

Oksidacijski stres in nosečnost

Oxidative stress and pregnancy

Barbara Rejc, Joško Osredkar, Ksenija Geršak

Povzetek: Nosečnost je fiziološko stanje povišanega oksidativnega stresa. Njegov obseg je odvisen od tvorbe reaktivnih kisikovih spojin ter od učinkovitosti antioksidantnega sistema. Ključno vlogo pri tvorbi reaktivnih kisikovih spojin in uravnavanju intrauterinoga oksidativnega ravnotežja v nosečnosti ima posteljica. Motnje oksidativnega ravnotežja v nosečnosti lahko vodijo v nastanek motenj v razvoju zarodka in kasneje ploda, saj prekomerni oksidativni stres povzroči oksidativno okvaro bioloških molekul. Določanje označevalcev oksidativne poškodbe ter določanje učinkovitosti antioksidantov omogoča ovrednotenje prisotnega oksidativnega stresa in ugotavljanje njegove povezanosti z zapleti v nosečnosti. V izbranih raziskavah so bili označevalci oksidacije lipidov in DNK v primeru preeklampsije, zastoja rasti ploda in prezgodnjega poroda značilno povišani glede na zdravo nosečnost. Aktivnost in ekspresija encimskih antioksidantov pa se med različnimi zapleti v nosečnosti razlikujeta. Članek zajema obrazložitev fiziološke in patofiziološke vloge reaktivnih kisikovih spojin v nosečnosti ter pregled nekaterih označevalcev oksidativnega stresa med zdravo nosečnostjo in med nosečnostjo z omenjenimi zapleti.

Ključne besede: reaktivne kisikove spojine, nosečnost, označevalci oksidativnega stresa

Abstract: Pregnancy itself is a state of increased oxidative stress. The extend of oxidative stress depends on reactive oxygen species formation and efficiency of antioxidant system. The placenta has the key role in the formation of reactive oxygen species and regulation of intrauterine oxidative balance. As excessive oxidative stress causes oxidative damage to biological molecules, disorders of oxidative balance in pregnancy can lead to defects in the embryonic and later in fetal development. The detection of markers of oxidative damage and of antioxidant efficiency permits the evaluation of oxidative stress and determination its association with pregnancy complications. In selected studies, markers of lipid and DNA oxidation were significantly elevated in preeclampsia, fetal growth restriction and preterm delivery in comparison to healthy pregnancy. The activity and expression of enzymatic antioxidants varies among high-risk pregnancies. This article includes description of physiological and patophysiological role of reactive oxygen species in pregnancy and overview of some oxidative stress markers throughout gestation of healthy and complicated pregnancies.

Key words: reactive oxygen species, pregnancy, oxidative stress biomarkers

1 Uvod

Oksidativni stres nastane zaradi neravnotežja med prooksidanti in antioksidanti. Vzrok oksidativnega stresa v organizmu je prekomerna tvorba radikalov in ostalih reaktivnih kisikovih/dušikovih spojin ali nezadosten obrambni antioksidantni sistem. Povzroči lahko neželene poškodbe bioloških molekul. Nosečnost je zaradi povečane metabolične aktivnosti in zmanjšane moči antioksidantov stanje povišanega oksidativnega stresa.

Namen tega preglednega članka je prikazati osnove in trenutna spoznanja o vlogi oksidativnega stresa v nosečnosti in njegovi povezanosti s patološkimi izidi. Informacije so podane sistematično z vidika določanja oksidativnega statusa v nosečnosti z znanimi biološkimi označevalci.

2 Reaktivne kisikove spojine

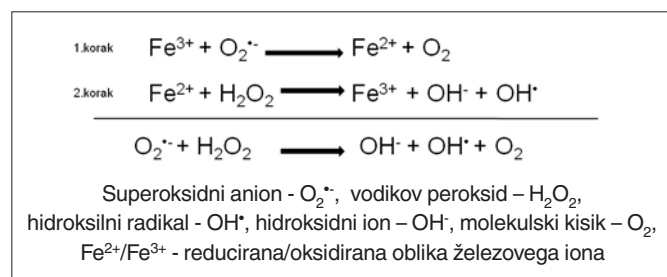
Izraz reaktivne kisikove spojine (ROS) vključuje kisikove radikale in njihove neradikalne intermediate. Nastajajo pri številnih redoks in encimskih reakcijah, kjer prihaja do prenosa elektronov. Glavni predstavniki ROS v bioloških sistemih so: superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$),

vodikov peroksid (H_2O_2) in hidroksilni radikal (OH^{\cdot}). Vzrok nastanka ROS pa predstavljajo tako endogeni viri (mitohondriji, citokrom P450, peroksisomi, endoplazemski retikulum, makrofagi, nevtrofilci, eozinofilci) kot eksogeni viri (ksenobiotiki, kovinski ioni, ionizirajoče sevanje) (1,2).

Superoksidni anion je za en elektron reducirana molekula kisika (O_2). Kot nabita molekula zato težko prehaja celične membrane in je prekursor večine ROS (3). Glavni vir nastanka $O_2^{\cdot-}$ so mitohondriji. Pri poteku transportne verige elektronov določeno število elektronov uide iz verige, predvsem z mesta kompleksa I in III. Ti elektroni tvorijo s kisikom $O_2^{\cdot-}$ (1). V normalnih pogojih se za tvorbo $O_2^{\cdot-}$ v mitohondrijih porabi 1-2% O_2 (3, 4). Pomemben vir $O_2^{\cdot-}$ so tudi encim ksantin-oksidadza, transportna veriga elektronov v endoplazemskem retikulumu, NADPH-oksidadza, citokrom P450 ter ostale oksido-reduktaze.

Vodikov peroksid je dokaj stabilen in lahko prečka celične membrane. Nastaja iz $O_2^{\cdot-}$ s pomočjo superoksid-dismutaze.

V prisotnosti železa lahko $O_2^{\cdot-}$ in H_2O_2 reagirata v Haber-Weissovi reakciji, katere drugi korak je Fentonova reakcija, in tvori OH^{\cdot} (slika 1). Hidroksilni radikal je zelo reaktiven, ima kratko razpolovno dobo in reagira blizu mesta nastanka. Je glavni krivec za oksidativne poškodbe bioloških molekul (2).



Slika 1: Haber-Weissova reakcija. 2. korak – Fentonova reakcija.

Figure 1: Haber-Weiss reaction. 2. step – Fenton reaction

2.1 Fiziološka vloga reaktivnih kisikovih spojin v organizmu

Reaktivne kisikove spojine se v organizmu tvorijo neprenehoma. V nadzorovanih, homeostaznih koncentracijah imajo fiziološko vlogo pri regulaciji delovanja nekaterih encimov, v signalnih poteh pri celičnem razvoju, diferenciaciji in programirani celični smrti ter pri genski ekspresiji občutljivi na redoks potencial (5).

