PROOKSIDACIONI STATUS KOD TRUDNICA KOJE BOLUJU OD TROMBOFILIJ NAKON PRVOG TRIMESTRA TRUDNOĆE

Pro-oxidative status of pregnant women suffering from thrombophilia after the first trimester of pregnancy

Marko Petrović¹, Violeta Ilić², Hristos Alexopoulos³, Vesna Vesić⁴, Slađana Pirić⁵

¹Zegin apoteke, Fruškogorska 12, Novi Sad

²ZU Apoteka BENU, Kosovska 4, Beograd

³Visoka medicinska škola strukovnih studija Čuprija, Čuprija

⁴Zdravstveni centar, Paraćin

⁵Univerzitet Megatrend, Fakultet za biofarming

APSTRAKT

Uvod: Trombofilija se definiše kao poremećaj u hemostazi koji rezultuje trombozom. Taj poremećaj može biti trajni ili prolazan, tako i trombofilija može biti kongenitalna i stečena. Trudnoća je stanje povećanog oksidativnog stresa, zbog visoke metaboličke potražnje i povišenih potreba za kiseonikom.

Cilj rada: Osnovni cilj ovog istraživanja je da se ispituju vrednosti markera oksidacionog stresa kod hematološki zdravih i trudnica koje boluju od trombofilije. Pored toga, cilj je i utvrđivanje korelacije između trombofilije u prvom trimestru trudnoće i prooksidativnog statusa. **Materijal i metode:** Ovo je longitudinalna studija koja obuhvata 70 ispitanica, podeljenih u dve jednake grupe, hematološki zdrave trudnice (kontrolna grupa) i trudnice koje boluju od trombofilije (eksperimentalna grupa). Kod obe grupe uzorci za određivanje markera oksidativnog stresa su se uzimali u prvom trimestru (11-14 nedelje gestacije). U uzorcima krvi su se određivali sledeći markeri oksidacionog stresa: O₂-, H₂O₂, TBARS i NO.

Rezultati: Pri proceni nivoa markera oksidativnog stresa, ustanovljena je statistički značajna povišenost svih markera oksidativnog stresa (O₂-, H₂O₂, NO) u eksperimentalnoj grupi (**p<0.01), sem indeksa lipidne peroksidacije (TBARS), koji je bio snižen (**p<0.01).

Zaključak: Ovi rezultati pokazuju da u prvom trimestru trudnoće postoji značajan porast svih navedenih prooksidativnih parametara, osim vrednosti TBARS-a. Ipak, na osnovu ovih vrednosti H₂O₂, O₂- i NO, možemo da očekujemo njihov dalji porast tokom drugog i trećeg trimestra trudnoće što će verovatno uzrokovati porast TBARS-a. Nalazi ove studije mogu da ukažu na prisustvo oksidacionog stresa kod trudnica sa trombofilijom što predstavlja dodatni rizik.

Ključne reči: oksidativni stres, trombofilija, trudnoća, prvi trimestar, slobodni radikali.

Korespondent:

Violeta Ilić, ZU Apoteka BENU

Kosovska 4, 11000, Beograd

e-mail: ilicvioleta@yahoo.com

mob. +381 63 667177

ABSTRACT

Introduction: Thrombophilia is defined as a hemostatic disorder which results in thrombosis. That disorder can be permanent or transient. Also, thrombophilia can be of inherited or acquired nature. Pregnancy is a state of increased oxidative stress, due to high metabolic demands and needs for oxygen.

Objective: Our main aim was to determine the levels of the oxidative stress markers in healthy pregnant women and in women that suffer from thrombophilia and determining the correlation between thrombophilia in the first trimester of pregnancy and oxidative stress.

Materials and methods: This was a longitudinal study which consisted of 70 study participants, divided into two equal groups: healthy pregnant women (control group) and pregnant women that suffer from thrombophilia (experimental group). Blood samples were taken from both groups in the first trimester of pregnancy (11.-14. gestational week), and were used to measure oxidative stress markers (O_2^- , H_2O_2 , TBARS and NO).

Results: These results show that there is a statistically significant ($**p < 0.01$) elevation of oxidative stress markers (O_2^- , H_2O_2 , NO) in the experimental group, except for TBARS, which levels were significantly lower ($**p < 0.01$).

