

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
UNIVERZITETA U BEOGRADU - FARMACEUTSKOG FAKULTETA**

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU - DOKTORSKE STUDIJE

Na sednici Nastavno-naučnog veća Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 19.06.2014. godine, imenovani smo u Komisiju za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije koja je prijavljena pod naslovom „**Pokazatelji oksidativnog stresa, lipidni profil i status enzima paraoksonaza 1 tokom trudnoće bez komplikacija i nakon porođaja**“, kandidata dipl.inž.medicinske biohemije Daniele Ardalić, specijaliste medicinske biohemije.

Posle pregledane disertacije podnosimo Nastavno-naučnom Veću Farmaceutskog fakulteta sledeći

I Z V E Š T A J

A. SADRŽAJ DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija je napisana na 127 strana, ima 26 tabela, 12 slika i 153 literaturna navoda. Sadržaj doktorske disertacije izložen je u sledećim poglavljima: Uvod (23 strane), Ciljevi istraživanja (1 strana), Materijali i metode (22 strane), Rezultati istraživanja (43 strane), Diskusija (20 strana), Zaključci (5 strana) i Literatura.

Ciljevi ove doktorske disertacije bili su sledeći: 1. Kod zdravih trudnica, kod kojih su trudnoća i porođaj prošli bez komplikacija, ispitati promenu parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, lipidnih parametara, aterogenih indeksa, subfrakcija LDL i HDL čestica, status enzima paraoksonaza 1 i distribuciju fenotipova enzima paraoksonaza 1. 2. Ispitati promene navedenih parametara u svim stupnjevima trudnoće, prvom trimestru, drugom trimestru, trećem trimestru, neposredno pre porođaja kao i dva meseca posle porođaja. 3. Ispitati da li postoji razlika u parametrima oksidativnog stresa, antioksidativne zaštite i lipidnog profila između trudnica u različitim periodima trudnoće i zdravih ispitanica iste starosne dobi. 4. Utvrditi da li između parametara oksidativnog stresa, lipidnih parametara, i aktivnosti enzima paraoksonaza 1 u trudnoći postoji povezanost, kao i da li fiziološka trudnoća predstavlja rizik za razvoj ateroskleroze. 5. Ispitati uticaj povećanja telesne težine trudnica tokom trudnoće, kao i uticaj pušenja i suplementacije vitaminima na parametre oksidativnog stresa, lipidne parametre i aktivnost enzima paraoksonaza 1. 6. Ispitati povezanost parametara oksidativnog stresa, lipidnih parametara i aktivnosti paraoksonaze 1 sa telesnom masom, dužinom i obimom glave norođenčadi.

U poglavlju **Materijali i metode** su dati podaci o ispitanicama i primenjenim metodama. Istraživanjem, koje je dizajnirano kao longitudinalna studija, obuhvaćeno je 60 zdravih gravidnih žena starosti 20-38 godina (medijana 31 godina), koje su se javile na pregled u Savetovalište za trudnice Ginekološko akušerske klinike (GAK) „Narodni front“,

Beograd, radi prenatalnog laboratorijskog screening-a. Svi uzorci su sakupljeni prema utvrđenom kalendaru poseta savetovalištu za trudnice GAK Narodni front i organizovani su u pet poseta: prvi trimestar, drugi trimestar, treći trimestar, neposredno pred porođaj (38. nedelja trudnoće) i sedam nedelja posle porođaja. Pri svakoj poseti trudnice su kompletno klinički i laboratorijski obrađene. Gestacijska starost određivana je ultrazvučnim pregledom. Kontrolnu grupu činile su 42 negravidne žene uparene po godinama (22-38 godina, mediana 32godine). Sve ispitanice su dale pismeni pristanak za učešće u studiji, koju je za trudnice odobrio Etički odbor GAK „Narodni front“, a za kontrolnu grupu Etički odbor Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

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

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

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

Trudnice su tokom trudnoće bile na adekvatnom režimu ishrane prema savetu lekara, a 21 trudnica je uzimala vitaminsku suplementaciju (multivitamine i minerale). Suplementi su uzimani jednom dnevno. Takođe, 21 trudnica je imala pušačke navike pre trudnoće sa konzumacijom do 20 cigareta dnevno, a prestale su sa pušenjem nakon što su saznale za trudnoću.

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

Kod ispitanica su određeni sledeći parametri:

1. Antropometrijski podaci: starost, visina, težina, indeks telesne mase, dobijanje u težini tokom trudnoće.

2. Osnovni biohemijski i hematološki parametri
3. Lipidni status - ukupni kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, razdvajanje LDL i HDL subfrakcija, ApoAI, ApoB.
4. Parametri oksidativnog stresa: tiobarbiturna kiselina-reagujuća supstanca – TBARS, superoksid anjon radikal, lipidni hidroperoksidi (LOOH), produkti oksidativne modifikacije proteina (AOPP), totalni oksidacioni status (TOS), prooksidativni-antioksidativni balans (PAB).
5. Parametri antioksidativne zaštite: aktivnost superoksid dismutaze (SOD), ukupne sulfhidrilne grupe (SH grupe), totalni antioksidativni status (TAS).
6. Status i aktivnost enzima PON1: aktivnost enzima paraoksonaze prema paraoksonu kao supstratu i aktivnost enzima paraoksonaze prema diazoksonu kao supstratu.

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

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

B. OPIS DOBIJENIH REZULTATA

U sprovedenom istraživanju su učestvovala 43 zdrave trudnice prosečne starosne dobi $30,0 \pm 4,15$ godine i 42 zdrave negravidne žene prosečne starosne dobi $30,4 \pm 4,93$ godine, uparene po godinama starosti. Najveći broj ispitanica, 34 trudnice (79%) imale su pre trudnoće indeks telesne mase (ITM) u granicama optimalne uhranjenosti. Srednja vrednost ITM u grupi trudnica pre trudnoće je bila $21,5 \pm 2,88$, a u kontrolnoj grupi $21,9 \pm 3,54$, tako da među njima nije bilo statistički značajne razlike. Među trudnicama njih 22 (51%) imale su pušačke navike pre trudnoće, a među ženama u kontrolnoj grupi iste navike je imalo 15 (35,7%) žena.

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

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

Vrednosti osnovnih biohemijskih i hematoloških parametara ispitanica kreću se tokom trudnoće u skladu sa očekivanim fiziološkim promenama koje prate zdravu trudnoću bez komplikacija.

U poglavlju **Rezultati** dalje su analizirani parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.