2.2 Vloga reaktivnih kisikovih spojin v nosečnosti

Sodelujejo v signalnih poteh ženskega reproduktivnega cikla. Pomembne so v procesu folikulogeneze, zorenju oocita, pri delovanju rumenega telesca ter miometrija, v procesu embriogeneze, implantacije zarodka in tudi pri fetoplacentnem razvoju. Nosečnost je že sama po sebi stanje povišanega oksidativnega stresa, zaradi velike metabolične aktivnosti v mitohondrijih posteljice (6, 7). Posteljica je pomemben vmesnik med materinim in fetalnim krvnim obtokom, saj prenaša kisik in številne metabolične substrate. Do sedaj zbrani dokazi nakazujejo na to, da ima ključno vlogo pri tvorbi oksidativnega stresa med nosečnostjo in direktno uravnava intrauterino oksidativno ravnotežje (8). V zgodnji nosečnosti, po implantaciji zarodka, sta posteljica in zarodek v pretežno hipoksičnem okolju (4, 8). To zgodnje obdobje predstavlja začetek organogeneze in takrat je zarodek posebno občutljiv na oksidativni stres (3, 9). Že v prvem trimesečju nosečnosti, okrog 10. tedna, se pojavi fiziološki porast ROS, ki je posledica vzpostavitve pretoka krvi v medresnični prostor. Do zvišanja parcialnega tlaka kisika med resicami pride predvsem ob invaziji trofoblastov v maternično sluznico, kar vodi v povečan pretok v uterinih spiralnih arterijah (3, 4). Pri tem je posteljica izpostavljena hipoksiji in reoksidaciji, kar povzroči porast ROS in oksidativno poškodbo tkiva. To ima za posledico tudi kompenzatorno, večje izražanje antioksidantnih encimov v posteljici (3, 8). Obseg oksidativnega stresa posteljice je torej odvisen od velikosti oksidativne poškodbe ter učinkovitosti antioksidantnega sistema posteljice. Nanju pa vplivajo različni faktorji, vključno s prehranjevalnimi navadami matere, aktivnostjo ter drugimi dejavniki pogojenimi z življenjskim slogom ter genski dejavniki in dejavniki okolja (10). Za zagotavljanje homeostaze mora biti stalno vzpostavljeno natančno ravnotežje med funkcijo ROS in antioksidanti. Motnje omenjenega oksidativnega ravnotežja lahko vodijo do motenj, ki vplivajo na razvoj zarodnih celic, zarodka in pozneje ploda, in imajo lahko dolgoročne posledice za kasnejše življenje, odvisno od tega v katerem obdobju znotrajmaterničnega razvoja se pojavijo (9).

2.3 Patofiziološka vloga - tarče reaktivnih kisikovih spojin v celici

Oksidativne poškodbe celičnih makromolekul vodijo do porušitve ravnotežja v celici in povzročijo poškodbe vseh glavnih bioloških molekul: nukleinskih kislin, lipidov in proteinov. Te poškodbe so lahko reverzibilne in odvisne od antioksidantnega sistema in stresnih proteinov. Če pa so poškodbe ireverzibilne vodijo celico v celično smrt (2).

2.3.1 Oksidacija proteinov

Oksidacija proteinov lahko povzroči spremembe strukture in izgube katalitične funkcije. Poveča se tudi občutljivost takih proteinov na proteolizo in denaturacijo (1).

Kljub nizki reaktivnosti lahko superoksidni radikal povzroči inhibicijo nekaterih antioksidantnih encimov (glutation-peroksidaza, katalaza, mitohondrijska ATP-aza). Vodikov peroksid inaktivira encime z oksidacijo pomembnih tiolnih skupin metioninskih in cisteinskih ostankov. Tvorba disulfidov v proteinih ali med njimi pa je reverzibilna poškodba, saj se lahko ostanki regenerirajo z redukcijo z glutationom ali tioredoksinom. Hidroksilni radikal povzroča hude poškodbe in nastanek karbonilov. Nastanek karbonilov je ireverzibilna okvara proteinov in vodi v njihovo razgradnjo ali združevanje v skupke, kar je tudi vzrok za nekatera obolenja (1, 11).

2.3.2 Oksidacija lipidov

Pri oksidaciji lipidov so tarča ROS najpogosteje polinenasičene maščobne kisline fosfolipidov v membranah celice ali lipoproteini. Proces vodi do nastanka hidroperoksidov, epoksidov, aldehydov in alkanov. Nekateri nastali produkti so zelo reaktivni in še dodatno sodelujejo pri nastajanju radikalov in poškodb makromolekul. Posledici peroksidacije lipidov sta slabša integriteta membrane in povečanje membranske fluidnosti (12).

2.3.3 Oksidacija DNK

Oksidacija DNK povzroči lom DNK verige, spremembe purinov, pirimidinov ali sladkornega dela, izgubo baz ter njihove navzkrižne povezave. Take poškodbe lahko vodijo do spremembe transkripcije, spremembe signalnih poti, kar je tudi vzrok za nastanek rakavih obolenj, različnih degenerativnih bolezni in staranja. Na oksidacijo je še bolj kot jedrna DNK občutljiva mitohondrijska DNK, ki ne vsebuje histonov in popravljalnih mehanizmov (1).

3 Antioksidantni sistem

Aerobni organizmi so neprenehoma izpostavljeni reaktivnim kisikovim zvrstem, ki nastajajo med normalnim celičnim metabolizmom. V organizmu je homeostazna, neškodljiva koncentracija ROS uravnavana s sistemom encimskih in neencimskih antioksidantov. Ko nastanek ROS preseže antioksidantno kapaciteto, govorimo o oksidativnem stresu.