Conclusion: The results of this study show that there is an evident increase in all of the measured pro-oxidative parameters, except for TBARS. Nevertheless, because of these high levels of H_2O_2 , O_2^- i NO, we can expect their elevation during the second and third trimester, which will probably cause the rise of TBARS as well. The findings of this study point out the presence of oxidative stress in pregnant women with thrombophilia, which present an additional risk factor.

Key words: oxidative stress, thrombophilia, pregnancy, first trimester, free radicals.

UVOD

Prema nacionalnom vodiču dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje akutnih i hroničnih oboljenja vena, trombofilija se definiše kao poremećaj u hemostazi koji rezultuje trombozom. Taj poremećaj može biti trajni ili prolazan, tako i trombofilija može biti kongenitalna i stečena [1].

Rizik od venskih tromboembolijskih događaja je veliki tokom trudnoće zbog psiholoških promena i dodatnog uticaja naslednih i stečenih trombofilija. Opšta učestalost venskih tromboembolijskih događaja u trudnoći je 200 u 100,000 porođaja [2]. Plućna tromboembolija i venske tromboze predstavljaju vodeće uzroke mortaliteta i morbiditeta tokom trudnoće i puerperijuma, sa visokom učestalošću razvoja kasnijeg posttromboznog sindroma [3].

Tokom trudnoće, povećan rizik od tromboze kod pacijenata sa naslednim ili stečenim trombofilijama, može biti značajan i nalaže razmatranje. Trudnoća se još opisuje kao dinamička promena u višestrukim telesnim sistemima rezultujući povećanom bazalnom potrošnjom kiseonika.

Trudnoća je stanje povećanog oksidativnog stresa, zbog visoke metaboličke potražnje i povišenih potreba za kiseonikom koji doprinosi stvaranju reaktivnih oksidativnih vrsta od strane mitohondrija placente, zajedno sa produkcijom citokina u proinformatornom stanju i do peroksidacije lipida, pre svega arahidonske kiseline [4,5].

Za placentu se smatra da je ona glavni izvor slobodnih radikala i produkcije lipidne peroksidaze, dovodeći do sistemskog oksidativnog stresa na početku trudnoće i tokom porođaja. Zdrave, mlade žene se obično izbere sa ovim fiziološkim promenama koje su kontrolisane povećanjem antioksidativne aktivnosti (većinom SOD i CAT) [5].

CILJ RADA

Osnovni cilj ovog istraživanja je da se ispituju vrednosti markera oksidacionog stresa kod hematološki zdravih i trudnica koje boluju od trombofilije. Takođe, još jedan od ciljeva ovog istraživanja je utvrđivanje korelacije između trombofilije u prvom trimestru trudnoće i prooksidativnog statusa. Rezultati istraživanja bi, ukoliko dokažu pozitivnu korelaciju, mogli pomoći u implementaciji novih terapijskih smernica koje se tiču prevencije i terapije trombofilije u trudnoći.

Očekuje se da kod trudnica koje boluju od trombofilije postoje povišene vrednosti parametara oksidacionog stresa koje bi

mogle da ukažu na prisustvo oksidacionog stresa kod ovih žena. U skladu sa tim, pretpostavlja se da će se pronaći pozitivna korelacija između trombofilije u prvom trimestru trudnoće i prooksidativnog statusa.

MATERIJAL I METODE

Longitudinalna studija obuhvata 70 ispitanica, podeljenih u dve jednake grupe, hematološki zdrave trudnice (kontrolna grupa) i trudnice koje boluju od trombofilije (eksperimentalna grupa).

Kod hematološki zdravih trudnica koje su se javljale u savetovališta Ginekološko-akušerske klinike Kliničkog centra u Kragujevcu uzorci za određivanje dole navedenih parametara su se uzimali u prvom trimestru (11-14 nedelje gestacije) prilikom uzimanja krvi za Double test). Kod trudnica koje boluju od trombofilije uzorci su se uzimali u istim vremenskim intervalima, u laboratoriji Hematološke klinike Kliničkog centra u Kragujevcu. U uzorcima krvi su se određivali sledeći markeri oksidativnog stresa:

1. Superoksid anjon radikal (O_2^-)

Određivanje koncentracije superoksid anjon radikala (O_2^-) se zasniva na reakciji sa nitro tetrazolijum plavim (Nitro Blue Tetrazolium - NBT) do nitroformazan plavog [6]. Merenje se odvijalo na talasnoj dužini $\lambda = 550$ nm.

