

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Mina Ž. Toljić

Nivo vanćelijskih miR-17, miR-29a, miR-181a,
proinflamatornih citokina i parametara
oksidativnog oštećenja u krvi pacijentkinja sa
gestacijskim dijabetesom i gestacijskom
arterijskom hipertenzijom

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Mina Ž. Toljić

Extracellular miR-17, miR-29a, miR-181a,
proinflammatory cytokines and oxidative damage
parameters levels in blood of patients with
gestational diabetes mellitus and gestational
arterial hypertension

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024

Mentori:

Dr sci dr Ivana Joksić, viši naučni saradnik
Ginekološko-akušerska klinika „Narodni front“, Beograd

Dr Marija Savić Veselinović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Članovi komisije:

Dr Jelena Milašin, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

Dr Nađa Nikolić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu - Stomatološki fakultet

Dr Nataša Karadžov Orlić, docent
Ginekološko-akušerska klinika „Narodni front“
Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet

Dr Katarina Zeljić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Dr Mihailo Jelić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Datum odbrane: _____

Eksperimentalni deo ovog rada urađen je u Laboratoriji za humanu genetiku Stomatološkog fakulteta u Beogradu i na Odseku za medicinsku genetiku Ginekološko-akušerske klinike "Narodni front" u Beogradu.

Zahvalnica

Mojoj dragoj mentorki i saputnici, dr sci dr Ivani Joksić, dugujem beskrajnu zahvalnost na podršci, korisnim savetima i znanju koje mi je prenela tokom izrade ove teze i dugogodišnjeg, lepog, zajedničkog rada.

Dragoj mentorki, dr Mariji Savić Veselinović, najlepše hvala što je uvek tu, spremna da pomogne.

Veliku zahvalnost dugujem Profesorki Jeleni Milašin na svim rečima podrške, smernicama, pozitivnoj energiji i ukazanoj prilici da budem deo njenog istraživačkog tima.

Zahvalnost dugujem dr Katarini Zeljić i dr Mihailu Jeliću na korisnim savetima i pruženoj pomoći.

Dragim kolegicama, dr Nađi Nikolić, dr Jeleni Čarkić, docentkinji Jeleni Munjas, docentkinji Nataši Karadžov Orlić i dr Gordani Joksić iskreno hvala na nesebično pruženoj pomoći prilikom izrade doktorske disertacije.

Mojim dragim kolegama sa Odseka za medicinsku genetiku Ginekološko-akušerske klinike "Narodni front" i iz Laboratorije za humanu genetiku Stomatološkog fakulteta hvala na lepom druženju, podršci i pomoći.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima. Bez vas ova disertacija ne bi postojala. Od srca vam hvala na divnim rečima podrške koje nikada niste štedeli, bezgraničnom razumevanju i što ste uvek verovali u mene.

Mom tati...

Znam, i sada ponosno letiš negde visoko među oblacima, a ja se i dalje radujem svakom novom avionu.

Ove stranice posvećujem tebi.

Hvala ti, tata.

Nivo vanćelijskih miR-17, miR-29a, miR-181a, proinflamatornih citokina i parametara oksidativnog oštećenja u krvi pacijentkinja sa gestacijskim dijabetesom i gestacijskom arterijskom hipertenzijom

Sažetak

Gestacijski dijabetes melitus (GDM) i gestacijska hipertenzija (GH) predstavljaju neke od najčešćih komplikacija koje se mogu javiti u trudnoći, a poznavanje mehanizama koji leže u njihovoj osnovi ključni su za razvoj adekvatnih mera prevencije i lečenja. U prikazanoj studiji ispitivan je nivo odabranih mikroRNK (miR-17, miR-29a i miR-181a), genske ekspresije citokina (*IL-1 β* , *TNF- α* , *IL-6* i *IL-17*) i parametara oksidativnog stresa (reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline – TBARs, i 8-hidroksi-2'-deoksiguanozina – 8-OHdG) u perifernoj krvi trudnica sa GDM-om, GH-om, kao i zdravih trudnica.

Kod GDM trudnica utvrđen je značajno niži nivo ekspresije miR-29a i značajno viši nivo ekspresije *IL-1 β* u poređenju sa kontrolom. Oba parametra imaju dovoljan dijagnostički potencijal za diskriminaciju trudnica sa GDM-om, a njihovo kombinovano korišćenje ima veći dijagnostički potencijal. U GH grupi utvrđen je značajno viši nivo ekspresije *TNF- α* u odnosu na kontrolnu grupu. Ipak, ovaj parametar nije pokazao potencijal korišćenja kao biomarker gestacijske hipertenzije. Dobijeni rezultati ukazuju na povišen nivo lipidne peroksidacije u obe ispitivane grupe, dok je u GDM grupi pokazan i značajno viši nivo DNK oštećenja nego u kontrolnoj grupi trudnica. *In vitro* ispitivanjima utvrđeno je da Metildopa ne utiče značajno na nivo ispitivanih parametara lipidne peroksidacije i oštećenja DNK, te je isključen njegov mogući efekat na meren nivo parametara oksidativnog stresa hipertenzivnih trudnica.

Promene nivoa genske ekspresije citokina i oksidativni stres uključeni su u patogenezu GDM-a i GH-a, dok u slučaju GDM-a dolazi i do promene nivoa ekspresije miRNK. miR-29a i *IL-1 β* mogu se koristiti kao biomarkeri gestacijskog dijabetesa, dok se TBARs može koristiti kao biomarker oba patološka stanja.

Ključne reči: gestacijski dijabetes melitus, gestacijska hipertenzija, miRNK, miR-29a, citokin, *IL-1 β* , *TNF- α* , oksidativni stres, malondialdehid, 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

Extracellular miR-17, miR-29a, miR-181a, proinflammatory cytokines and oxidative damage parameters levels in blood of patients with gestational diabetes mellitus and gestational arterial hypertension

Abstract

Gestational diabetes mellitus (GDM) and gestational hypertension (GH) present some of the most common pregnancy-related complications. Understanding the mechanisms underlying their development is critical for appropriate prevention and management. In the presented study, levels of selected microRNAs (miR-17, miR-29a, miR-181a), cytokines gene expression (*IL-1 β* , *TNF- α* , *IL-6*, *IL-17*) and oxidative stress parameters (thiobarbituric acid reactive substances – TBARs, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine – 8-OHdG) were measured in peripheral blood samples of pregnant women with GDM or GH, and healthy pregnant women.

In GDM women significantly lower miR-29a and significantly higher *IL-1 β* expression levels were found in comparison to controls. Both parameters had sufficient diagnostic potential to discriminate between controls and GDM, while the combined use of miR-29a and *IL-1 β* showed better diagnostic potential. GH women had significantly higher *TNF- α* expression level than controls, although it does not appear to possess the potential to be used as biomarker of GH. Obtained results showed increased lipid peroxidation levels in both examined groups, while significantly higher DNA damage level was found in GDM group compared to controls. As it was shown by *in vitro* examinations, Metildopa did not have significant effect on lipid peroxidation and DNA damage parameters level. Therefore, we could assume that Metildopa did not influence measured oxidative stress parameters levels in GH women.

Cytokines gene expression levels changes and oxidative stress are involved in GDM and GH pathogenesis, while GDM also involves miRNAs expression levels changes. miR-29a and *IL-1 β* can be used as biomarkers of GDM, while TBARs can be used as biomarker for both pathological conditions.

Key words: gestational diabetes mellitus, gestational hypertension, miRNA, miR-29a, cytokine, *IL-1 β* , *TNF- α* , oxidative stress, malondialdehyde, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Genetics

Lista skraćenica

3' UTR – 3' netranslatirajući region (engl. *3' Untranslated Region*)

4-HNE – 4-hidroksinonenal

8-OHdG – 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin

8-oxodG – 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin

AGE – napredni krajnji produkti glikacije (engl. *Advanced Glycation End-products*)

AGO – argonaut protein

ALEs – krajnji produkti lipidne peroksidacije (engl. *Advanced Lipid Peroxidation End-products*)

ANCOVA – analiza kovarijanse

AT-II – angiotenzin II

AUC – engl. *Area Under the Curve*

BER – mehanizam ekscizija baza (engl. *DNA Base Excision Repair pathway*)

BH₂ – dihidrobiopterin

BH₄ – kofaktor tetrahidrobiopterin

BMI – indeks telesne mase (engl. *Body Mass Index*)

BRCA1 – engl. *breast cancer 1 protein*

CG – kontrolna grupa

CI – interval poverenja (eng. *Confidence Interval*)

DGCR8 – kritični region za Di Džordžov sindrom 8 (engl. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*)

DM2 – dijabetes tipa 2

EFNB2 – efrin-B2

ELB – pufer za lizu eritrocita (engl. *Erythrocyte Lysis Buffer*)

ELISA – enzimski imunosorbentni test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

eNOS – endotelna azot oksid sintaza

EPHB4 – efrin tip B receptor 4

ER – endoplazmatični retikulum

ET-1 – endotelin-1

FGF2 – faktor rasta fibroblasta 2 (engl. *Fibroblast Growth Factor 2*)

GAPDH – gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza

GDM – gestacijski dijabetes melitus

GH – gestacijska hipertenzija (gestacijska arterijska hipertenzija)

HDP – hipertenzivni poremećaja u trudnoći (engl. *Hypertensive Disorders of Pregnancy*)

IDO – indolamin 2,3-dioksidogenaza

IL-17 – interleukin 17

IL-1R1 – IL-1 receptor tip 1

IL-1Ra – IL-1 receptor antagonist

IL-1 β – interleukin 1 β

IL-6 – interleukin 6

IL-6R – receptor IL-6 α

Insig1 – engl. *insulin-induced gene 1*

IRS-1 – supstrat insulinskog receptora 1

IUZR – intrauterini zastoj u rastu ploda

LLB – pufer za lizu leukocita (engl. *Leukocyte Lysis Buffer*)

lncRNK – duge nekodirajuće RNK (engl. *Long Non-Coding RNA*, lncRNA)

LOOH – lipidni hidroperoksid (engl. *lipid hydroperoxides*)

MAPK – mitogenom aktivirane protein kinaze (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MCT1 – membranski monokarboksilatni transporter

MDA – malondialdehid

MGB – fluorescentna proba (engl. *Minor Groove Binder*)

miRISC kompleks – miRNK indukujući utišavajući kompleks (engl. *miRNA-Induced Silencing Complex*)

miRNK – mikroRNK

MTH1 – MutT homolog

NF- κ B – nukleusni faktor kapa B (engl. *Nuclear Factor kappa B*)

NFQ – kvenčer (engl. *Non-Fluorescent Quencher*, NFQ)

NK ćelije – engl. *Natural Killer cells*

NLRP3 – engl. *Nod-Like Receptor Protein 3*

OGG1 – 8-oksoguanin-DNK glikozilaza 1

OGTT – oralni test tolerancije na glukozu (engl. *Oral Glucose Tolerance Test*)

PCK2 – fosfoenolpiruvat karboksilaza 2

PE – preeklampsija

PKC – protein kinaza C

Pre-miRNK – prekursor miRNK

pri-miRNK – primarni miRNK transkript

PTEN – engl. *Phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten*

qPCR – kvantitativni PCR u realnom vremenu (engl. *Quantitative Real-Time PCR*)

RAGE – receptori krajnjih produkata glikacije (engl. *Receptors of Advanced Glycation End-products, RAGE*)

RET – reverzni transport elektrona (engl. *Reverse Electron Transport*)

RNS – reaktivne vrste azota (engl. *Reactive Nitrogen Species*)

ROC – engl. *Receiver Operating Characteristics*

ROS – reaktivne kiseonične vrste (engl. *Reactive Oxigene Species*)

rpm – engl. *Revolutions per Minute*

RT – reverzna transkripcija

SGK1 kinaza – engl. *Serum/Glucocorticoid regulated Kinase 1*

SOCS3 – supresor signalizacije citokina 3

SOD – superoksid dismutaza

SREBPs – sterol regulatorni element vezivanja proteina (engl. *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins*)

STAT3 – signalni transduktor i aktivator transkripcije 3 (engl. *Signal Transducers and Activators of Transcription 3*)

TAC – totalni antioksidativni kapacitet

TBA – tiobarbituratna kiselina

TBARs – reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*)

Th1, Th2, Th17 – T ćelije pomoćnice (engl. *T-helper cells*)

TNF- α – faktor nekroze tumora α

TopBP1 – topoizomeraza (engl. *Topoisomerase DNA II Binding Protein 1*)

TXNIP – engl. *Thioredoxin-interacting Protein*

VCAM-1 – adhezioni molekul vaskularnih ćelija 1 (engl. *Vascular Cell Adhesion Molecul 1*)

VEGFA – vaskularni endotelni faktor rasta A (engl. *Vascular Endothelial Growth Factor A*)

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Dijabetes i hipertenzija u trudnoći | 1 |
| 1.1.1. Gestacijski dijabetes melitus | 1 |
| 1.1.2. Gestacijska hipertenzija | 2 |
| 1.2. Potencijalni biomarkeri patoloških stanja u trudnoći | 3 |
| 1.2.1. MikroRNK | 4 |
| 1.2.1.1. hsa-miR-29a-3p | 7 |
| 1.2.1.2. hsa-miR-17-5p | 8 |
| 1.2.1.3. hsa-miR-181a-5p | 10 |
| 1.2.2. Citokini | 11 |
| 1.2.2.1. Interleukin 1 β | 13 |
| 1.2.2.2. Faktor nekroze tumora α | 14 |
| 1.2.2.3. Interleukin 6 | 15 |
| 1.2.2.4. Interleukin 17 | 15 |
| 1.2.3. Parametri oksidativnog stresa | 16 |
| 1.2.3.1. Prooksidativni i antioksidativni mehanizmi | 17 |
| 1.2.3.2. Hiperglikemija i oksidativni stres | 18 |
| 1.2.3.3. Hipertenzija i oksidativni stres | 19 |
| 1.2.3.4. Lipidna peroksidacija | 20 |
| 1.2.3.5. Oštećenja DNK molekula | 21 |
| 2. CILJEVI | 23 |
| 3. MATERIJAL I METODE | 24 |
| 3.1. Studijska grupa | 24 |
| 3.2. Određivanje nivoa ekspresije mikroRNK | 25 |
| 3.2.1. Izolacija RNK | 25 |
| 3.2.2. Reverzna transkripcija mikroRNK | 26 |
| 3.2.2.1. Poliadenilacija | 26 |
| 3.2.2.2. Ligacija adaptera | 27 |

| | |
|--|----|
| 3.2.2.3. Reverzna transkripcija..... | 27 |
| 3.2.2.4. Amplifikacija cDNK..... | 28 |
| 3.2.3. Određivanje ekspresije miRNK metodom kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu ... | 29 |
| 3.3. Određivanje nivoa genske ekspresije citokina | 30 |
| 3.3.1. Izolacija RNK | 30 |
| 3.3.2. Reverzna transkripcija RNK..... | 31 |
| 3.3.3. Određivanje genske ekspresije citokina metodom kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu | 31 |
| 3.4. Određivanje nivoa parametara oksidativnog stresa | 32 |
| 3.4.1. Određivanje nivoa lipidne peroksidacije | 32 |
| 3.4.2. Određivanje nivoa oštećenja DNK molekula | 33 |
| 3.5. <i>In vitro</i> ispitivanja uticaja leka Metildopa na nivo oksidativnog stresa | 33 |
| 3.6. Statistička obrada podataka..... | 34 |
| 4. REZULTATI | 35 |
| 4.1. Rezultati prve faze istraživanja | 35 |
| 4.1.1. Kliničke karakteristike ispitanica..... | 35 |
| 4.1.2. Ekspresija miRNK..... | 36 |
| 4.1.3. Ekspresija citokina | 38 |
| 4.1.4. Analiza prediktivnih i diskriminatorne mogućnosti miR-29a, <i>IL-1β</i> i <i>TNF-α</i> | 40 |
| 4.1.5. Analize korelacije ekspresije miR-29a i <i>IL-1β</i> kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom | 43 |
| 4.1.6. Analiza korelacije ekspresije <i>TNF-α</i> kod trudnica sa gestacijskom hipertenzijom | 44 |
| 4.2. Rezultati druge faze studije | 45 |
| 4.2.1. Kliničke karakteristike ispitanica..... | 45 |
| 4.2.2. Nivo parametara oksidativnog stresa kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom i gestacijskom hipertenzijom | 46 |
| 4.2.2.1. Nivo lipidne peroksidacije | 46 |
| 4.2.2.2. Nivo oštećenja DNK molekula..... | 47 |
| 4.2.2.3. Analiza prediktivnih i diskriminatornih mogućnosti parametara oksidativnog stresa | 48 |
| 4.2.2.4. Analiza korelacije parametara oksidativnog stresa u grupi trudnica sa gestacijskim dijabetesom | 50 |
| 4.2.2.5. Analiza korelacije lipidne peroksidacije u grupi trudnica sa gestacijskom hipertenzijom | 51 |

| | |
|--|----|
| 4.2.3. Rezultati <i>in vitro</i> ispitivanja leka Metildopa..... | 52 |
| 5. DISKUSIJA | 54 |
| 5.1. Ekspresija miRNK kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom i gestacijskom hipertenzijom | 54 |
| 5.2. Ekspresija citokina kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom i gestacijskom hipertenzijom | 57 |
| 5.3. Oksidativni stres kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom i gestacijskom hipertenzijom.... | 60 |
| 5.4. Efekat leka Metildopa na nivo oksidativnog stresa <i>in vitro</i> | 62 |
| 6. ZAKLJUČCI | 64 |
| 7. LITERATURA | 65 |
| 8. PRILOZI..... | 81 |

1. UVOD

1.1. Dijabetes i hipertenzija u trudnoći

Trudnoća predstavlja kompleksan fiziološki proces u čijoj osnovi leži veliki broj različitih biohemijskih promena. Za njen normalan tok neophodan je adekvatan balans biološki značajnih molekula, poput hormona, regulatornih proteina, medijatora inflamacije i nekodirajućih RNK koje imaju ulogu regulatora genske ekspresije (Sharma i sar, 2022). Takođe, održavanje stabilnosti genoma i oksidativnog stresa na fiziološkom nivou predstavljaju neke od glavnih preduslova za povoljan ishod trudnoće. Narušavanje odgovarajućih nivoa navedenih molekula i procesa u koje su uključeni može dovesti do razvoja širokog spektra komplikacija u trudnoći što neretko ima nepovoljan uticaj kako na dalji tok trudnoće, tako i na dugoročno zdravlje majke i fetusa. Dijabetes melitus i hipertenzija u trudnoći su neke od najčešćih komplikacija u perinatalnom periodu i predstavljaju značajan uzrok maternalnog i fetalnog morbiditeta i mortaliteta (ACOG Practice Bulletin, 2020; Wang i sar, 2022), te je razumevanje bioloških procesa koji ih karakterišu od izuzetnog značaja za razvoj adekvatnih mera prevencije i lečenja u cilju sprečavanja mogućih neželjenih posledica.

1.1.1. Gestacijski dijabetes melitus

Gestacijski dijabetes melitus (GDM) predstavlja poremećaj tolerancije glukoze koji se prvi put detektuje u trudnoći, a čija globalna standardizovana prevalenca iznosi 14% (Pheiffer i sar, 2018; Wang i sar, 2022). Iako korišćenje različitih testova za detekciju GDM-a, kao i različitih dijagnostičkih kriterijuma značajno otežava procenu učestalosti ovog poremećaja, jasno je da GDM predstavlja jedan od najčešćih poremećaja u trudnoći sa učestalošću koja je u stalnom porastu (Wang i sar, 2022).

Trudnoća u kasnijoj životnoj dobi žene, etnička pripadnost, GDM u prethodnoj trudnoći, istorija dijabetesa tipa 2 u porodici, gojaznost (BMI>25), konzumacija cigareta, slaba fizička aktivnost pre i u toku trudnoće i genetička predispozicija predstavljaju faktore rizika za razvoj dijabetesa u trudnoći (McIntyre i sar, 2019).

Poznato je da su dva glavna uzroka razvoja GDM-a insulinska rezistencija i hronična subklinička inflamacija. Insulinska rezistencija nastaje usled smanjene sekrecije insulina od strane β ćelija pankreasa i neadekvatnog odgovora tkiva na insulin (Vrachnis i sar, 2012). Tokom normalne trudnoće, usled produkcije hormona rasta, kortikotropina, laktogena i progesterona u placenti, raste rezistencija na insulin, a ukoliko se insulin ne produkuje u dovoljnoj količini da nadomesti porast insulinske rezistencije dolazi do razvoja gestacijskog dijabetesa (Ibarra i sar, 2018). S druge strane, inflamatorni procesi u trudnoći mogu dovesti do poremećaja glikemije. Dva glavna inflamatorna puta kod GDM-a su NF- κ B (engl. *nuclear factor kappa B*) i STAT3 (engl. *signal transducers and activators of transcription 3*) koji regulišu ekspresiju proinflamatornih i antiinflamatornih citokina i inflamatorni odgovor (Mendonça i sar, 2022). Citokini, IL-1 β , IL-6 i TNF- α , učestvuju u pokretanju kanonskog puta aktivacije NF- κ B, dok je IL-6 uključen u razvoj insulinske rezistencije preko STAT3 puta. Ne samo da se aktivacijom navedenih puteva pojačava inflamatorno stanje, već se pospešuje razvoj insulinske rezistencije i pogoršava hiperglikemija usled čega dolazi do razvoja GDM-a (Mendonça i sar, 2022).

Kod trudnica sa GDM-om homeostaza glukoze se u najvećem broju slučajeva ponovo uspostavlja nedugo nakon porođaja (Pheiffer i sar, 2018). Međutim, hiperglikemija u trudnoći može dovesti do različitih perinatalnih komplikacija, kao što su makrozomija, prevremeni porođaj, preeklampsija i neonatalna hipoglikemija (Jensen i sar, 2003; Metzger i sar, 2008). Pokazano je da su navedene komplikacije češće kod trudnica kod kojih je nivo glukoze u drugom satu oralnog testa tolerancije na glukozu (engl. *Oral Glucose Tolerance Test*, OGTT) $\geq 11,1$ mmol/l, kao i da se navedene negativne posledice GDM-a mogu preduprediti adekvatnim lečenjem i regulisanjem maternalnog nivoa glukoze u krvi u toku trudnoće (Jensen i sar, 2003; McIntyre i sar, 2019).