3.1 Encimski antioksidantni sistem

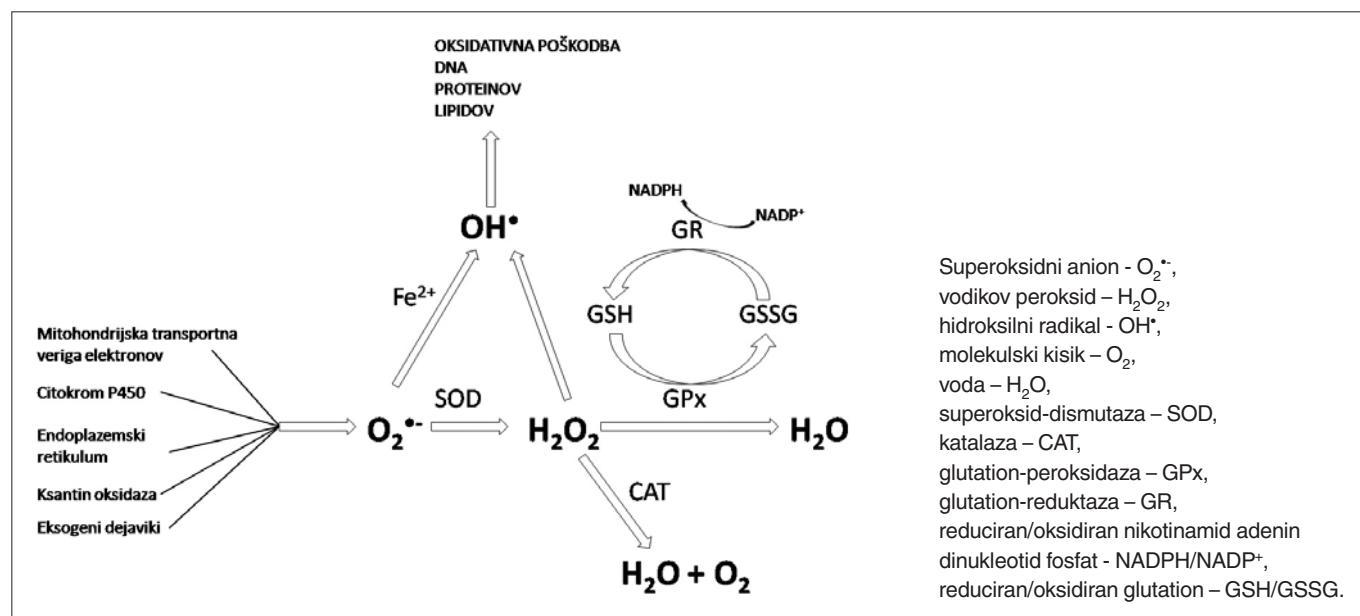
Encimski sistem antioksidantov sodeluje pri razgradnji in odstranjevanju omenjenih reaktivnih zvrsti in vključuje superoksid-dismutazo (SOD), katalazo (CAT), glutationski in tioredoksinški encimski sistem (glutation-peroksidaza - GPx, glutation-reduktaza - GR, tioredoksin-peroksidaza - TrxP, tioredoksin-reduktaza - TrxR) (13).

Preglednica 1: Pregled nekaterih raziskav, ki so preučevale encimske antioksidantne sisteme v zdravi nosečnosti in v nosečnosti z različnimi zapleti.

Table 1: Summary of some studies of enzymatic antioxidant systems in healthy and high-risk pregnancy.

ENCIM	KJE, KDAJ	REFERENCA	POPULACIJA, VELIKOST VZORCA	REZULTATI
SOD	eritrociti, 6.-8. teden, 15.-20. teden, 26.-30. teden, 6 tednov po porodu	14	105 zdravih nosečnic, 40 zdravih žensk v rodni dobi	aktivnost SOD ↑ v 3. trimesečju pri nosečnicah glede na nenoseče ženske
SOD	eritrociti, 1., 2., 3. trimester nosečnosti	16	30 nosečnic z DM1, 30 zdravih nosečnic, 30 zdravih nenosečih žensk v rodni dobi	značilno ↑ aktivnost SOD pri zdravih nosečnicah v primerjavi z nenosečimi ženskami; aktivnost SOD ↑ s tedni gestacije
SOD	eritrociti	17	39 žensk z normalno nosečnostjo, nenoseče ženske v rodni dobi	značilno ↑ aktivnost SOD v nosečnosti v primerjavi s skupino nenosečih žensk
SOD	popkovna kri-eritrociti, ob porodu	23	20 zdravih novorojenčkov majhnih za njihovo gestacijsko starost (38-40 tednov), rojenih podhranjenim materam (teža matere po nosečnosti <50kg) ter 20 zdravih novorojenčkov primerne velikosti za gestacijsko starost (38-40 tednov), rojenih zdravim materam	nivo SOD značilno ↓ pri novorojenčkih, ki so bili majhni za gestacijsko starost in rojeni podhranjenim materam
CAT	eritrociti	17	39 žensk z normalno nosečnostjo, nenoseče ženske v rodni dobi	značilno ↑ aktivnost CAT pri nosečnicah
GPx	eritrociti, 6.-8. teden, 15.-20. teden, 26.-30. teden, 6 tednov po porodu	14	105 zdravih nosečnic, 40 zdravih žensk v reproduktivni dobi	aktivnost GPx ↑ v 3. trimesečju pri nosečnicah glede na nenoseče ženske
GPx	eritrociti, 1., 2., 3. trimester nosečnosti	16	30 nosečnic z DM, 30 zdravih nosečnic, 30 zdravih nenosečih žensk v rodni dobi	aktivnost GPx ↑ z gestacijo; najvišje vrednosti doseže v 3. trimesečju.
GPx	eritrociti, 1., 2., 3. trimester nosečnosti	19	10 nosečnic z DM1, 10 zdravih nosečnic, 10 nenosečih žensk	aktivnost GPx tekom nosečnosti ni značilno odstopala od vrednosti pri nenosečih ženskah
GPx	polna kri, plazma	20	49 zdravih nosečnic, 45 zdravih nenosečih žensk ustrezne starosti	po 20. tednu nosečnosti začne aktivnost GPx značilno ↓ glede na aktivnost GPx pri nenosečih ženskah
GPx	posteljica, ob porodu	39	12 preiskovank s spontanim prezgodnjim porodom (28-36 teden nosečnosti), 16 preiskovank s porodom po 37. tednu nosečnosti	aktivnost GPx značilno ↑ v skupini preiskovank s spontanim prezgodnjim porodom
GR	posteljica, ob porodu	39	12 preiskovank s spontanim prezgodnjim porodom (28-36 teden nosečnosti), 16 preiskovank s porodom po 37. tednu nosečnosti	aktivnost GR značilno ↑ v skupini preiskovank s spontanim prezgodnjim porodom
TAC	plazma, 6.-8. teden, 15.-20. teden, 26.-30. teden, 6 tednov po porodu	14	105 zdravih nosečnic, 40 zdravih žensk v reproduktivni dobi	pred 30. tednom TAC značilno ↓ pri nosečnicah
TAC	serum, 3. trimester nosečnosti	41	14 nosečnic z zastojem rasti ploda, 18 zdravih nosečnic	TAC značilno ↓ v skupini preiskovank z zastojem rasti ploda

↑ - povišan, ↓ - znižan, SOD – superoksid-dismutaza, GPx – glutation-peroksidaza, GR – glutation-reduktaza, CAT – katalaza, GSH – glutation, TAC – celokupni antioksidantni status, DM – diabetes mellitus



Superoksidni anion - $O_2^{\bullet -}$,
 vodikov peroksid - H_2O_2 ,
 hidroksilni radikal - OH^{\bullet} ,
 molekularni kisik - O_2 ,
 voda - H_2O ,
 superoksid-dismutaza - SOD,
 katalaza - CAT,
 glutation-peroksidaza - GPx,
 glutation-reduktaza - GR,
 reduciran/oksidiran nikotinamid adenin
 dinukleotid fosfat - NADPH/NADP⁺,
 reduciran/oksidiran glutation - GSH/GSSG.