TBARS je krajnji produkt razgradnje lipidnih peroksida i predstavlja marker kasne faze oštećenja oksidansima. Tokom trudnoće te vrednosti su uglavnom nepromenjene, a statistička analiza pokazala je da ne postoji značajna razlika u vrednostima tokom trudnoće u odnosu na početak trudnoće. Vrednosti posle porođaja su, međutim, značajno više u odnosu na početak trudnoće, kao i u odnosu na kontrolnu grupu. Slično je kretanje i vrednosti LOOH tokom trudnoće, a vrednosti na početku trudnoće, kao i sedam nedelja nakon porođaja značajno su više od vrednosti u kontrolnoj grupi. AOPP kao pouzdan indirektan marker oksidativnog oštećenja proteina značajno raste tokom trudnoće i već od drugog trimestra vrednosti su značajno veće nego na početku trudnoće. Posle porođaja vrednosti značajno opadaju u odnosu na početak trudnoće, ali nisu značajno različite od vrednosti kontrolne grupe. Superoksid anjon, slobodni radikal koji se i normalno stvara u metaboličkim reakcijama, raste na početku trudnoće i ta vrednost kasnije tokom trudnoće varira, tako da je u trećem trimestru značajno niža nego u prvom trimestru. Posle porođaja superoksid anjon značajno je niži nego na početku trudnoće, ali se ne razlikuje od vrednosti u kontrolnoj grupi. Vrednosti TOS rastu tokom trudnoće i u trećem trimestru vrednost je značajno viša u odnosu na prvi trimestar. Dalje prema kraju trudnoće i nakon porođaja vrednosti opadaju prema vrednostima sa početka trudnoće, ali ta razlika nije statistički značajna. PAB pokazuje značajno više vrednosti u prvom trimestru trudnoće u odnosu na vrednosti kontrolne grupe negravidnih žena, ali i u svim ispitivanim periodima trudnoće u odnosu na prvi trimestar. Posle porođaja vrednost PAB-a opada i značajno je niža u odnosu na početak trudnoće i doseže približne vrednosti kontrolne grupe.

Endogeni sistem antioksidativne zaštite čine antioksidativni enzimi i neenzimski antioksidansi. Superoksid dismutaza (SOD) predstavlja enzim prve linije odbrane od oksidativnog stresa, i njegove vrednosti prema dobijenim rezultatima variraju tokom trudnoće, tako da su u drugom trimestru značajno niže u poređenju sa prvim trimestrom, a u trećem trimestru i neposredno pred porođaj SOD značajno je viša nego na početku trudnoće. Posle porođaja ovaj enzim je značajno viši u odnosu na početak trudnoće i kontrolnu grupu. SH grupe proteina kao deo neenzimskog sistema odbrane od oksidativnog stresa, ne variraju bitno tokom trudnoće ako se posmatraju srednje vrednosti. Međutim, zbog male standardne devijacije statistička analiza pokazuje da postoji značajna razlika među pojedinim trimestrima: vrednosti u drugom trimestru su značajno niže, a vrednosti u trećem trimestru značajno više u odnosu na prvi trimestar. Vrednosti posle porođaja su značajno više od vrednosti na početku trudnoće, ali se ne razlikuju od vrednosti u kontrolnoj grupi. TAS kao marker sveukupne antioksidativne zaštite pokazuje značajno više vrednosti u trećem trimestru, neposredno pred porođaj i nakon porođaja u poređenju sa vrednošću u prvom trimestru.

Rezultati analize lipidnih parametara pokazuju kontinuirani porast ukupnog holesterola tokom trudnoće, sa značajno višim vrednostima u odnosu na prvi trimestar. Posle porođaja, iako dolazi do pada vrednosti u odnosu na predporođajni period, ta vrednost ostaje i dalje značajno viša u odnosu na prvi trimestar, ali i u odnosu na kontrolnu grupu. Značajan porast vrednosti holesterola već u prvom trimestru je očekivan, imajući u vidu značaj holesterola za normalan razvoj fetusa. Vrednosti triglicerida prate isti trend kretanja tokom

trudnoće kao i vrednosti holesterola, sa značajno višim vrednostima u odnosu na početak trudnoće, da bi nakon porođaja te vrednosti opale do nivoa prvog trimestra. Ipak, ova vrednost nakon porođaja ostaje značajno viša u odnosu na kontrolnu grupu. Vrednosti HDL-holesterola značajno rastu već u prvom trimestru u odnosu na kontrolnu grupu, a najveće su u drugom trimestru, nakon čega lagano opadaju do termina porođaja. Posle porođaja beleži se dalji pad vrednosti, koje su značajno niže u odnosu na vrednosti sa početka trudnoće i približno su jednake vrednostima u kontrolnoj grupi. LDL-holesterol značajno raste u drugom trimestru i dalje tokom trećeg trimestra i neposredno pred porođaj. Posle porođaja vrednosti LDL-holesterola neznatno opadaju ali su i dalje značajno više nego na početku trudnoće i u odnosu na kontrolnu grupu, odnosno potreban je duži period od ispitivanog da bi se vrednost normalizovala i dovela na nivo pre trudnoće. Iako HDL-holesterol tokom trudnoće raste, dobijeni rezultat pokazuje da u odmakloj trudnoći, u momentu stagnacije vrednosti HDL holesterola koji ima ateroprotektivno dejstvo, LDL-holesterol svojim daljim rastom u istom periodu postaje dominantna strana ovog odnosa. Promene vrednosti ApoAI i ApoB tokom ispitivanog perioda uglavnom prate kretanje vrednosti HDL i LDL-holesterola. Posle porođaja vrednosti su na nivou vrednosti kontrolne grupe u slučaju ApoB, ili niže kada je u pitanju ApoAI. Iz osnovnih lipidnih parametara izračunati su i lipidni indeksi.

Kako je prethodnom analizom parametara lipidnog profila utvrđeno da se tokom normalne, nekomplikovane trudnoće većina lipidnih parametara menja i ide ka aterogenom lipidnom profilu, sledeći korak u ovoj studiji bio je ispitivanje veličine LDL i HDL čestica i promena raspodele njihovih subfrakcija tokom trudnoće. Procenat LDL I subfrakcije koja je karakteristična za fenotip sa malim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti, opada tokom trudnoće i u trećem trimestru je statistički značajno manji u poređenju sa prvim trimestrom, a ostaje statistički značajno manji i nakon porođaja. Ovaj rezultat je praćen statistički značajno većim procentom udela LDL III B subfrakcije (male, guste LDL čestice) u trećem trimestru, kao i nakon porođaja. Veličina HDL čestica se nije statistički značajno menjala tokom trudnoće ali je sedam nedelja nakon porođaja veličina HDL čestica statistički značajno manja u poređenju sa prvim trimestrom.