Takođe, GDM povećava rizik za različita oboljenja koja se mogu javiti kasnije tokom života majke i njenih potomaka. Pokazano je da deca iz GDM trudnoća imaju viši rizik za gojaznost, razvoj metaboličkog sindroma i dijabetes tipa 2 (DM2) od dece čije majke nisu imale dijabetes u trudnoći (Clausen i sar, 2008; Clausen i sar, 2009). Za razliku od perinatalnih komplikacija koje se mogu javiti kao posledica gestacijskog dijabetesa, dosadašnja istraživanja, iako malobrojna, pokazala su da adekvatno lečenje ovog poremećaja nema uticaja na dugoročne komplikacije koje se mogu javiti kod dece iz GDM trudnoća (McIntyre i sar, 2019). Pored navedenog, žene koje su u trudnoći imale GDM imaju sedam puta viši rizik da kasnije tokom života razviju dijabetes melitus tipa 2 u odnosu na zdrave trudnice (Bellamy i sar, 2009). Povišen indeks telesne mase (engl. *body mass index*, BMI), razvoj GDM-a rano u trudnoći, viši nivoi glukoze u krvi u trenutku postavljanja dijagnoze GDM-a, potreba za lečenjem insulinom i poremećaj tolerancije glukoze nakon porođaja predstavljaju faktore rizika za kasniji razvoj dijabetesa kod žena koje su imale GDM (McIntyre i sar, 2019). Takođe, GDM za posledicu ima povišen rizik za kasniji razvoj kardiovaskularnih oboljenja (Kramer i sar, 2019). Brojna istraživanja su pokazala da su pravovremena detekcija ovog poremećaja i adekvatna terapija od izuzetnog značaja, a sve u cilju poboljšanja ishoda trudnoće i zdravlja majke i deteta.

Dijagnoza gestacijskog dijabetesa postavlja se korišćenjem oralnog testa tolerancije na glukozu koji se savetuje svim trudnicama između 24. i 28. nedelje gestacije. Do danas nije razvijen adekvatan rani skrining test koji bi omogućio detekciju žena koje će kasnije u trudnoći razviti GDM. Dalje studije neophodne su kako bi se rasvetlili metabolički putevi i molekularni mehanizmi koji leže u osnovi ovog poremećaja, u cilju bolje prevencije, tretmana, identifikacije biomarkera GDM-a i eventualnog razvoja adekvatnog skrining testa.

1.1.2. Gestacijska hipertenzija

Gestacijska hipertenzija (gestacijska arterijska hipertenzija, GH) zajedno sa preeklampsijom (PE), superponiranom preeklampsijom i hroničnom hipertenzijom čini grupu hipertenzivnih poremećaja u trudnoći (engl. *Hypertensive Disorders of Pregnancy*, HDP) (Metoki i sar, 2022). GH predstavlja povišen krvni pritisak (sistolni pritisak ≥ 140 i/ili dijastolni pritisak ≥ 90 mm Hg) bez proteinurije (< 300 mg/24 h) koji je detektovan prvi put nakon 20. nedelje trudnoće u dva merenja sa minimum 4 sata razmaka (Lo i sar, 2020). Teži oblici gestacijske hipertenzije podrazumevaju sistolni krvni pritisak ≥ 160 mm Hg i/ili dijastolni krvni pritisak ≥ 110 mm Hg (ACOG Practice Bulletin, 2020). GH, za razliku od PE, karakteriše odsustvo znakova disfunkcije organa (ACOG Practice Bulletin, 2020; Beech i Mangos, 2021). Poremećaj je prisutan u 1-6% trudnoća (Lo i sar, 2020). Prekomerna težina, gojaznost i dijabetes predstavljaju neke od faktora rizika za razvoj gestacijske hipertenzije (Riise i sar, 2018).

Krvni pritisak trudnica sa GH najčešće se normalizuje u prvih dvanaest nedelja nakon porođaja, a ukoliko u tom periodu ne dođe do regulisanja krvnog pritiska potrebno je razmotriti revidiranje dijagnoze u primarnu ili sekundarnu hipertenziju (Beech i Mangos, 2021). Iako je ishod trudnoća sa GH u najvećem broju slučajeva povoljan, gestacijska hipertenzija se dovodi u vezu sa

različitim komplikacijama koje se mogu javiti u kasnoj trudnoći. GH u do 50% slučajeva progredira u preeklampsiju uz prateću proteinuriju i disfunkciju organa majke, te je strogi nadzor trudnica sa GH neophodan. Pogoršanje kliničke slike i razvoj preeklampsije uglavnom se dešavaju tokom prve tri nedelje nakon postavljanja dijagnoze GH, a češći su kod trudnica kod kojih je GH dijagnostikovano pre 32. nedelje gestacije (ACOG Practice Bulletin, 2020). Pored navedenog, trudnice sa GH imaju povišen rizik za razvoj eklampsije, HELLP sindroma, abrupciju placente, smanjen rast ploda, prevremeni porođaj i mrtvorođenost (Riise i sar, 2018; ACOG Practice Bulletin, 2020). Takođe, različita oboljenja koja se mogu javiti kasnije u životu majke češće se dešavaju kod trudnica sa GH nego kod zdravih trudnica. Tako, GH u prvoj trudnoći 1,8 puta povećava rizik za razvoj kardiovaskularnih oboljenja majke, a ukoliko je GH spregnut sa zastojem u rastu ploda i/ili prevremenim porođajem rizik se povećava na 2,6 puta u odnosu na trudnice bez hipertenzivnih poremećaja (Riise i sar, 2018). Rizik za razvoj kardiovaskularnih oboljenja viši je kod trudnica koje su imale GH u dve ili samo u drugoj trudnoći u odnosu na one sa GH samo u prvoj trudnoći. Pokazano je da su rizici za razvoj kardiovaskularnih oboljenja slični kod trudnica koje su u prvoj ili drugoj trudnoći imale GH kao kod onih koje su imale PE (Riise i sar, 2018), što dodatno ukazuje na težinu poremećaja i potrebu za strogim i dugoročnim praćenjem žena sa istorijom gestacijske hipertenzije.

Nekoliko studija ukazuje na zajedničke mehanizme različitih tipova hipertenzije u trudnoći, koji uključuju inflamaciju, oksidativni stres i endotelnu disfunkciju (Kurlak i sar, 2014; Phoswa, 2019; Gencheva i sar, 2022). Oksidativni stres rezultuje smanjenom perfuzijom placente, endotelnom disfunkcijom i pojačanim inflamatornim procesima kod majke, te se smatra glavnim uzročnikom razvoja GH i PE (Phoswa, 2019). Endotelna disfunkcija predstavlja poremećaj koji se definiše smanjenom vazodilatacijom uz favorizovanje proinflamatornog okruženja i stanja tromboze, što vodi pojačanoj inflamaciji u vaskularnom tkivu (Rodrigo i sar, 2011). Prethodna saznanja ukazuju da se parametri oksidativnog stresa ne razlikuju između gestacijske hipertenzije i preeklampsije (Kurlak i sar, 2014). Kako su navedeni mehanizmi zajednički za GH i PE dugo se debatovalo da li su to različiti spektri jednog poremećaja ili dva odvojena entiteta. Danas je poznato da metaboličke i molekularne promene koje leže u njihovoj osnovi nisu u potpunosti iste, te da se radi o dva različita patološka stanja. Međutim, većina dosadašnjih istraživanja obuhvatala su više tipova hipertenzivnih poremećaja u trudnoći ili samo PE, te su studije koje ispituju isključivo GH neophodne kako bi se napravila jasna distinkcija između različitih hipertenzivnih poremećaja u trudnoći, razjasnila patogeneza gestacijske hipertenzije i unapredile metode njene prevencije i lečenja.

1.2. Potencijalni biomarkeri patoloških stanja u trudnoći

Rana detekcija žena sa visokim rizikom za razvoj različitih komplikacija u trudnoći mogla bi poboljšati ishode trudnoće i dugoročno zdravlje majki i njihovih potomaka. Do danas nije identifikovan adekvatan biomarker koji bi dovoljno rano u trudnoći uz visoku specifičnost i senzitivnost detektovao trudnice sa povišenim rizikom za razvoj GDM-a ili GH-e. Idealan biomarker bio bi onaj koji bi omogućio detekciju visokorizičnih trudnica već u prvom trimestru trudnoće, u periodu kada se radi skrining na fetalne aneuploidije (Mavreli i sar, 2021). Uz to, potrebno je da ovaj marker bude lako dostupan uz minimalno invazivne procedure poput uzorkovanja periferne krvi i da se za njegovo merenje mogu koristiti standardizovane laboratorijske metode, relativno brze, jednostavne i ekonomski isplative (Mavreli i sar, 2021).

Kako u razvoju dijabetesa i hipertenzije u trudnoći učestvuje veći broj međusobno umreženih patofizioloških procesa, za odabir adekvatnog biomarkera neophodno je razumevanje molekularnih mehanizama koji leže u njihovoj osnovi, te su potrebne studije sa većim studijskim grupama koje ispituju različite domene nastanka ovih poremećaja. Oksidativni stres zauzima značajno mesto u ispitivanjima dijabetesa i hipertenzije u trudnoći. Nekoliko studija pokazalo je da je nivo oksidativnog

stresa povišen kod žena sa poremećajem hiperglikemije ili krvnog pritiska u trudnoći (Draganovic i sar, 2016; Li i sar, 2016). Jedan od nedostataka dosadašnjih istraživanja je što obuhvataju veliki broj različitih parametara te su rezultati često neadekvatni za poređenje. Stoga Drejza i saradnici (2022) preporučuju uvođenje univerzalnog seta markera koji bi se ispitivali, a među kojima bi bili 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin i malondialdehid kao glavni parametri za procenu nivoa oksidativnog oštećenja DNK i lipida.

Imunološki status predstavlja još jedan aspekt značajan kako za normalne trudnoće, tako i one praćene razvojem različitih komplikacija. Nivo citokina u perifernoj krvi odražava različite imunološke procese u organizmu, pa se merenje istih koristi u ispitivanjima inflamatornog statusa trudnice, imunoloških poremećaja, fetalnog stresa i perinatalnih komplikacija (Gelen i sar, 2017; Slijivancanin Jakovljevic i sar, 2019; Jarmund i sar, 2021).

Pored gore navedenog, poslednjih godina studije koje ispituju nekodirajuće RNK, među kojima su male nekodirajuće mikroRNK (engl. *microRNA*, miRNK) i duge nekodirajuće RNK (engl. *long non-coding RNA*, lncRNK), daju obećavajuće rezultate kada je u pitanju identifikacija markera različitih patoloških stanja u trudnoći (Munjas i sar, 2021; Gao i sar, 2023). Stabilnost miRNK glavna je prednost ovih molekula u odnosu na većinu drugih potencijalnih biomarkera, a smatra se da bi u budućnosti miRNK mogli imati i terapijski značaj (Mavreli i sar, 2021).

Iako se poslednjih godina sve veći broj studija bavi ispitivanjem perinatalnih komplikacija i biomarkera koji ih karakterišu, dinamičke promene na molekularnom nivou i ćelijski procesi koji dovode do razvoja i progresije ovih komplikacija još uvek nisu u potpunosti jasni.

1.2.1. MikroRNK

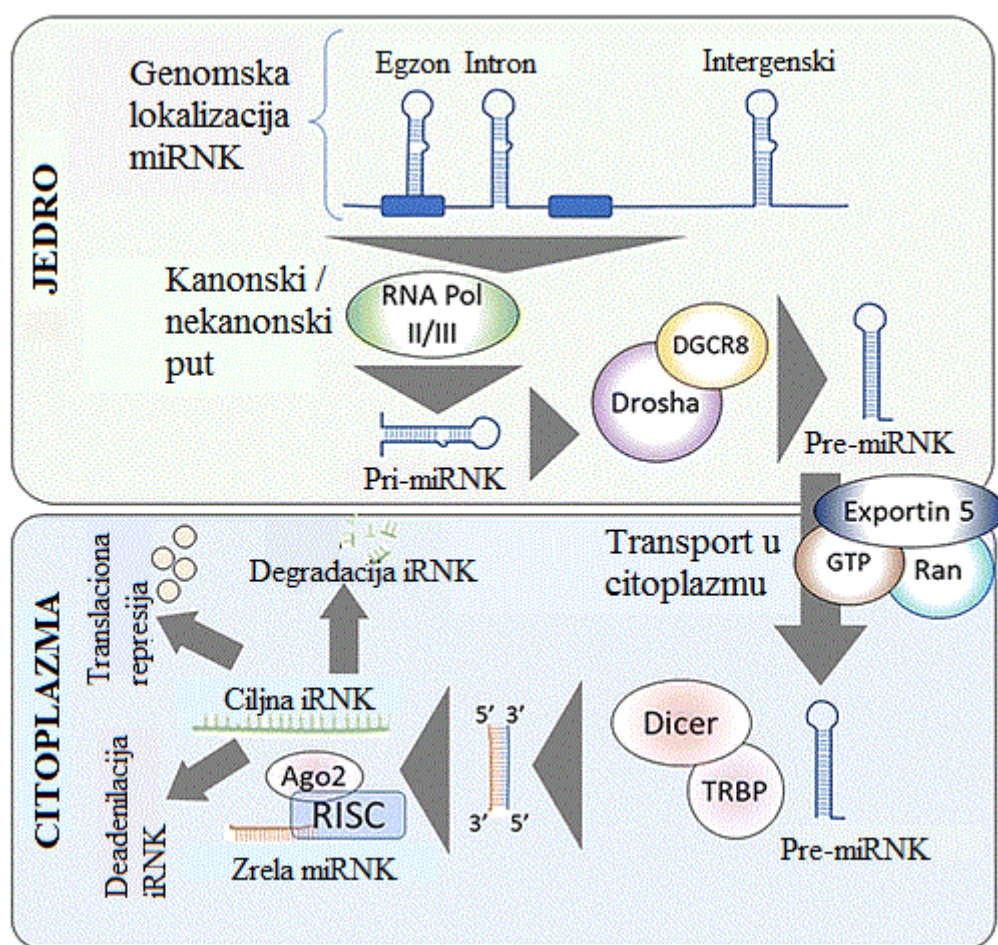
MikroRNK predstavljaju male, nekodirajuće, visoko evoluciono očuvane RNK molekule koji se sastoje od 18 do 25 nukleotida (Moura i sar, 2014). Imaju ulogu u regulaciji genske ekspresije na posttranskripcionom nivou. Svoju aktivnost postižu vezivanjem za 3' netranslatirajući region (engl. *3' untranslated region*, 3' UTR) ciljne informacione RNK (iRNK) što dovodi do njene degradacije ili sprečavanja translacije, a oba mehanizma za posledicu imaju smanjenje nivoa proteina (Pheiffer i sar, 2018). Dosadašnja istraživanja pokazuju da je degradacija iRNK dominantni mehanizam dejstva miRNK (Guo i sar, 2010).

Oko 50% gena za miRNK nalazi se u intronima protein kodirajućih gena, dok se manji broj miRNK prepisuje sa egzonskih sekvenci protein kodirajućih gena. Preostali geni za miRNK pripadaju intergenskim delovima DNK molekula, imaju svoje promotore i nezavisno se prepisuju. Postoje i familije miRNK koje se prepisuju zajedno u vidu jednog dugog transkripta (O'Brien i sar, 2018). Biogeneza miRNK započinje u jedru sintezom primarnog miRNK transkripta (pri-miRNK) uz pomoć RNK polimeraze II kod kanonskog puta biogeneze miRNK, odnosno RNK polimeraze III u slučaju nekanonskog puta (Dalgaard i sar, 2022) (slika 1). Najveći broj miRNK sintetise se kanonskim putem tokom kog ribonukleaza III, Drosha, u kompleksu sa RNK vezujućim proteinom DGCR8 (engl. *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) od pri-miRNK produkuje prekursor miRNK (pre-miRNK) dužine oko 70 nukleotida. Pre-miRNK se zatim transportuje u citoplazmu pomoću Exportin-5/Ran-GTP kompleksa. Nakon toga, RNaza III endonukleaza pod nazivom Dicer zajedno sa TRBP iseca petlju i prevodi pre-miRNK u kratku dvolančanu RNK. Argonaut (AGO, kod čoveka AGO1-4) protein potom vezuje jedan od dva lanca iz miRNK dupleksa i to najčešće onaj čiji je 5' kraj termodinamički manje stabilan ili koji na 5' kraju ima uracil. Ovaj lanac će na kraju predstavljati zreli miRNK, te se naziva vodeći lanac (engl. *guide strand*). Drugi, komplementaran ili delimično komplementaran lanac, koji se naziva i lanac putnik (engl. *passenger strand*), ubrzo biva degradovan

(O'Brien i sar, 2018). miRNK zajedno sa AGO proteinom čini miRNK-indukovani utišavajući kompleks (engl. *miRNA-induced silencing complex*, miRISC kompleks) u okviru kog miRNK ostvaruje svoju funkciju.

Nekanonski put biogeneze miRNK može biti Drosha/DGCR8-nezavisan ili Dicer-nezavisan. Jedan od primera Drosha/DGCR8-nezavisnog puta su pre-miRNK koje nastaju isecanjem introna iz iRNK tokom splajsovanja, a nazivamo ih mirtroni. Dicer-nezavisan put predstavlja biogenezu miRNK od RNK transkripata koji imaju strukturu kratke ukosnice, te nemaju dovoljnu dužinu da bi predstavljali supstrat za Dicer, a njihovu biogenezu finalizuje AGO2 protein (O'Brien i sar, 2018).

Nazivi miRNK uključuju prefiks koji se sastoji iz tri slova, a koji označava vrstu ("hsa" za čoveka), zatim "miR" gde veliko "R" označava da se radi o zreloj miRNK. Ukoliko je "mir" navedeno malim slovima odnosi se na ime gena (i tada se navodi u italiku), pri-miRNK ili pre-miRNK. Nakon navedenih oznaka sledi broj koji je specifičan za određenu miRNK, a zatim se navodi oznaka koja ukazuje od kog lanca kratke dvolančane RNK je nastala miRNK (3' ili 5') (McDonald i Ajit, 2015). Radi lakšeg navođenja u daljem tekstu biće korišćeni skraćeni oblici naziva za miRNK, bez oznake za vrstu i lanac, te će na primer hsa-miR-29a-3p biti označena kao miR-29a.



Slika 1. Šematski prikaz biogeneze miRNK. Preuzeto i prilagođeno prema Dalgaard i sar, 2022.

Otkriće miRNK 1993. godine kod *Caenorhabditis elegans* (Lee i sar, 1993) značajno je izmenilo dotadašnje poglede na regulaciju genske ekspresije. Kod čoveka je do sada poznato preko 2000 miRNK, od kojih svaka može regulisati do 200 različitih gena. Smatra se da miRNK regulišu

preko 30% genoma (Dias i sar, 2018; Pheiffer i sar, 2018). Zahvaljujući svom širokom spektru dejstva miRNK imaju značajnu ulogu u regulaciji različitih ćelijskih procesa uključujući proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu (Pheiffer i sar, 2018).

Pokazano je da čak i male promene u funkcionisanju miRNK mogu dovesti do velikog broja fizioloških promena i posledičnog razvoja različitih bolesti. Nekoliko studija pokazalo je da miRNK imaju izmenjenu ekspresiju kod komplikacija koje se javljaju u trudnoći (Zhao i sar, 2011; Munaut i sar, 2016; Khaliq i sar, 2018). Cirkulišuće miRNK u perifernoj krvi trudnica pretežno su placentnog porekla (Abdelazim i sar, 2022). miRNK se u perifernu krv majke oslobađaju u okviru egzozoma, drugih ekstracelularnih vezikula, apoptotskih tela ili u kompleksu sa lipidima ili proteinima, te ih odlikuje visoka stabilnost (Dias i sar, 2018; Pheiffer i sar, 2018). Uz to se jednostavno i brzo mogu izolovati iz seruma ili plazme, što je razlog sve većeg interesovanja za miRNK kao potencijalne biomarkere različitih komplikacija u trudnoći. Pored toga, njihova ekspresija se lako može odrediti korišćenjem kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu (engl. *quantitative real-time PCR*, qPCR), brzom metodom visoke senzitivnosti i specifičnosti (Pheiffer i sar, 2018).

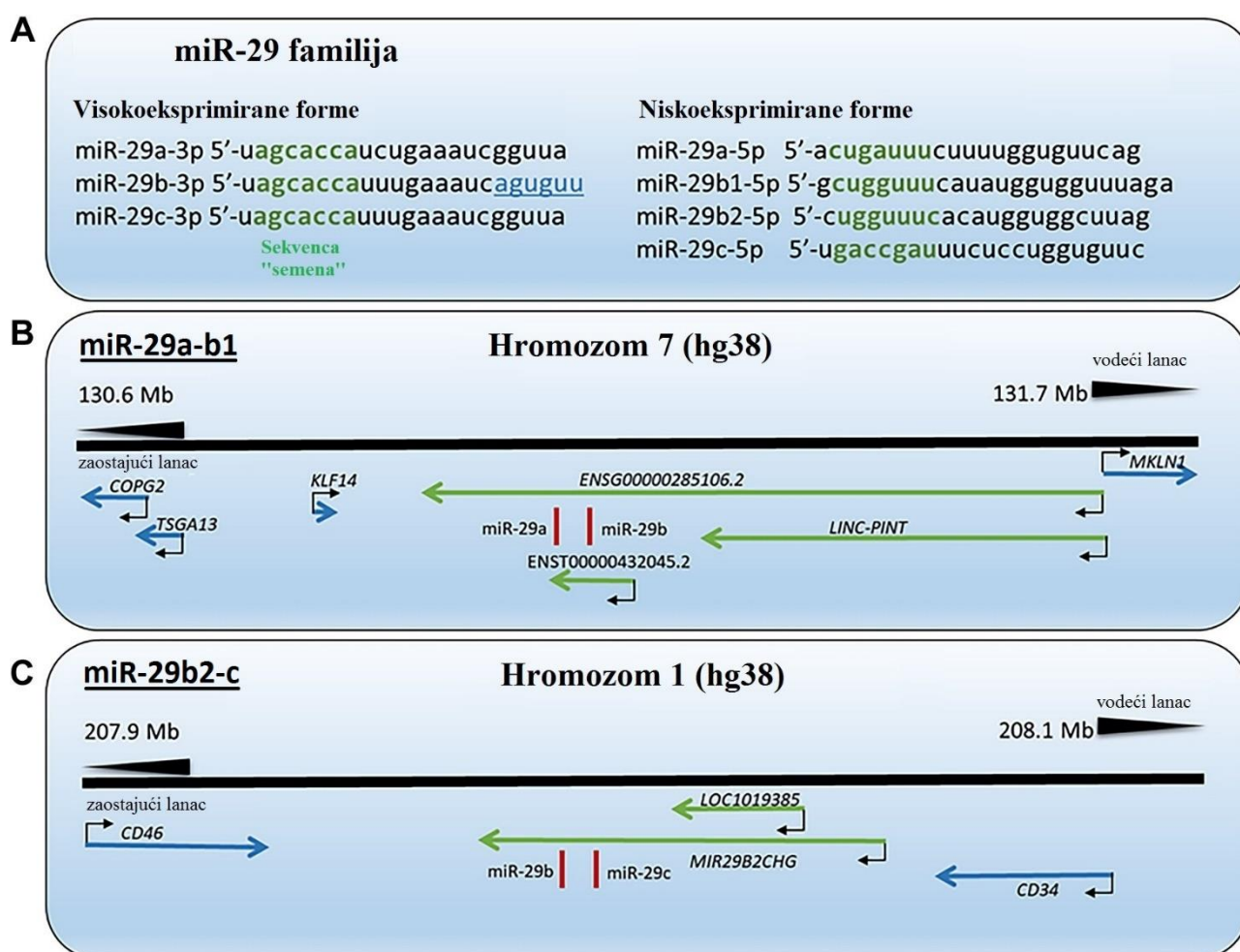
Smatra se da miRNK imaju tkivno-specifičnu ekspresiju, a kako se miRNK koje proizvode placenta oslobađaju u krvotok majke, analiza miRNK iz majčine krvi ima veliki potencijal u ispitivanjima placentalne disfunkcije koja karakteriše hipertenzivne poremećaje trudnoće. Poznato je da normalizacija nivoa miRNK ima ulogu u sprečavanju ili lečenju različitih bolesti poput dijabetesa, te ovi molekuli, pored dijagnostičkog, imaju i terapijski potencijal (Regazzi, 2018). Takođe, nekoliko studija je pokazalo da detekcija promene nivoa ekspresije miRNK može imati i prognostički značaj (Pheiffer i sar, 2018). Ipak, kako svaka miRNK reguliše ekspresiju velikog broja gena, određena miRNK može biti uključena u razvoj više različitih poremećaja i oboljenja, stoga je moguće da bi istovremeno korišćenje više različitih markera povećalo njihov pojedinačni prediktivni značaj (Dias i sar, 2018).