2. Vodonič peroksid (H_2O_2)

Determinacija količine vodonik peroksida (H_2O_2) se zasniva na oksidaciji fenol crvenog pomoću vodonik peroksid reakcije koja je katalizovana enzimom peroksidazom iz konjske rotkvice (Horse Radish Peroxidase - HRPO). Ova reakcija rezultuje formiranjem jedinjenja čiji je maksimum apsorpcije $\lambda_{max} = 610$ nm [7].

3. Indeks lipidne peroksidacije (TBARS)

Indeks lipidne peroksidacije (TBARS) je određen indirektno preko produkata reakcije lipidne peroksidacije sa tiobarbiturnom kiselinom, (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) [8]. Merenje se odvijalo na talasnoj dužini $\lambda = 530$ nm.

4. Azot monoksid (NO)

Koncentracija azot monoksida (NO) je određena na osnovu količine oslobođenih nitrita [9]. Biohemijski se ova metoda zasniva na upotrebi Griess-reagensa, koji sa nitritima gradi diazo-kompleks, koji daje ljubičastu boju. Merenje se odvijalo na talasnoj dužini $\lambda = 550$ nm.

Statistička obrada podataka

Razlike između grupa analizirane su parametrijskim nezavisnim T-testom ili ne-parametrijskim Mann-Whitney testom, u

zavisnosti od normalnosti raspodele. Normalnost raspodele unutar grupa analizirana je Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk testovima. Rezultati su prikazani u vidu srednjih vrednosti $\pm$ standardna devijacija ($X \pm SD$). Vrednost p manja od 0.05 se računa kao statistički značajna ($**p < 0,05$). Za statističku obradu svih podataka korišćen je SPSS paket, verzija 20.

REZULTATI

1. O_2^- (superoksidni anjon radikal)

Grafik 1. Nivo superoksidnog anjona (O_2^-) u krvi ispitanica kontrolne grupe (zdrave trudnice) i eksperimentalne grupe (trudnice sa trombofilijom) tokom prvog trimestra trudnoće.

Pri proceni nivoa superoksidnog anjona, ustanovljena je statistički značajna povišenost ($**p < 0.01$) u eksperimentalnoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu ispitanica.

Nivo superoksidnog anjona (O_2^-) u krvi ispitanica kontrolne grupe (zdrave trudnice) iznosio je 1,41 nmol/ml nasuprot eksperimentalnoj grupi (trudnice sa trombofilijom) gde je bio 30,04 nmol/ml tokom prvog trimestra trudnoće.

2. H_2O_2 (vodonik peroksid)

Grafik 2. Nivo vodonik peroksida (H_2O_2) u krvi ispitanica

kontrolne grupe (zdrave trudnice) i eksperimentalne grupe (trudnice sa trombofilijom) tokom prvog trimestra trudnoće.

Pri proceni nivoa vodonik peroksida (H_2O_2), ustanovljena je statistički značajna povišenost ($**p < 0.01$) u eksperimentalnoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu ispitanica.

Nivo vodonik peroksida (H_2O_2) u krvi ispitanica kontrolne grupe (zdrave trudnice) iznosio je 3,13 nmol/ml nasuprot eksperimentalnoj grupi (trudnice sa trombofilijom) gde je bio 5,79 nmol/ml tokom prvog trimestra trudnoće.

3. TBARS (indeks lipidne peroksidacije)

Grafik 3. Nivo indeksa lipidne peroksidacije (TBARS) u krvi ispitanica kontrolne grupe (zdrave trudnice) i eksperimentalne grupe (trudnice sa trombofilijom) tokom prvog trimestra trudnoće.

Pri proceni nivoa indeksa lipidne peroksidacije (TBARS) ustanovljena je statistički značajna sniženost ($**p < 0.01$) u eksperimentalnoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu ispitanica.