Za procenu nezavisnog uticaja veličine LDL i HDL čestica i raspodela njihovih subfrakcija na antropometrijske karakteristike novorođenčadi, primenjena je univarijantna linearna regresiona analiza. Visok procentualni udeo malih, gustih LDL čestica (LDL IV B) je povezan sa manjim obimom glave, a visok procentualni udeo većih LDL čestica (LDL I) je povezan sa većim obimom glave novorođenčadi. Visok procentualni udeo HDL 2a subfrakcije u serumu trudnice u 38. nedelji trudnoće je u negativnoj korelaciji sa dužinom i obimom glave novorođenčadi.

U cilju procene nezavisnog uticaja parametara koji su se pokazali kao značajni prediktori antropometrijskih mera novorođenčadi u univarijantnoj analizi, primenjena je multipla linearna regresiona analiza. U ovoj analizi je izvršen adjustment (podešavanje) vrednosti ovih parametara za starost majke, procenat dobijanja na težini tokom trudnoće, i koncentracije holesterola, triglicerida, LDL-holesterola, HDL-holesterola, ApoAI i ApoB, kako bi se eliminisao njihov uticaj. Uticaj procentualnog udela LDL I i LDL IV A subfrakcija u serumu trudnica u 38. nedelji trudnoće na antropometrijske mere novorođenčadi je izgubio

statističku značajnost u multiploj analizi. Procentualni udeo LDL IV B subfrakcije, međutim, ostaje nezavisno povezan sa dužinom novorođenčadi i obimom glave novorođenčadi i posle eliminisanja uticaja starosti trudnice, procenta dobijanja u težini trudnice kao i parametara lipidnog profila. Što je procentualni udeo LDL IVB subfrakcije u serumu trudnice u 38. nedelji trudnoće veći, obim glave i dužina novorođenčadi su manje. Takođe, procentualni udeo HDL 2a subfrakcije u serumu trudnica je ostao nezavisno povezan sa obimom glave novorođenčadi i posle adjustment analize.

Jedan od ciljeva istraživanja bio je i ispitivanje aktivnosti enzima PON 1 tokom trudnoće i posle porođaja. Aktivnost enzima PON1 određivana je preko brzine razgradnje veštačkih supstrata - paraoksona i diazoksona. Aktivnost enzima PON1 prema supstratu paraoksonu značajno opada tokom trudnoće u poređenju sa prvim trimestrom. Aktivnost enzima PON1 prema supstratu diazoksonu, ima izrazit i značajan pad u trećem trimestru, sa približnim vrednostima do porođaja, a nakon porođaja aktivnost je značajno niža u poređenju sa prvim trimestrom i u odnosu na kontrolnu grupu.

Kako je statistička analiza pokazala da diazoksonazna aktivnost značajno pada u trećem trimestru trudnoće, sledeći korak u ovoj studiji bio je ispitivanje nezavisnog uticaja parametara koji su pokazali značajnu korelaciju sa diazoksonaznom aktivnošću u trećem trimestru trudnoće, na ovaj pad aktivnosti enzima PON1. Posle korekcija vezanih za ispitivanje multikolinearnosti, rezultati multiple linearne regresione analize su pokazali da su pušački status pre trudnoće, koncentracija glukoze i PAB nezavisno povezani sa padom diazoksonazne aktivnosti u trećem trimestru trudnoće. Naime, 37,3% pada aktivnosti enzima PON1 prema diazoksonu je uslovljeno povećanjem PAB-a, pušenjem majke pre trudnoće i promenom koncentracije glukoze

U cilju ispitivanja uticaja indeksa telesne mase (ITM) na oksidativno-stresni status tokom trudnoće, upoređivani su parametri oksidativnog stresa trudnica u grupama dobijenim podelom na osnovu kvartilnih vrednosti ITM-a. Rezultati statističke analize su pokazali da su koncentracije AOPP, TOS-a i PAB-a statistički značajno veće kod trudnica u odnosu na kontrolnu grupu, bez obzira na vrednost ITM, ali nema razlike između grupa trudnica sa različitim ITM. Nema statistički značajne razlike u koncentracijama TBARS-a između kontrolne grupe i grupe trudnica različitih ITM, kao ni u vrednostima LOOH, izuzev između trudnica sa najvećim ITM i kontrolne grupe. Rezultati analize varijanse pokazuju da su vrednosti SOD statistički značajno veće u grupi trudnica sa najvišim ITM u odnosu na grupu trudnica sa najnižim ITM, ali ni u jednoj grupi trudnica nema razlike u odnosu na kontrolnu grupu. Vrednosti TAS i SH-grupa, kao i aktivnost paraoksonaze prema supstratu paraoksonu nisu statistički značajno različite između trudnica različitog ITM, kao ni između trudnica i kontrolne grupe. Aktivnost enzima paraoksonaze prema supstratu diazoksonu (DZO) značajno je niža u grupama trudnica sa ITM-om višim od 21,2.

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

triglicerida, LDL-holesterola i ApoB statistički značajno veće u grupi trudnica sa vrednostima ITM < 24,3 u odnosu na kontrolnu grupu, kao i u odnosu na grupu trudnica sa najmanjim ITM. Nije uočena statistički značajna razlika u koncentraciji HDL-holesterola između trudnica različitog ITM, ali su vrednosti u svim grupama veće od kontrolne grupe. Aterogeni indeks plazme (AIP) statistički značajno raste sa porastom ITM i to počev od grupe trudnica sa ITM > 21,2.

Rezultati ispitivanja uticaja ITM na parametre lipidnog profila i oksidativno-stresnog statusa su pokazali da ITM značajno utiče na promene ovih parametara tokom trudnoće. Da bi se otklonio potencijalni uticaj ITM trudnica pre trudnoće na ispitivane parametre primenjena je Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza kojom je ispitano postojanje veze parametara lipidnog profila i oksidativno-stresnog statusa sa dobijenom težinom tokom trudnoće koja je izražena u procentima u odnosu na težinu trudnica pre trudnoće. Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza je pokazala pozitivnu korelaciju između procenta dobijanja na težini tokom trudnoće i koncentracije mokraćne kiseline, ukupnog holesterola, triglicerida, ApoAI, ApoB, TBARS, AOPP i SOD aktivnosti. Takođe, dokazano je postojanje statistički značajne negativne korelacije između procenta dobijene težine tokom trudnoće i koncentracije TAS kao i diazoksonazne aktivnosti enzima PON1.