Sve veći broj studija zasniva se na ispitivanju miRNK kao potencijalnih biomarkera komplikacija koje se javljaju u trudnoći. Iako ovi molekuli za sada imaju veliki dijagnostički potencijal kada je u pitanju detekcija trudnica sa povišenim rizikom za razvoj dijabetesa i hipertenzije u trudnoći, dosadašnji rezultati su prilično heterogeni i neadekvatni za poređenje za šta postoji nekoliko mogućih razloga (Ibarra i sar, 2018):

1. različita vrsta analiziranog biološkog materijala. Čak i kada je u pitanju samo periferna krv kao izvor ispitivanih miRNK pristup u ispitivanjima je dosta različit, pa tako neke studije koriste plazmu ili serum, dok je u drugim korišćena puna krv za dalja ispitivanja;
2. postojanje značajnih razlika između studija u veličini ispitivane grupe;
3. postojanje razlika između studija u periodu gestacije kada su prikupljeni uzorci. Kako miRNK ekspresija varira tokom trudnoće nisu sve studije adekvatne za međusobno poređenje;
4. faktori poput pola fetusa, BMI i prirode porođaja mogu uticati na dobijene rezultate;
5. kriterijumi za postavljanje odgovarajuće dijagnoze, npr. gestacijskog dijabetesa, mogu se razlikovati među studijama, a samim tim i selekcija ispitanika;
6. odabir metode izolacije i endogene kontrole korišćene za normalizaciju su od ključnog značaja za adekvatnu postavku eksperimenta i dobijanje validnih rezultata. Adekvatna endogena kontrola se može razlikovati za različite vrste tkiva.

1.2.1.1. hsa-miR-29a-3p

Gen za hsa-miR-29a-3p (u daljem tekstu miR-29a) nalazi se na hromozomu 7, u regionu q32.3, pripada miR-29 familiji i transkribuje se zajedno sa miR-29b-1 (Kriegel i sar, 2012). miR-29 familija obuhvata sedam zrelih miRNK, od kojih tri predstavljaju visoko eksprimirane, glavne (engl. *major*) forme (hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-29b-3p i hsa-miR-29c-3p), dok je ekspresija preostale četiri značajno niža, te ih nazivamo “minor” formama (hsa-miR-29a-5p, hsa-miR-29b1-5p, hsa-miR-29b2-5p i miR-29c-5p). Familija miR-29 je u potpunosti evoluciono očuvana među sisarima, a sve “major” forme imaju identične ključne regione, takozvane sekvence “semena” (engl. “*seed sequence*”), zbog čega im je većina ciljnih gena zajednička, što nije slučaj sa “minor” formama. Sve miRNK ove familije se prepisuju sa dva klastera: miR-29a-b1 koji je u humanom genomu lokalizovan na hromozomu 7, i miR-29b2-c, lokalizovanog na hromozomu 1 (Dalgaard i sar, 2022) (slika 2).



Slika 2. miR-29 familija kod čoveka. (A) Sekvence zrelih miRNK. (B) Genomska lokalizacija klastera 1, *miR-29a-b1*. Sa klastera 1 prepisuju se miR-29a i miR-29b1. (C) Genomska lokalizacija klastera 2, *miR-29b2-c*. Sa klastera 2 prepisuju se miR-29b2 i miR-29c. Preuzeto i prilagođeno prema Dalgaard i sar, 2022.

Iako predstavlja jednu od najčešće ispitivanih miRNK kod dijabetesa tipa 2 i GDM-a (Deng i sar, 2020; Sørensen i sar, 2021; Dalgaard i sar, 2022), dosadašnji rezultati su oprečni, verovatno usled korišćenja različitih vrsta uzoraka i male grupe ispitanika. Smatra se da miR-29a učestvuje u normalnom funkcionisanju β-ćelija pankreasa, zatim sekreciji i signalnim putevima insulina (Pullen

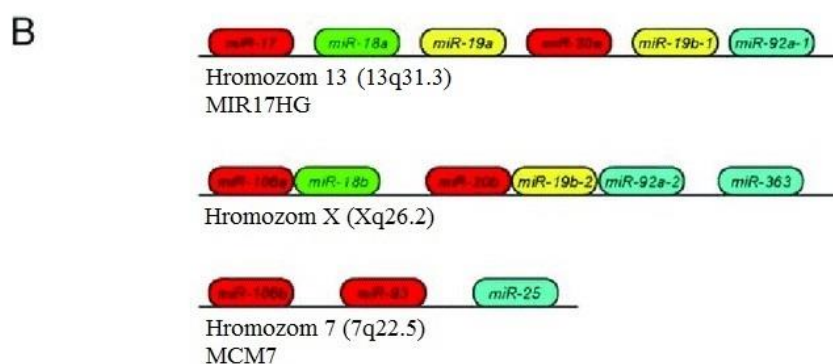
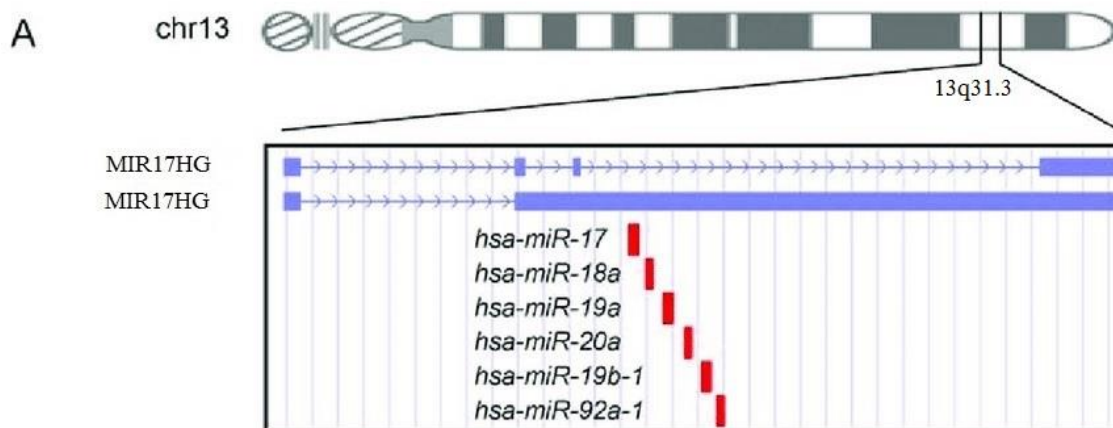
i sar, 2011; Dooley i sar, 2016). Pokazano je da se miR-29a i miR-29b vezuju za 3'UTR region iRNK membranskog monokarboksilatnog transportera (MCT1) kod ljudi i miševa, što za posledicu ima smanjenje ekspresije MCT1 proteina. Promena ekspresije *MCT1* može uticati na sekreciju insulina od strane β -ćelija, a regulacija ekspresije ovog gena egzogenim miRNK predložena je za mogući terapijski pristup kod dijabetesa tipa 2 (Pullen i sar, 2011).

Pored moguće uloge u nastanku dijabetesa, nekoliko studija je ukazalo na izmenjenu ekspresiju miR-29a kod hipertenzivnih poremećaja u trudnoći (Li i sar, 2013; Khaliq i sar, 2018). Takođe, pokazana je veza između miR-29a i vaskularne disfunkcije koja se javlja kod trudnica sa GH i PE. Naime, endotelna funkcija, placentna angiogeneza i vazodilatacija su strogo regulisani faktorima rasta koji predstavljaju ciljne gene miR-29a/c, kao što su vaskularni endotelni faktor rasta A (engl. vascular endothelial growth factor A, *VEGFA*) i faktor rasta fibroblasta 2 (engl. *fibroblast growth factor*, *FGF2*). *VEGFA* i *FGF2* regulišu ćelijske procese aktivacijom različitih protein kinaza, uključujući AKT1, a njihova ekspresija u placenti značajno je izmenjena kod hipertenzivnih poremećaja poput preeklampsije. Pokazano je da u odsustvu miR-29a/c dolazi do inhibicije FGF2-zavisne fosforilacije AKT1 u endotelnim ćelijama umbilikalne vene. Takođe, inhibira se FGF2- i VEGFA-zavisna migracija endotelnih ćelija, što ukazuje na proangiogenu ulogu miR-29a/c i njenu verovatno ključnu ulogu u endotelnoj disfunkciji u PE (Zhou i sar, 2017).

1.2.1.2. hsa-miR-17-5p

hsa-miR-17-5p (u daljem tekstu miR-17) pripada policistronskom miR-17-92 klasteru koji je kodiran genom *MIR17HG*, a koji se u humanom genomu nalazi na hromozomu 13 u regionu q31.3. Sa miR-17-92 klastera se istovremeno prepisuje šest različitih zrelih miRNK: hsa-miR-17, hsa-miR-18a, hsa-miR-19a, hsa-miR-20a, hsa-miR-19b-1 i hsa-miR-92a-1 (Dal Bo i sar, 2015). Na osnovu sekvence "semena", ovih šest miRNK je podeljeno u četiri familije, tako da miR-17 i miR-20a pripadaju miR-17 familiji (Wang i sar, 2012). Na suprotnom lancu DNK kodirane su miRNK koje su komplementarne prekursorima gore navedenih miRNK. Zatim, postoje i dva paraloga ovog klastera, miR-106a-363 na hromozomu X i klaster miR-106b-25 na hromozomu 7 u okviru kojih postoje miRNK homologe onim iz miR-17-92 klastera. Ostali članovi miR-17 familije kodirani su u okviru jednog od navedenih paraloga (Dal Bo i sar, 2015) (slika 3).

miR-17 je placentno specifična miRNK koja reguliše diferencijaciju, angiogenezu i apoptozu trofoblastnih ćelija, te njena aberantna regulacija dovodi do poremećaja razvoja placentne (Abdelazim i sar, 2022). Bioinformatičke predikcije ukazuju da su među ciljnim genima miR-17 geni koji kodiraju VEGFA, efrin tip B receptor 4 (*EPHB4*) i efrin-B2 (*EFNB2*), a koji imaju važnu ulogu u placentaciji (Wang i sar, 2012). Mogući mehanizam dejstva kod pacijentkinja sa PE, a za koje je poznato da imaju povišene nivoe miR-17, zasniva se na tome da prekomerna ekspresija miR-17 dovodi do inhibicije ekspresije *EFNB2* i *EPHB4*, što sprečava invaziju trofoblastnih ćelija i adekvatnu vaskularizaciju (Wang i sar, 2012). Takođe, povišen nivo miR-17 ima negativan efekat na ekspresiju *VEGFA* što može dovesti do poremećaja angiogeneze (Abdelazim i sar, 2022). Navedeni mehanizmi jasno ukazuju na moguće razloge postojanja poremećaja razvoja placentne koji se javljaju kod trudnica sa HDP.



C

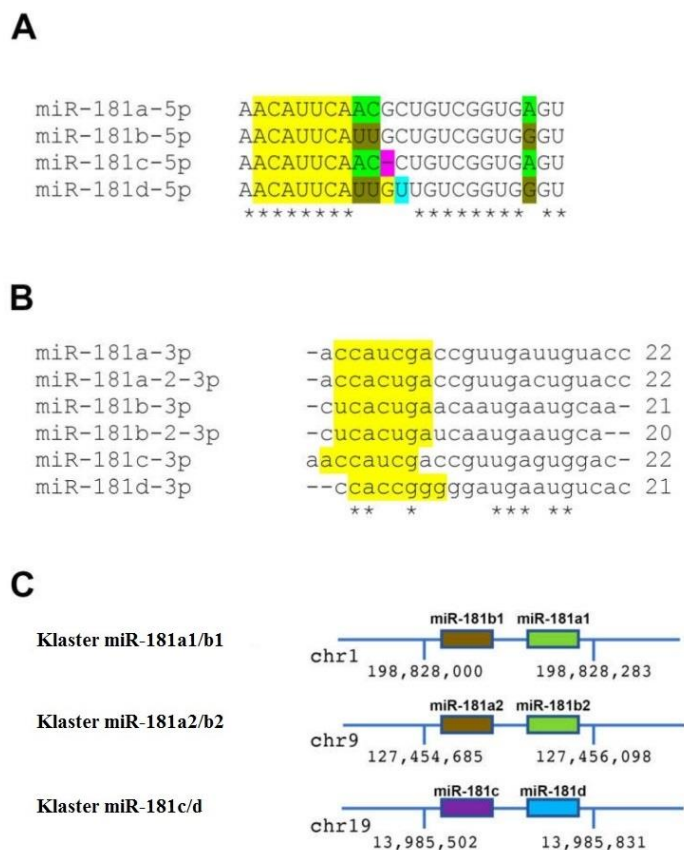
| | | | |
|-----------------|---------------------|----|---|
| miR-17 familija | <i>miR-17-5p</i> | 14 | - caaagug cuuacagugcagguag - 36 |
| | <i>miR-20a-5p</i> | 8 | - uaagug cuuuagugcagguag - 30 |
| | <i>miR-106a-5p</i> | 13 | - aaaagug cuuacagugcagguag - 35 |
| | <i>miR-20b-5p</i> | 6 | - caaagug cucauagugcagguag - 28 |
| | <i>miR-106b-5p</i> | 12 | - uaagug cugacagugcagau - 32 |
| | <i>miR-93-5p</i> | 11 | - caaagug cuguucgugcagguag - 33 |
| miR-18 familija | <i>miR-18a-5p</i> | 6 | - uaaggug caucuagugcagauag - 28 |
| | <i>miR-18b-5p</i> | 6 | - uaaggug caucuagugcaguuag - 28 |
| miR-19 familija | <i>miR-19a-3p</i> | 49 | - ugugcaa aucuauugcaaaacuga - 71 |
| | <i>miR-19b-1-3p</i> | 54 | - ugugcaa auccaugcaaaacuga - 76 |
| | <i>miR-19b-2-3p</i> | 62 | - ugugcaa auccaugcaaaacuga - 84 |
| miR-92 familija | <i>miR-92a-1-3p</i> | 48 | - uaugca cuuguccggccugu - 69 |
| | <i>miR-92a-2-3p</i> | 48 | - uaugca cuuguccggccugu - 69 |
| | <i>miR-363-3p</i> | 50 | - aaugca cgguauccaucugua - 71 |
| | <i>miR-25-3p</i> | 52 | - caugca cuugucggucuga - 73 |

Slika 3. miR-17-92 klaster kod čoveka. (A) Genomska lokalizacija miR-17-92 klastera (gen *MIR17HG*). Dva transkripta gena predstavljena su plavom bojom, a crvenom pojedinačne miRNK koje se prepisuju sa klastera. (B) Struktura i lokalizacija miR-17-92 klastera i njegovih paraloga miR-106a-363 i miR-106b-25. (C) miR-17, miR-18, miR-19 i miR-92 familije. Sekvence "semena" označene su boldovanim slovima. Preuzeto i prilagođeno prema Dal Bo i sar, 2015.

Pored navedenog, predikcije pokazuju da je miR-17 preko AKT3 uključena u mTOR signalni put, zatim u signalni put mitogenom aktiviranih protein kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) i signalni put insulina, te se dovodi u vezu sa insulinskom rezistencijom i gestacijskim dijabetesom (Zhu i sar, 2015). Poremećaji u MAPK signalnom putu uključeni su u razvoj visokog krvnog pritiska, dijabetesa i komplikacija u trudnoći. Zhu i saradnici (2015) su pokazali da je nivo miR-17 značajno povišen u plazmi trudnica sa GDM-om u odnosu na zdrave trudnice.

1.2.1.3. hsa-miR-181a-5p

hsa-miR-181a-5p (u daljem tekstu miR-181a), pored hsa-miR-181b-5p, hsa-miR-181c-5p i hsa-miR-181d-5p, pripada miR-181 familiji, visoko evoluciono očuvanoj kod svih kičmenjaka. Sve miRNK ove familije imaju identične 5' sekvence "semena", što ukazuje na sličnost ciljnih grupa gena čiju ekspresiju regulišu (Kim i sar, 2021). Kod čoveka se navedene miRNK prepisuju sa tri različita klastera, sa hromozoma 1, 9 i 19. Pored četiri zrele 5p miRNK, sa istih klastera se prepisuju i šest zrelih 3p miRNK, ali je njihova ekspresija kod čoveka značajno manja nego 5p formi. Zrela miR-181a-5p se sintetiše od dva različita prekursora, pre-mir-181a1 i pre-mir-181a2, od kojih se prvi prepisuje sa klastera na hromozomu 1, dok je drugi kodiran u okviru klastera na hromozomu 9 (slika 4). Navedeni prekursori daju identične zrele miRNK (Indrieri i sar, 2020).



Slika 4. Sekvence zrelih (A) 5p i (B) 3p miRNK iz familije miR-181 čoveka. Sekvenca "semena", identična u slučaju 5p miRNK, označena je žutom bojom. Zelenom i braon bojom označeni su nukleotidi koji se razlikuju među zrelim 5p miRNK. Nukleotidi koji se razlikuju samo kod miR-181c, odnosno miR-181d, obeleženi su ljubičastom i plavom bojom, redom. Zvezdicom su označeni nukleotidi identični kod svih 5p, odnosno 3p miRNK. (C) Šematski prikaz genomske organizacije tri klastera miR-181 familije kod čoveka sa

prikazanim pozicijama na hromozomima i genomskim koordinatama (hg19). Šema ne prikazuje realan odnos veličina klastera. Preuzeto i prilagođeno prema Indrieri i sar, 2020.

Kako učestvuje u sazrevanju B ćelija u kostnoj srži, kao i u diferencijaciji i aktivaciji T ćelija timusa i perifernih T ćelija, miR-181a ima važnu ulogu u funkcionisanju imunskog sistema (Kim i sar, 2021). Takođe, smatra se da ima značaja u razvoju hipertenzije, dijabetesa i insulinske rezistencije (Zhou i sar, 2012; Khaliq i sar, 2018).

Moguće je da hipertenzija u trudnoći, konkretno PE, nastaje kao posledica neadekvatne regulacije miR-181a. Pokazano je da je kod trudnica sa PE povišena ekspresija miR-181a u mezenhimalnim ćelijama izolovanim iz pupčane vrpce i decidue, što inhibira proliferaciju i imunosupresivna svojstva ovih ćelija. Inhibirajući ekspresiju svojih ciljnih gena *TGFBR1* i *TGFBRAP1*, miR-181a blokira TGF- β signalni put što za posledicu ima smanjenje proliferacije ćelija. Takođe, preko MAPK signalnog puta, miR-181a povećava ekspresiju *IL-6*, *VEGF* i indolamin 2,3-dioksidaze (*IDO*) čime se smanjuje imunosupresija mezenhimalnih ćelija (Liu i sar, 2012). Pored navedenog, ekspresija miR-181a je povišena u placenti trudnica sa PE, što inhibira proliferaciju i progresiju ćelijskog ciklusa, kao i invaziju trofoblastnih ćelija, dok indukuje njihovu apoptozu (Huang i sar, 2019). Iako uloga miR-181a u GH još uvek nije u potpunosti razjašnjena, dosadašnja saznanja o asocijaciji miR-181a i PE ukazuju na potencijal za razvoj novih terapija hipertenzije u trudnoći (Liu i sar, 2012).

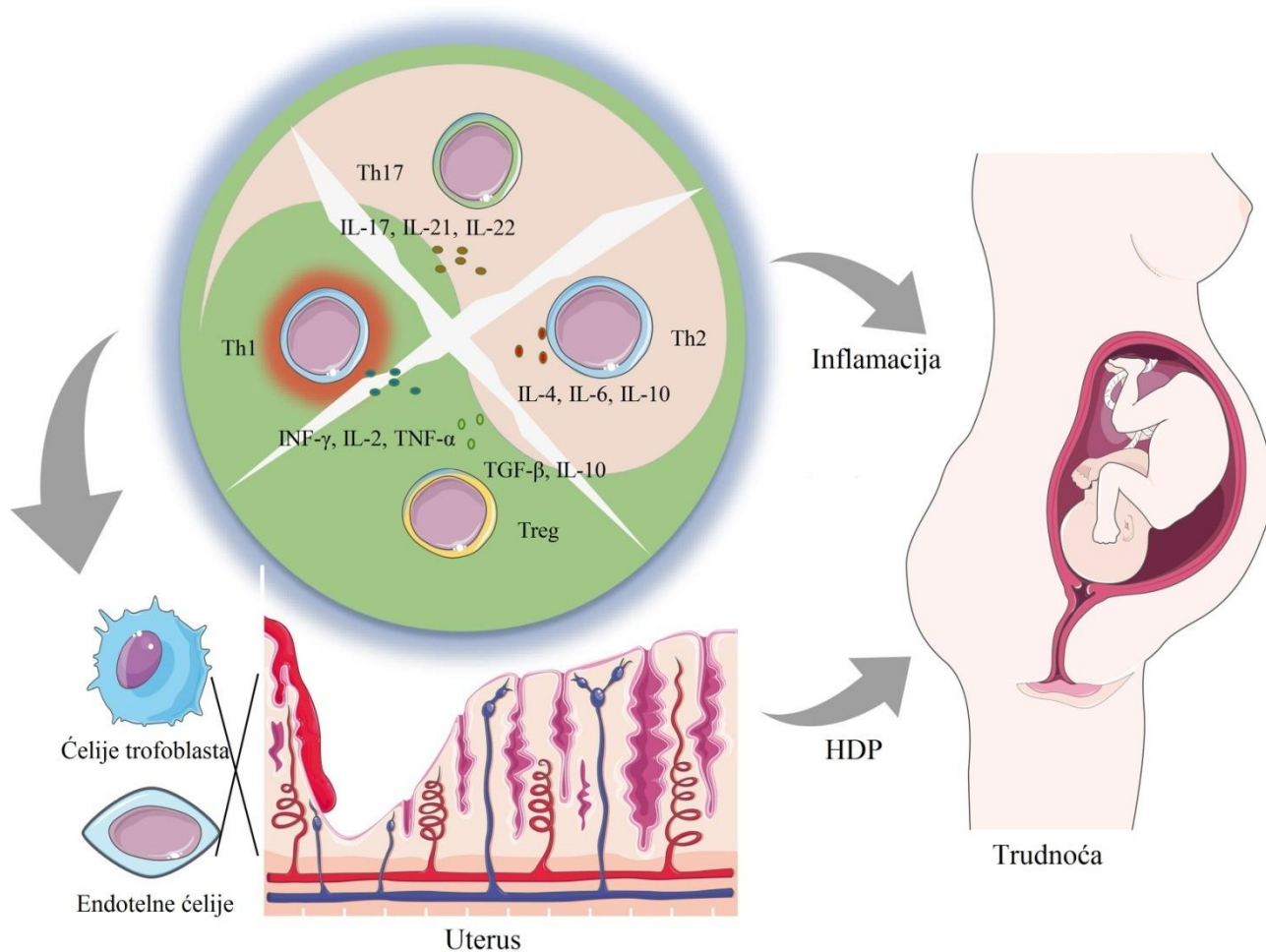
Pokazano je da je u serumu osoba sa dijabetesom tipa 2 povišen nivo miR-181a u odnosu na zdrave ispitanike (Zhou i sar, 2012). miR-181a se vezuje za 3'UTR region iRNK *Sirt1* gena, te prekomerna ekspresija ove miRNK dovodi do smanjene količine SIRT1 proteina i insulinske rezistencije u hepatocitima. Takođe, inhibicija miR-181a antisens oligonukleotidima povećava nivo i aktivnost SIRT1 proteina što poboljšava senzitivnost na insulin hepatocita i reguliše glukoznu homeostazu, te je miR-181a prepoznata kao potencijalni target za terapije kod dijabetesa tipa 2 (Zhou i sar, 2012). Dodatne studije su neophodne kako bi se razjasnila uloga miR-181a u hiperglikemiji u trudnoći.

