

Aktivnost antioksidativnih enzima u eritrocitima zdravih trudnica, trudnica sa preeklampsijom i novorođenčadi

Aleksić-Veličković Vesna¹, Kardum Nevena², Berisavac Milica¹, Konić-Ristić Aleksandra², Glibetić Marija²

¹Klinika za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije, Beograd

²Centar izuzetnih vrednosti za istraživanje u oblasti ishrane i metabolizma-Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu

Apstrakt

Cilj ovog rada je određivanje aktivnosti superoksid-dizmutaze i katalaze u eritrocitima periferne krvi trudnica sa preeklampsijom i zdravih trudnica pre porođaja i krvi pupčanika njihovih beba neposredno posle porođaja. Preeklampsija je sindrom nepoznate etiologije i podrazumeva multisistemski poremećaj u organizmu trudnice. Karakteriše se povećanjem krvnog pritiska, edemom i proteinurijom i u ozbiljnijim slučajevima može doći do dramatičnog pogoršanja bolesti i ugrožavanja funkcije bubrega, jetre, mozga i hematoloških poremećaja. Preeklampsija predstavlja veliki rizik za zdravlje i majke i ploda. Poremećaj balansa između antioksidanasa i produkcije reaktivnih vrsta kiseonika smatra se jednim od uzroka različitih patoloških stanja reproduktivnog sistema, uključujući i preeklampsiju. Deo enzimskog sistema antioksidativne zaštite organizma čine enzimi superoksid-dizmutaza i katalaza, uključeni u regulaciju nivoa reaktivnih vrsta kiseonika. Dobijeni rezultati pokazali su da je aktivnost superoksid-dizmutaze u eritrocitima statistički značajno niža u grupi ispitanica sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice, kao i u grupi beba ispitanica sa preeklampsijom u odnosu na bebe zdravih trudnica. Takođe, pokazano je da je aktivnost katalaze u eritrocitima statistički značajno niža kod trudnica sa preeklampsijom u odnosu na kontrolnu grupu, kao i kod njihovih beba u odnosu na bebe zdravih majki. Razlike u aktivnost antioksidativnih enzima u ispitivanim grupama trudnica i njihovih beba ukazuje na povezanost preeklampsije i smanjenog antioksidativnog statusa. S obzirom da primena direktnih antioksidanasa nije dala očekivane rezultate prikazani podaci ukazuju na mogućnost prevencije ili ublažavanja komplikacija izazvanih preeklampsijom dijetarnim merama i poboljšanjem stila života trudnica i žena u reproduktivnom periodu, usmerenim na jačanje mehanizama antioksidativne zaštite.

Ključne reči: preeklampsija, eritrociti, superoksid-dizmutaza, katalaza

Antioxidant enzyme activities in erythrocytes of healthy pregnant women, preeclamptic women and newborns

Aleksić-Veličković Vesna¹, Kardum Nevena², Berisavac Milica¹, Konić-Ristić Aleksandra², Glibetić Marija²

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Clinical Center of Serbia, Belgrade

²Centre of excellence for research in the field of nutrition and metabolism-Institute for Medical Research, University of Belgrade

Abstract

Preeclampsia is a pregnancy-specific syndrome of unknown etiology and represents multisystem disorder. It is characterized by the increased blood pressure, proteinuria, and edema. Preeclampsia is a great risk for both mother and fetus. Disturbances of the balance between the production of reactive oxygen species antioxidants status is considered to be one of the causes of various pathological conditions of the reproductive system, including preeclampsia. The main objective of this study is to determine the activities of superoxide-dismutase and catalase in peripheral blood erythrocytes of the pregnant women with preeclampsia and healthy pregnant women before delivery and umbilical cord blood erythrocytes of their babies immediately after the delivery. The results showed that the activity of superoxide dismutase in erythrocytes were statistically significantly lower in the group of patients with preeclampsia than in healthy pregnant women, as in the group of their babies compared to the babies of healthy pregnant women. Similarly, catalase activity was significantly lower in women with preeclampsia compared to the controls, as well as in erythrocytes of their babies compared to babies of healthy mothers. An observed difference in the antioxidant enzyme activities suggests a putative association between preeclampsia and decreased antioxidant status. Since the direct application of antioxidants did not give expected results of the data presented indicate the opportunity for the prevention of preeclampsia and alleviation of symptoms by dietary measures and life style changes in the population of pregnant women and women of childbearing age, directly targeting the enzymatic antioxidant system.