Kako su rezultati Spearman-ove korelacione analize pokazali značajnu povezanost procenta dobijanja na težini tokom trudnoće sa velikim brojem lipidnih parametara i parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite, dalje je ispitan potencijalno nezavisni uticaj procenta dobijanja na težini tokom trudnoće na promenu parametara lipidnog profila kod trudnica u trećem trimestru trudnoće. Prilikom formiranja modela za multiplu linearnu regresionu analizu, kao nezavisna promenljiva označen je aterogeni indeks plazme (AIP), koji može da predstavi promenu lipidnih parametara tokom trudnoće ka aterogenom lipidnom profilu.

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

U cilju preciznije procene lipidnog profila, parametara oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite i aktivnosti enzima PON1 tokom nekomplikovane trudnoće, ispitan je uticaj antioksidantne suplementacije tokom trudnoće na navedene parametre. Obzirom da su promene ispitivanih parametara najizraženije u trećem trimestru trudnoće, ispitivanje je usmereno upravo na taj period trudnoće.

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

Među trudnicama koje su pušile pre trudnoće značajno je veći broj onih koje su uzimale vitaminsku suplementaciju tokom trudnoće. Pušači su imali značajno veće dobijanje u težini u poređenju sa trudnicama koje nisu pušile. Takođe je među pušačima značajno veća

koncentracija LDL-holesterola u poređenju sa nepušačima i značajno niža koncentracija triglicerida. Kod parametara oksidativnog stresa primećuje se značajno viša vrednost TBARS-a i TOS-a među pušačima, kao i značajno niža aktivnost PON1.

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA IZ DOKTORSKE DISERTACIJE SA PODACIMA IZ LITERATURE

Slobodni kiseonikovi radikali (ROS) imaju značajnu ulogu kao signalni molekuli u fiziološkim reproduktivnim procesima, u održavanju normalnog toka trudnoće i razvoja fetusa, ali su odgovorni i za razvoj patofizioloških stanja i komplikacija u trudnoći. Prema istraživanjima, trudnoća je stanje intenzivnog oksidativnog stresa, ali i dalje u fiziološkim okvirima, uz istovremeno povećane parametre antioksidativne zaštite, tako da trudnoća kod zdravih žena sa očuvanom ravnotežom između ovih parametara prolazi bez komplikacija. Narušena ravnoteža sistema oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite vodi organizam u stanje oksidativnog stresa i posledično, kada je trudnoća u pitanju, nastajanju komplikacija u trudnoći, kao što je preeklampsija, gestacijski dijabetes, spontani pobačaj, prevremeni porođaj, intrauterini zastoj u rastu fetusa (IUGR), smrt fetusa.

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

Istraživanje koje na populaciji zdravih trudnica koje je izvedeno u ovoj doktorskoj disertaciji, pokazalo je da među parametrima oksidativnog stresa koji su određivani postoji značajan porast vrednosti lipidnih peroksida u prvom trimestru trudnoće u odnosu na kontrolnu grupu negravidnih žena, i taj rast se održava uz neznatne varijacije do kraja trudnoće. Toescu i saradnici (1) pokazali su da vrednosti lipidnih peroksida rastu tokom nekomplikovane trudnoće u drugom i trećem trimestru i da te vrednosti osam nedelja nakon porođaja opadaju, ali još uvek ne dosežu vrednosti zdravih negravidnih žena. Ovo ispitivanje obuhvatilo je sedamnaest zdravih trudnica u longitudinalnoj studiji, što je značajno manji broj ispitanica u odnosu na našu studiju.

Određivanje TBARS prema pojedinim autorima daje bolji uvid u stepen lipidne peroksidacije nego pojedinačno određivanje MDA, obzirom da obuhvata i MDA i druge srodne aldehide kao konačne produkte lipidne peroksidacije (2 U ovoj studiji, trudnice tokom cele trudnoće nisu imale značajne promene vrednosti TBARS, ali posle porođaja su vrednosti značajno više i u odnosu na vrednost rane trudnoće u prvom trimestru i u odnosu na kontrolnu grupu. Patil i saradnici (3) pokazali su da vrednosti TBARS značajno rastu tokom nekomplikovane trudnoće u poređenju sa kontrolnom grupom negravidnih žena i to povećanje je progresivno od prvog do trećeg trimestra. Studija je obuhvatila različite grupe zdravih trudnica koje su u odgovarajućim trimestrima dolazile na redovnu kontrolu, a rađena je na populaciji trudnica Indije.

Kod ispitanica u ovoj studiji totalni antioksidativni status, TAS značajno raste u trećem trimestru u odnosu na prvi trimestar i taj rast se dalje nastavlja do kraja trudnoće, kao i

sedam nedelja posle porođaja. Toescu i saradnici su pokazali da TAS nakon početnog sniženja vrednosti u prvom trimestru, raste značajno tokom dalje trudnoće (1), a Hung i saradnici nalaze da TAS u poređenju sa negravidnim ženama ima niže vrednosti do 30 nedelje gestacije, kada počinje da raste do termina porođaja, i ostaje na sličnim vrednostima šest do osam nedelja posle porođaja (4, 5).

Ispitanice u ovoj studiji počele su trudnoću sa nižim vrednostima SOD enzima u odnosu na kontrolnu grupu negravidnih žena i ta vrednost dalje opada u drugom trimestru u poređenju sa prvim trimestrom. Značajan rast aktivnosti ovog enzima, koji inače predstavlja prvu liniju odbrane od oksidativnog stresa, javlja se kod ispitanica u trećem trimestru. Rezultati drugih studija su i u ovom slučaju kontradiktorni. I dok jedni autori ukazuju na rast SOD tokom trudnoće (5), drugi ukazuju na pad vrednosti ovog enzima u trećem trimestru trudnoće (3). Interesantno je da svi ispitivani parametri antioksidativnog statusa pokazuju rast u trećem trimestru, sa tendencijom opadanja prema kraju trudnoće.