1.2.2. Citokini

Citokini su solubilni proteini čiju sekreciju vrši više tipova ćelija poput limfocita, makrofaga i NK ćelija (engl. *natural killer cells*) (Liu i sar, 2021). Reguliraju rast, sazrevanje i aktivnost imunskih ćelija i predstavljaju medijatore i regulatore imunskog sistema i inflamacije. Jedan citokin može biti produkovan od strane više različitih tipova ćelija, a takođe može učestvovati u više različitih bioloških procesa (Sprague i Khalil, 2009). Promene u njihovoj sekreciji leže u osnovi velikog broja oboljenja, a detekcija nivoa različitih citokina može dati značajan uvid o dijagnozi i prognozi bolesti (Liu i sar, 2021).

Kako učestvuju u održavanju normalnih ćelijskih funkcija, proliferaciji i migraciji ćelija, međućelijskoj komunikaciji i remodelovanju tkiva, citokini imaju značajnu ulogu i u trudnoći (Yockey i Iwasaki, 2018). Za normalan tok trudnoće neophodan je adekvatan balans između proinflamatornih i antiinflamatornih citokina, te je inflamacija strogo kontrolisana tokom cele trudnoće. Prva, proinflamatorna faza karakteristična je za sam početak trudnoće, odnosno implantaciju blastocista, tokom koje dolazi do lokalizovane aktivacije medijatora inflamacije (Chatterjee i sar, 2014). Tokom druge, antiinflamatorne faze dolazi do povećanja nivoa Th2 citokina, što može biti sistemski ili lokalizovano na feto-maternalnom spoju. Tokom porođaja nastupa poslednja faza koja je pretežno proinflamatorna (Chatterjee i sar, 2014). Poremećaji u regulaciji

ekspresije, odnosno aktivnosti citokina i imunskog odgovora u trudnoći za posledicu mogu imati neadekvatan razvoj fetusa, placente i razvoj različitih komplikacija (Yockey i Iwasaki, 2018) (slika 5).



Slika 5. Uloga citokina u razvoju hipertenzije u trudnoći. Narušen balans između citokina koje proizvode Th1 (IFN- γ , IL-2, TNF- α), Th2 (IL-4, IL-6, IL-10), Th17 (IL-17, IL-21, IL-22) i Treg ćelije (IL-10, TGF β) povećava nivo lokalne i sistemske inflamacije, narušava infiltraciju trofoblastnih ćelija i indukuje disfunkciju endotela čime doprinosi razvoju HDP. Th1, Th2 i Th17 – T ćelije pomoćnice (engl. *T-helper cells*). Preuzeto i prilagođeno prema Zhou i sar, 2023.

Poslednjih godina veliki broj studija ispituje povezanost inflamacije i komplikacija u trudnoći. Jasno je da određeni faktori imaju uticaja na ekspresiju citokina uključujući nedelju gestacije, etničku pripadnost, pušenje i BMI (Gomes i sar, 2013). Normalnu trudnoću karakteriše stanje blage inflamacije, dok je ona pojačana u slučaju razvoja dijabetesa ili hipertenzije u trudnoći. Smatra se da sekrecija citokina od strane Th2 ćelija, poput IL-4, IL-6 i IL-10, favorizuje normalan razvoj trudnoće, dok povećana sekrecija Th1 citokina, među kojima su IFN- γ i TNF- α , može narušiti njen normalan tok (Gomes i sar, 2013). Pokazano je da izmenjena ekspresija citokina ima ulogu u signalnom putu insulina i inflamaciji kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom (Gelen i sar, 2017).

Jedna od najčešće korišćenih metoda za detekciju nivoa citokina je enzimski imunosorbentni test (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) (Liu i sar, 2021). Citokini se relativno jednostavno mogu izolovati iz različitih vrsta uzoraka poput periferne krvi, pljuvačke ili urina. Njihovo uzorkovanje je neinvazivno ili niskoinvazivno, što predstavlja jedan od glavnih zahteva u

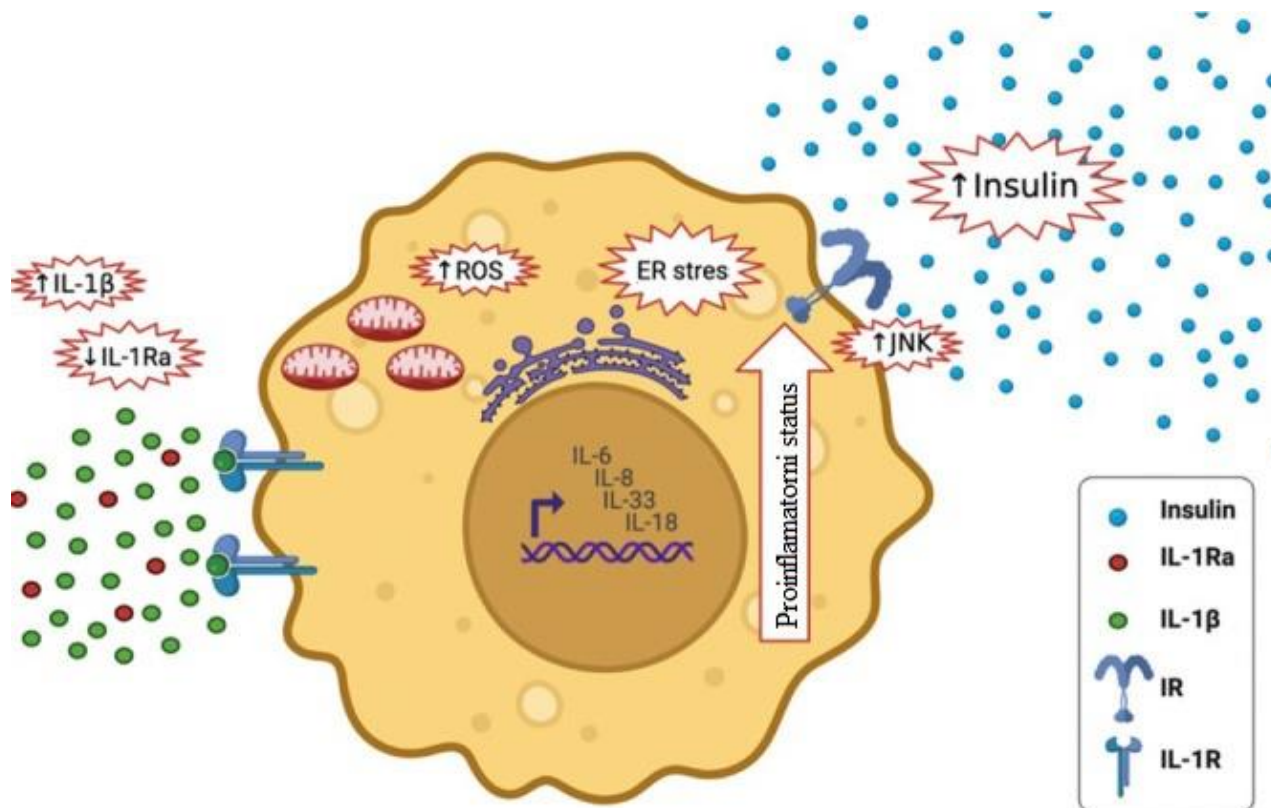
ispitivanjima potencijalnih dijagnostičkih ili prognostičkih markera različitih stanja. Međutim, zbog kratkog polu-života ovih molekula i njihove sposobnosti vezivanja za receptore lako se mogu dobiti lažno negativni rezultati. Takođe, poznato je da antikoagulansi, poput heparina, kao i način pripreme i čuvanja uzoraka mogu uticati na koncentracije citokina, te proces izolacije i dalje analize zahteva visoku stručnost u rukovanju ovim uzorcima (Liu, 2021). Drugi metod za indirektnu detekciju citokina je qPCR kojim se meri količina iRNK citokina. Ova metoda omogućava prilično jednostavnu i visoko senzitivnu procenu relativne ekspresije gena citokina iz male količine početnog uzorka (Amsen i sar, 2009). Različita oboljenja kod čoveka su povezana sa povišenom inflamacijom, te su ELISA metod i qPCR u širokoj upotrebi u detekciji citokina i/ili njihovih iRNK kao potencijalnih biomarkera patoloških stanja.

1.2.2.1. Interleukin 1 β

Interleukin 1 β (IL-1 β) pripada IL-1 familiji interleukina, a proizvode ga dendritske ćelije, monociti, neutrofili, B ćelije, T ćelije, a najvećim delom makrofagi (Margaryan i sar, 2020; Melton i Qiu, 2021). U humanom genomu kodiran je genom koji se nalazi na dugom kraku hromozoma 2 u regionu q14.1 (NCBI, Gene ID: 3553).

Ovaj proinflamatorni citokin signalnu transdukciju i ćelijski odgovor započinje vezivanjem za IL-1 receptor tip 1 (IL-1R1). Aktivnost IL-1 β regulisana je endogenim inhibitorom, IL-1 receptor antagonistom (IL-1Ra), koji ima sposobnost vezivanja za isti receptor kao IL-1 β . IL-1Ra takođe proizvode makrofagi, a odnos IL-1 β /IL-1Ra je autoregulisan povratnom spregom. Odgovarajući balans između ova dva citokina neophodan je za normalno funkcionisanje β ćelija, a poznato je da narušavanje njihovog odnosa može dovesti do razvoja dijabetesa tipa 2 (Margaryan i sar, 2020).

Kako usled vezivanja IL-1 β za receptor dolazi do aktivacije p38, ERK i JNK kinaza, IL-1 β ima značajnu ulogu u MAPK signalnom putu (Gelen i sar, 2017). Takođe, indukuje sekreciju drugih proinflamatornih citokina, među kojima je IL-6, čime se pojačava nivo inflamacije. Povišen nivo IL-1 β stimuliše endoplazmatični retikulum (ER), dovodi do prekomerne produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (engl. *reactive oxigene species*, ROS) i povećanja oksidativnog stresa u ćeliji (Alfadul i sar, 2022) (slika 6). Pokazano je da kratkoročno izlaganje β ćelija interleukinu 1 β dovodi do povećanja sekrecije insulina, dok dugoročno izlaganje za posledicu ima rezistenciju i disfunkciju β ćelija pankreasa i razvoj dijabetesa (Margaryan i sar, 2020; Alfadul i sar, 2022). Pored uloge u razvoju dijabetesa, IL-1 β je asociran i sa razvojem hipertenzije, pa je tako u limfocitima periferne krvi žena sa PE pokazan povišen nivo IL-1 β u poređenju sa zdravim trudnicama (Sljivancanin Jakovljevic i sar, 2019).



Slika 6. Dejstvo povišenog nivoa IL-1 β i sniženog nivoa IL-1Ra kod DM2: aktivacija ekspresije proinflamatornih citokina IL-6, IL-8, IL-33 i IL-18, stimulacija ER, oksidativnog stresa i produkcije ROS-a, aktivacija JNK kinase, povećana sekrecija insulina. Preuzeto i prilagođeno prema Alfadul i sar, 2022.

1.2.2.2. Faktor nekroze tumora α

Faktor nekroze tumora α (TNF- α), poznat i pod nazivima kaheksin ili kahektin, proinflamatorni je molekul koji pripada Th1 grupi citokina. U humanom genomu kodiran je genom koji je lociran na hromozomu 6 u regionu p21.33 (NCBI, Gene ID: 7124), a navedeni citokin proizvode prvenstveno makrofagi, ali i ćelije masnog tkiva i placenta. TNF- α ostvaruje svoju funkciju vezujući se za jedan od dva receptora, TNFR1 i TNFR2, čime se aktivira ekspresija različitih gena koja može biti praćena apoptozom (Alijotas-Reig i sar, 2017). Pored regulacije ćelijske smrti, ima važnu ulogu u proliferaciji ćelija i inflamaciji. Značajna je i njegova funkcija u trudnoći, posebno u procesu implantacije i placentacije (Alijotas-Reig i sar, 2017). Tokom normalne trudnoće povećava se ekspresija ovog citokina, a njegov glavni izvor je placenta, pri čemu se najveći deo produkovanog TNF- α sekretuje u maternalnu cirkulaciju (Vrachnis i sar, 2012). Patološki visoka ekspresija ovog citokina može biti uzrok različitih komplikacija u trudnoći poput rekurentnih pobačaja, neuspelih implantacija, preeklampsije i prevremenog porođaja. Za povoljan ishod trudnoće neophodan je adekvatan balans između TNF- α , kao predstavnika Th1 grupe citokina, i, sa druge strane, Th2 i Th17 citokina (Alijotas-Reig i sar, 2017).

Hiperglikemija u trudnoći može dovesti do povećane ekspresije TNF- α , što dalje doprinosi razvoju insulinske rezistencije i hiperlipidemije, čime se dodatno pogoršava hiperglikemijsko stanje i favorizuje razvoj gestacijskog dijabetesa (Coughlan i sar, 2001). Naime, *in vitro* ispitivanja su pokazala da TNF- α indukuje fosforilaciju serina na poziciji 307 u okviru supstrata insulinskog receptora 1 (IRS-1). Pretpostavlja se da se time narušava interakcija IRS-1 i insulinskog receptora i signalni put insulina, što za posledicu može imati razvoj insulinske rezistencije (Rui i sar, 2001).

Pokazano je da je u plazmi trudnica sa HDP-om prisutan viši nivo TNF- α nego kod zdravih trudnica (Peraçoli i sar, 2007). TNF- α može dovesti do aktivacije neutrofila, ekspresije adhezionog molekula vaskularnih ćelija 1 (engl. *Vascular Cell Adhesion Molecul 1, VCAM-1*) i apoptoze trofoblastnih ćelija, što vodi oštećenju endotela, placentnoj ishemiji i hipoksiji. Navedeni mehanizmi doprinose daljem razvoju hipertenzije u trudnoći, a povišen nivo ovog citokina verovatnije predstavlja posledicu nego uzrok nastanka hipertenzije. Oštećenje tkiva nastalo tokom HDP-a i posledično povećanje sistemske inflamacije verovatni je razlog povećanog nivoa Th1 citokina, uključujući TNF- α , što dalje može pogoršati kliničku sliku i dodatno doprineti razvoju hipertenzije u trudnoći (Zhou i sar, 2023).

1.2.2.3. Interleukin 6

Interleukin 6 (IL-6) je deo IL-6 familije citokina koji može imati kako proinflamatornu, tako i antiinflamatornu ulogu. Uključen je u regulaciju velikog broja različitih bioloških procesa poput proliferacije, diferencijacije ćelija i apoptoze (Kristiansen i Mandrup-Poulsen, 2005; Vilotić i sar, 2022). U humanom genomu gen za IL-6 je lociran na hromozomu 7 u p15.3 regionu (NCBI, Gene ID: 3569).

IL-6 ostvaruje svoju funkciju vezivanjem za membransku ili solubilnu formu receptora IL-6 α (IL-6R). Antiinflamatorna uloga IL-6 postiže se vezivanjem IL-6 za membransku formu receptora, nakon čega dolazi do formiranja heksamernog signalnog kompleksa sa transmembranskim glikoproteinom 130 (gp130) i pokretanja JAK/STAT ili MAPK signalnog puta (Kristiansen i Mandrup-Poulsen, 2005; Vilotić i sar, 2022). Aktivirani STAT3 najverovatnije indukuje ekspresiju supresora signalizacije citokina 3 (SOCS3), koji zatim negativno reguliše JAK/STAT. SOCS3 je antiinflamatorni medijator koji održava inflamaciju na odgovarajućem nivou. Ekspimirani SOCS3 može inhibirati autofosforilaciju receptora insulina i fosforilaciju tirozina IRS-1/IRS-2, što smanjuje senzitivnost na insulin i narušava signalni put insulina (Kristiansen i Mandrup-Poulsen, 2005).

Pored opisanog ćelijskog odgovora, IL-6 pokreće i međućelijsku signalnu transdukciju vezujući se za solubilne forme IL-6R receptora zahvaljujući čemu ostvaruje svoje proinflamatorno dejstvo (Kristiansen i Mandrup-Poulsen, 2005; Vilotić i sar, 2022). Ekspresija ovog citokina, između ostalog, regulisana je različitim miRNK, pa tako miR-29a stimuliše ekspresiju IL-6, kao i TNF- α , od strane makrofaga (Nejad i sar, 2018). S druge strane, inhibicija miR-17 u makrofagima dovodi do smanjene produkcije navedenih citokina (Zhu i sar, 2013).

Nekoliko studija pokazalo je da je kod trudnica sa HDP-om povišen nivo IL-6 u odnosu na zdrave trudnice (Kong i sar, 2018; Gencheva i sar, 2021). Istraživanja pokazuju da IL-6 ima važnu ulogu u formiranju krvnih sudova placentne (Zhou i sar, 2023). Takođe, pokazano je da ekspresija IL-6, kao i TNF- α , pozitivno koreliše sa visinom sistolnog krvnog pritiska i da je njihov nivo značajno viši kod žena sa nepovoljnim ishodom trudnoće, te navedeni citokini predstavljaju potencijalne prognostičke markere hipertenzije u trudnoći (Kong i sar, 2018).

1.2.2.4. Interleukin 17

Proinflamatorni citokin interleukin 17 (IL-17) pripada IL-17 familiji, a proizvode ga Th17 ćelije. Gen koji ga kodira se u humanom genomu nalazi na kratkom kraku hromozoma 6 u regionu p12 (Kolls i Lindén, 2004). Produkuju ga makrofagi, dendriidske ćelije, NK ćelije i CD4⁺ T ćelije.

Ima značajnu ulogu u inflamaciji, angiogenim procesima, autoimunskim i metaboličkim bolestima, a takođe i u održavanju normalnog toka trudnoće (Martínez-García i sar, 2011). Najznačajniji izvor ovog citokina u trudnoći je placenta, a poremećaji nivoa IL-17 se dovode u vezu sa spontanim pobačajima. Ekspresija IL-17 raste u poslednjem trimestru trudnoće, što sugeriše njegovu ulogu u terminaciji trudnoće (Martínez-García i sar, 2011).

Pokazano je da IL-1 β indukuje diferencijaciju CD4⁺ u Th17 ćelije, dok IL-6 pospešuje ovaj proces, te IL-1 β i IL-6 zajedno dovode do povećanja produkcije IL-17 (Acosta-Rodriguez i sar, 2007). S druge strane, IL-17 indukuje ekspresiju proinflamatornih citokina IL-6 i TNF- α (Martínez-García i sar, 2011) što za posledicu može imati razvoj endotelne disfunkcije i hipertenzije (Zhou i sar, 2023). Takođe, povećanje nivoa TNF- α pod dejstvom IL-17 može dovesti do inhibicije signalnog puta insulina, što ukazuje na značaj ova dva citokina u razvoju dijabetesa tipa 2 (Abdel-Moneim i sar, 2018).

Pokazano je da je u serumu trudnica sa PE i zastojem u rastu ploda povišena ekspresija IL-17, a nivo ovog citokina pozitivno koreliše sa sistolnim krvnim pritiskom (Darmochwal-Kolarz i sar, 2017). Eksperimenti na pacovima su pokazali da IL-17 u trudnoći indukuje rast krvnog pritiska, povećanu produkciju ROS-a i oksidativni stres u placenti (Dhillion i sar, 2012), što dalje doprinosi razvoju endotelne disfunkcije (Zhou i sar, 2023). Dodatne studije su neophodne kako bi se razjasnila moguća uloga IL-17 u GDM i GH.

1.2.3. Parametri oksidativnog stresa

Oksidativni stres nastaje usled narušenog balansa između prooksidanasa i antioksidativnog kapaciteta ćelije. Slobodni radikali imaju ključnu ulogu u nastanku oksidativnog stresa, a predstavljaju molekule sa jednim ili više nesparenih elektrona zbog čega su jako nestabilni i visoko reaktivni (Simon-Szabo i sar, 2021). Prilikom interakcije sa drugim molekulima u organizmu dovode do oštećenja ćelija i tkiva, te povećana produkcija slobodnih radikala i oksidativni stres leže u osnovi velikog broja bolesti kod čoveka (Fogarasi i sar, 2016).

Reaktivne kiseonične vrste i reaktivne vrste azota (engl. *reactive nitrogen species*, RNS) imaju ključnu ulogu u nastanku oksidativnog stresa. U ROS spadaju superoksid anjon radikal (O₂⁻), hidrosil anjon radikal (OH^{*}), singletni kiseonik (¹O₂) i vodonik peroksid (H₂O₂), dok RNS obuhvataju nitroksil anjon (NO^{*}), azot oksid radikal (NO^{*}) i peroksinitrit (ONOO⁻). Većina pripadnika ROS i RNS molekula su slobodni radikali, a oni koji nemaju slobodan elektron u svom sastavu predstavljaju reaktivne intermedijere koji interakcijom sa drugim molekulima indukuju stvaranje slobodnih radikala (Simon-Szabo i sar, 2021).