Keywords: preeclampsia, erythrocyte, superoxide-dismutase, catalase

Uvod

Preeklampsija je sindrom nepoznate etiologije i podrazumeva multisistemski poremećaj u organizmu trudnice. Može se javiti u bilo kom periodu trudnoće, najčešće posle 20-te nedelje gestacije, pri porođaju ili u postpartalnom periodu. Karakteriše se povećanjem krvnog pritiska, edemom i proteinurijom i u ozbiljnijim slučajevima može doći do dramatičnog pogoršanja bolesti i ugrožavanja funkcije bubrega, jetre, mozga i hematoloških poremećaja¹. Preeklampsija predstavlja veliki rizik za zdravlje i majke i ploda. U vrlo ozbiljnim slučajevima preeklampsija može progredirati u stanja koja ugrožavaju život majke: eklampsiju i HELLP sindrom (eng. Haemolysis-Elevated Liver Enzymes-Low Platelets)². Istovremeno, povezana je sa negativnim ishodima trudnoće vezanim za plod uključujući intra-uterinu retardaciju ploda, odvajanje placente, oligohidramniju i predstavlja uzrok velikog broja prevremenih porođaja. Preeklampsija direktno ili indirektno, kao uzrok prevremenog porođaja, utiče i na zdravlje deteta i povezuje se sa usporenim rastom u detinjstvu³ i povećanom incidencijom šećerne bolesti i hipertenzije u odrasloj dobi⁴.

Povećan nivo reaktivnih vrsta kiseonika (RVK) u toku razvoja embriona, fetusa i placente predstavljaju funkcionalnu karakteristiku trudnoće i ima fiziološku ulogu u folikulogenezi, sazrevanju oocita, funkciji žutog tela i uterusu, embriogenezi, implantaciji embriona i fetoplacentalnom razvoju⁵. Tačan mehanizam obuhvata učešće RVK, kao signalnih molekula, u regulaciji aktivnosti transkripcionih faktora osetljivih na oksidativni status ćelije i brojnih proteinskih kinaza, uključenih u procese ćelijske proliferacije, diferencijacije, apoptoze, remodelovanja i angiogeneze⁶, kao i fagocitnu ulogu u zaštiti horioamniona od infekcije⁷. Istovremeno, oksidativni stres predstavlja jedan od mogućih uzročnika poremećaja vezanih za trudnoću kao što su resorpcija embriona, učestali pobačaji, preeklampsija, intrauterina restrikcija rasta i smrt fetusa⁸. Oksidativni stres u placenti uključen je u etiopatogenezu preeklampsije i ima ulogu u lipidnoj peroksidaciji, kao rezultat reakcije RVK sa polinezasićenim masnim kiselinama u ćelijskoj membrani i lipoproteinima plazme. Povećani nivo lipidnih peroksida povezan je uzročno i/ili posledično sa smanjenjem neenzimskih i enzimskih antioksidanasa⁹.

Poremećaj balansa između antioksidanasa i produkcije reaktivnih vrsta kiseonika smatra se generalno jednim od uzroka različitih patoloških stanja reproduktivnog sistema¹⁰.