Istraživanje u ovoj doktorskoj disertaciji je pokazalo da tokom trudnoće postoji izmenjen lipidni profil u pravcu hiperlipidemije i proaterogenog lipidnog profila, što je u skladu sa drugim studijama (6, 7). Posle porođaja vrednost holesterola ostaje i dalje povišena u odnosu na prvi trimestar, ali i u odnosu na kontrolnu grupu. Vrednosti triglicerida posle porođaja vraćaju se na vrednosti sa početka trudnoće, ali su ipak još uvek za oko 20% više u poređenju sa negravidnim ženama. Mankuta i saradnici (8) navode da vrednosti holesterola lagano opadaju u prvom trimestru, najverovatnije kao posledica smanjenog unosa hrane u tom periodu zbog prisutne mučnine i povraćanja, i da se, nakon očekivanog fiziološkog rasta tokom trudnoće, vraćaju na nivo pre trudnoće unutar jedne godine posle porođaja. Gunderson i saradnici (7) navode da nakon porođaja trigliceridi opadaju rapidno, dok holesterol i LDL-holesterol ostaju povišeni, a HDL-holesterol je ispod vrednosti pre koncepcije ili rane trudnoće, što su pokazali i rezultati ovog istraživanja.

Rezultati u ovoj studiji slažu se sa rezultatima drugih studija, koje su dokumentovale rast vrednosti triglicerida, holesterola i LDL lipoproteinskih čestica tokom napredovanja trudnoće, dok je povećanje HDL lipoproteinskih čestica prisutno u ranijoj trudnoći (9). Izmenjen lipidni profil neophodan je da bi se zadovoljile potrebe majke i fetusa tokom fiziološke trudnoće. Međutim, obzirom na karakteristike hiperlipidemije tokom trudnoće i činjenicu da do kraja trudnoće većina trudnica razvije lipidni profil koji se kod zdravih negravidnih žena može smatrati proaterogenim, postavlja se pitanje eventualnog uticaja trudnoće na razvoj ateroskleroze kod žena. Pojedine studije tvrde da trudnoća ima proaterogeni potencijal i da, ukoliko se ponavlja više puta tokom života, može dovesti do razvoja ateroskleroze i posledično razvoja kardiovaskularne bolesti u kasnijem životu (10, 11). Drugi istraživači smatraju da trudnoća ipak nije proaterogena i da su svi ti procesi u trudnoći hormonski kontrolisani (12). Mankuta i saradnici (8) pokazali su da višebrojne trudnoće imaju kumulativni efekat na sniženje vrednosti HDL-a, što može uticati na razvoj kardiovaskularne bolesti u budućnosti.

Da bi se ustanovile karakteristike hiperlipidemije u trudnoći i procenila njena potencijalna proaterogenost, određena je veličina HDL i LDL čestica i distribucija njihovih subklasa tokom ispitivanog perioda trudnoće i nakon porođaja. Napredovanje trudnoće

povezano je sa promenama u distribuciji LDL i HDL lipoproteinskih subklasa, a pravi mehanizam ovih varijacija još uvek nije jasan (13). Kod trudnica glavna komponenta LDL i HDL lipoproteina jesu trigliceridi. Povećanje koncentracije triglicerida u plazmi trudnica odgovara akumulaciji VLDL lipoproteina, kao posledica njihove povećane sinteze indukovane od strane estradiola s jedne strane, a sa druge, njihovog smanjenog uklanjanja iz cirkulacije zbog smanjene aktivnosti enzima hepatičke lipaze i lipoproteinske lipaze. Ovakva visoka akumulacija VLDL čestica dovodi do prenosa triglicerida na LDL i HDL čestice u zamenu za holesterol estere, posredstvom enzima holesterol estar transportnog proteina, čija aktivnost tokom trudnoće raste. Konačni rezultat ovih pomenutih procesa jeste povećano stvaranje malih, gustih LDL i HDL čestica. Rezultati u ovoj studiji pokazuju da je redistribucija LDL i HDL subklasa prema malim gustim česticama povezana sa povećanjem koncentracije triglicerida na početku trudnoće, kao i njihovim daljim porastom tokom trudnoće, što je i ranije dokumentovano. Literaturni podaci koji se odnose na promenu lipoproteinskih subklasa tokom trudnoće govore da tokom trudnoće postoji predominacija malih gušćih LDL čestica, ali su rezultati koji se odnose na distribuciju subklasa unutar LDL oprečni. Sattar i saradnici (14) u svom istraživanju odredili su tri LDL subklase (LDL I-III) kod deset trudnica, ali su ovi rezultati prilično neubedljivi. Kod četiri trudnice nije bilo promena u LDL subklasama tokom trudnoće, a kod ostalih ispitanica došlo je do pomeranja profila LDL subklasa prema manjim, gušćim LDL česticama. Winkler i saradnici (15) u svojoj studiji koju su sprovedeli kod trudnica, odredili su koncentraciju šest LDL subklasa i pronašli povećanje gušćih LDL čestica u prvom trimestru, ali i akumulaciju većih plutajućih LDL čestica u drugom i trećem trimestru trudnoće. Silliman i saradnici (9) su takođe pokazali da su najmanje LDL čestice prisutne pre porođaja, ali i da je proces redistribucije LDL subklasa reverzan unutar šest nedelja posle porođaja. Istraživanja su takođe pokazala da stvaranje malih gustih čestica može dovesti do stvaranja i razvoja preeklampsije.

Za razliku od LDL lipoproteinskih čestica, distribucija HDL subklasa je manje istraživana. Subfrakcijski profil HDL-a određen je u ovoj studiji određivanjem pet subfrakcija HDL-a i pokazalo se da razvojem trudnoće ne dolazi do značajne promene u veličini HDL čestica, ali se posle porođaja beleži značajan pad veličine ovih čestica u poređenju sa veličinom u prvom trimestru, što je u skladu sa rezultatima istraživanja Alvarez-a i saradnika (16). Alvarez i saradnici (16) su pokazali da je u trećem trimestru manja zastupljenost HDL 2a uz istovremeno povećanje HDL 3c subklasa. Suprotno ovome, Silliman i saradnici (9) su našli predominaciju HDL 2b subklasa tokom kasne trudnoće. Ovakvi različiti rezultati mogu se objasniti time što je distribucija veličine HDL čestica u trudnoći nezavisno regulisana od strane estrogena, odvojeno od drugih metaboličkih faktora, ali i različitim metodama primenjenim za određivanje subklasa LDL-a i HDL-a.