ROS predstavljaju normalne produkte metabolizma neophodne za veliki broj bioloških procesa i hemijskih reakcija u organizmu, a njihov glavni izvor su mitohondrije (Menzel i sar, 2021). Usled prekomerne produkcije i/ili njihovog nedovoljnog uklanjanja dovode do oštećenja lipida, proteina i DNK molekula (Simon-Szabo i sar, 2021). Takođe, ROS indukuju sintezu velikog broja proinflamatornih citokina, među kojima su TNF- α , IL-1 β , IL-6, te se smatraju medijatorima imunskog odgovora, a oksidativni stres se dovodi u vezu sa aktivacijom inflamazoma i inflamacijom (González i sar, 2023). Nivo oksidativnog stresa može se odrediti praćenjem različitih biomarkera među kojima su produkti lipidne peroksidacije, produkti oksidacije proteina ili DNK, različiti enzimi i miRNK (Simon-Szabo i sar, 2021).

Trudnoću, između ostalog, odlikuje stanje povišenog oksidativnog stresa, a glavni izvor ROS-a je placenta. Usled rasta placente bogate mitohondrijama i aktivacije različitih imunoloških procesa,

tokom normalne trudnoće raste nivo slobodnih radikala, prvenstveno superoksid anjon radikala (Toboła-Wróbel i sar, 2020; Phoswa i Khaliq, 2021). Takođe, makrofagi placente proizvode azot oksid (Toboła-Wróbel i sar, 2020). Pored toga, u prvom trimestru trudnoće zdravih trudnica smanjen je totalni antioksidativni kapacitet (TAC) u poređenju sa zdravim ženama koje nisu trudne, zatim, počevši od drugog trimestra TAC raste, da bi u periodu porođaja dostigao normalan nivo (Toescu i sar, 2002). Poznato je i da je aktivnost superoksid dismutaze (SOD) smanjena u trudnoći (Hussain i sar, 2021). Navedeno može uzrokovati povećanje lipidne peroksidacije i nivoa malondialdehida u krvi trudnica.

Visok nivo oksidativnog stresa u trudnoći može imati negativne efekte po majku i plod, te se dovodi u vezu sa poremećajima implantacije, spontanom pobačajima, smanjenom težinom bebe na rođenju i razvojem anomalija ploda (Toboła-Wróbel i sar, 2020; Phoswa i Khaliq, 2021). Do navedenih komplikacija dolazi zbog poremećaja funkcije placente i posledično smanjene količine kiseonika i nutritijenata koje dobija fetus (Toboła-Wróbel i sar, 2020). Pokazano je da je kod zdravih trudnica nivo oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije viši nego kod žena koje nisu trudne (Idonije i sar, 2011). Takođe, kod trudnica sa dijabetesom ili hipertenzijom postoji povišen nivo oksidativnog stresa u poređenju sa zdravim trudnicama, bilo usled prekomerne produkcije ROS-a ili smanjenog antioksidativnog kapaciteta ćelija (Sudharshana i sar, 2018; Phoswa i Khaliq, 2021).

1.2.3.1. Prooksidativni i antioksidativni mehanizmi

U regulaciji ćelijskog redoks balansa učestvuju dve grupe proteina, prooksidativni i antioksidativni enzimi. Azot oksid sintaza, NADPH oksidaza, lipoksigenaza, ksantin oksidaza, hem oksigenaza, mijeloperoksidaza i citohrom P450 predstavljaju prooksidativne enzime, a po prirodi svoje funkcije većinom su oksidaze. Hiperglikemija indukuje povećanu aktivnost navedenih enzima, najčešće posredstvom NF- κ B, što za posledicu ima povećanu produkciju ROS-a, oksidativni stres, ekspresiju proinflamatornih citokina i lipidnu peroksidaciju (González i sar, 2023). Aktivacija NADPH oksidaze glavni je uzrok povišene produkcije ROS-a i oksidativnog stresa u hipertenzivnim uslovima (Rodrigo i sar, 2011). S druge strane, antioksidativni enzimi među kojima su superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza, peroksiredoksin i tioredoksin imaju ulogu u snižavanju nivoa ROS-a u ćeliji (Birben i sar, 2012). Antioksidativni mehanizmi regulisani su u velikoj meri transkripcionim faktorom Nrf2 koji aktivira ekspresiju više antioksidativnih proteina (González i sar, 2023). Pored enzima, u snižavanju nivoa ROS-a učestvuju i neenzimski antioksidativni molekuli poput vitamina A, C, D i E, polifenola i flavonoida. Vitamini E i D sprečavaju lipidnu peroksidaciju, a uz to vitamin D povećava aktivnost glutationa i smanjuje produkciju naprednih krajnjih produkata glikacije (engl. *advanced glycation end-products*, AGE). Vitamin C prevodi oksidovani glutation u njegovu redukovanu formu čime povećava antioksidativni kapacitet ćelije (Chatzakis i sar, 2021). Kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom utvrđen je niži nivo totalnog antioksidativnog kapaciteta, kao i vitamina A, superoksid dismutaze, redukovanog glutationa i glutation peroksidaze (Sudharshana i sar, 2018; Ma i sar, 2021). Pokazano je da dodatak vitaminskih suplemenata ishrani trudnica sa GDM-om može smanjiti nivo oksidativnog stresa i inflamacije (Chatzakis i sar, 2021; Li i sar, 2021). Međutim, kada je u pitanju primena antioksidativne terapije kod hipertenzivnih osoba dosadašnji rezultati su prilično heterogeni (Rodrigo i sar, 2011; Chiarello i sar, 2020). Ipak, smatra se da bi konzumacija vitaminskih suplemenata mogla imati određeni benefit u prevenciji razvoja hipertenzivnih poremećaja (Rodrigo i sar, 2011).

1.2.3.2. Hiperglikemija i oksidativni stres

Hiperglikemija uzrokuje povećanje oksidativnog stresa na ćelijskom nivou aktivacijom više različitih molekularnih mehanizama. U normalnim uslovima metabolizam glukoze se najvećim delom odvija putem glikolize u mitohondrijama. Oko 2% kiseonika koji se koristi prilikom ovog procesa prevodi se u superoksid anjon radikal, te formiranje ROS-a predstavlja deo normalnog metabolizma glukoze (González i sar, 2023). U uslovima hiperglikemije intenziviraju se procesi glikozilacije i transporta elektrona u elektrotransportnom lancu što vodi formiranju veće količine ROS-a koja prevazilazi kapacitete antioksidativnih sistema mitohondrija (Burgos-Morón i sar, 2019). Posledično, u uslovima hiperglikemije dolazi do povećanja oksidativnog stresa, lipidne peroksidacije, oštećenja DNK i proteina, disfunkcije mitohondrija, ali i daljeg pogoršanja hiperglikemije indukovane reaktivnim kiseoničnim vrstama (Burgos-Morón i sar, 2019; González i sar, 2023).

Usled hiperglikemije, pored intenziviranog procesa ćelijskog disanja u mitohondrijama, aktiviraju se aberantni putevi metabolizma glukoze u citosolu i ER: heksozaminski put i putevi poliola, a aktivira se i protein kinaza C (PKC). U normalnim uslovima aktivnost navedenih puteva je niska. Takođe, ćelijski procesi aktivirani hiperglikemijom obuhvataju i spontane reakcije glukoze među kojima su neenzimska glikacija proteina i autooksidacija glukoze (González i sar, 2023) (slika 7).

Neenzimska glikacija proteina podrazumeva spontanu, ireverzibilnu interakciju između proteina i slobodnih šećera u krvi. Tom prilikom nastaju visoko reaktivni dikarbonilni molekuli koji interagujući sa proteinima formiraju napredne krajnje produkte glikacije (Mengstie i sar, 2022). AGE zatim indukuju produkciju ROS-a, narušavaju antioksidativne mehanizme ćelije i dovode do oštećenja ekstracelularnog matriksa. U interakciji sa receptorima naprednih krajnjih produkata glikacije (engl. *receptors of advanced glycation end products*, RAGE) aktiviraju veći broj enzima, signalnih i metaboličkih puteva među kojima su: JAK, p38-MAPK i ERK kinaze, GTPaze, transkripcioni faktor NF- κ B, protein kinazu C, heksozaminski i polioski put (Singh i sar, 2014; Mengstie i sar, 2022; González i sar, 2023). Sveukupno, AGE dovode do porasta oksidativnog stresa, apoptoze, produkcije proinflamatornih citokina među kojima su TNF- α i IL-6 i porasta inflamacije (Mengstie i sar, 2022; González i sar, 2023). Nivo AGE jedinjenja u krvi predstavlja potencijalni prediktivni biomarker mogućih komplikacija dijabetesa (Simó-Servat i sar, 2018).

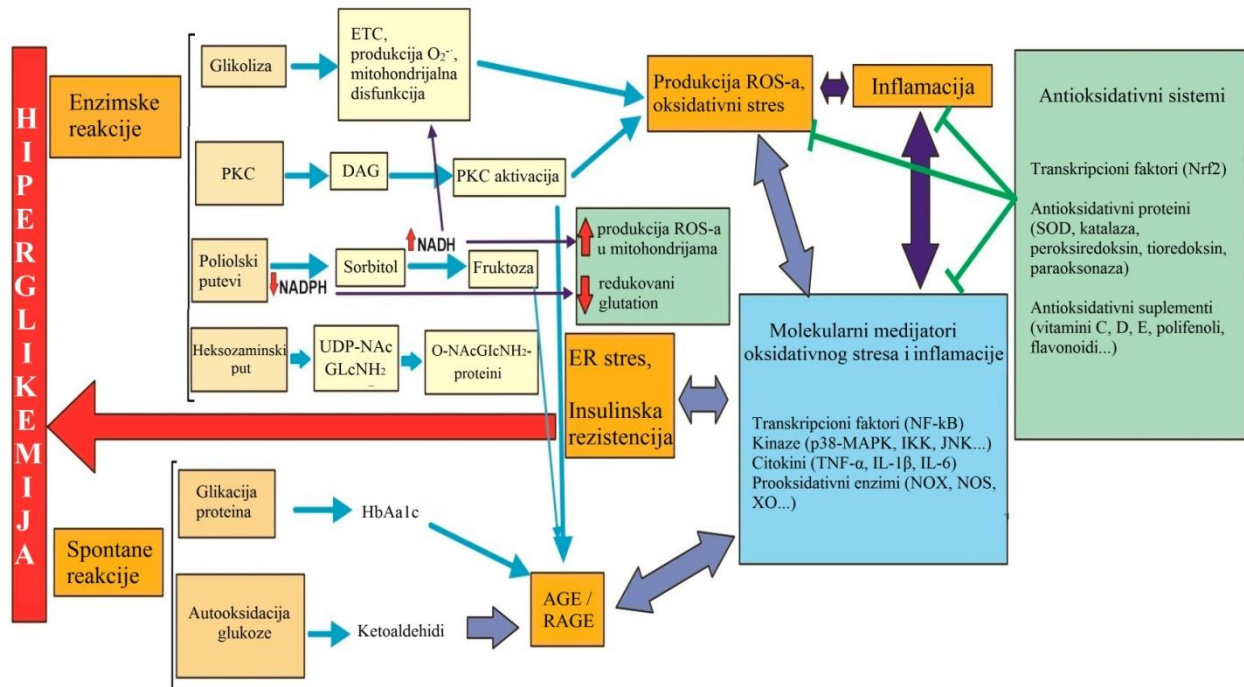
Slobodna glukoza u krvi može podleći autooksidaciji tokom koje dolazi do fragmentacije molekula šećera i nastanka ketoaldehida i superoksid anjon radikala. Ketoaldehidi dalje interaguju sa proteinima i produkuju AGE, dok superoksid anjon direktno vodi povećanju oksidativnog stresa (González i sar, 2023).

Takođe, usled pojačanog procesa glikolize u uslovima hiperglikemije dolazi do povećane produkcije diacilglicerola koji aktivira PKC proteine (Geraldés i sar, 2010). PKC potom dovodi do aktivacije prooksidativnog enzima NADPH oksidaze i AGE-RAGE puta što, kako je već opisano, vodi daljem povećanju oksidativnog stresa (González i sar, 2023).

Smatra se da se oko 30% glukoze u uslovima hiperglikemije metaboliše kroz puteve poliola (González i sar, 2023). Posledica aktivacije ovog puta je glikacija proteina i njihova disfunkcija, povećana produkcija AGE, smanjenja količina NADPH i povećanje NADH u citosolu ćelija. Usled nedostatka NADPH nije moguće prevođenje oksidovane forme glutationa u redukovanu, dok s druge strane NADH povećava produkciju ROS-a u mitohondrijama. Sveukupno, aktivacija ovog puta vodi povećanju oksidativnog stresa (Bravi i sar, 1997; González i sar, 2023).

Tokom heksozaminskog puta međuprodukt glikolize, fruktozo-6-fosfat, metaboliše se do uridin difosfat-N-acetilglukozamina koji se vezuje za ER proteine, dovodi do njihove disfunkcije i

povišenog nivoa ER stresa (Morino i Maegawa, 2021; González i sar, 2023). Poznato je da heksozaminski put ima značajnu ulogu u razvoju insulinske rezistencije (Kaneto i sar, 2001).



Slika 7. Molekularni mehanizmi koji povezuju hiperglikemiju i oksidativni stres. UDP-NAc GLcNH₂ - uridin difosfat-N-acetilglukozamin. O-NacGlcNH₂-proteini – glikozilovani proteini. Preuzeto i prilagođeno prema González i sar, 2023.

Oksidativni stres predstavlja glavni uzrok nastanka GDM-a, a opisani mehanizmi ne predstavljaju zasebne entitete već se međusobno prepliću i jedni druge aktiviraju (Urbaniak i sar, 2020; González i sar, 2023). Njihova povišena aktivnost u uslovima hiperglikemije dovodi do akumulacije reaktivnih kiseoničnih vrsta, mitohondrijskih oštećenja i razvoja insulinske rezistencije. Pored toga, oksidativni stres i proinflamatorni mehanizmi dovode do progresije hiperglikemije, razvoja dijabetesa i asociranih komplikacija (González i sar, 2023). Dosadašnje studije ukazuju na povišene markere oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom (Li i sar, 2016; Rodrigues i sar, 2018).

1.2.3.3. Hipertenzija i oksidativni stres

Oksidativni stres predstavlja jedan od glavnih uzroka razvoja hipertenzije. Endotelne ćelije krvnih sudova proizvode azot oksid koji ima ulogu vazodilatatora. U uslovima hipertenzije povećana je produkcija superoksid anjon radikala u vaskularnim ćelijama koji indukuje degradaciju azot oksida, te ima ulogu vazokonstriktora. Stoga, povećana produkcija ROS-a, snižen nivo azot oksida i antioksidativnih enzima pospešuju razvoj hipertenzije (Rodrigo i sar, 2011; Baradaran i sar, 2014).

U krvnim sudovima glavnu ulogu u produkciji ROS-a imaju NADPH oksidaza, azot oksid sintaza, ksantin oksidaza i mitohondrije (Rodrigo i sar, 2011). NADPH oksidaza, visoko eksprimirana u neutrofilima i endotelnim ćelijama, ima ulogu u stvaranju superoksid anjon radikala redukcijom

molekularnog kiseonika uz pomoć NADPH kao donora elektrona. U hipertenzivnim uslovima angiotenzin II (AT-II), endotelin-1 (ET-1) i urotenzin II indukuju povećanu aktivnost ove oksidaze, a posledična prekomerna produkcija ROS-a može dovesti do vaskularnih oštećenja i daljeg razvoja hipertenzije. Superoksid anjon u interakciji sa NO daje peroksinitrit čime se remeti vazodilatacija usled smanjene količine NO s jedne strane, dok pored toga peroksinitrit narušava funkcionisanje endotelne azot oksid sintaze (eNOS) (Rodrigo i sar, 2011, Baradaran i sar, 2014).

Endotelna azot oksid sintaza proizvodi NO koristeći L-arginin kao supstrat i kosupstrate molekularni kiseonik i NADPH (Förstermann i Sessa, 2012). Kofaktor tetrahidrobiopterin (BH₄) omogućava transfer elektrona sa reduktaznog na oksigenazni domen eNOS-a i ima ključnu ulogu u normalnom funkcionisanju enzima. U interakciji sa peroksinitritom dolazi do oksidacije BH₄ i njegovog prevođenja u dihidrobiopterin (BH₂) što uzrokuje destabilizaciju sintaze. Ovaj fenomen poznat je pod nazivom “dekuplovanje eNOS-a” (engl. *eNOS uncoupling*), a za posledicu ima izmenjenu funkciju enzima koji umesto NO počinje da sintetiše superoksid anjon radikal dodatno doprinoseći produkciji ROS-a i povećanju oksidativnog stresa. Smatra se da dekuplovanje eNOS-a ima značajnu ulogu u razvoju endotelne disfunkcije i kardiovaskularnih oboljenja (Janaszak-Jasiecka i sar, 2023).

Ksantin oksidaza je enzim koji katalizuje poslednja dva koraka metabolizma purina (Rodrigo i sar, 2011). Koristeći ksantin ili hipoksantin kao supstrat ksantin oksidaza redukuje molekularni kiseonik do superoksid anjon radikala ili vodonik peroksida (Chung i sar, 1997), što predstavlja značajan izvor ROS-a i oksidativnog stresa u endotelnim ćelijama krvnih sudova.

Kao što je prethodno objašnjeno mitohondrije imaju značajnu ulogu u produkciji slobodnih radikala, pri čemu kompleksi I i III mitohondrijskog respiratornog lanca predstavljaju glavne izvore superoksid anjona (Dikalov i Ungvari, 2013). Kompleks I povećava količinu ROS-a u mitohondrijskom matriksu, dok kompleks III produkuje slobodne radikale bilo u matriks ili intermembranski prostor mitohondrija (Scialò i sar, 2017). Pokazano je da je kod hipertenzivnih osoba povećana produkcija ROS-a u okviru mitohondrijskog kompleksa I usled reverznog transporta elektrona (engl. *reverse electron transport*, RET). RET je proces prilikom koga se elektroni sa ubikinola transportuju nazad na kompleks I pri čemu se produkuje O₂⁻, a NAD⁺ redukuje u NADH (Dikalov i Ungvari, 2013; Scialò i sar, 2017).

Tokom trudnoće povišen nivo ROS-a u perifernoj cirkulaciji majke dovodi do aktivacije monocita i neutrofila koji, između ostalog, imaju ulogu u produkciji TNF- α i IL-6, pa ovi proinflamatorni citokini potencijalno predstavljaju biomarkere oksidativnog stresa u trudnoći. Takođe, aktivirani neutrofili predstavljaju značajne izvore dodatnih količina ROS-a aktivacijom gore navedenih enzima. Azot oksid ima važnu ulogu u razvoju placente, angiogenezi i invaziji trofoblata, te poremećaj nivoa NO za posledicu ima ćelijsku smrt i disfunkciju endotelnih ćelija što leži u osnovi razvoja hipertenzivnih poremećaja u trudnoći (Phoswa i Khaliq, 2021).

1.2.3.4. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je proces tokom kog dolazi do formiranja lipidnih hidroperoksida (engl. *lipid hydroperoxides*, LOOH) usled interakcije slobodnih radikala i, najčešće, polinezasićenih masnih kiselina, ili, ređe, glikolipida, fosfolipida i holesterola (Yin i sar, 2011; Ayala i sar, 2014). Ukoliko nivo lipidne peroksidacije prevazilazi reparativne kapacitete ćelije pokreće se apoptoza ili nekroza, što za posledicu može imati razvoj različitih patoloških stanja.

Slobodni radikali koji najčešće indukuju peroksidaciju lipida su hidroksil radikal (HO^\bullet) i hidroperoksil radikal (HO_2^\bullet), a sam proces sastoji se iz tri faze: inicijacije, propagacije i terminacije. Inicijacija lipidne peroksidacije podrazumeva apsorpciju vodonikovog atoma od strane slobodnih radikala i nastanak lipidnih radikala (L^\bullet). Tokom propagacije vrši se adicija kiseonika i formiranje lipidnog peroksi radikala (LOO^\bullet). LOO^\bullet zatim može da nadomesti vodonik koji mu nedostaje od drugog nezasićenog lipida formirajući lipidni hidroperoksid (LOOH) i nov L^\bullet koji dalje nastavlja lančanu reakciju. Prilikom terminacije antioksidansi poput vitamina E imaju ulogu donora atoma vodonika koji se vezuje za LOO^\bullet , pri čemu nastaje radikal antoksidansa koji interagujući sa novim LOO^\bullet formira neradikalske produkte (Yin i sar, 2011; Ayala i sar, 2014). Pored LOOH kao primarnog produkta, tokom lipidne peroksidacije dolazi do formiranja sekundarnih produkata među kojima su najznačajniji malondialdehid (MDA) i 4-hidroksinonenal (4-HNE) čiji su stabilnost i toksičnost viši u odnosu na hidroperokside.

MDA ostvaruje svoje negativne efekte kroz interakcije s proteinima i DNK formirajući napredne krajnje produkte lipidne peroksidacije (engl. *advanced lipid peroxidation end-products*, ALEs). Jedan od najznačajnijih proteina s kojima MDA interaguje je protein kinaza C što može dovesti do remećenja različitih bioloških procesa poput diferencijacije, proliferacije i inflamacije. Interakcijom sa DNK, MDA može indukovati nastanak tačkastih mutacija, promena okvira čitanja, prekida u lancu DNK molekula, zaustavljanje ćelijskog ciklusa i apoptozu (Ayala i sar, 2014). U interakciji sa tiobarbituratnom kiselinom, MDA formira reaktivne supstance tiobarbituratne kiseline (engl. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS) čija se koncentracija može relativno jednostavno i brzo izmeriti kolorimetrijskom metodom, te MDA predstavlja značajan biomarker oksidativnog stresa i lipidne peroksidacije i u širokoj je upotrebi u kliničkim istraživanjima (Aguilar Diaz De Leon i Borges, 2020). Dosadašnje studije ukazuju na povišene nivoe MDA i lipidne peroksidacije kod trudnica sa GDM ili HDP u poređenju sa zdravim trudnicama (Arribas i sar, 2016; Draganovic i sar, 2016).