Poremećaj antioksidativne aktivnosti enzima i smanjenje nivoa direktnih antioksidanasa predstavlja jedan od potencijalnih uzroka povećane lipidne peroksidacije kod trudnica sa preeklampsijom, što može dovesti do oštećenja vaskularnog endotela i manifestacija simptoma ovog poremećaja. Modulacija sistema antioksidativne zaštite dijetarnim intervencijama ili poboljšanjem stila života pre trudnoće i u ranoj trudnoći predstavlja jedan od predloženih strategija za smanjenje mogućih komplikacija vezanih za trudnoću¹¹.

Enzimski sistem antioksidativne zaštite organizma čine: superoksid dizmutaza, katalaza, glutation-peroksidaza, glutation-reduktaza i transferaze, tiol-disulfid oksidoreduktaze i peroksiredoksini. Superoksid dizmutaza (SOD) je metaloenzim prisutan u svim eukariotskim ćelijama i katalizuje dismutaciju superoksidnih anjona do vodonik peroksida i molekularnog kiseonika. Ključna uloga SOD je da zaštiti azot monoksid (NO) sintetisan od strane endotelne ćelije od oksidacije i gubitka funkcije. Nivo vodonik-peroksida nastalog u reakciji katalizovanoj superoksid-dizmutazom kontrolisan je aktivnošću dva enzima: katalazom i glutation-peroksidazom¹².

Cilj rada je određivanje aktivnosti superoksid-dizmutaze i katalaze u eritrocitima periferne krvi trudnica sa preeklampsijom i zdravih trudnica pre porođaja i krvi pupčanika njihovih beba neposredno posle porođaja.

Materijal i metode

Istraživanje je dizajnirano u studiji koja je izvedena u Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije i Centru izuzetnih vrednosti za istraživanja ishrane i metabolizma, Instituta za medicinska istraživanja u Beogradu u periodu od 18.12.2010. godine do 01.06.2011. godine. Izvođenje studije odobreno je od strane Etičkog odbora Kliničkog centra Srbije.

Grupu ispitanica činilo je 30 trudnica sa preeklampsijom (vrednost sistolnog pritiska iznad 140mmHg i dijastolnog iznad 90mmHg), a kontrolnu grupu 30 normotenzivnih trudnica. Kriterijum za uključivanje u studiju za ispitanice sa preeklampsijom bili su sledeći: preeklampsija, prvorođena, gestaciona starost između 29 NG i 39NG, monofetalna trudnoća, starosna dob do 35 godina, nepušač i prethodno zdrava ispitanica. Kriterijumi za

uključenje u studiju za ispitanice kontrolne grupe bili su: normotenzivna, prvorođena, gestaciona starost između 29 NG i 39 NG, monofetalna trudnoća, starosna dob do 35 godina, nepušač i zdrava ispitanica. Kriterijum za isključenje iz studije za obe grupe bile su trudnice sa endokrinim, kardiovaskularnim oboljenjima i nefrološkim oboljenjima i višepodna trudnoća, starosna dob iznad 35 godina života i žene pušači. Svim ispitanicama po prijemu u Klinikum za ginekologiju i akušerstvo KCS uzeta je kompletna anamneza, urađen kompletan ginekološki i fizikalni pregled, ultrazvučni pregled, konstatovan prirast telesne mase, laboratorijske analize (kompletna krvna slika, proširena biohemija sa lipidnim statusom, CRP) urin. Karakteristike ispitanica prikazane su u Tabeli 1.