Izmenjen lipidni metabolizam u trudnoći u pravcu balansirane hiperlipidemije značajan je za zdrav razvoj fetusa i zdravlje novorođenčeta u daljem životu. Snižen nivo holesterola, triglicerida, LDL-a i HDL-a tokom trudnoće može dovesti do zastoja u rastu fetusa (IUGR) i smanjene telesne težine na porođaju (17-19). Istraživanja su pokazala da veličina novorođenčeta negativno korelira sa razvojem kardiovaskularne bolesti u kasnijem životu (20, 21). Takođe, nebalansirana hiperlipidemija trudnice može dovesti do stvaranja

prvih aterosklerotičnih promena u vidu stvaranja masnih pruga već u fetalnom dobu i posledično razvoja ateroskleroze u kasnijem životu odrasle osobe.

Paraoksonaza1 (PON1) je enzim vezan za HDL čestice, deo je antioksidativnog kapaciteta organizma i igra značajnu ulogu u zaštiti fosfolipida LDL i HDL čestica od oksidacije. Humana PON1 pokazuje dva genetska polimorfizma, jedan na poziciji 55 gde je metionin (M) zamenjen leucinom (L), i jedan na poziciji 192, gde je glutamin (Q) zamenjen argininom (R). Polimorfizam utiče na hidrolitičku aktivnost PON1 izoenzima prema lipidnim peroksidima i smatra se da PON1- 192 R alelna forma poseduje veći rizik za nastanak kardiovaskularne bolesti i prevremenog porođaja, značajno doprinoseći endotelijalnoj disfunkciji i nižim aktivnostima ovog enzima koje su nađene u stanjima udruženim sa oksidativnim stresom (22, 23).

Kod trudnica koje su bile uključene u ovu studiju pokazalo se da aktivnost enzima PON1, koju je određivana prema supstratu paraoksonu, značajno opada tokom trudnoće. Nakon porođaja aktivnost enzima je i dalje je značajno niža u odnosu na ranu trudnoću prvog trimestra. Aktivnost PON1 merena prema diazoksonu pokazala je da u trećem trimestru dolazi do značajnog pada aktivnosti i da se taj pad nastavlja napredovanjem trudnoće. Nakon porođaja aktivnost enzima i dalje je značajno niža u poređenju sa prvim trimestrom.

Rezultati istraživanja drugih studija su različiti jer su neke studije pokazale da aktivnost PON1 tokom trudnoće raste, a druge studije su pokazale da aktivnost opada. Naime, rezultati istraživanja Ferre i saradnika (24), kojim su obuhvaćene trudnice u longitudinalnoj studiji, došli su do zaključaka da tokom nekomplikovane trudnoće aktivnost PON1 opada. Ovakav pad aktivnosti PON1 tokom trudnoće, autori objašnjavaju oslabljenim antioksidativnim obrambenim sistemom tokom kasne trudnoće. Vlachos i saradnici (25) su takođe pokazali da tokom trudnoće dolazi do sniženja aktivnosti PON1, a nakon porođaja vrednosti su niže kod žena koje su se porodile hitnim carskim rezom ili nakon prolongiranog vaginalnog porođaja, što takođe upućuje na povezanost aktivnosti enzima i oksidativnog stresa. Nasuprot ovim istraživanjima, Roy i saradnici (26), kao i Carpintero i saradnici (27), u svojim istraživanjima su pokazali da su u trudnoći povećane aktivnosti PON1, ali su poređenja rađena u odnosu na kontrolnu grupu.

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

D. OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Utvrđeno je da tokom trudnoće postoji stanje povećanog oksidativnog stresa a oksidativna oštećenja su posebno izražena kada je trudnoća praćena komplikacijama kao što je preeklampsija. Međutim, nema mnogo informacija o baznim nivoima oksidativnog stresa i antioksidantnog statusa kod žena sa nekomplikovanom trudnoćom. Studije koje su se bavile ovim problemom su uglavnom studije preseka, a longitudinalnih studija je mali broj (4, 28).

Uzroci povećanog oksidativnog stresa majke tokom trudnoće nisu poznati, ali mnogi podaci govore da placenta igra važnu ulogu u produkciji oksidativnog stresa tokom trudnoće (29, 30). Fiziološka uloga placentalnog oksidativnog stresa još uvek nije u potpunosti razjašnjena, ali se zna da na brojne ćelijske funkcije unutar placentе utiče povećana koncentracija kiseonika (31). Tu spada remodeliranje matriksa, angiogeneza, proliferacija i migracija citotrofoblasta, fuzija citotrofoblasta, endokrina sekrecija i produkcija citokina. Lokalni oksidativni stres unutar placentе može biti važan za razvoj placentе, a verovatno ima uticaja i na zdravlje majke. Pretpostavlja se da se u tom slučaju enzimski i neenzimski antioksidantni sistemi majke adaptivno aktiviraju da spreče dalje oksidativno oštećenje ćelijskih komponenata (4). Ako se poveća neravnoteža između reaktivnih kiseonikovih radikala i antioksidantnog odbrambenog mehanizma majke, mogu da se jave sistemska oksidativna oštećenja, što dovodi do komplikacija u trudnoći kao što su preeklampsija, spontani pobačaj, zastoje u razvoju fetusa, gestacijski dijabetes melitus, prevremeni porođaj (32). Upravo ova povezanost oksidativnog stresa i komplikacija u trudnoći, ishoda trudnoće i razvoja fetusa, predmet je intenzivnog istraživanja poslednjih godina. Takođe je pokazano da postoji veza između oksidativnog stresa majke i težine novorođenčeta (33).

Fiziološke promene koje se javljaju u trudnoći praćene su metaboličkim adaptacijama, koje omogućavaju odgovarajući rast i razvoj fetusa, obezbeđuju depoe energije i supstrata potrebnih fetusu nakon rođenja i obezbeđuju depoe energije i supstrata majci da iznese trudnoću do kraja i pripremi se za porođaj i laktaciju. U toku ove anaboličke faze povećava se osetljivost na insulin, kao i aktivnost lipoproteinske lipaze (LPL) koja razlaže trigliceride u cirkulaciji kako bi bili na raspolaganju tkivima, a sve to vodi ka pojačanoj lipogenezi i stvaranju depoa masti. Depoi masti su izvor energije za majku, čime se glukoza štedi i ostaje na raspolaganju fetusu u kataboličkoj fazi trudnoće (34). Tokom trećeg trimestra trudnoće anabolička faza u masnom tkivu prelazi u kataboličku, odnosno lipogenezu smenjuje lipoliza. Signali koji dovode do ove promene nisu sasvim jasni, ali se pretpostavlja da glavnu ulogu igraju placentalni hormoni (placentalni hormon rasta, humani placentalni laktogen, leptin i TNF- α), čija se koncentracija povećava kako trudnoća napreduje i koji dovode do rezistencije na insulin (35). Insulin inhibira lipolitičku aktivnost u adipoznom tkivu, glukoneogenezu u jetri i ketogenezu, a povećava aktivnost LPL u tkivima, a rezistencija na insulin pokreće sve ove procese u suprotnom smeru. Ovi procesi se dalje modifikuju u gestacionom dijabetesu, u kome se povećava rezistencija na insulin.