Nivo indeksa lipidne peroksidacije (TBARS) u krvi ispitanica kontrolne grupe (zdrave trudnice) iznosio je 2,18 μ mol/ml nasuprot eksperimentalnoj grupi (trudnice sa trombofilijom) gde je bio 0,95 μ mol/ml tokom prvog trimestra trudnoće.

4. NO (nitratni radikal)

Korespondent:

Milena Despotović

despotovicm12@gmail.com

Grafik 4. Nivo azot monoksida (NO) u krvi ispitanica kontrolne grupe (zdrave trudnice) i eksperimentalne grupe (trudnice sa trombofilijom) tokom prvog trimestra trudnoće.

Pri proceni nivoa nitratnog radikala ustanovljene su statistički značajne povišene vrednosti (** $p < 0.01$) u eksperimentalnoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu ispitanica.

Nivo azot monoksida (NO) u krvi ispitanica kontrolne grupe (zdrave trudnice) iznosio je 2,58 nmol/ml dok je u eksperimentalnoj grupi (trudnice sa trombofilijom) iznosio 3,16 nmol/ml tokom prvog trimestra trudnoće.

DISKUSIJA

U ovom istraživanju, sa ciljem da se ispita pro-oksidacioni status tokom prvog trimestra trudnoće, praćena je dinamika promene nivoa pro-oksidacionih markera u krvi trudnica koje boluju od trombofilije, kao eksperimentalne grupe i trudnica koje su hematološki zdrave, kao kontrolne grupe.

U prvom delu studije, praćen je nivo superoksid anjon radikala i vodonik peroksida kod zdravih i trombofilčnih trudnica u prvom trimestru trudnoće. Oni su bili značajno povišeni tokom trombofilije u odnosu na zdrave trudnice u istoj gestacijskoj nedelji (grafik br. 1 i 2).

Nalazi studije Pristov JB i saradnika pokazali su da se oksidativni stres vrši na placentu u trombofiliji. Značajno povećanje aktivnosti enzima koji uklanjaju vodonik peroksid (katalaza i GSH peroksidaza) pokazuju da je glavna reaktivna vrsta koja utiče na tkivo placentne hidrogen peroksid (H_2O_2).

Antioksidantna aktivnost u fetalnoj krvi i oksidativni status amniotske tečnosti nisu bili povećani u trombofiliji [10].

Studija Raičević S. i saradnika se bavila utvrđivanjem povezanosti između fetalnog distresa i oksidativnog stresa. U studiji su mereni nivoi superoksid dismutaze i H_2O_2 u krvi majke i fetusa. Nađeno je da je nivo superoksida bio značajno povećan u plazmi beba u distresu, dok je nivo H_2O_2 u krvi bio povećan i kod majki i kod neonatusa sa fetalnim distresom. Koncentracija superoksida u plazmi neonatusa u distresu bila je veća nego u plazmi majki. Sa druge strane, nivo H_2O_2 je bio sličan u plazmi neonatusa u distresu i njihovih majki [11].

U drugom delu studije, praćeni su nivoi indeksa lipidne peroksidacije i azot monoksida kod zdravih i trombofilčnih trudnica u prvom trimestru trudnoće. TBARS je značajno bio snižen tokom trombofilije u toku prvog trimestra u odnosu na hematološki zdrave trudnice u istoj gestacijskoj nedelji, dok je NO bio značajno povišen (grafik br. 3 i 4).

U studiji Jakovljević B. i saradnika koja je ispitivala koncentracije markera lipidne peroksidacije TBARS i MDA kod trudnica i žena koje nisu trudne (kontrola) ustanovljeno je da su nivoi MDA bili detektabilni u obe ispitivane grupe. Srednje vrednosti MDA (> 20 pmol/mg) bile su merljive kod trudnica u odnosu na kontrolu.

Slična istraživanja [12, 13-15] takođe napominju da je MDA povećana tokom prvog trimestra trudnoće i da su njene vrednosti

veće u odnosu na izmerene vrednosti kod žena koje nisu trudne, i da se povećavaju tokom trudnoće.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da su srednje vrednosti TBARS markera niži kod trudnica ($\leq 50 \mu M$) nego kod negravidnih žena uključenih u ovo istraživanje ($> 100 \mu M$). Slični podaci mogu biti nađeni u drugim studijama [16], posebno da TBARS nije izuzetno povećan u normalnoj trudnoći.