Slika 2: Shematski prikaz izvora ROS in glavnih celičnih antioksidantnih poti.

Figure 2: Schematic presentation of sources of ROS and main cellular antioxidant pathways.

Superoksid-dismutaza katalizira dismutacijo $O_2^{\bullet -}$ v H_2O_2 ter O_2 . Baker (Cu) in cink (Zn) vsebujoča superoksid-dismutaza (Cu,Zn-SOD, SOD1) je dimerni protein, ki se nahaja v citoplazmi, medtem ko je mangan vsebujoča superoksid-dismutaza (Mn-SOD, SOD2) homotetramerni protein, ki je prisoten predvsem v mitohondrijih (slika 2). Zunajcelično pa najdemo SOD3, ki vsebuje Cu in Zn. Med normalno nosečnostjo je aktivnost SOD v plazmi in eritrocitih višja kot pri nenosečih ženskah ter narašča s tedni nosečnosti (preglednica 1) (13-17). Vse tri oblike encima se izražajo v tkivu posteljice, tako da je narasla aktivnost v materinem krvnem obtoku lahko posledica tega povečanega nastajanja SOD (13).

Glutation peroksidaza in katalaza uravnava nastali H_2O_2 . Katalaza je prisotna predvsem v peroksisomih. Encimsko molekulo sestavljajo večinoma štiri podenote, od katerih vsaka vsebuje hemsko skupino, vezano na aktivno mesto. Katalaza odstranjuje H_2O_2 s pretvorbo v vodo in kisik. (15). Raziskava pri nosečnicah brez zapletov v primerjavi z zdravimi nenosečimi preiskovankami je pokazala porast aktivnosti CAT v polni krvi med nosečnostjo (preglednica 1) (17).

Glutation-peroksidaza je tetramerni protein, ki za svoje delovanje potrebuje kovinski ion selena (Se). Aktivnost GPx je odvisna od prisotnosti reduciranega glutationa (GSH), ki je donor vodika. Glutation-peroksidaza katalizira reakcijo med reduciranim glutationom in vodikovim peroksidom. Pri tem nastajata voda in glutation disulfid (GSSG) (18).

Rezultati raziskav ekspresije in aktivnosti GPx v nosečnosti so si nasprotujoči. Nekatere študije so pokazale visoko raven GPx v posteljici in porast GPx v plazmi zdravih nosečnic v primerjavi z nenosečimi ženskami (13). Pri nosečnicah z normalnim potekom nosečnosti so ugotovili večjo aktivnost GPx v eritrocitih le v tretjem trimesečju v primerjavi s kontrolnimi nenosečimi ženskami v rodni dobi (preglednica 1) (14, 16). Starejši raziskavi pri nosečnicah brez zapletov v nosečnosti v primerjavi z nenosečimi preiskovankami pa sta pokazali

nespremenjeno aktivnost v plazmi ali celo znižano aktivnost v plazmi in eritrocitih proti koncu nosečnosti (preglednica 1) (19, 20).

3.2 Neencimski antioksidanti

Neencimske antioksidante vnašamo v telo kot vitamine s prehrano in s prehranskimi dopolnili. Kot esencialne snovi so pomembni tudi nekateri elementi v sledovih, ki sodelujejo pri tvorbi aktivnega mesta ali so sodejavniki opisanih antioksidantnih encimov.

Glutation je tiolni tripeptid in je glavni celični neencimski antioksidant. Sintetizira se v citosolu iz L-glutamata, L-cisteina ter glicina. Sodeluje pri detoksifikaciji številnih snovi in se s pomočjo GR in v prisotnosti nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) regenerira nazaj do reducirane oblike (18). Meritve GSH v nosečnosti so pokazale znižano koncentracijo v plazmi ter povišano koncentracijo v eritrocitih (13).

Vitamin E je maščobotopen antioksidant iz družine tokoferolov. Najbolj aktivna oblika vitamina E je α -tokoferol, ki zagotavlja predvsem zaščito celičnih membran pred oksidacijo z ROS in lipidnimi radikali (1).

Vitamin C je vodotopen antioksidant, znan kot askorbinska kislina. Poleg neposrednega preprečevanja razširitve verižne reakcije v oksidativnih procesih, sodeluje tudi pri regeneraciji oksidirane vitamina E in GSH, zato ima z omenjenima antioksidantoma sinergistično delovanje (7).

4 Zapleti v nosečnosti in oksidativni stres

Za razvoj ploda je pomembno materino biokemično okolje (4). Mnoge raziskave so potrdile domnevo, da oksidativni stres matere med nosečnostjo vpliva na razvoj ploda in je vpleten v patološke izide nosečnosti (9). Asociacijo so pokazali predvsem med povečanim

oksidativnim stresom v uteroplacentnem okolju in motnjami placentacije. Povečane oksidativne poškodbe so prisotne pri pojavu preeklampsije

4.1 Preeklampsija

Preeklampsija je za nosečnost značilna bolezen, ki se kaže s hipertenzijo, edemi in proteinurijo matere. Izbruh bolezni povzroči okvara endotelija žil. Vzrok za nastanek je nenormalna placentacija oz. napačen materin odziv na nosečnost, čeprav etiologija preeklampsije ni dokončno pojasnjena. Motena je invazivnost trofoblastov, kar povzroči zmanjšanje uteroplacentne perfuzije, ishemijo in hipoksijo posteljice. Posledica teh stanj pa je tudi povečana tvorba ROS, ki še dodatno lahko vodijo do endotelne in vaskularne oksidativne poškodbe (4).

4.2 Zastoj v rasti ploda

Rezultati raziskav nakazujejo, da je oksidativni stres matere med nosečnostjo dejavnik tveganja za zastoj rasti ploda (ang. fetal growth restriction (FGR)) in nizko porodno težo (10, 21). O zastoju plodove rasti govorimo, če plod ne doseže svojega genetsko določenega ravnega potenciala in je njegova ocenjena teža pod 10. percentilo razporeditve porodnih tež za določeno gestacijsko starost. Ugotavljamo ga glede na krivulje rasti ploda za individualno populacijo (22). Zastoj rasti je lahko posledica materine bolezni (hipertenzija, kronična ledvična bolezen, prirojene srčne napake, anemija), neugodnih vplivov na intrauterino okolje (kajenje, alkohol) ali so vzroki plodovi (prirojene razvojne nepravilnosti, kromosomopatije, večplodna nosečnost). V 50% primerov ostaja etiologija neznana (23).