Sve ove metaboličke promene dovode do toga da se u trudnoći razvija prolazna hiperlipidemija sa hipertrigliceridemijom i posledičnim stvaranjem malih, gustih LDL čestica, a i jedno i drugo predstavlja nezavisan faktor rizika za razvoj KVB. Većina žena u trećem trimestru ima lipidni profil koji se kod žena koje nisu trudne smatra visoko aterogenim. Postoje dokazi da hiperholesterolemija tokom trudnoće, čak i kada je privremena i ograničena samo na trudnoću, može da bude okidač za neke patološke procese u fetalnoj aorti, kao i da bude uzrok aterogeneze u kasnijem životu i majke i deteta. Nivo holesterola u fetalnoj plazmi je proporcionalan nivou holesterola kod majke, smanjuje se sa fetalnom starošću i na rođenju je nizak. Ovo potkrepljuje činjenica da je nivo lipida u krvi iz pupčane vrpce kod normalnih trudnoća značajno niži od nivoa lipida u krvi majke, sa izuzetkom HDL-holesterola, kao i da

je odnos LDL/HDL kod novorođenčadi niži nego kod majki (36). Visok nivo HDL-holesterola i nizak LDL/HDL odnos u krvi pupčanika ukazuju na to da je fetus u normalnoj trudnoći zaštićen od uticaja aterogenih lipoproteina.

U kataboličkoj fazi u kasnijoj trudnoći dolazi do razgradnje depoa masti, a oslobođene masne kiseline se usmeravaju u sintezu triglicerida koji se akumuliraju u VLDL česticama, ali i u LDL i HDL česticama koje ih normalno ne transportuju. Koncentracija triglicerida u plazmi se povećava 2-4 puta i ovo povećanje triglicerida utiče na promene u subklasama pojedinih lipoproteina, posebno LDL-a.

Paraoksonaza-1 (PON1, arildialkilfosfataza, EC 3.1.8.1), hidrolaza koja se u cirkulaciji nalazi vezana na HDL čestice, ima sposobnost da razgrađuje lipidne perokside, pa predstavlja deo antioksidantnog sistema plazme (24). Pojedine studije pokazale su da aktivnost PON1 tokom trudnoće raste, što predstavlja još jedan mehanizam u očuvanju oksidativnog balansa tokom trudnoće, druge pak, ukazuju na smanjenje aktivnosti ovog enzima tokom trudnoće (1, 37). Uočeno je takodje, smanjenje aktivnosti ovog enzima kod trudnica iznad 35 godina u odnosu na trudnice mlađe od 25 godina, što ukazuje na smanjeni antioksidativni enzimski kapacitet kod starijih trudnica i njihovu veću izloženost riziku za razvoj KVB (24).

Citirana relevantna literatura

1. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol* 2002;57(5):609-613.
2. Takahashi M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J Reprod Dev* 2012;58:1-9.
3. Patil SB, Kodliwadmth MV, Kodliwadmth SM. Study of oxidative stress and enzymatic antioxidants in normal pregnancy. *Ind J Clin Biochem* 2007;2(1):135-137
4. Hung TH, Lo LM, Chiu TH, Yeh YL, Chen SF, Hsien TT. A longitudinal study of oxidative stress and antioxidant status in women with uncomplicated pregnancies through gestation. *Reproductive Sciences* 2010;17:401-409
5. Saker M, Mokhtari NS, Merzouk SA, Merzouk H, Belarbi B, Narce M. Oxidant and antioxidant status in mothers and their newborns according to birthweight. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol* 2008;141:95-99.
6. Amundsen AL, Khoury J, Iversen PO, Bergei C, Ose L, Tonstad S, Retterstol K. Marked changes in plasma lipids and lipoproteins during pregnancy in women with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2006;189:451-457.
7. Gunderson EP, Lewis CE, Murtaugh MA, Quesenberry CP, West DS, Sidney S. Long-term plasma lipid changes associated with a first birth. The coronary artery risk development in young adults study. *Am J Epidemiol* 2004;159:1028-1039
8. Mankuta D, Elami-Suzin M, Elhayani A, Vinker S. Lipid profile in consecutive pregnancies. *Lipids in Health and Disease* 2010;9:58-62.
9. Silliman K, Shore v, Forte TM. Hypertriglyceridemia during late pregnancy is associated with the formation of small dense low-density lipoproteins and the presence of large buoyant high-density lipoproteins. *Metabolism* 1994;43(8):1035-1041.
10. Nicholson WK, Asao K, Brancati F, Coresh J, Pankow JS, Powe NR. Parity and risk of type 2 diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes care* 2006;29:2349-2354.