1.2.3.5. Oštećenja DNK molekula

Povišen nivo oksidativnog stresa i ROS-a u ćeliji može dovesti do oštećenja DNK molekula. Glavnu ulogu u nastanku ovih oštećenja ima hidroksil anjon radikal koji kao dva najčešća produkta oksidacije DNK daje 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) i 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oxodG). OH^\bullet ili $^1\text{O}_2$ interagujući sa guaninom dovode do hidroksilacije ugljenika na poziciji C8 pri čemu nastaje 8-OHdG koji keto-enolnom tautomerizacijom može preći u 8-oxodG (Urbaniak i sar, 2020). Iako reaktivne kiseonične vrste mogu formirati i druge vrste DNK oštećenja, zbog relativno jednostavnog načina nastanka i svog promutagenog efekta navedeni produkti su najzastupljeniji (Valavanidis i sar, 2009). Poznato je da se u ćeliji tokom dana formira do 10^5 8-oxoG lezija, a njihov negativan efekat ogleda se u nastanku GC→TA transverzija (Valavanidis i sar, 2009; Urbaniak i sar, 2020). Oksidativna oštećenja DNK najčešće se dešavaju u regionima sa visokim sadržajem GC parova, poput sekvenci za koje se vezuju transkripcioni faktori, što za posledicu može imati izmenjenu ekspresiju gena (Ghosh i Mitchell, 1999).

U normalnim uslovima navedene oksidovane baze bivaju prepoznate i reparirane mehanizmom ekscizija baza (engl. *DNA base excision repair pathway*, BER) u kome glavnu ulogu imaju enzimi 8-oksoguanin-DNK glikozilaza 1 (OGG1) i MutT homolog (MTH1) (Urbaniak i sar, 2020). U uslovima hiperglikemije smanjena je efikasnost BER mehanizma kao posledica snižene ekspresije 8-oxoG-DNK glikozilaze (OGG1), a usled redoks-zavisne aktivacije Akt proteina i posledične fosforilacije tuberina (Simone i sar, 2008). Takođe, poznato je da je u slučajevima plućne hipertenzije povećan nivo oštećenja DNK molekula usled snižene ekspresije BRCA1 (engl. *breast cancer 1 protein*) i TopBP1 (engl. *topoisomerase DNA II binding protein 1*) proteina (Ranchoux i sar,

2016), ali njihova uloga u održanju integriteta genoma u slučaju gestacijske hipertenzije nije razjašnjena. Do danas, nije u potpunosti sagledano da li se stepen oštećenja DNK molekula dovodi u vezu sa rizikom za razvoj različitih poremećaja u trudnoći, ali nekolicina studija ukazuje na povišene nivoe DNK oštećenja kod trudnica sa hiperglikemijom ili hipertenzijom (Hilali i sar, 2013; Gelaleti i sar, 2015; Urbaniak i sar, 2020).

2. CILJEVI

Kako bi se doprinelo boljem razumevanju uloge miRNK (miR-17, miR-29a i miR-181a), proinflammatoryh citokina (IL-1 β , TNF- α , IL-6 i IL-17) i parametara oksidativnog stresa (TBARS, 8-OHdG) kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom i gestacijskom hipertenzijom i kako bi se ispitalo da li neki od odabranih parametara može služiti kao novi biomarker za detekciju navedenih oboljenja postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Utvrđivanje nivoa genske ekspresije miR-17, miR-29a i miR-181a kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom i trudnica sa gestacijskom hipertenzijom, i njihovo poređenje sa nivoima ekspresije kod zdravih trudnica.
2. Utvrđivanje nivoa ekspresije gena za proinflammatory citokine *IL-1 β* , *TNF- α* , *IL-6* i *IL-17* u grupi trudnica sa gestacijskim dijabetesom i trudnica sa gestacijskom hipertenzijom i njihovo poređenje sa ekspresijom ovih gena kod zdravih trudnica.
3. Ispitivanje međusobne povezanosti nivoa genske ekspresije analiziranih miRNK i citokina i njihove povezanosti sa kliničkim parametrima kako u grupi trudnica sa dijabetesom, tako i u grupi hipertenzivnih trudnica.
4. Utvrđivanje da li nivo ekspresije ispitivanih miRNK i citokina ima dovoljnu diskriminatornu moć za detekciju trudnica sa GDM-om i GH-om, te da li se navedeni parametri mogu koristiti kao biomarkeri gestacijskog dijabetesa i/ili gestacijske hipertenzije.
5. Detekcija nivoa oštećenja DNK molekula merenjem 8-hidroksi-2'-deoksiguanozina (8-OHdG) i lipidne peroksidacije analizom malondialdehid ekvivalenta (TBARS) kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom i gestacijskom hipertenzijom i njihovo poređenje sa nivoima navedenih parametara utvrđenim kod zdravih trudnica.
6. Analiza povezanosti markera lipidne peroksidacije i oštećenja DNK sa kliničkim parametrima u grupi trudnica sa gestacijskim dijabetesom i gestacijskom hipertenzijom.
7. Određivanje diskriminatorne moći parametara oksidativnog stresa za detekciju trudnica sa ispitivanim patološkim stanjima u cilju determinisanja potencijalnih biomarkera gestacijskog dijabetesa i gestacijske hipertenzije.
8. Ispitivanje efekata različitih koncentracija leka Metildopa u *in vitro* uslovima na nivo oksidativnog stresa, merenjem 8-hidroksi-2'-deoksiguanozina i malondialdehid ekvivalenta u kulturi ćelija limfocita periferne krvi.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Studijska grupa

Studija je dizajnirana po tipu slučaj-kontrola, a ispitivanje je bilo podeljeno u dve faze. Tokom prve faze istraživanja određivan je nivo genske ekspresije miRNK i proinflamatornih citokina kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom i gestacijskom hipertenzijom. Ovom fazom ispitivanja obuhvaćeno je 95 trudnica gestacijske starosti 24-36 nedelja koje su prema kliničkim karakteristikama podeljene u 3 grupe. Prvu grupu činile su pacijentkinje koje su tokom trudnoće razvile gestacijski dijabetes melitus (GDM grupa, 31 pacijentkinja). Pacijentkinje kod kojih je u toku trudnoće dijagnostikovana gestacijska hipertenzija činile su drugu ispitivanu grupu (GH grupa, 30 pacijentkinja). Trudnice koje do porođaja nisu razvile komplikacije svrstane su u treću, kontrolnu grupu (CG, 34 trudnice). U drugu fazu istraživanja koja je obuhvatila ispitivanje oksidativnih oštećenja kod trudnica sa GDM i GH uključeno je 86 pacijenkinja gestacijske starosti između 24 i 28 nedelja koje su prema istom obrascu podeljene u grupe: GDM (37 pacijentkinja), GH (21 pacijentkinja) i kontrolna grupa (28 zdravih trudnica). Sve trudnice uključene u ovu studiju dolazile su na redovne ginekološke preglede na Ginekološko-akušersku kliniku “Narodni front” i praćene su na klinici do porođaja.

Gestacijski dijabetes dijagnostikovao je primenom oralnog testa tolerancije glukoze prema kriterijumima postavljenim od strane Američkog udruženja za dijabetes (American Diabetes Association, 2021), dok je gestacijska hipertenzija dijagnostikovana na osnovu kriterijuma datih od strane Američkog koledža za ginekologiju i akušerstvo (ACOG Practice Bulletin, 2020).

Pre uključivanja u studiju svaka ispitanica je potpisala informisani pristanak za učešće u istraživanju, a zatim su prikupljene informacije o njihovoj medicinskoj i akušerskoj anamnezi, kao i demografski i lični podaci (etnička pripadnost, zanimanje, starost trudnice, visina, težina pre trudnoće i u trenutku uključivanja u studiju, podaci o prethodnim trudnoćama). Sve trudnice su popunile anamnestički upitnik koji se odnosio i na njihove životne navike pre i u toku trudnoće (konzumacija lekova, vitamina, pušačke navike) (prilog 1). Gestacijska starost trudnoće procenjena je na osnovu ultrazvučnog pregleda obavljenog na Klinici.

Kriterijumi za isključivanje trudnica iz studije bili su: višeplodna trudnoća, postojanje hroničnih ili sistemskih oboljenja pre trudnoće, intrauterini zastoje u rastu ploda (IUZR), ultrazvučno viđene anomalije fetusa, intrauterina smrt ploda, postojanje hipertenzije ili hiperglikemije pre 20. nedelje gestacije.

Uzorkovanje periferne krvi ispitanica za potrebe studije učinjeno je tokom venepunkcije radi redovnih laboratorijskih analiza. Uzorci korišćeni za analizu ekspresije miRNK i proinflamatornih citokina uzeti su u po dve vakutajner epruvete sa EDTA kao antikoagulansom, dok su za potrebe ispitivanja oksidativnih oštećenja uzorci uzeti u vakutajner epruvete sa heparinom. U GDM grupi uzorci krvi prikupljeni su pre uključivanja dijabetične dijete. Od ukupno 30 trudnica iz GH grupe koje su uključene u prvu fazu studije u trenutku uzimanja uzorka periferne krvi 23 trudnice su uzimale antihipertenzivnu terapiju, lek Metildopa, propisanu od strane lekara. U drugoj fazi studije sve trudnice iz GH grupe, ukupno 21, bile su na terapiji lekom Metildopa.

Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Ginekološko-akušerske klinike “Narodni front” (broj odobrenja: 05006-2020-18898, prilog 2). Eksperimentalni deo istraživanja sproveden je u Laboratoriji za humanu genetiku Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i na Odseku za medicinsku genetiku Ginekološko-akušerske klinike “Narodni front”.

3.2. Određivanje nivoa ekspresije mikroRNK

3.2.1. Izolacija RNK

Odmah nakon venepunkcije po jedna EDTA vakutajner epruveta sa uzorkom pune krvi pacijenta centrifugirana je na 2500 x g 15 minuta na sobnoj temperaturi (15-25 °C). Plazma je zatim prebačena u novu tubu, centrifugirana još jednom pod istim uslovima, a zatim ponovo prebačena u novu tubu ostavljajući 100 µl na dnu prve tube. Uzorci plazme su potom čuvani na -80 °C do izolacije RNK.

Ukupna RNK, uključujući miRNK, izolovana je iz 200 µl plazme korišćenjem komercijalno dostupnog kita (miRNeasy Serum/Plasma Kit, Qiagen, Dusseldorf, Nemačka) prema uputstvima datim od strane proizvođača (miRNeasy Serum/Plasma Handbook, Qiagen). Uzorci, prethodno čuvani u zamrzivaču na -80 °C, inkubirani su 5 minuta na 37 °C na grejnoj ploči radi adekvatne pripreme uzorka. Potom je u 200 µl plazme dodato 1000 µl QIAzol Lysis reagensa (odnos volumena uzorka i QIAzol Lysis reagensa 1:5), uzorci su vorteksovani, a zatim inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je dodat hloroform u volumenu jednakom početnoj zapremini uzorka (200 µl). Uzorci su vorteksovani 15 sekundi, zatim inkubirani 2-3 minuta na sobnoj temperaturi, a nakon toga su centrifugirani 15 minuta na 12000 x g na 4 °C što omogućava razdvajanje lizata u tri faze. Nakon centrifugiranja gornja faza prebačena je u nove tube od 1,5 ml strogo vodeći računa da se ne prenese i srednja faza. Dodat je 1,5 volumen 100% etanola i sadržaj je pažljivo izmešan pipetom. Nakon dodavanja etanola, 700 µl uzorka prebačeno je na kolonice koje su u 2 ml kolekcionim tubama dobijenim u okviru kita (RNeasy MinElute spin column). Kolonice su centrifugirane na 12000 rpm (engl. *revolutions per minute*) 45 sekundi na sobnoj temperaturi. Nakon centrifugiranja ukupna RNK ostaje vezana za membranu kolonice, dok fenol i ostale komponente u narednim koracima ispiranja bivaju prikupljene u kolekcionoj tubi i odbačene. Preostali deo uzorka iz tube od 1,5 ml sa etanolom zatim je prebačen na istu kolonicu, ponovljeno je centrifugiranje i odbačen deo iz kolekcionarne tube. Dodato je 700 µl RWT pufera na kolonicu, uzorci su centrifugirani pod istim uslovima i odbačen odlivak iz kolekcionarne tube. Zatim je dodato je 500 µl RPE pufera, ponovljeno centrifugiranje i odliven deo iz kolekcionarne tube. Prilikom prvog korišćenja u RWT pufer je dodato 2 volumena 96-100% etanola, a u RPE pufer 4 volumena 96-100% etanola u cilju pripreme radnog rastvora. U kolonice je potom dodato 500 µl 80% etanola (pripremljenog sa vodom koja ne sadrži RNaze), uzorci su centrifugirani 3 minuta na 12000 rpm, a kolonice nakon toga prebačene u nove 2 ml kolekcionarne tube. Otvorene kolekcionarne tube sa kolonicama centrifugirane su 5 minuta na najvećoj brzini kako bi se osušila membrana. Kolonice su prebačene u nove kolekcionarne tube, dodato je 14 µl vode koja ne sadrži RNazu vodeći računa da se voda nalije tačno u centar membrane. Uzorci su centrifugirani 1,5 minut na najvećoj brzini čime je izvršena elucija ukupne RNK. Izolovana RNK čuvana je na -80 °C do narednog koraka.

3.2.2. Reverzna transkripcija mikroRNK

Za sintezu cDNK korišćen je TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u skladu sa protokolom datim od strane proizvođača (TaqMan® Advanced miRNA Assays User Guide, 2016).

3.2.2.1. Poliadenilacija

Poliadenilacija, odnosno dodavanje poli(A) repa na 3' kraj mikroRNK, izvršena je korišćenjem Poly(a) reakcione smeše predstavljene u tabeli 1. Reakciona smeša je pripremana u 1,5 ml tubama multiplikacijom količina reagenasa datih u tabeli sa brojem uzoraka koji su u ovom koraku obrađeni. Čitav proces sproveden je na ledu.

Tabela 1. Sastav poly(A) reakcione smeše (količine predstavljene po uzorku)

| | |
|--------------------|--------|
| 10x Poly(A) puffer | 0,5 µl |
| ATP | 0,5 µl |
| Poly(A) enzim | 0,3 µl |
| Voda bez RNAze | 1,7 µl |
| Ukupan volumen | 3 µl |

Reakciona smeša je vorteksovana, zatim kratko centrifugirana kako bi se sav sadržaj spustio na dno tube i razbili mehurići. U sterilnu reakcionu tubu od 0,2 ml dodato je 2 µl uzorka dobijenog u prethodnom procesu izolacije RNK, a zatim i 3 µl reakcione smeše. Uzorci sa reakcionom smešom su zatim vorteksovani i kratko centrifugirani, nakon čega su inkubirani u PCR aparatu prema temperaturnom profilu datom u tabeli 2 (ukupan volumen reakcije 5 µl). Po završetku inkubacije odmah je nastavljen sledeći korak.

Tabela 2. Temperaturni uslovi inkubacije tokom poliadenilacije

| | Temperatura | Trajanje |
|------------------------|-------------|--------------|
| Poliadenilacija | 37 °C | 45 minuta |
| Zaustavljanje reakcije | 65 °C | 10 minuta |
| Hlađenje | 4 °C | Neograničeno |

3.2.2.2. Ligacija adaptera

Ligacija, odnosno vezivanje adaptera za 5' kraj mikroRNK, omogućena je korišćenjem reakcione smeše prikazane u tabeli 3. 50% PEG 8000 je potrebno prethodno zagrejati na 15-25 °C.

Tabela 3. Sastav reakcione smeše za ligaciju adaptera (količine su predstavljene po uzorku)

| | |
|----------------------|--------|
| 5x DNK ligazni pufer | 3 µl |
| 50% PEG 8000 | 4,5 µl |
| 25x Adapter | 0,6 µl |
| RNK ligaza | 1,5 µl |
| Voda bez RNAze | 0,4 µl |
| Ukupan volumen | 10 µl |

Nakon pripreme, reakciona smeša je vorteksovana i kratko centrifugirana, a potom je po 10 µl reakcione smeše prebačeno u svaku od tubica u kojima se nalaze produkti poliadenilacije. Tubice su vorteksovane, kratko centrifugirane, a zatim inkubirane kako je predstavljeno u tabeli 4 (ukupan volumen reakcije je 15 µl). Nakon inkubacije odmah je nastavljen sledeći korak.

Tabela 4. Temperaturni uslovi inkubacije tokom ligacije adaptera

| | Temperatura | Trajanje |
|-------------------|-------------|--------------|
| Ligacija adaptera | 16 °C | 60 minuta |
| Hlađenje | 4 °C | Neograničeno |

3.2.2.3. Reverzna transkripcija

Reakciona smeša za reverznu transkripciju (RT) pripremljena je prema uputstvima datim u tabeli 5. Korišćenje univerzalnog RT prajmera, koji se vezuje za 3' poli(A) rep miRNK, omogućava prevođenje svih mikroRNK iz uzorka u odgovarajuće cDNK.

Tabela 5. Sastav RT reakcione smeše (količine predstavljene po uzorku)

| | |
|----------------------------|-------------|
| 5x RT pufer | 6 μ l |
| dNTP (25nM svaki) | 1,2 μ l |
| 20x Univerzalni RT prajmer | 1,5 μ l |
| 10x RT enzim | 3 μ l |
| Voda bez RNAze | 3,3 μ l |
| Ukupan volumen | 15 μ l |

Reakciona smeša je vorteksovana i kratko centrifugirana, a zatim je po 15 μ l reakcione smeše dodato u svaku tubu sa produktima reakcije iz prethodnog koraka, te je ukupan volumen reakcije bio 30 μ l. Uzorci su vorteksovani, kratko centrifugirani i inkubirani (tabela 6). Po završetku opisanih koraka odmah je nastavljena amplifikacija.

Tabela 6. Temperaturni uslovi inkubacije tokom reverzne transkripcije

| | Temperatura | Trajanje |
|------------------------|-------------|--------------|
| Reverzna transkripcija | 42 °C | 15 minuta |
| Zaustavljanje reakcije | 85 °C | 5 minuta |
| Hlađenje | 4 °C | Neograničeno |

3.2.2.4. Amplifikacija cDNK

U tubama od 1,5ml pripremljena je miR-Amp reakciona smeša (tabela 7), koja je zatim vorteksovana i kratko centrifugirana. Po 45 μ l miR-Amp reakcione smeše sipano je u nove PCR tubice (0,2 μ l). U svaku tubu sa reakcionom smešom dodato je po 5 μ l produkta reverzne transkripcije.

Tabela 7. Sastav miR-Amp reakcione smeše (količine predstavljene po uzorku)

| | |
|----------------------------|--------------|
| 2x miR-Amp smeša | 25 μ l |
| 20x miR-Amp smeša prajmera | 2,5 μ l |
| Voda bez RNAze | 17,5 μ l |
| Ukupan volumen | 45 μ l |

Tubice sa miR-Amp reakcionom smešom i RT produktom su vorteksovane, kratko centrifugirane i stavljene u PCR aparat na kome je podešen program za amplifikaciju (tabela 8). Po završetku programa produkti su čuvani na -20 °C do sledećeg koraka.

Tabela 8. Temperaturni uslovi za amplifikaciju cDNK

| | Temperatura | Trajanje | Broj ciklusa |
|----------------------------------|-------------|--------------|--------------|
| Aktivacija enzima | 95 °C | 5 minuta | 1 |
| Denaturacija | 95 °C | 3 sekunde | 14 |
| Vezivanje prajmera/amplifikacija | 60 °C | 30 sekundi | |
| Zaustavljanje reakcije | 99 °C | 10 minuta | 1 |
| Hlađenje | 4 °C | Neograničeno | 1 |

3.2.3. Određivanje ekspresije miRNK metodom kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu

Nivo ekspresije miRNK određen je primenom metode kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu. Prilikom qPCR reakcije korišćeni su TaqMan Advanced miRNA eseji za odabrane miRNK (hsa-miR-17-5p, hsa-miR-29a-3p, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-191-5p; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) prema uputstvu datom od strane proizvođača (TaqMan® Advanced miRNA Assays User Guide, 2016). Korišćene probe obeležene su FAM bojom koja emituje signal talasne dužine 517 nm. Eseji sadrže “*forward*” i “*reverse*” prajmere, kao i MGB (engl. *minor groove binder*) probe koje na svom 5’ kraju imaju fluorescentnu boju, dok na 3’ kraju sadrže “kvenčer” (engl. *non-fluorescent quencher*, NFQ).

miRNK eseji su prilikom pripreme qPCR reakcije držani na ledu, kratko vorteksovani i centrifugirani. Sekvence zrelih miRNK prikazane su u tabeli 9. Produkti amplifikacije cDNK dobijeni u prethodnom koraku razblaženi su deset puta tako što je u 18 µl 0,1 x TE pufera dodato 2 µl uzorka.

Tabela 9. Sekvence zrelih miRNK

| miRNK | Sekvenca | Dužina (broj nukleotida) |
|-------------|-------------------------|--------------------------|
| miR-17-5p | CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG | 23 |
| miR-29a-3p | UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA | 22 |
| miR-181a-5p | AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU | 23 |
| miR-191-5p | CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG | 23 |

Reakciona smeša (TaqMan® Gene Expression Master Mix, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) kratko je vorteksovana, a zatim je pripremljena qPCR

reakciona smeša prema datom uputstvu zasebno za svaku miRNK uz dodavanje odgovarajućeg eseja (tabela 10).

Tabela 10. Sastav qPCR reakcione smeše (količine predstavljene po uzorku)

| | |
|----------------------------|----|
| Reakciona smeša | 10 |
| TaqMan Advanced miRNK esej | 1 |
| Voda bez RNAze | 4 |
| Ukupan volumen | 15 |

Reakciona smeša za qPCR je vorteksovana i centrifugirana, a zatim je za svaki uzorak prebačeno po 15 μ l smeše u novu PCR tubu od 0,2 ml i dodato po 5 μ l razblažene cDNK. Tubice su vorteksovane i kratko centrifugirane kako bi se razbili mehurići i sadržaj tubice spustio na dno. qPCR je rađen na Line gene K fluorescentnom kvantitativnom PCR detekcionom sistemu (BIOER Technology Co, Hangzhou, Kina) prema uslovima datim u tabeli 11. Svi eksperimenti rađeni su u duplikatu (ukupan volumen reakcije 20 μ l).

Tabela 11. Temperaturni uslovi qPCR reakcije

| | Temperatura | Trajanje | Broj ciklusa |
|----------------------------------|-------------|------------|--------------|
| Aktivacija enzima | 95 °C | 20 sekundi | 1 |
| Denaturacija | 95 °C | 3 sekunde | 40 |
| Vezivanje prajmera/amplifikacija | 60 °C | 30 sekundi | |

Prema dostupnim literaturnim podacima i preporukama proizvođača utvrđeno je da miR-191-5p ima stabilnu ekspresiju u serumu i plazmi, te je odabrana za endogenu kontrolu na osnovu koje je rađena normalizacija ekspresije ispitivanih miRNK (Pescador i sar, 2013; Thermo Fisher Scientific Inc, 2016; Costé i Rouleux-Bonnin, 2020; Formichi i sar, 2021). Nakon svake PCR reakcije određena je Ct vrednost koja je naknadno korišćena za normalizaciju i izračunavanje $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednosti.

3.3. Određivanje nivoa genske ekspresije citokina

3.3.1. Izolacija RNK

Odmah nakon venepunkcije po jedna EDTA vakutajner epruveta centrifugirana je na 3600 rpm. RNK je izolovana iz leukocitnog prstena korišćenjem TRIzol reagensa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD).

U prvom koraku u tubice sa leukocitnim prstenom (300-400 μ l) dodato je 700 μ l pufera za lizu eritrocita (engl. *erythrocyte lysis buffer*, ELB) uz lagano resuspendovanje pipetom. ELB je prethodno napravljen po proskripciji: 1,1 g saharoze, 0,1 ml 1 M TRIS HCl (pH 7,5), 0,1 ml TRITON x 100, 0,05 ml 1M MgCl₂ uz dodavanje destilovane vode do 10 ml, a zatim autoklaviran i čuvan na 4 °C. Prilikom pripreme ELB-a prema datom uputstvu pripremljen je i pufer za lizu leukocita (engl. *leukocyte lysis buffer*, LLB) koji će se koristiti u jednom od narednih koraka: 0,1 ml 1 M Tris-HCl (pH 8), 4 ml 1M NaCl, 0,04 ml 0,5M Na₂EDTA (pH 8), uz dodavanje destilovane vode do 10 ml. Uzorci su po dodavanju ELB-a centrifugirani na 14000 rpm 30 sekundi. Odliven je supernatant i osušene su tubice. Sediment je ispran sa 1 ml ELB-a i pažljivo resuspendovan, a zatim centrifugiran pod istim uslovima. Supernatant je ponovo odliven, a tubice osušene. Pelet je potom resuspendovan u 300 μ l LLB-a, dodato je 20 μ l 10% SDS-a, a nakon toga i 20 μ l proteinaze K (10 ng/ml). Uzorci su potom vorteksovani i inkubirani na 56 °C 30-60 minuta.

Nakon inkubacije dodat je 1 ml TRIzol reagensa, resuspendovano pipetom i inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi (15-25 °C). Dodato je 0,2 ml hloroforma, a potom mućkano u ruci 15 sekundi. Uzorci su zatim centrifugirani na 12000 x g 15 minuta na 4 °C. Izdvojena gornja, bezbojna faza je potom prebačena u nove tubice i dodato je 0,5 ml izopropanola u cilju precipitacije RNK. Uzorci su inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi (15-25 °C), a zatim centrifugirani na 12000 x g 10 minuta na 4 °C. Supernatant je aspiriran i dodat je 1 ml 75% etanola. Uzorci su vorteksovani, a zatim centrifugirani na 7500 x g 5 minuta na 4 °C. Supernatant je aspiriran, a tubice ostavljene otvorene na sobnoj temperaturi 10 minuta. Pelet je resuspendovan u 40 μ l vode bez RNaze. Uzorci su inkubirani u vodenom kupatilu na 55-60 °C 10-15 minuta. Koncentracije RNK molekula proverene su korišćenjem NanoDrop (BioSpec-nano, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) spektrofotometra merenjem apsorbance na 260 nm, dok je merenjem apsorbance na 280 i 230 nm procenjena čistoća uzorka. Uzorci RNK kod kojih je odnos apsorbance 260/280 bio oko 2, odnosno 260/230 između 2 i 2,2 procenjeni su kao uzorci adekvatne čistoće. Uzorci su zatim čuvani na -80 °C do narednog koraka.

3.3.2. Reverzna transkripcija RNK

Za sintezu cDNK korišćen je 1,5 μ g ukupne RNK izolovane u prethodnom koraku i Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kita (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). U svaki uzorak (22 μ l) je dodato po 2 μ l oligo (dT) prajmera (100 μ M), 8 μ l 5x reakcionog pufera, 2 μ l RiboLock inhibitora RNaze (20 U/ μ L), 4 μ l dNTP (10 mM) i 2 μ l RevertAid RT (200 U/ μ L) tako da je ukupan volumen reakcije bio 40 μ l. Prema preporukama proizvođača, temperaturni uslovi PCR-a prilikom reverzne transkripcije bili su: 60 minuta inkubacije na 42 °C, a zatim terminacija reakcije 5 minuta na 70 °C.

3.3.3. Određivanje genske ekspresije citokina metodom kvantitativnog PCR-a u realnom vremenu

U daljem radu sintetisana cDNK korišćena je za amplifikaciju gena za proinflamatorne citokine (*TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6* i *IL-17*) korišćenjem 5X HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Rox) kita (Solis BioDyne, Tartu, Estonija) i Line gene K aparata za qPCR (BIOER Technology Co, Hangzhou, Kina). Po uzorku (2 μ l cDNK) je korišćeno 3 μ l 5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR reakcione smeše, po 1 μ l "forward" i "reverse" prajmera (po 200 nM svakog) i 8 μ l destilovane

vode, tako da je ukupan volumen reakcije bio 15 μ l. Sekvence prajmera korišćenih za amplifikaciju gena za citokine i kontrolni gen prikazane su u tabeli 12.

Tabela 12. Sekvence prajmera korišćenih za odabrane citokine i kontrolni gen

| Gen | “Forward” i “reverse” prajmeri | dužina amplifikata (bp) |
|--------------------------------|--|-------------------------|
| <i>IL-1β</i> | 5'-ACAACAGGAAAGTCCAGGCTA-3' “forward” | 59 |
| | 5'-TGGCAGAAAGGGAACAGAA-3' “reverse” | |
| <i>IL-6</i> | 5'-GTGAGGAACAAGCCAGAGC-3' “forward” | 232 |
| | 5'-TACATTTGCCGAAGAGCC-3' “reverse” | |
| <i>IL-17</i> | 5'-CAATGACCTGGAATTACCCAA-3' “forward” | 52 |
| | 5'-TGAAGGCATGTGAAATCGAGA-3' “reverse” | |
| <i>TNF-α</i> | 5'-CCTGCCCCAATCCCTTTATT-3' “forward” | 81 |
| | 5'-CCCTAAGCCCCCAATTCTCT-3' “reverse” | |
| <i>GAPDH</i> | 5'-TCATGACCACAGTCCATGCCATCA-3' “forward” | 450 |
| | 5'-CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3' “reverse” | |

qPCR reakcija obuhvatala je: inicijalnu denaturaciju 10 minuta na 95 °C; zatim 45 ciklusa po 30 sekundi na svakoj od tri temperature: 95 °C, 60 °C i 72 °C; i finalnu ekstenziju 10 minuta na 72 °C.

Eksperimenti su rađeni u duplikatu, zasebno za svaki od ispitivanih gena, a pored toga je u odvojenoj tubici amplifikovan i gen za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu (*GAPDH*) koji je odabran za endogenu kontrolu i naknadno korišćen za normalizaciju. Nakon svake reakcije proverena je njena specifičnost analizom krive topljenja. Očitane su Ct vrednosti za ispitivani i kontrolni gen i primenjen je $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metod.

3.4. Određivanje nivoa parametara oksidativnog stresa

3.4.1. Određivanje nivoa lipidne peroksidacije

U drugoj fazi istraživanja, u cilju ispitivanja nivoa oksidativnog oštećenja, odnosno lipidne peroksidacije kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom i gestacijskom hipertenzijom, kolorimetrijskom metodom su merene koncentracije reaktivnih supstanci tiobarbituratne kiseline

(TBARs). Metoda se zasniva na interakciji MDA i tiobarbituratne kiseline (TBA) pri čemu se formiraju kompleksi TBARs crveno-roze boje čiji je maksimum apsorpcije na 532 nm (Janero, 1990).

Nakon venepunkcije uzorci su centrifugirani na 3500 rpm, a plazma je zatim prebačena u novu tubu. Eksperimenti su rađeni u duplikatu. Za rastvaranje 2-tiobarbituratne kiseline (1% w/v; Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka) korišćeni su 0,05 M NaOH i HCl (25% w/v), a rastvori su zatim dodati prethodno pripremljenim uzorcima. Uzorci su potom prebačeni u staklenu epruvetu i zagrevani u ključaloj vodi 10 minuta, a reakcija je zaustavljena naknadnim držanjem epruveta 15 minuta na ledu. Radi ekstrakcije hromogena dodat je n-butanol, a centrifugiranjem na 5000 rpm 10 minuta izdvojena je organska faza. Apsorbanca organske faze merena je spektrofotometrijski (Tecan Sunrise microplate reader, Männedorf, Švajcarska) na 532 nm, a dobijene vrednosti izražene su kao nmol TBARs-a (MDA ekvivalent) po mililitru uzorka korišćenjem standardne krive 1,1,3,3-tetrametoksipropana.

3.4.2. Određivanje nivoa oštećenja DNK molekula

Nivo oštećenja DNK molekula i oksidativnog stresa ispitivan je spektrofotometrijski merenjem nivoa 8-hidroksi-2'-deoksiguanozina korišćenjem imunoeseja HT8-oxo-dG ELISA kit II (Trevigen Inc, Gaithersburg, MA, SAD) prema preporukama proizvođača. Uzorci plazme pripremljeni su na isti način kao za analizu TBARs, a eksperimenti su rađeni u duplikatu. Po 50 μ l standarda i uzoraka sipano je u plejt za imunoesej. Nakon dodavanja antitela i inkubacije plejta sat vremena na sobnoj temperaturi, komorice sa uzorcima su isprane 6 puta puferom za ispiranje. Potom su dodata IgG antitela, ponovljeni su inkubacija i ispiranje. Dodato je 100 μ l tetrametilbenzidin susprata, nakon čega je plejt inkubiran 15 minuta u mraku na sobnoj temperaturi, te je dodato 100 μ l rastvora za zaustavljanje reakcije. Apsorbanca je očitana spektrofotometrijski (Tecan Sunrise microplate reader, Männedorf, Švajcarska) na 450 nm talasne dužine. Intenzitet žute boje uzorka obrnuto je proporcionalan koncentraciji 8-OHdG-dG. Količina 8-OHdG preračunata je na osnovu standardne krive, a vrednosti su izražene kao nM 8-OHdG.

3.5. *In vitro* ispitivanja uticaja leka Metildopa na nivo oksidativnog stresa

Uzorci periferne krvi 4 zdrave trudnice zasađeni su u PB-Max medijumu (GIBCO brand, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), tako što je za svaki uzorak zasađeno po 7 odvojenih kultura ćelija. Ćelije su tretirane sa 5 različitih koncentracija leka Metildopa, a odabrane koncentracije leka bile su u skladu sa preporučenim dozama za lečenje hipertenzije i više od preporučenih. Metildopa (Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka) je rastvorena u 0,1 N HCl i dodata kulturi ćelija u navedenim koncentracijama: 1,2 μ g/ml (maksimalna serumska koncentracija leka), 2,4 μ g/ml, 4,8 μ g/ml, 9,6 μ g/ml i 24 μ g/ml. Kako bi se odredio bazalni nivo ispitivanih parametara po jedna kultura svakog uzorka nije bila tretirana. Rastvarač (0,1 N HCl) je dodat u po jednu kulturu svakog uzorka kao negativna kontrola.

Nakon 72 sata kultivacije u prisustvu leka Metildopa po 500 μ l supernatanta svake kulture korišćeno je za dalja ispitivanja nivoa MDA i 8-OHdG u skladu sa procedurama opisanim u poglavljima 3.4. i 3.5. prikazane studije.

3.6. Statistička obrada podataka

Dobijeni rezultati analizirani su u IBM® SPSS® Statistics softveru, verzija 22 (IBM Armonk, NY, SAD), i STATISTICA 6.0 softveru (StatSoft Inc, Tulsa, OK, SAD). Za proveru normalnosti raspodele korišćen je Kolmogorov-Smirnov test. Podaci koji su imali normalnu distribuciju prikazani su kao aritmetičke srednje vrednosti sa standardnim devijacijama ($SV \pm SD$), dok su podaci koji nisu imali normalnu raspodelu logaritmovani i prikazani kao geometrijske srednje vrednosti sa intervalom poverenja (eng. *confidence interval*, CI). Za poređenja u okviru grupa korišćen je Hi kvadrat test. Studentov t-test, Kruskal-Wallis test i Pirsonova regresiona analiza korišćeni su za poređenja između grupa. Korekcija za asocirane varijable rađena je primenom analize kovarijanse (ANCOVA). Prediktivne i diskriminatorne mogućnosti analiziranih parametara procenjene su analizom površine (engl. *area under the curve*, AUC) ispod ROC (engl. *receiver operating characteristics*) krive. Na osnovu Youden-ovog indeksa (maksimalna vrednost: $Y = \text{senzitivnost} + \text{specifičnost} - 1$) su izračunate granične vrednosti za optimalnu specifičnost i senzitivnost parametara iz ROC krive. Logistička regresiona analiza je korišćena za pravljenje kombinovanog modela za predviđanje GDM-a, a verovatnoća predikcije (engl. *predicted probability*) dobijena je primenom formule: $\text{logit}(p = \text{GDM} [\text{GDM/KG}]) = -0,494 + 0,062 \times \text{miR-29a} + 64,903 \times \text{IL-1}\beta$). Dobijeni rezultati interpretirani su u skladu sa preporukama koje je dao Swets (1988): za AUC manji od 0,5 procenjeno je da test nema prediktivnu i dijagnostičku mogućnost, za 0,5-0,7 procenjeno je da test ima slabu, a za 0,7-0,9 zadovoljavajuću prediktivnu i dijagnostičku mogućnost, dok vrednosti više od 0,9 ukazuju na visoku pouzdanost testa. P vrednost manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati prve faze istraživanja

4.1.1. Kliničke karakteristike ispitanica

Trudnice uključene u prvu fazu studije podeljene su u tri grupe prema prethodno opisanim kriterijumima (sekcija 3.1.). Broj ispitanika svake grupe, starosna dob i kliničke karakteristike prikazane su u tabeli 13. Između grupa nije postojala statistički značajna razlika u starosnoj dobi trudnica ($P_1=0,100$, $P_2=0,119$; P_1 , P_2 vrednost – P vrednost dobijena poređenjem GDM, odnosno GH grupe, redom, sa CG grupom). Indeks telesne mase pre trudnoće bio je statistički značajno viši u obe ispitivane grupe nego u kontrolnoj grupi ($P_1=0,037$, $P_2=0,011$). Indeks telesne mase u trenutku uzorkovanja krvi (trenutni BMI u daljem tekstu), procenat povećanja telesne težine i sistolni krvni pritisak bili su statistički značajno viši u grupi trudnica sa GH u poređenju sa zdravim trudnicama (P vrednosti, redom, $1,98E-07$, $0,0006$ i $3,90E-09$), dok analizom navedenih parametara između GDM i CG grupe nije uočena značajna razlika (P vrednosti, redom, $0,069$, $0,070$, $0,704$). Poređenjem među grupama nije utvrđeno postojanje značajne razlike u nivou dijastolnog krvnog pritiska ($P_1=0,088$, $P_2=0,129$). Sve trudnice su u toku trudnoće uzimale vitaminske suplemente, dok je 23 GH trudnica bilo na antihipertenzivnoj terapiji lekom Metildopa ordiniranoj od strane lekara. GDM trudnice nisu uzimale medikamentoznu terapiju, a dijabetična dijeta je kod ovih trudnica uvedena nakon uzorkovanja krvi za potrebe studije.

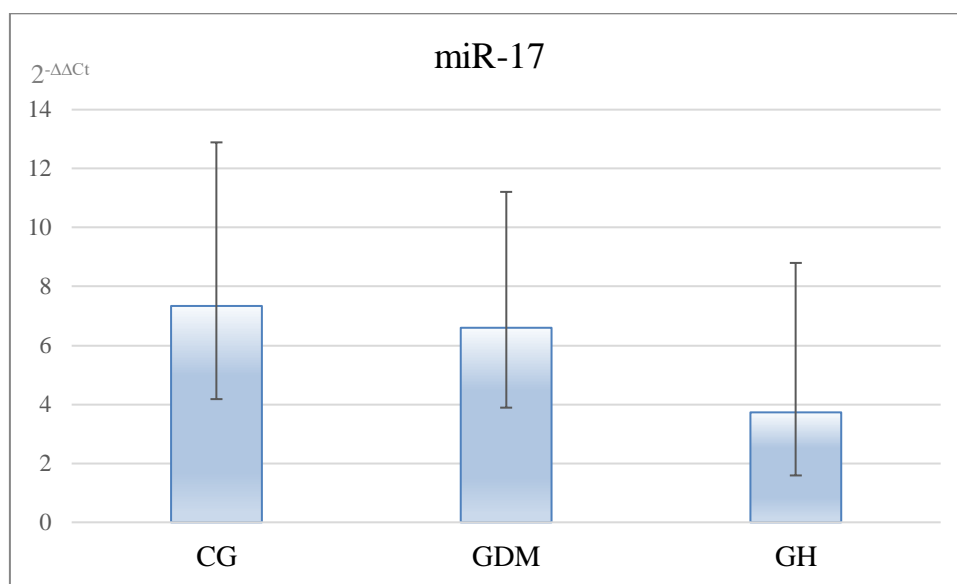
Tabela 13. Kliničke karakteristike trudnica uključenih u prvu fazu studije i poređenje analiziranih grupa trudnica u odnosu na kontrolne trudnice (CG – kontrolna grupa, GDM – gestacijski dijabetes, GH – gestacijska hipertenzija)

| Parametar i broj ispitanica | CG (N=34) | GDM (N=31) | GH (N=30) | P_1 | P_2 |
|--|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------------|
| Godine starosti ^a | 31 (20-39) | 33 (19-45) | 33 (20-42) | 0,100 | 0,119 |
| BMI pre trudnoće, kg/m ² | 21,9±3 | 24,3±5 | 25,5±5 | 0,037* | 0,011* |
| Trenutni BMI, kg/m ² | 24±3 | 26,7±5 | 29,5±4 | 0,069 | 1,98E-07*** |
| Procenat povećanja telesne mase, % | 10±5 | 13±8 | 17±10 | 0,070 | 0,0006*** |
| Konsumacija cigareta (pušači/nepušači) ^b | 7/27 | 9/22 | 7/23 | 0,430 | 0,791 |
| Sistolni krvni pritisak (mm Hg) | 112±9 | 110±1 | 143±24 | 0,704 | 3,90E-09*** |
| Dijastolni krvni pritisak (mm Hg) | 75±6 | 67±10 | 88±19 | 0,088 | 0,129 |

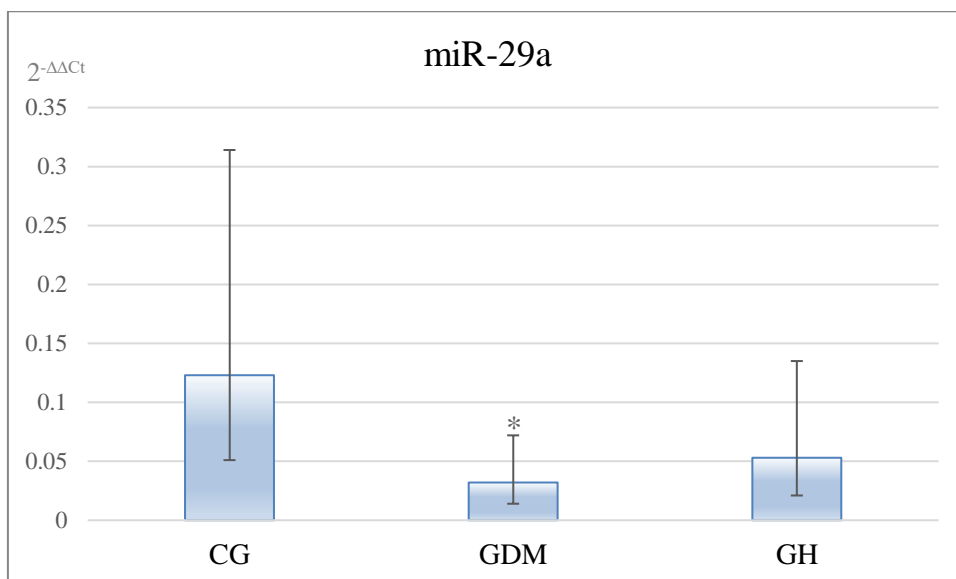
BMI – indeks telesne mase; P_1 , P_2 vrednost – P vrednosti dobijene poređenjem GDM (P_1), odnosno GH grupe (P_2), redom, sa kontrolnom (CG) grupom; Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti ± standardna devijacija; ^aVrednosti prikazane kao srednji broj godina ispitanika iz odgovarajuće grupe (min-max); ^bZa poređenje među grupama korišćen Hi kvadrat test. Statistički značajne vrednosti su boldovane, a nivo značajnosti označen brojem zvezdica: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

4.1.2. Ekspresija miRNK

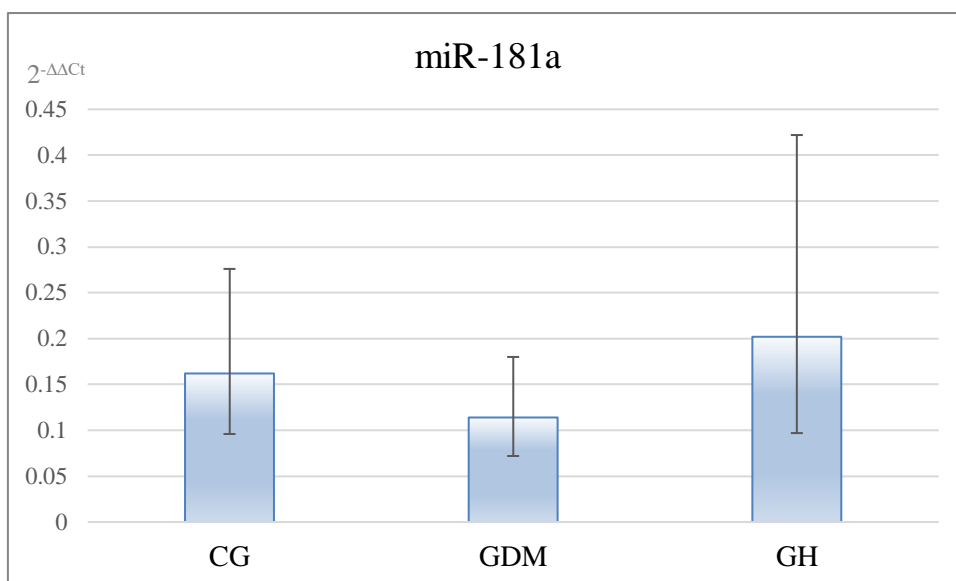
Nivoi ekspresije ispitivanih miRNK (miR-17, miR-29a, miR-181a) u grupi trudnica sa dijabetesom i hipertenzijom, kao i zdravih trudnica kvantifikovane su iz uzoraka plazme periferne krvi, korišćenjem miR-191 kao endogene kontrole. Iako je zabeležena niža ekspresija miR-17 u GH grupi u odnosu na kontrolu, ekspresija navedene miRNK nije se statistički značajno razlikovala među grupama ($P_1=0,789$, $P_2=0,191$) (slika 8). Ekspresija miR-29a bila je niža kod ispitanica u odnosu na zdrave trudnice, ali statistički značajna razlika uočena je samo u GDM grupi ($P_1=0,031$, $P_2=0,196$) (slika 9). Najniža ekspresija miR-181a zabeležena je kod trudnica sa dijabetesom, a najviša kod ispitanica sa hipertenzivnim poremećajem, ali razlike u njoj ekspresiji u odnosu na kontrolu nisu bile statistički značajne ($P_1=0,326$, $P_2=0,603$) (slika 10). Nakon izvršene korekcije za udružene varijable (godine starosti trudnice, nedelja gestacije, procenat povećanja telesne mase) razlika u nivou ekspresije miR-29a između GDM i CG trudnica imala je veći nivo značajnosti ($P=0,006$).