Moguće je da su visoki nivoi TBARS u grupi žena koje nisu trudne posledica starosti žena uključenih u ispitivanje i pušenje, ako se uzme u obzir da se antioksidativni kapacitet organizma smanjuje sa godinama, ali i da pušenje značajno utiče na nastanak oksidativnog stresa [17].

Studija Basu J. i saradnika bavila se merenjem nivoa malonilaldehida (MDA) u nekomplikovanim trudnoćama. Placentalni nivoi MDA su bili najviši u prvom trimestru normalne trudnoće. U drugom i trećem trimestru, nivoi MDA bili su progresivno niži [18].

Autor Patil SB i saradnici, čiji je cilj bio da preko svoje studije procene status lipidne peroksidacije i ne-enzimskih antioksidanasa kod hipertenzivnih komplikacija tokom trudnoće (preeklampsičke i eklampsičke) u odnosu na zdrave žene i one koje nisu trudne (kao kontrola), ustanovili su da je lipidna peroksidacija bila značajno povišena, a nivoi antioksidanasa značajno sniženi kod eklampsičkih i preeklampsičkih ispitanika [19].

Bogavac M. i saradnici su u studiji pokušali da odrede da li se primarni antioksidantni enzimi mogu koristiti kao rani biomarkeri predviđanja komplikacija u trudnoći. Merili su nivo antioksidanasa, i između ostalog, i nivo lipidne peroksidacije u amniotskoj tečnosti kao uzorku. Koncentracija MDA je varirala značajno među posmatranim grupama. Njihov je zaključak bio da parametri oksidativnog stresa u amniotskoj tečnosti mogu biti izmenjeni u raznim patološkim stanjima. [20].

Studija čiji je cilj bio određivanje potencijalne uloge antioksidantnog statusa i faktora tumora nekroze (TNF) u neobjašnjenim rekurentnim spontanim pobačajima (URSA) je merila, između ostalog, nivo NO radikala i malonilaldehida (MDA).

Pokazano je da je povećana produkcija istih bila zabeležena u eksperimentalnoj grupi sa URSA u poređenju sa kontrolom (trudnice u prvom trimestru i žene koje nisu trudne u folikularnoj fazi) [21]. Yüksel S. i saradnici koji su ispitivali nivo NO, malonilaldehida (MDA), superoksid dismutaze, glutation peroksidaze i katalaze među sva tri trimestra trudnoće su uočili da su aktivnosti nivoa NO u njihovoj studiji bili veći u drugom i trećem trimestru nego u prvom trimestru.

MDA nivoi su bili niži u trećem trimestru u odnosu na prvi trimestar. U krvi pupčane vrpce NO i MDA nivoi su bili niži nego u trećem trimestru trudnoće [22].

U studiji koja se bavila promenama u ukupnom plazma koncentraciji tiola, NO i lipidne peroksidacije tokom normalne trudnoće, pronađeno je da postoji značajno povećanje u nivoima serumske lipidne peroksidacije trudnica tokom prvog i trećeg trimestra u poređenju sa kontrolom koju su činile žene koje nisu bile trudne.

ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da već u prvom trimestru trudnoće postoji značajan porast svih navedenih prooksidativnih parametara, osim vrednosti TBARS-a. Ipak, na osnovu ovih vrednosti H_2O_2 , O_2^- i NO, možemo da očekujemo njihov dalji porast tokom drugog i trećeg trimestra trudnoće što će verovatno uzrokovati porast TBARS-a.

Nalazi ove studije mogu da ukažu na prisustvo oksidacionog stresa kod trudnica sa trombofilijom što predstavlja dodatni rizik za ovu grupu trudnica. U skladu sa tim, konkretan doprinos studije može da se ogleda u eventualnoj primeni antioksidanasa kao pomoćne terapije kod ovih žena.