11. Fowler-Brown AG, De Boer IH, Catov JM, Carnethon MR, Kamineni A, Kuller LH, Siscovick DS, Mukamal KJ. Parity and association with diabetes in older women. *Diabetes Care* 2010;33:1778-1782.
12. Setareh A, Mitra MG, Sedigheh B, Shoaleh S, Vahid Y, Siroos S. Maternal plasma lipid concentrations in first trimester of pregnancy and risk of severe preeclampsia. *Pak J Med Sci* 2009;25(4):563-567.
13. Okazaki M, Usui S, Tokunaga K, Nakajima Y, Takeichi S, Nakano T, Nakajima K. Hypertriglyceridemia in pregnancy does not contribute to the enhanced formation of remnant lipoprotein particles. *Clin Chim Acta* 2004;339:169-181.
14. Sattar N, Greer IA, Loudon J, Lindsay G, McConnel M, Shepherd J. Lipoprotein subfraction changes in normal pregnancy: Threshold effect of plasma triglyceride on appearance of small, dense low density lipoprotein. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2483-2491.
15. Winkler K, Wetzka B, Hoffmann MM, Friedrich I, Kinner M, Baumstark MW, Wieland H, Marz W, Zahradnik HP. Low density lipoprotein (LDL) subfraction during pregnancy: Accumulation of buoyant LDL with advancing gestation. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4543-4550.
16. Alvarez J, Montelongo A, Iglesias A, Lasuncio'n MA, Herrera E. Longitudinal study on lipoprotein profile, high density lipoprotein subclass, and postheparin lipases during gestation in women. *J Lip Res* 1996;37: 299-308.
17. Catov JM, Roberta BN, Wellons MF, Jacobs DR, Roberts JM, Gunderson EP. Prepregnancy lipids related to preterm birth risk: The coronary artery risk development in young adults study. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:3711-3718.
18. Risnes KR, Nilsen TI, Romundstad PR, Vatten LJ. Head size at birth and long-term mortality from coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 2009; 38: 955-962.
19. Kramer MS, Kahn SR, Dahhou M, Otvos J, Genest J, Platt RW, Evans RW. Maternal lipids and small for gestational age birth at term. *J Pediatr* 2013;163:983-988.
20. Alkemade FE, Gittenberger-de Grot AC, Schiel AE, VanMunsteren JC, Hogers B, Van Vliet SJ, Poelmann RE, Havekes LM, Wilems van Dijk K, DeRuiter MC. Intrauterine Exposure to maternal atherosclerotic risk factors increases the susceptibility to atherosclerosis in adult life. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2228-2235.
21. Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJP. Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *BMJ* 2001;322:949-953.
22. Sarandol E, Safak O, Dirican M, Uncu G. Oxidizability of apolipoprotein B-containing lipoproteins and serum paraoxonase / arylesterase activities in preeclampsia. *Clin Biochem* 2004;37:990-996
23. Uzun H, Benian A, Madazli R, Topcuoglu MA, Aydin S, Al-bayrak M. Circulating oxidized low-density lipoprotein and paraoxonase activity in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 2005;60:195-200.
24. Ferre N, Camps J, Fernandez-Ballart J, Arija V, Murphy MM, Marsillach J, Joven J. Longitudinal changes in serum paraoxonase-1 activity through normal pregnancy. *Clin Chem Lab Med* 2006;44(7):880-882.
25. Vlachos GD, Bartzeliotou A, Schulpis KH, Partsinevelos GA, Lazaropoulou C, Papadima C, Papastamataki M, Antsaklis A, Papassotiriou I. Maternal-neonatal serum paraoxonase 1 activity in relation to the mode of delivery. *Clin Biochem* 2006;39:923-928.
26. Roy AC, Loke DF, Saha N, viegas OA, Tay JS, Ratnam SS. Interrelationships of serum paraoxonase, serum lipids and apolipoproteins in normal pregnancy. A longitudinal study. *Gynecol Obstet Invest* 1994;38:10-13.

27. Carpintero A, Sanchez-Martin MM, Cabezas-Delamare MJ, Cabezas JA. Variation in serum arylesterase, β -glucuronidase, cathepsin L and plasminogen activators during pregnancy. *Clin Chim Acta* 1996;255:153-164.
28. Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod Toxicol.* 1999;13:347-352.
29. Burton GJ, Jauniaux E. Placental oxidative stress: from miscarriage to preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 2004;11:342-352.
30. Hung TH, Burton GJ. Hypoxia and reoxygenation: a possible mechanism for placental oxidative stress in preeclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2006;45:189-200.
31. Burton GJ. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J Anat.* 2009;215:27-35.
32. Al-Gubory K, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Cell Biology* 2010;42:1634-1650.
33. Osorio JC, Cruz E, Milanes M, et al.. Influence of maternal redox status on birth weight. *Reprod Toxycol* 2011;31:35-40.
34. Herrera E . Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine.* 2002;19:43-55
35. Sivan E, Boden G. Free fatty acids, insulin resistance, and pregnancy. *Curr.Diab. Rep.* 3003;3:319-322
36. Catarino C, Rebelo I, Belo L, et al. Fetal lipoprotein changes in pre-eclampsia. *Acta Obstetricia et Gynecologica* 2008;87:628-634.
37. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, et al. Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. *Clin Sci* 2004;106:93–8.

E. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE SASTAVNI DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

M21 – Rad u vrhunskom međunarodnom naučnom časopisu

1. Stefanovic A, Ardalic D, Kotur-Stevuljevic J, Vujovic A, Spasic S, Spasojevic-Kalimanovska V, Jelic-Ivanovic Z, Mandic-Markovic V, Mikovic Z, Cerovic N. Longitudinal changes in PON1 activities, PON1 phenotype distribution and oxidative status throughout normal pregnancy. *Reproductive Toxicology* 2012; 33: 20-26 (IF 3.94; 6/28)

M23 – Rad u međunarodnom naučnom časopisu

2. **Ardalić D**, Stefanović A, Kotur-Stevuljević J, Vujović A, Spasić S, Spasojević-Kalimanovska V, Jelić-Ivanović Z, Mandić-Marković V, Miković Ž, Cerović N. The influence of maternal smoking habit before pregnancy and antioxidative supplementation during pregnancy on oxidative stress status in non-complicated pregnancy. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* (Primljen za štampu, potvrda u prilogu) (IF 0.293, 113/121)

F. MIŠLJENJE I PREDLOG KOMISIJE

Na osnovu svega što je izloženo u doktorskoj disertaciji smatramo da ovaj rad predstavlja značajan naučni doprinos u proučavanju i tumačenju uloge oksidativnog stresa, lipida i enzima PON1 u trudnoći bez komplikacija u utvrđivanju referentnih vrednosti za različitu gestacijsku starost. Ovi podaci će moći da se koriste u proceni stanja trudnica i predviđanju eventualnih komplikacija u trudnoći.

Komisija smatra da je kandidat uspešno realizovao postavljene ciljeve istraživanja i predlaže Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu da prihvati ovaj Izveštaj i uputi ga Veću naučnih oblasti medicinskih nauka, radi dobijanja saglasnosti za javnu odbranu doktorske disertacije pod nazivom „**Pokazatelji oksidativnog stresa, lipidni profil i status enzima paraoksonaza 1 tokom trudnoće bez komplikacija i nakon porođaja**“ kandidata dipl.inž.medicinske biohemije Daniele Ardalić, specijaliste medicinske biohemije.

Članovi komisije:

1. Dr Slavica Spasić, redovni profesor u penziji, (mentor)
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

2. Dr Aleksandra Stefanović, docent,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

3. Dr Željko Miković, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet