys. Lipids*. 1987;44:255-276.
 323. Valko M, Leibfrize D, Moncol J, Cronin MTD, Mayur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological function and human disease. *Jut J Biochem Cell Biol*. 2007;39:44-48.
 324. van Faassen EE, Bahrami S, Feelisch M, Hogg N, Kelm M, Kim-Shapiro DB, Kozlov AV, Li H, Lundberg JO, Mason R, Nohl H, Rassaf T, Samouilov A, Slama-Schwok A, Shiva S, Vanin AF, Weitzberg E, Zweier J, Gladwin MT. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. *Med Res Rev*. 2009;29(5): 683-741.
 325. Van Vliet G. Thyroid disorders in infancy. In: Lifshitz F, ed. *Pediatric Endocrinology*, 5th ed. New York: Informa, 2007, pp. 391-404.
 326. Veeracharari U, Venkatesh S, Yadov A, Narayanappa R. Biomonitoring genetic instability in normal healthy population using a simple cytogenetic marker-micronucleus test. *International Multidisciplinary research Journal*. 2011;1/2:01-09.
 327. Verhamme P, Hoylaerts MF. The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta Clin Belg*. 2006;61(5):213-219.
 328. Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des*. 2004;10(14):1677-94.
 329. Vila-Petroff MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollott SJ. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res*. 1999;84(9):1020-1031.
 330. Zimonjic DB, Savkovic N, Andjelkovic M. Genotoxic agents: the effects: principles and methodology of detection. *Naučna knjiga, Beograd*, 1990: 1-395
 331. Wagenaar GT, ter Horst SA, van Gastelen MA, Leijser LM, Mauad T, van der Velden PA, de Heer E, Hiemstra PS, Poorthuis BJ, Walther FJ. Gene expression profile and histopathology of experimental bronchopulmonary dysplasia induced by prolonged oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2004;36:782-801.
-

-
332. Wagner KH, Reichhold S, Neubauer O. Impact of endurance and ultraendurance exercise on DNA damage. *Annals of the New York Academy of Sciences*.2011;1229:115-123.
333. Wang D, Zheng F, Holmberg S, Kohlhaw GB. Yeast transcriptional regulator Leu3p. Self-masking, specificity of masking, and evidence for regulation by the intracellular level of Leu3p. *J Biol Chem* .1999;274(27):19017-24.
334. Wang S, Teng WP, Li JX, Wang WW, Shan ZY. Effects of maternal subclinical hypothyroidism on obstetrical outcomes during early pregnancy. *J Endocrinol Invest*. 2012;35(3):322-325.
335. Weiss HJ, Turitto VT. Prostacyclin (prostaglandin I₂, PGI₂) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *Blood*. 1979;53(2):244-250.
336. Whinna HC, Church FC. Interaction of thrombin with antithrombin, heparin cofactor II, and protein C inhibitor. *J Protein Chem*. 1993;12:677-688.
337. Wilson JD, Foster DW. The thyroid gland. In: *Williams Textbook of Endocrinology*. Saunders Ed. Philadelphia, 2002. pp. 357-487.
338. Wilson KL, Casey BM, McIntire DD, Halvorson LM, Cunningham FG. Subclinical thyroid disease and the incidence of hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2012;119:315–320.
339. Wink DA, Nims RW, Darbyshire JF, Christodoulou D, Hanbauer I, Cox GW, Laval F, Laval J, Cook JA, Krishna MC, et al. Reaction kinetics for nitrosation of cysteine and glutathione in aerobic nitric oxide solutions at neutral pH. Insights into the fate and physiological effects of intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem. Res. Toxicol*. 1994;7:519-525.
340. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 1998;25:434-456.
341. Wirstlein PK, Mikołajczyk M, Jasiński P, Skrzypczak J. Evaluation of the markers of inflammation in the umbilical cord blood of newborns of mothers with thrombophilia. *Am J Reprod Immunol*. 2014;72:561-570.
342. Wiwanitki V. Correlation between plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and pre-eclampsia: an appraisal. *Arch Gynecol Obstet*. 2006;273: 322–324.
343. Wolin MS. Interactions of Oxidants with Vascular Signalling Systems. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol*.2000;20:1430-42.
344. Wu J, Lin Q, Lu Y, Willis WD, Westlund KN. Changes in nitric oxide synthase isoforms in the spinal cord of rat following induction of chronic arthritis. *Exp Brain Res*. 1998;118:457- 465.
-

345. Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med.* 1996;47:315-331.
346. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science.* 1992;256:225-228.
347. Yamazaki K, Sato K, Shizume K, Kanaji Y, Ito Y, Obara T, Nakagawa T, Koizumi T, Nishimura R. Potent thyrotropic activity of human chorionic gonadotropin variants in terms of ¹²⁵I incorporation and de novo synthesized thyroid hormone release in human thyroid follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:473–470.
348. Yilmaz S, Ozan S, Benzer F, Canatan H. Oxidative damage and antioxidant enzyme activities in experimental hypothyroidism. *Cell Biochem Funct.* 2003;21:325-330.
349. Yin J, Ren W, Liu G, Duan J, Yang G, Wu L, Li T, Yin Y. Birth oxidative stress and the development of an antioxidant system in newborn piglets. *Free Radic Res.* 2013;47:1027-1035.
350. Yu L. Human Amniotic Fluid-Derived and Amniotic Membrane-Derived Stem Cells. In: Zhao CR. (ed.) *Stem Cells: Basics and Clinical Translation.* Springer, Dordrecht, 2015, pp. 29-66.
351. Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol Aspects Med.* 2009;30(1-2):29-41.

RADOVI I SAOPŠTENJA PROISTEKLI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE

Spisak radova:

Radovi objavljeni u međunarodnim časopisima (M20)

Novakovic T, Dolicanin Z, Djordjevic N. Oxidative stress biomarkers in amniotic fluid of pregnant women with hypothyroidism. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. DOI: 10.1080/14767058.2017.1400005.

IF: 1,826 (M22)

Novakovic T, Dolicanin Z, Djordjevic N. Effects of maternal subclinical hypothyroidism on amniotic fluid cells oxidative status. Reproductive Toxicology.2018;78:97-101.

IF: 2,341(M22)

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M30)

Novakovic T, Dolicanin Z, Babic G, Djordjevic N. A corelation between hematological changes and fetal cells mcronuclei in pregnant women with hypothyroidism. Fourth International conference on radiation and applications in various fields of research. Nis, Serbia, May 23-27, 2016. Abstract Book p.37.

(M34).

BIOGRAFIJA

Tanja Novaković rođena je 14. 08.1968. godine u Kragujevcu, gde je završila osnovnu školu “Milutin i Draginja Todorović”, kao i srednju školu “Prva kragujevačka gimnazija”. Osnovne akademske studije biologije na Institutu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Kragujevcu upisala je školske 1987/88. godine. Studije je završila 1994. godine sa prosečnom ocenom 8,22 i stekla akademsko zvanje diplomirani biolog.

Na Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Kragujevcu upisala je Magistarske akademske studije školske 1995/96. godine. Magistarsku tezu pod nazivom “Frekvencija mikronukleusa u limfocitima periferne krvi pacijentkinja kao posledica lokalne aplikacije metotreksata” odbranila je 2001. godine, čime je stekla akademsko zvanje magistar medicinskih nauka. Doktorske studije u oblasti biomedicine upisala je 2016. godine na Državnom univerzitetu u Novom Pazaru.

Od 1995. godine zaposlena je u Laboratoriji za citogenetiku, Ginekološko-akušerske klinike, Kliničkog centra „Kragujevac“ u Kragujevcu. Poslove šefa Odseka citogenetske dijagnostike Ginekološko-akušerske klinike, Kliničkog centra „Kragujevac“ u Kragujevcu obavlja od 2006. godine.

Autor je ili koautor 9 radova (2 - M22; 2 - M23; 1 - M24; 4 - M52) publikovanih u domaćim i međunarodnim časopisima, kao i 3 saopštenja štampana u izvodu sa nacionalnih i međunarodnih naučnih skupova.

Član je Društva genetičara Srbije i Sekcije za Medicinsku genetiku.

Eksperimentalni deo doktorske disertacije uradila je u Laboratoriji za citogenetiku, Ginekološko-akušerske klinike, Kliničkog centra „Kragujevac“ u Kragujevcu i u Laboratoriji za biomedicinska istraživanja Departmana za biomedicinske nauke na Državnom univerzitetu u Novom Pazaru.