LITERATURA:

1. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse za dijagnostikovanje i lečenje akutnih i hroničnih obolenja vena. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča dobre kliničke prakse, 2013.
Доступно на: <http://www.zdravlje.gov.rs/downloads/2013/April/Vodic%20za%20dijagnostikovanje%20i%20lecenje%20akutnih%20i%20hronicnih%20oboljenja%20vena.pdf> Последњи пут посећено: 28.03.2017.
2. Battinelli EM, Marshall A, Connors JM. The role of thrombophilia in pregnancy. *Thrombosis*, vol. 2013 (2013), 9 pages.
3. Mitić G, Považan L, Lazić R, Spasić D, Matići-Sekulić M. Nedostatak prirodnih inhibitora koagulacije kod žena sa venskim trombozama u trudnoći. *Medicinski pregled* 2009; 62(1-2): 53-62.
4. Leal CA, Schetinger MR, Leal DB et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in pregnant women. *Redox Rep.* 2011; 16(6): 230-6.
5. Figueroa A, Quevedo, Agil A. Changes in Plasma's Oxidative Stress and Antioxidant Activity, Measured with Melatonin Levels, and its Relationship to Newborns from Obese and Diabetic Pregnancies. *J Diabetes Metab* 2011; S4-002
6. Auclair C, Voisin E (1985). Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenvald RA (ed) *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press Une, Boca Raton, pp 123-132.
7. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurment of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38:161-170.
8. Barbous LA. Thromboembolism in pregnancy. *ACOG Practice Bull.* 2000;19.
9. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 26:131-138.
10. Pristov JB, Spasojevic I, Mikovic Ž, Mandić V, Cerovic N, Spasic M. Antioxidative defense enzymes in placenta protect placenta and fetus in inherited thrombophilia from hydrogen peroxide. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2009;2(1):14-18.
11. Raičević S, Čubrilo D, Arsenijević S, et al. Oxidative stress in fetal distress: Potential prospects for diagnosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2010; 3(3): 214-218.
12. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002; 57(5): 609-13.
13. Patil SB, Kodliwadmth MV, Kodliwadmth SM. Study of oxidative stress and enzymatic antioxi-dants in normal pregnancy. *Indian J Clin Biochem* 2007; 22: 135-137.
14. Upadhyaya C, Mishra S, Singh PP, Sharma P. Antioxi-dant status and peroxidative stress in mother and new-born – A pilot study. *Indian J Clin Biochem* 2005; 20: 30-34.
15. Gladen BC, Tabacova S, Baird DD, Little RE, Balabaeva L. Variability of lipid hydroperoxides in pregnant and nonpregnant women. *Reprod Toxicol* 1999; 13: 41-44.
16. Ruder EH, Hartman TJ, Goldman MB. Impact of oxidative stress on female fertility. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 2009; 21(3): 219-222.
17. Jakovljevic B, Novakov-Mikic A, Brkic S, Bogavac MA, Tomic S, Miler V. Lipid peroxidation in the first trimester of pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012; 25(8): 1316-8.
18. Jayasri Basu, Bolek Bendek, Enyonam Agamasu, et al., "Placental Oxidative Status throughout Normal Gestation in Women with Uncomplicated Pregnancies," *Obstetrics and Gynecology International*, vol. 2015, Article ID 276095, 6 pages, 2015.
19. Patil SB, Kodliwadmth MV, Kodliwadmth SM. Lipid peroxidation and antioxidant status in hypertensive pregnancies. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2008; 35(4): 272-4.
20. Bogavac M, Lakic N, Simin N, Nikolic A, Sudji J, Bozin B. Biomarkers of oxidative stress in amniotic fluid and complications in pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012; 25(1): 104-8.
21. El-Far M, El-Sayed IH, El-Motwally Ael-G, Hashem IA, Bakry N. Tumor necrosis factor-alpha and oxidant status are essential participating factors in unexplained recurrent spontaneous abortions. *Clin Chem Lab Med*. 2007; 45(7): 879-83.
22. Yüksel S, Yiğit AA. Malondialdehyde and nitric oxide levels and catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase levels in maternal blood during different trimesters of pregnancy and in the cord blood of newborns. *Turk J Med Sci*. 2015; 45(2): 454-9.
23. Ozkan Y, Yardim-Akaydin S, Erdem A, Simşek B. Variability of total thiol compounds, oxidative and nitrosative stress in uncomplicated pregnant women and nonpregnant women. *Arch Gynecol Obstet*. 2012; 285(5): 1319-24.