4.3 Ostali zapleti v nosečnosti

Oksidativni stres matere med nosečnostjo naj bi povečal tudi tveganje za prezgodnji porod, spontani splav, hipertenzijo in inzulinsko resistenco pri potomcu (9, 21, 24).

Natančna osnova patološkega oksidativnega stresa v nosečnostih z omenjenimi zapleti za zdaj še ni znana. Pri nagnjenosti k oksidativnemu stresu in zapletom v nosečnosti igrajo pomembno vlogo polimorfizmi v antioksidantnih encimih in nezadostni vnos mikronutrientov, predvsem Se (1). Vpliv na večjo tvorbo ROS ima tudi prisotnost metaboličnih nepravilnosti pri materi, kot na primer diabetes (4, 16).

5 Ocena oksidativnega stresa

Neposredno merjenje oksidativnega stresa pri človeku je zelo težavno, saj so kisikove zvrsti in radikali dokaj kratkoživi. Zato se uporablja predvsem merjenje produktov interakcij ROS z biološkimi makromolekulami. Za določevanje oksidativnega stresa ne zadostuje meritev samo enega biološkega označevalca, saj pri oksidativni poškodbi različnih organov oziroma pri različnih boleznih nastaja različno razmerje oksidativnih produktov (25).

5.1 Določanje poškodovanih proteinov

Ločimo dva načina določanja poškodovanih proteinov. Prvi način zajema meritev karbonilnih produktov, ki pa ne omogoča določitve, kateri aminokislinski ostanek se je oksidiral in kateri protein je bil modificiran. Z neposredno oksidacijo aminokislinskih ostankov, predvsem lizina, arginina, histidina in prolina, nastanejo proteini s karbonilnimi skupinami. Proteini s karbonilno skupino so kemično stabilni označevalci

oksidativnega stresa. V krvi so prisotni dalj časa kot drugi oksidirani produkti. Za določanje proteinov s karbonilnimi skupinami največkrat uporabljamo spektrofotometrično analizo metodo z 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNFH). Pri tej metodi z derivatizacijo karbonilne skupine z DNFH tvorimo stabilni 2,4-dinitrofenilhidrazon, ki ga lahko zaznamo na različne načine. Sam dinitrofenilhidrazon absorbira ultravijolično svetlobo in ga lahko določimo spektrofotometrično pri 370 nm. Spektrofotometrično DNFH metodo pa lahko združimo s proteinsko frakcionacijo z visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC), eno- ali dvo-dimenzionalno elektroforezo ter prenosom Western, kar poveča občutljivost in specifičnost metode (11).

Drugi način meritev pa zajema metode, ki zaznavajo specifične spremembe posameznih aminokislin. Ena glavnih tarč oksidacije proteinov je aminokislina tirozin. Določamo lahko njene različne derivate, ki nastajajo odvisno od tipa radikala: nitrotirozin, ditirozin (11). Največkrat uporabljana metoda za analizo slednjih označevalcev oksidativnega stresa v bioloških tekočinah in tkivih je encimsko imunski test (ELISA). Nitrotirozin v biološkem materialu in humani plazmi lahko uspešno določamo tudi s sklopitvijo tekočinske kromatografije s tandemsko masno spektroskopijo (LC-MS/MS) ali plinske kromatografije s tandemsko masno spektroskopijo (GC-MS/MS). Bazalne vrednosti dobljene s to metodo služijo kot referenčne vrednosti za nitrotirozin. Ker pa se izmerjene vrednosti nitrotirozina med posameznimi študijami zelo razlikujejo, predvidevajo, da nitrotirozin nastaja tudi *ex-vivo* med pripravo vzorca in njegovo analizo. Ditirozin ima ugodno lastnost, da se nemetaboliziran izloča v urin, kjer ga lahko določamo kot neinvazivni marker proteinske oksidacije z LC-MS/MS (26).

5.2 Določanje lipidne peroksidacije

Prisotnost lipidne peroksidacije lahko ocenimo z določanjem konjugiranih dienov, produktov preureditve kemijskih vezi po interakciji nenasičenih maščobnih kislin z radikali, z določanjem primarnih produktov peroksidacije (lipidnih hidroperoksidov) ali z določanjem različnih sekundarnih produktov (malondialdehid, 4-hidroksinonenal, heksanoil lizin) (12). Malondialdehid (MDA) je dokazano mutagen in z bazami nukleinskih kislin tvori komplekse (5). Njegovo določanje temelji na nastanku obarvanega kompleksa MDA-tiobarbiturna kislina (TBA). Nastanek kompleksa poteka pri povišani temperaturi v kislem mediju. Količino obarvanega produkta določimo spektrofotometrično pri valovni dolžini 532 nm. Problem je nespecifičnost metode, saj se pri lipidni peroksidaciji tvorijo tudi drugi aldehidi, ki reagirajo s TBA in imajo podobno območje absorbance. Pri interpretaciji rezultatov se zato uporablja izraz »s TBA reagirajoče snovi« (TBARS) (12, 27). Specifičnost določitve MDA se lahko poveča z uporabo različnih separacijskih tehnik, npr. HPLC (28).

Pri določanju produktov lipidne peroksidacije v nosečnosti je večina raziskav pokazala, da je njihova raven v polni krvi in plazmi povečana (preglednica 2) (14, 16). Lipidna peroksidacija poteka predvsem v posteljici. Oksidativni produkti se nato iz posteljice prenesejo v materine placentne vene, kar povečuje koncentracijo teh produktov v materinem krvnem obtoku. Do drugega trimesečja je koncentracija produktov lipidne peroksidacije v krvi matere narasla za 10 do 50% (12). Novejša raziskava, v katero je bilo vključenih 31 zdravih nosečnic v prvem trimesečju in 29 nenosečih zdravih ženskah je pokazala prisotnost MDA in TBARS v obeh skupinah. Raven MDA je bila povišana pri nosečnicah,

TBARS pa v skupini nenosečih žensk, kar ni v skladu s predhodnimi raziskavami (preglednica 2) (29). K povečanju nastanka TBARS v polni krvi prispeva prisotnost diabetesa matere (preglednica 2) (16). Serumske in urinske koncentracije MDA so bile povišane pri nosečnicah z zastojem rasti ploda glede na kontrolno skupino zdravih nosečnic (preglednica 2) (10, 30). Povečano lipidno peroksidacijo v posteljici pa so opazili pri nosečnicah s preeklampsijo (8).