Karakteristike	Trudnice sa preklampsijom	Zdrave trudnice
Nedelja gestacije pri porođaju	36.1±2.2	37.7±.5
Sistolni arterijski pritisak (mmHg)	169.5±15.8	120.3±9.9
Dijastolni arterijski pritisak (mmHg)	109.3±9.3	76.5±5.2
Ukupni proteini u serumu (g/L)	56.58±6.8	64.41±4.49
Albumin (g/L)	30.67±4.22	35.76±2.23
Prirast telesne mase (kg)	19.0±8.9	16.2±4.6
Ukupni holesterol (mmol/L)	7.53±1.53	7.52±1.38
HDL (mmol/L)	1.77±0.34	2.00±0.41
LDL (mmol/L)	3.96±1.18	4.17±1.21
trigliceridi (mmol/L)	3.98±2.13	2.97±1.15
CRP (mg/L)	46.1±39.0	6.4±6.3
Protrombinsko vreme	26.9±1.8	25.7±1.9
Fibrinogen (g/L)	6.1±0.8	5.3±0.5
Broj eritrocita (x10 ¹² /L)	3.7±0.51	4.2±0.51
Hemoglobin (g/L)	109.4±14.5	121.0±13.1
Broj leukocita (x10 ⁹ /L)	15.1±6.0	12.9±2.9

Tabela 1. Karakteristike trudnica sa preklampsijom i zdravih trudnica

Uzorci heparinizirane krvi dobijeni su punkcijom kubitalne vene trudnica i umbilikalne vene pupčanika novorođenčadi neposredno posle porođaja. Nakon odvajanja plazme centrifugiranjem (2400 x g, 5 min, 4°C) i višestrukog ispiranja eritrocita fiziološkim rastvorom, eritrociti su lizirani inkubacijom sa destilovanom vodom (20 min, 0°C). Aktivnost enzima određivana je u supernatantu dobijenom centrifugiranjem nakon liziranja, a rezultati izraženi u odnosu na sadržaj hemoglobina. Sadržaj hemoglobina u lizatu eritrocita određen je kolorimetrijski, primenom cijanmethemoglobin metode¹³.

Aktivnost superoksid-dizmutaze u lizatu eritrocita određivana je primenom komercijalnog kompleta (RANSOD, Biorex Diagnostics, UK). Ukratko, reakcijom 2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijum hlorida (INT) i superoksidnog anjona nastalog u sistemu ksantin-ksantin oksidaza, formira se crveno obojeno jedinjenje čija se apsorbcija meri na 505nm. Aktivnost enzima u uzorcima određuje se na osnovu inhibicije ove bojene reakcije u vremenu i izražava u jedinicama po ml analita (IU/ml) pri čemu se jednadžina predstavlja aktivnost enzima koja u definisanim reakcionim uslovima dovodi do 50% inhibicije reakcije formiranja obojenog formazanskog kompleksa.

Aktivnost katalaze u lizatu eritrocita određivana je modifikovanim metodom po Goth-u¹⁴ na osnovu smanjenja količine prisutnog vodonik-peroksida delovanjem enzima u uzorku, u trajanju od 1 minuta na temperaturi od 37°C. Vodonik-peroksid sa amonijum-molibdatom (NH₄Mo₇O₂₄) gradi žuto obojeno jedinjenje čija se apsorbcija meri na 405nm. Aktivnost enzima u uzorcima određuje se na osnovu inhibicije ove bojene reakcije i izražava u arbitarnim jedinicama (AU) po ml analita, odnosno gramu hemoglobina, pri čemu jedna arbitarna jedinica razlaže 1μM vodonik-peroksida u periodu od 1 minuta pri opisanim uslovima reakcije.

Rezultati

Uporedna analiza aktivnosti superoksid-dizmutaze po analiziranim grupama i po parovima majke-bebe u prikazana je u Tabeli 2 i a rezultati analize među grupama prikazani su i grafički (Dijagram 1.).