Statusa lipidne peroksidacije ne bi smeli vrednotiti samo na podlagi zgoraj omenjenih označevalcev, saj se lipidni hidroperoksidi in aldehidi lahko absorbirajo v telo tudi iz prehrane, zato bi bilo smiselno, da bi se prehrano ob določanju teh snovi nadzorovalo (25). Boljši označevalci lipidne peroksidacije v organizmu so izoprostani.

Izoprostani nastajajo z neencimsko, z radikali katalizirano peroksidacijo fosfolipidov oziroma arahidonske kisline. Nastane serija izomerov, ki

vsebujejo prostanski obroč. Intermediat pri nastanku so prostaglandinu- H_2 podobne spojine, ki se reducirajo do F_2 -izoprostanov. V organizmu pa prihaja tudi do preureditve in tvorbe E_2 , D_2 , A_2 in J_2 -izoprostanov, izotromboksanov in izoketalov. Na začetku so izoprostani esterificirani na fosfolipidih in se kasneje po delovanju fosfolipaz sprostijo kot prosta oblika. Najpogosteje določamo 8-izoPGF_{2α} izomero izoprostanov, ki ima mnogo prednosti pred ostalimi produkti lipidne peroksidacije, saj je kemično zelo stabilna in je v zaznavnih količinah prisotna v vseh tkivih in bioloških tekočinah. 8-izoPGF_{2α} ima tudi biološko aktivnost, saj deluje kot renalni in pulmonalni vazokonstriktor (31). Referenčna analitična metoda za merjenje izoprostanov je plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS), čeprav je dokaj draga in zamudna (8, 30). Večkrat se kot metoda za kvantifikacijo uporabi kvantitativna metoda ELISA (14, 32). V nosečnosti se koncentracija F_2 -izoprostanov v urinu značilno poviša v primerjavi z nenosečimi ženskami predvsem v zadnjem

Preglednica 2: Pregled nekaterih raziskav, ki so preučevale označevalce oksidativne poškodbe lipidov v zdravi nosečnosti in v nosečnosti z različnimi zapleti.

Table 2: Summary of some studies of markers of lipide damage in healthy and high-risk pregnancy.

OZNAČEVALEC	KJE, KDAJ	REFERENCA	POPULACIJA, VELIKOST VZORCA	REZULTATI
TBARS	eritrociti, 1., 2., 3. trimester	16	30 nosečnic z DM, 30 zdravih nosečnic, 30 zdravih nenosečih žensk v rodni dobi	nivo TBARS značilno ↑ pri nosečnicah v 3. trimesečju glede na nenoseče preiskovanke; v skupini nosečnic z DM nivo TBARS celotno nosečnost značilno ↑ glede na normalno nosečnost
MDA, TBARS	urin, 1. trimester	29	31 zdravih nosečnic (18-45 let), zdrave nenoseče ženske (18-45 let)	MDA značilno ↑ v skupini nosečnic, TBARS ↑ v skupini nenosečih preiskovank
MDA	urin, 24.-28. teden nosečnosti	10	prospektivna študija 272 nosečnic, starih 24-28 let	velikost novorojenčka se ni značilno razlikovala med nizkim in visokim MDA nivojem (presečna vrednost nivojev je 75. percentil)
MDA	urin, ob koncu prve faze poroda	30	261 nosečnic, razdeljenih v skupine glede na porodno težo otroka, prezgodnji porod	MDA ↑ v urinu nosečnic s prezgodnjim porodom ter z nizko porodno težo otroka
izoprostani	plazma, 6.-8. teden, 15.-20. teden, 26.-30. teden, 6 tednov po porodu	14	105 zdravih nosečnic, 40 zdravih žensk v reproduktivni dobi	značilno ↑ pri nosečnicah, glede na nenoseče ženske v 37-41. tednu nosečnosti
izoprostani	urin, 12.-16. teden nosečnosti	21	prospektivna študija pri 508 nosečnicah; razdeljene so bile v skupine glede koncentracijo označevalca ter izid oz. potek nosečnosti: preeklampsija, nizka porodna teža, prezgodnji porod	izoprostani v urinu povezani z večjim tveganjem za nastanek preeklampsije
izoprostani	amnijska tekočina, 15.-18. teden nosečnosti	32	122 nosečnic, ki so prišle na amniocentezo v 15.-18. tednu nosečnosti (18-40 let), razdeljene v skupine glede na porodno težo otroka	↑ koncentracija izoprostanov v amnijski tekočini pri nosečnostih z zastojem rasti ploda

↑ - povišan, ↓ - znižan, MDA – malondialdehid, TBARS – s tiobarbiturno kislino reagirajoče snovi, DM – diabetes mellitus

trimesečju nosečnosti (preglednica 2) (14). Koncentracija je sorazmerna s količino adipoznega tkiva matere (32). Prospektivna raziskava s 508 vključenimi nosečnicami je pokazala, da se koncentracija F_2 -izoprostanov v urinu dodatno poveča v primeru pojava preeklampsije (preglednica 2) (21). Domnevo, da se povišan oksidativni stres v povezavi z zastojem rasti ploda pojavi že v zgodnji nosečnosti, so potrdile povišane koncentracije F_2 -izoprostanov v amnijski tekočini v začetku 2. trimesečja pri 37 nosečnicah z IUGR (preglednica 2) (32).

5.3 Določanje oksidacije DNK

Med purinskimi in pirimidinskimi bazami je gvanin najbolj dovzeten za oksidacijo. Pri oksidativnem napadu OH^* se največkrat na 8. mesto gvaninske molekule doda hidroksilna skupina, ki povzroči nastanek produkta 8-hidroksidegvanozina (8-OHdG), ki omogoča ovrednotenje oksidativne okvare DNK. Oksidirane nukleinske baze so dokaj topne v vodi in se brez predhodnega metabolizma izločijo v urin (33). 8-OHdG pa lahko določamo tudi v serumu in tkivu. Za kvantitativno določitev se največkrat uporablja kompetitivna metoda ELISA ali kombinacija kromatografske tehnike z masno spektrometrijo (6, 8, 10, 28).

Koncentracija 8-OHdG v urinu je značilno povišana pri kadilcih (6). V normalni nosečnosti brez zapletov je količina 8-OHdG v urinu značilno povišana predvsem v 3. trimesečju in v zgodnji fazi poroda (preglednica 3) (14). Povišano koncentracijo v primerjavi z nosečnicami brez zapletov pa so opazili tudi v urinu nosečnic, ki so kasneje imele prezgodnji porod ali so rodile otroka z nizko porodno težo (preglednica 3) (6, 10, 21, 30). V tkivu posteljice so ugotovili povišano raven 8-OHdG, kadar se je preeklampsiji pridružil še intrauterini zastoj plodove rasti (preglednica 3) (34).

5.4 Določanje statusa antioksidantov

Sposobnost obrambe telesa pred ROS lahko merimo z statusom posameznih antioksidantov ali kot celokupno vsoto vseh antioksidantnih snovi.

Izražanje encimov v določenem tkivu (npr. posteljici) lahko spremljamo z analizo ekspresije genov, ki kodirajo za izbrani encim, a največkrat pa določamo aktivnost encima. Aktivnost SOD merimo na podlagi merjenja inhibicije reakcije med 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazol kloridom in superoksidnim radikalom, ki nadzorovano nastaja iz ksantina

Preglednica 3: Pregled nekaterih raziskav, ki so preučevale označevalce poškodbe DNK v zdravi nosečnosti in v nosečnosti z različnimi zapleti.

Table 3: Summary of some studies of markers of DNA damage in healthy and high-risk pregnancy.

OZNAČEVALEC	KJE, KDAJ	REFERENCA	POPULACIJA, VELIKOST VZORCA	REZULTATI
8-OHdG	urin, 6.-8. teden, 15.-20. teden, 26.-30. teden, 6 tednov po porodu	14	105 zdravih nosečnic, 40 zdravih žensk v reproduktivni dobi	značilno ↑ pri nosečnicah, glede na nenoseče ženske v 26-30. tednu nosečnosti
8-OHdG	urin, 12. ter 28. teden nosečnosti	6	55 nosečnic (18-40 let) z otroki z nizko porodno težo, 55 nosečnic (18-40 let) z otroki s primerno porodno težo	8-OHdG v 12. in 28. tednu nosečnosti značilno ↑ v skupini nosečnic z otroki z nizko porodno težo
8-OHdG	urin - 24-28. tednov nosečnosti, posteljica - ob porodu	10	prospektivna študija 272 nosečnic, starih 24-28 let, analiza placente pri 59 nosečnicah	8-OHdG v urinu ter posteljici značilno povezan z velikostjo otroka ob porodu
8-OHdG	urin, 12.-16. teden nosečnosti	21	prospektivna študija pri 508 nosečnicah, razdeljene so bile v skupine glede koncentracijo označevalca ter izid oz. potek nosečnosti: preeklampsija, nizka porodna teža, prezgodnji porod	8-OHdG v urinu povezan z nižjo porodno težo in nižjo gestacijsko starostjo ob porodu; s preeklampsijo niso našli značilne povezave
8-OHdG	urin, ob koncu prve faze poroda	30	261 nosečnic, razdeljenih v skupine glede na porodno težo otroka, prezgodnji porod	8-OHdG je bil ↑ v urinu nosečnic s prezgodnjim porodom ter z nizko porodno težo
8-OHdG	posteljica, ob porodu	34	18 nosečnic z zdravo nosečnostjo, 17 nosečnic s preeklampsijo brez IUGR, 18 nosečnic s preeklampsijo z IUGR	Značilno ↑ nivo 8-OHdG v posteljici nosečnic z preeklampsijo z IUGR

↑ - povišan, ↓ - znižan, 8-OHdG – 8-hidroksidegvanozin, SOD – superoksid-dismutaza, GPx – glutation-peroksidaza, GR – glutation reduktaza, CAT – katalaza, GSH – glutation, TAC – celokupni antioksidantni status, DM – diabetes mellitus

s ksantin-oksidazno katalizo. Superoksid-dismutaza inhibira nastanek formazanskega barvila, kateremu merimo absorbanco pri 505 nm (35).

Metoda za merjenje GPx temelji na katalizi oksidacije glutationa s kumen peroksidom. V prisotnosti GR in NADPH se oksidirani glutation takoj pretvori v reducirano obliko s sočasno oksidacijo NADPH v NADP⁺, ki povzroči padec absorbance pri 340 nm (36).

Zadnji del postopka služi tudi kot metoda za merjenje aktivnosti glutation-reduktaze (37).

Za merjenje aktivnosti katalaze se uporablja preprosta spektrofotometrična metoda, ki meri padec absorbance, oziroma koncentracije vodikovega peroksida ob prisotnosti katalaze pri 240 nm (38).

Znižanje izražanja SOD mRNA v posteljici ter nižjo aktivnost encima v eritrocitih in posteljici so opazili pri preeklampsiji (8, 13), diabetesu (16) ter spontanih splavih (15). Pri zastoju plodove rasti pa je bila aktivnost encima nižja v eritrocitih popkovne krvi novorojenčkov, ki so bili premajni za gestacijsko starost in rojeni podhranjenim materam (preglednica 1) (23). V posteljici prezgodaj rojenih otrok so ugotovili povišano raven GPx in GR (preglednica 1) (39), pri preeklampsiji pa je bila povišano raven GPx, GSH in CAT (8). V raziskavi oksidativnega stresa v nosečnosti je skupina 30 nosečnic z diabetesom imela značilno povišano aktivnost CAT v eritrocitih v zadnjem trimesečju nosečnosti v primerjavi s skupino 30 zdravih nosečnic. V isti skupini nosečnic z diabetesom pa se je aktivnost GPx v eritrocitih v zadnjem trimesečju zmanjšala v primerjavi z 2. trimesečjem, kar bi bilo lahko povezano s komplementarnim povečanjem aktivnosti CAT (preglednica 1) (16).

Poleg posameznih antioksidantov lahko merimo tudi celokupni antioksidantni status (ang. total antioxidant capacity, TAC). Prednost tega pristopa je, da izmerimo aktivnost vseh prisotnih antioksidantov v biološkem vzorcu. Za določanje TAC je najpogosteje uporabljena metoda FRAP (ang. ferric reducing ability of plasma), ki temelji na merjenju redukcije železa ob prisotnosti antioksidantov. Reducirani ioni železa (Fe²⁺) reagirajo z 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazin (TPTZ). Nastane modro obarvan kompleks z absorbanco pri 593 nm (14, 40). Pri nosečnosti brez zapletov je bil TAC v plazmi do 30. tedna nosečnosti nižji kot pri nenosečih ženskah, po 30. tednu značilno povišan (14), v serumu nosečnic z IUGR pa značilno znižan (preglednica 1) (41).