Aktivnost SOD	Grupa	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Medijana	Minimum	Maksimum
Majke	Preeklampsija	1394.1	464.5	1334.8	618.7	2623.5
	Kontrolna	1810.5	559.6	1791.2	812.3	2996.2
	Ukupno	1611.4	552.2	1543.2	618.7	2996.2
Bebe	Preeklampsija	1152.4	565.2	1066.1	301.5	2294.0
	Kontrolna	1841.9	480.2	1943.0	1087.0	2768.3
	Ukupno	1512.1	623.1	1520.3	301.5	2768.3

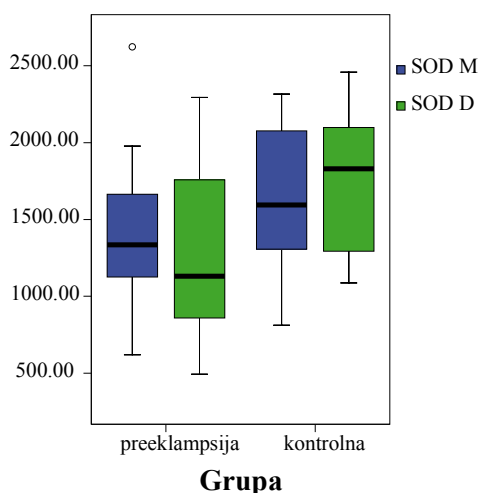
Tabela 2. Aktivnost superoksid-dizmutaze (SOD, IU/gHb) u ispitivanim grupama

Prosečne vrednosti i medijane aktivnosti SOD su manje u grupi ispitanica sa preeklampsijom u odnosu na ispitanice kontrolne grupe i kod majki i kod beba. Mann-Whitney U testom je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika u SOD aktivnosti u eritrocitima kod majki između grupa ($z=-2.463$; $p=0.014$). Razlika u aktivnosti SOD između grupa beba je takođe visoko statistički značajna ($z=-3.794$ $p<0.001$).

Kada se analizira aktivnost SOD (nezavisno od grupa) utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između majki i beba, a i prosečne vrednosti i medijane su vrlo slične. Kada se uzorci podele na grupu sa preeklampsijom i kontrolnu grupu utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između majki i beba sa preeklampsijom ($Z=-1.596$; $p=0.110$) kao ni majki i beba kontrolne grupe ($Z=-0.217$; $p=0.829$).

Korelacionom analizom je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika kod svih pacijenata zajedno kada se analizira aktivnost SOD majke i beba ($r=0.351$; $p=0.017$).

Kada se ista analiza uradi odvojeno po grupama utvrđeno je da nema statistički značajne povezanosti kod pacijentkinja sa preeklampsijom ($r=-0.011$; $p=0.962$), kao ni kod pacijentkinja kontrolne grupe ($r=0.155$; $p=0.300$).



Dijagram 1. Grafički prikaz aktivnosti superoksid-dizmutaze u analiziranim grupama ispitanika.

Analogno SOD-u, analizirana je i aktivnost katalaze u ispitivanim grupama. Deskriptivna statistika katalaze po grupama za majke i bebe prikazana je u Tabeli 3, i grafički u Dijagramu 2.

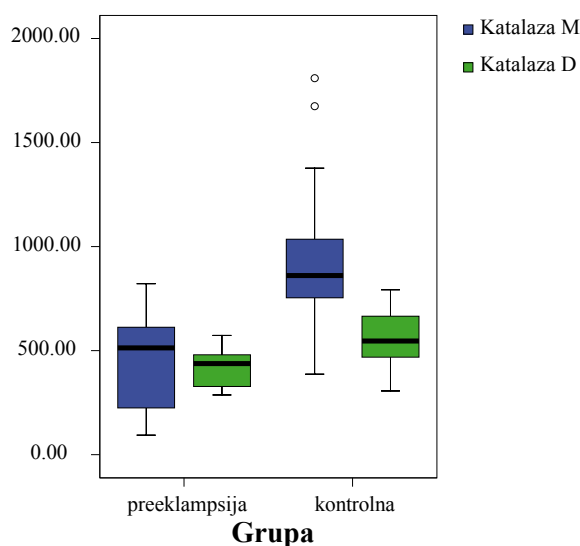
Aktivnost katalaze	Grupa	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Medijana	Minimum	Maksimum
Majke	Preeklampsija	466.6	213.0	512.9	94.6	821.5
	Kontrolna	928.8	350.2	860.8	387.1	1809.3
	Ukupno	707.8	372.0	709.6	94.6	1809.3
Bebe	Preeklampsija	415.6	88.5	438.2	287.4	573.5
	Kontrolna	566.7	148.6	546.6	306.4	792.7
	Ukupno	494.5	144.1	479.1	287.4	792.7