6 Sklep

Pogosti zapleti v nosečnosti nas spodbujajo k iskanju vzrokov in označevalcev za napovedovanje tveganja in lažje prepoznavanje teh zapletov. Meritve posameznih označevalcev so pokazale, da ima oksidativni stres v nosečnosti in pri nekaterih njenih zapletih pomembno vlogo. Novi raziskovalni izzivi temeljijo na iskanju novih informacij v zvezi s fiziološkimi stanjem oksidativnega stresa v nosečnosti, sodelovanjem oksidativnega stresa v patofizioloških procesih različnih zapletov v nosečnosti, preprečevanjem teh z različnimi antioksidanti ter z razvojem novih diagnostičnih metod za čim boljšo oceno oksidativne okvare. Z raziskavami bi bilo smiselno ovrednotiti tudi oksidativni stres v neposrednem plodovem okolju (amnijska tekočina) in ga primerjati s spremembami v krvi in urinu matere. V primeru dobre korelacije označevalcev med materinim in plodovim okoljem, bi ti izsledki lahko pripomogli k razvoju novih neinvazivnih metod na področju spremljanja oksidativnega statusa ploda in njegovega razvoja med nosečnostjo.

7 Literatura

1. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011; 25: 287-299.
2. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010; 15: 186-190.
3. Burton GJ. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. *J Anat* 2009, 215: 27-35.
4. Jauniaux E, Poston L, Burton GJ. Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update* 2006; 12: 747-155.
5. Valo M, Leibfritz D, Moncol J et al. Free radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
6. Potdar N, Singh R, Mistry V et al. First-trimester increase in oxidative stress and risk of small-for gestational-age fetus. *BJOG* 2009; 116: 637-642.
7. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biol Endocrinol* 2005, 3: 28.
8. Myatt L, Cui X. Oxidative stress in placenta. *Histochem Cell Biol* 2004, 122: 369-382.
9. Denery PA. Oxidative stress in development: Nature or nurture? *Free Radic Biol Med* 2010; 49: 1147-1151.
10. Min J, Park B, Kim YJ et al. Effect of Oxidative Stress on Birth Size: Consideration of Window from Mid Pregnancy to Delivery. *Placenta* 2009; 30: 418-423.
11. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329: 23-38.
12. Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod Toxicol* 1999; 13: 347-352.
13. Perkins AV. Endogenous anti-oxidants in pregnancy and preeclampsia. *ANZJOG* 2006; 46: 77-83.
14. Hung TH, Lo LM, Chiu TH et al. A Longitudinal Study of Oxidative Stress and Antioxidant Status in Women With Uncomplicated Pregnancies Throughout Gestation. *Reprod Sci* 2010; 17: 401-409.
15. Jenkins C, Wilson R, Roberts J et al. Antioxidants: their role in pregnancy and miscarriage. *Antioxid Redox Signal* 2000; 2: 623-628.
16. Djordjevic A, Spasic S, Jovanovic-Galovic A et al. Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity and lipid peroxidation products. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004; 16: 367-372.
17. Leal CA, Schetinger MR, Leal DB et al. Oxidative stress and antioxidant defences in pregnant women. *Redox Rep* 2011; 16: 230-236.
18. Knapen M, Zusterzeel PL, Peters WH. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 82: 171-184.
19. Carone D, Loverro, Gereco P, Capuano F. Lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in red blood cells during normal and diabetic pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Repro Biol* 1993; 51: 103-109.
20. Zachara BA, Wardak C, Didkowski W et al. Changes in blood selenium and glutathione concentrations and glutathione peroxidase activity in human pregnancy. *Gynecol Obstet Invest* 1993; 35: 12-17.
21. Stein TP, Scholl TO, Schuller MD et al. Oxidative stress early in pregnancy and pregnancy outcome. *Free Radic Res* 2008; 42(10): 841-848.
22. Geršak K, Ismaili H, Kavšek G. Uspešnost prenatalnega odkrivanja zastoja plodove rasti. *Zdrav Vestn* 2010; 79: 690-697.
23. Gupta P, Narang M, Banerjee BD. Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: a case control study. *BMC Pediatr* 2004; 4: 14.
24. Maulik D. Fetal growth restriction: the etiology. *Clin Obstet Gynecol* 2006; 49: 228-235.
25. 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? *BJP* 2004; 142: 231-255.
26. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R et al. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin Chem* 2006; 52: 601-623.
27. Gupta S, Agarwal A, Banerjee J et al. The Role of Oxidative Stress in Spontaneous Abortion and Recurrent Pregnancy Loss: A Systematic Review. *Obstet Gynecol Surv* 2007; 62: 335-347.

28. Yagi K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol Biol* 1998; 108: 101-106.
29. Jakovljevic B, Novakov-Mikic A, Brkic S et al. Lipid peroxidation in the first trimester of pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2011; posted online on Nov 24: 1-3.
30. Kim YJ, Hong YC, Lee KH et al. Oxidative stress in pregnant women and birth weight reduction. *Reprod Toxicol* 2005; 19: 487-492.
31. Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ. II. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J* 2004; 18: 1791-1800.
32. Longini M, Perrone S, Kenanidis A et al. Isoprostanes in amniotic fluid: A predictive marker for fetal growth restriction in pregnancy. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 1537-1541.
33. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG of oxidative stress to DNA and risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004; 339 (1-2): 1-9.
34. Wiktor H, Kankofer M, Schmerold I et al. Oxidative DNA damage in placenta from normal and pre-eclamptic pregnancies. *Virchows Arch* 2004; 445:74-78.
35. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte protein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055.
36. Paglia DE, Valentine WN. Study on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-69.
37. Goldberg DM, Spooner RJ. Glutathione reductase. In Bergmeyer HU ed. *Methods Enzymol* Basel Verlag Chemie 1983; 3: 258-265.
38. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-126.
39. Prokopenko VM, Partsalis GK, Pavlova NG et al. Glutathione-Dependent System of Antioxidant Defense in the Placenta in Preterm Delivery. *Bull Exp Biol Med* 2002; 133: 442-443.
40. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of »Antioxidant Power«: The FRAP Assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-76.
41. Toy H, Camuzcuoglu H, Arioz DT. Serum prolidase activity and oxidative stress markers in pregnancies with intrauterine growth restricted infants. *J Obstet Gynaecol Res* 2009; 35: 1047-1053.

6. Simpozij Homeopatske sekcije
Sobota, 6. oktober 2012
Fakulteta za farmacijo v Ljubljani

HOMEOPATIJA V SLOVENSКИH LEKARNAH

DOPOLDAN

Tanja Šegula, mag.farm.

HOMEOPATSKA LEKARNA ZA SAMOZDRAVLJENJE

Pregled osnovnih homeopatskih zdravil

Homeopatska potovalna lekarna

Pregled težav in zdravljenja (bolezen/homeopatsko zdravilo)

Zanimivi primeri terapije iz lekarniške prakse

POPOLDAN

Dr. Maruša Hribar, mag.farm.

PSIHIČNE TEŽAVE V HOMEOPATIJI

Stres, fobije

»Burn out sindrom«

Nemirni otroci

Primeri iz prakse

Dodatne informacije in prijava:

www.sfd.si