Tabela 3. Aktivnost katalaze (AU/gHb) u ispitivanim grupama

Iz tabele se uočava da su prosečne vrednosti i medijane kod pacijentkinja sa preeklampsijom manje nego kod pacijentkinja kontrolne grupe. Kada se rezultati testiraju testovima razlike utvrđeno je da postoji visoko statistički značajna razlika između grupa kod majki ($t=-5.349$; $p<0.001$) i beba ($t=-4.228$; $p<0.001$).

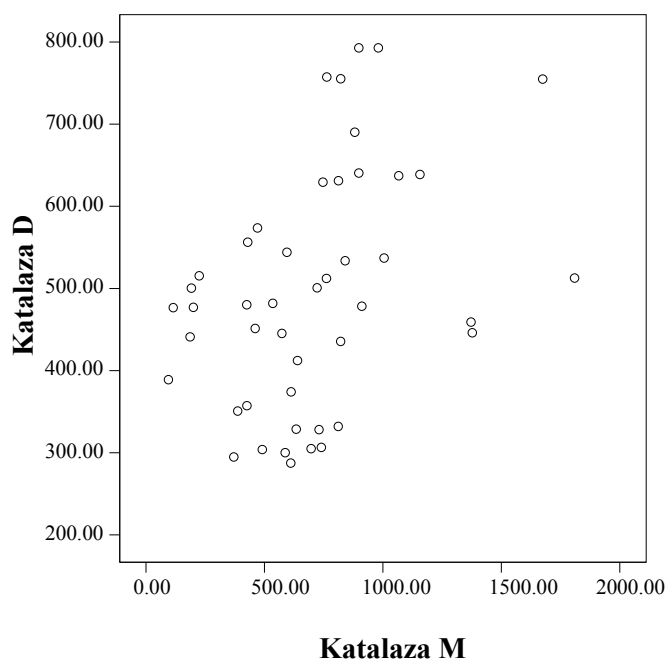
Analizom varijanse ponovljenih merenja utvrđeno je da postoji visoko statistički značajna razlika u katalazi između majki i beba ($F=20.537$; $p<0.001$; $\text{Eta}^2=0.318$), ali postoji i statistički značajan uticaj grupe na ovu razliku ($F=11.649$; $p<0.001$; $\text{Eta}^2=0.209$).

Razlika između majki sa preeklampsijom i njihovih beba nije statistički značajna ($p=0.433$), dok je razlika između majki kontrolne grupe i njihovih beba visoko statistički značajna ($p<0.001$).



Dijagram 2. Grafički prikaz aktivnosti katalaze u analiziranim grupama ispitanika

Korelacionom analizom je utvrđeno da postoji visoko statistički značajna korelacija između vrednosti katalaze majki i beba nezavisno od grupa ($r=0.384$; $p=0.008$). Korelacija je i grafički prikazana (Dijagram 3).



Dijagram 3. Grafički prikaz korelacije aktivnosti katalaze u grupi majki i beba.

Kada se uzorak podeli po grupama, utvrđeno je da nema statistički značajne korelacije kod pacijentkinja sa preeklampsijom i njihove beba ($r=-0.385$; $p=0.077$) i kod pacijentkinja kontrolne grupe i njihovih beba ($r=0.302$; $p=0.151$).

Diskusija i zaključak

Rezultati dobijeni u eksperimentalnom delu pokazali su da je aktivnost SOD u eritrocitima statistički značajno niža u grupi ispitanica sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice, kao i u grupi beba ispitanica sa preeklampsijom u odnosu na bebe zdravih trudnica, pri čemu razlike u aktivnosti ovog enzima između majki i beba u obe grupe nisu statistički značajne. Statistički značajna razlika u aktivnosti SOD eritrocita krvi majki i krvi pupčanika između grupa u saglasnosti je sa ranije publikovanim istraživanjima¹⁵. Bulgan Kilicdag i saradnici¹⁶ pokazali su da se ova razlika povećava sa povećanjem intenziteta simptoma preeklampsije. Negi i saradnici¹⁷ dovode u vezu ovo smanjenje aktivnosti sa smanjenim nivoom mikronutrijenata koji predstavljaju kofaktore ovog enzima. To se pre svega odnosi na bakar, cink i mangan. Važno je istaći da je povećana aktivnost SOD jedna od karakteristika trudnoće, zajedno sa povećanjem ostalih komponenata enzimske antioksidativne zaštite. Naime, svi ovi antioksidativni enzimi se aktiviraju u odgovoru na povećanje oksidativnog stresa funkcionalno uključenog u procese karakteristične za trudnoću, što predstavlja kompenzatorni odgovor organizma majke na stres¹⁸.

Prikazane vrednosti aktivnosti katalaze pokazuju da je aktivnost ovog enzima u eritrocitima statistički značajno niža u grupi trudnica sa preeklampsijom u odnosu na kontrolnu grupu trudnica. Ovi rezultati u skladu su sa prethodno publikovanim rezultatima koji pokazuju da je aktivnost katalaze u eritrocitima u trudnoći statistički značajno smanjena u odnosu na kontrolnu grupu ispitanica iste starosne dobi, kao i smanjenje aktivnosti ovog enzima kod ispitanica sa preeklampsijom, srazmerno stepenu prisutnih simptoma¹⁹. Potencijalni uzrok smanjene aktivnosti je smanjenje produkcije NADPH u eritrocitima ispitanica sa preeklampsijom²⁰ uzimajući u obzir delovanje NADPH na inhibiciju inaktivacije katalaze do koje dolazi pri visokim koncentracijama vodonik peroksida. U prilog ovoj tvrdnji su i rezultati studije Mohan i Venkataramana²¹ koji pokazuju smanjenu aktivnost katalaze u eritrocitima kod trudnica sa hipertenzijom izazvanom trudnoćom.

Pokazano je da je aktivnost katalaze eritrocita kod beba majki sa preeklampsijom statistički značajno niža od vrednosti ovog parametra kod beba zdravih majki. Iako je statistička značajnost pokazana u i razlici aktivnosti katalaze kod majki u odnosu na bebe kod obe grupe ispitanica, ona je izraženija u kontrolnoj u odnosu na grupu sa preeklampsijom, odnosno razlika između vrednosti ovog parametra izraženija između grupa majki u odnosu na bebe. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodno publikovanim rezultatima²² ukazujući na mogućnost da bebe ispitanica sa preeklampsijom delimično razvijaju kompenzatorne mehanizme u pogledu snižene aktivnosti katalaze.

U zaključku, razlika u aktivnost enzima antioksidativne zaštite superosid-dizmutaze i katalaze u eritrocitima trudnica sa preeklampsijom i njihovih beba, u odnosu na aktivnost ovih enzima u eritrocitima zdravih trudnica i njihovih beba ukazuje na povezanost preeklampsije i smanjenog antioksidativnog statusa. S obzirom da primena direktnih antioksidanasa u prevenciji preeklampsije nije dala očekivane rezultate prikazani podaci ukazuju na mogućnost prevencije ovog stanja ili ublažavanja komplikacija izazvanih preeklampsijom dijetarnim merama i poboljšanjem stila života trudnica i žena u reproduktivnom periodu, usmerenim na jačanje mehanizama antioksidativne zaštite.

Literatura

1. Williams D. Long-term complications of preeclampsia. *Semin Nephrol.* 2011;31(1):111-22.
2. Ahonen J, Nuutila M. HELLP syndrome-severe complication during pregnancy. *Duodecim.* 2012;128(6):569-77.
3. McCowan L, Harding J, Barker S, Ford C. Perinatal predictors of growth at six months in small for gestational age babies. *Early Human Development* 1999;56(2-3):205-16.
4. Barker DJ, Martyn CN, Osmond C, Hales CN, Fall CH. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. *BMJ.* 1993 Dec 11;307(6918):1524-7.
5. Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, Shah R. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(8):1375-403.
6. Myatt L. Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta* 2010; 31 Suppl:S66-S69.
7. Matsubara S, Sato I. Enzyme histochemically detectable NAD(P)H oxidase in human placental trophoblasts: normal, preeclamptic, and fetal growth restriction-complicated pregnancy. *Histochem Cell Biol* 2001; 116:1-7.
8. Gupta S, Aziz N, Sekhon L, Agarwal R, Mansour G, Li J, Agarwal A. Lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia: a systematic review. *Obstet Gynecol Surv.* 2009;64(11):750-9.
9. Rogers MS, Wang CC, Tam WH, et al. Oxidative stress in midpregnancy as a predictor of gestational hypertension and pre-eclampsia. *BJOG* 2006;113:1053-1059.
10. Agarwal A, Allamaneni SS. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online.* 2004;9(3):338-47.
11. Poston L, Igosheva N, Mistry HD, Seed PT, Shennan AH, Rana S, Karumanchi SA, Chappell LC. Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders. *Am J Clin Nutr.* 2011;94(6 Suppl):1980S-1985S.
12. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999;32(8):595-603.
13. Drabkin DL, Austin JM. Spectrophotometric constants for common haemoglobin derivatives in human, dog and rabbit blood. *J Biol Chem* 1932;98:719-33.
14. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta.* 1991;196(2-3):143-51.
15. Suhail M, Suhail S, Gupta BK, Bharat V. Malondialdehyde and Antioxidant Enzymes in Maternal and Cord Blood, and their Correlation in Normotensive and Preeclamptic Women. *J Clin Med Res.* 2009;1(3):150-7
16. Bulgan Kilicdag E, Ay G, Celik A, Ustundag B, Ozercan I, Simsek M. Oxidant-antioxidant system changes relative to placental-umbilical pathology in patients with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2005;24(2):147-57.
17. Negi R, Pande D, Karki K, Kumar A, Khanna RS, Khanna HD. Trace elements and antioxidant enzymes associated with oxidative stress in the pre-eclamptic/eclamptic mothers during fetal circulation. *Clin Nutr.* 2012.

18. Hung TH, Lo LM, Chiu TH, Li MJ, Yeh YL, Chen SF, Hsieh TT. A longitudinal study of oxidative stress and antioxidant status in women with uncomplicated pregnancies throughout gestation. *Reprod Sci.* 2010;17(4):401-9.
19. 19. Kulusari A, Kurdoglu M, Bugdayci G, Adali E, Yildizhan R, Cebi A, Demir H, Sahin G, Kamaci M. Relationship between erythrocyte catalase and serum adenosine deaminase activities in eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009;22(4):321-4.
20. Afzal-Ahmed I, Mann GE, Shennan AH, Poston L, Naftalin RJ. Pre-eclampsia inactivates glucose-6-phosphate dehydrogenase and impairs the redox status of erythrocytes and fetal endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2007;42:1781–1790.
21. Krishna Mohan S, Venkataramana G. Status of lipid peroxidation, glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant enzymes in patients with pregnancy – induced hypertension. *Indian J Physiol Pharmacol* 2007;51:284–288.
22. Orhan H, Onderoglu L, Yücel A, Sahin G. Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet.* 2003;267(4):189-95.