Slika 8. Nivo ekspresije miR-17 u CG, GDM i GH grupi, prikazanih preko $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednosti. Vrednosti ispitivanih parametara prikazane su kao geometrijska srednja vrednja sa intervalom poverenja.



Slika 9. Nivo ekspresije miR-29a u CG, GDM i GH grupi, prikazanih preko $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednosti. Vrednosti ispitivanih parametara prikazane su kao geometrijska srednja vrednost sa intervalom poverenja. Statistički značajne razlike ispitivane grupe u poređenju sa kontrolom označene su zvezdicom: * $p < 0,05$.

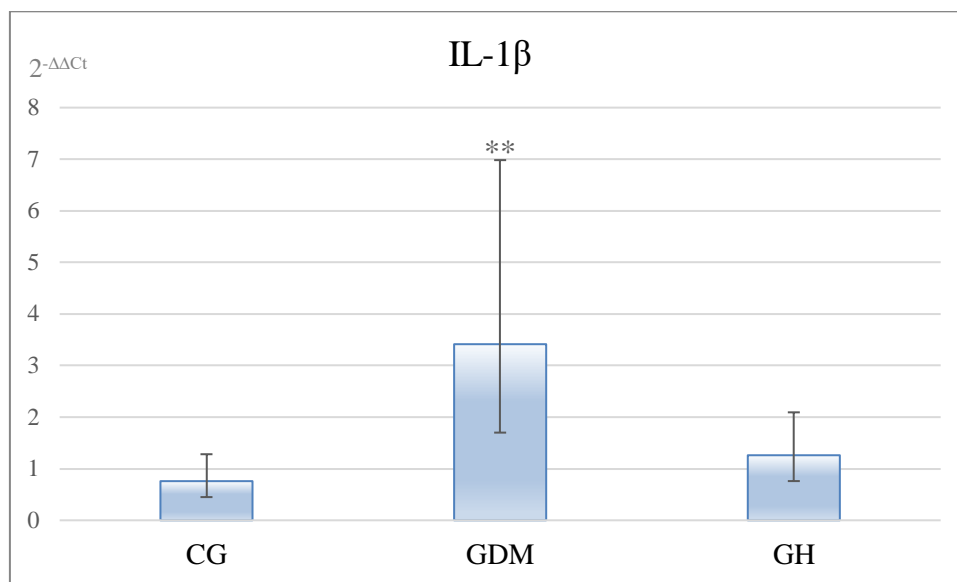


Slika 10. Nivo ekspresije miR-181a u CG, GDM i GH grupi, prikazanih preko $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednosti. Vrednosti ispitivanih parametara prikazane su kao geometrijska srednja vrednost sa intervalom poverenja.

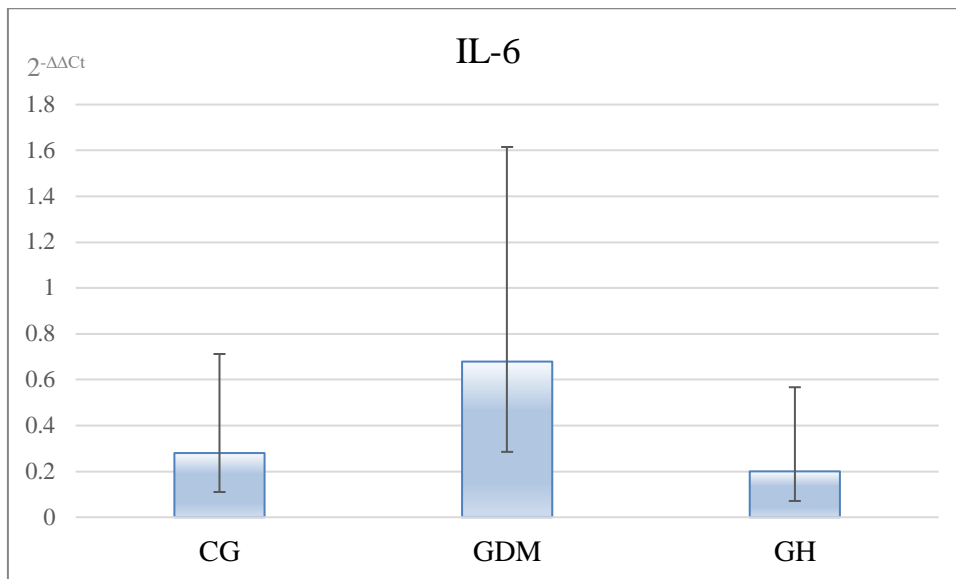
4.1.3. Ekspresija citokina

Značajna razlika u nivou genske ekspresije *IL-1 β* zabeležena je kod trudnica sa dijabetesom kod kojih je navedeni citokin imao 4,5 puta višu ekspresiju nego u kontrolnoj grupi ($P_1=0,002$) (slika 11). Nakon korekcije za udružene varijable (godine starosti trudnice, nedelja gestacije, procenat povećanja telesne mase) razlika u nivou ekspresije *IL-1 β* ostala je statistički značajna ($P=0,036$). U grupi trudnica sa hipertenzijom ekspresija *IL-1 β* nije bila značajno različita u poređenju sa kontrolnom grupom ($P=0,180$) (slika 11).

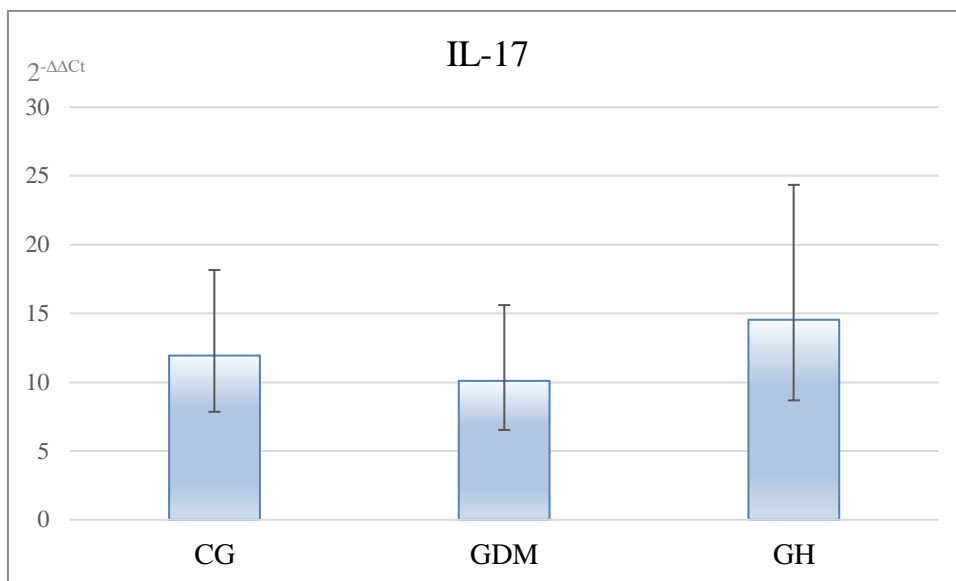
Iako je uočen viši nivo ekspresije *IL-6* u GDM nego u CG grupi, ova razlika nije bila statistički značajna ni u jednoj od ispitivanih grupa ($P_1=0,180$, $P_2=0,640$) (slika 12). Ekspresija *IL-17* bila je najviša u GH grupi, ali bez značajne razlike među poređenim grupama ($P_1=0,590$, $P_2=0,560$) (slika 13). *TNF- α* je imao značajno višu ekspresiju kod trudnica sa hipertenzijom u poređenju sa zdravim trudnicama, čak 1,65 puta viši nivo nego u CG grupi ($P=0,030$), dok se u GDM grupi ekspresija ovog citokina nije razlikovala u odnosu na kontrolu ($P=0,954$) (slika 14).



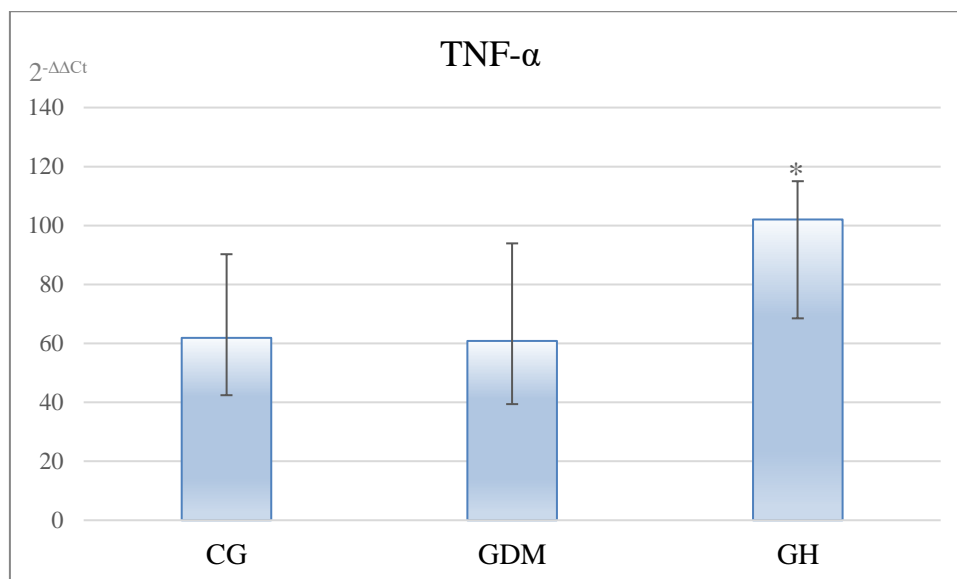
Slika 11. Nivo ekspresije iRNK *IL-1 β* u CG, GDM i GH grupi, prikazanih preko $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednosti. Vrednosti ispitivanih parametara prikazane su kao geometrijska srednja vrednost sa intervalom poverenja. Statistički značajne razlike ispitivane grupe u poređenju sa kontrolom označene su zvezdicama: ** $p<0,01$.



Slika 12. Nivo ekspresije iRNK *IL-6* u CG, GDM i GH grupi, prikazanih preko $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednosti. Vrednosti ispitivanih parametara prikazane su kao geometrijska srednja vrednost sa intervalom poverenja.



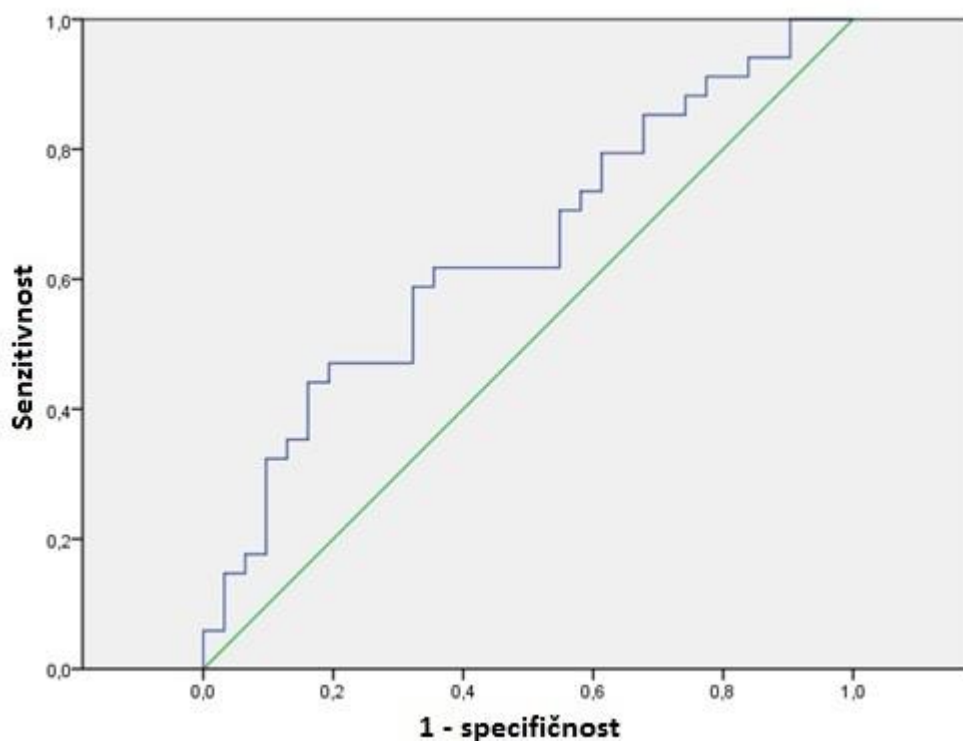
Slika 13. Nivo ekspresije iRNK *IL-17* u CG, GDM i GH grupi, prikazanih preko $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednosti. Vrednosti ispitivanih parametara prikazane su kao geometrijska srednja vrednost sa intervalom poverenja.



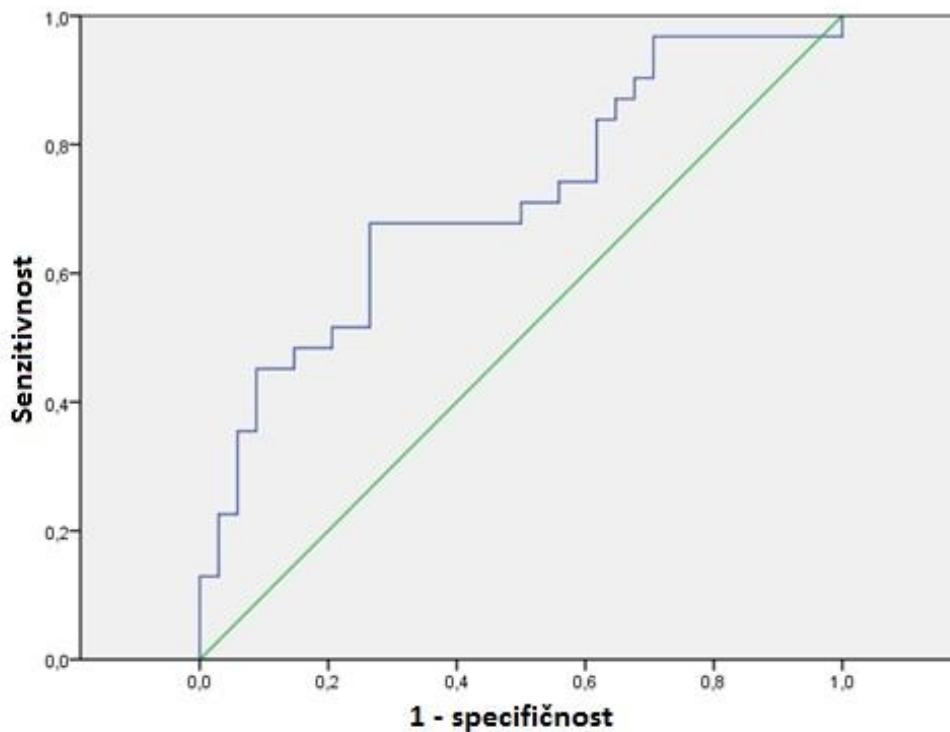
Slika 14. Nivo ekspresije iRNK *TNF-α* u CG, GDM i GH grupi, prikazanih preko $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vrednosti. Vrednosti ispitivanih parametara prikazane su kao geometrijska srednja vrednja sa intervalom poverenja. Statistički značajne razlike ispitivane grupe u poređenju sa kontrolom označene su zvezdicom: * $p < 0,05$.

4.1.4. Analiza prediktivnih i diskriminatorne mogućnosti miR-29a, *IL-1β* i *TNF-α*

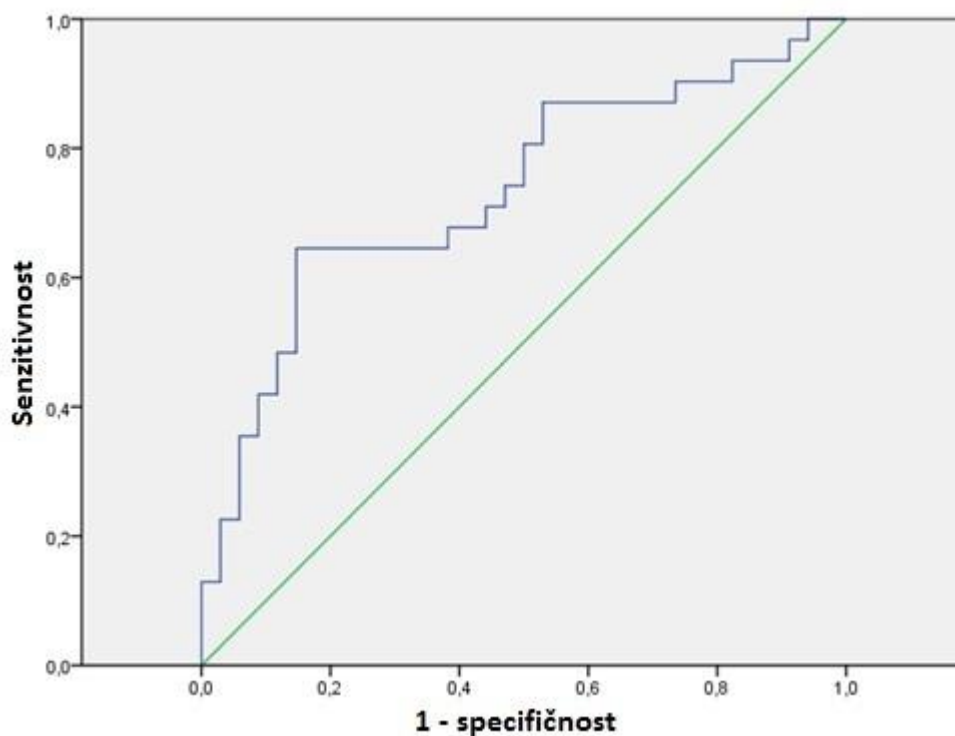
Analizom ROC krive procenjene su diskriminatorne i prediktivne mogućnosti miR-29a i *IL-1β* za detekciju žena sa GDM-om, odnosno *TNF-α* za detekciju žena sa GH-om. Dobijena površina ROC krive (AUC) za miR-29a iznosila je 0,645 (95% CI: 0,511-0,779, $P=0,044$, granična vrednost: 0,275, senzitivnost: 44%, specifičnost: 84%) što na osnovu Swets-ovih kriterijuma ukazuje da ovaj parameter ima dovoljnu dijagnostičku vrednost za detekciju GDM-a (slika 15). Analizom *IL-1β* dobijena ROC kriva imala je vrednost AUC od 0,713 (95%: 0,586-0,839, $P=0,003$, granična vrednost: 0,001, senzitivnost: 68%, specifičnost: 59%), čime je pokazana zadovoljavajuća dijagnostička vrednost navedenog citokina za diskriminaciju žena sa GDM-om i zdravih trudnica (slika 16). Logističkom regresionom analizom iz modela, koji je uključivao dva parametra, miR29a i *IL-1β*, izračunata je verovatnoća predikcije na osnovu koje se mogu razlikovati pacijenti sa GDM od zdravih trudnica. Utvrđeno je da korišćenje navedena dva parametra u kombinaciji ima najbolje prediktivne i diskriminatorne mogućnosti za GDM (AUC=0,734, 95% CI: 0,610-0,859, $P=0,001$) (slika 17). Na slici 18 prikazana je ROC kriva za *TNF-α* u GH grupi. Iako je kod trudnica sa hipertenzijom pokazana statistički značajna razlika u ekspresiji ovog citokina u odnosu na kontrolu, utvrđeno je da *TNF-α* nema zadovoljavajuću dijagnostičku vrednost za detekciju trudnica sa GH (AUC=0,613, 95% CI: 0,474-0,751, $P=0,122$).



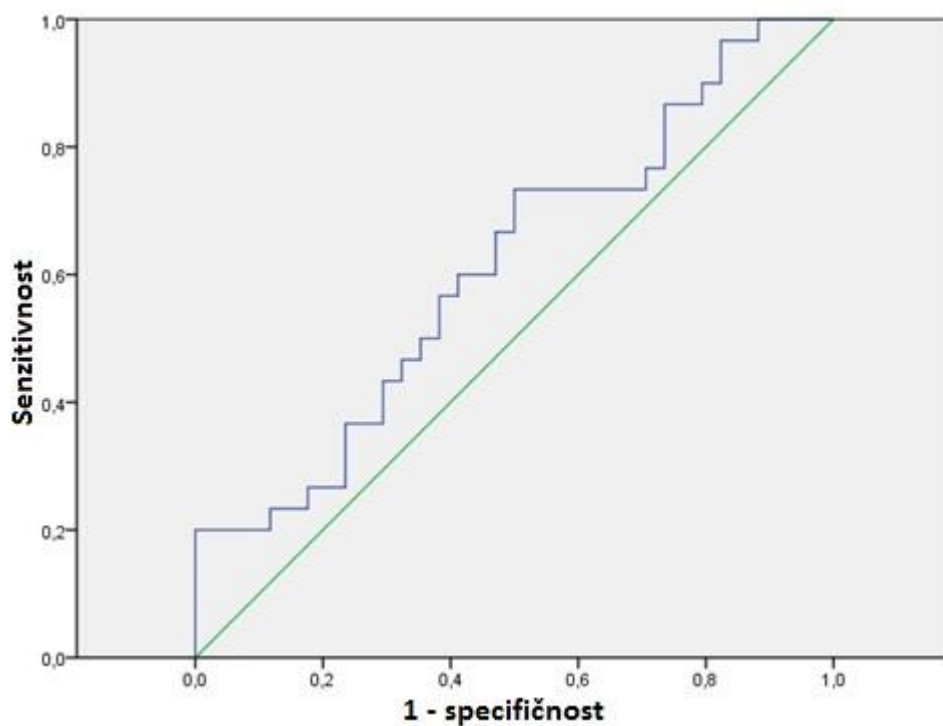
Slika 15. Dijagnostički potencijal ekspresije miR-29a za diskriminaciju GDM i zdravih trudnica. ROC kriva dobijena analizom miR-29a, AUC=0,645 (0,511-0,779, P=0,044, granična vrednost: 0,275, senzitivnost: 44%, specifičnost: 84%).



Slika 16. Dijagnostički potencijal ekspresije $IL-1\beta$ za diskriminaciju GDM i zdravih trudnica. ROC kriva dobijena analizom $IL-1\beta$, AUC=0,713 (0,586-0,839, P=0,003, granična vrednost: 0,001, senzitivnost: 68%, specifičnost: 59%).



Slika 17. Dijagnostički potencijal kombinovanog korišćenja parametara miR-29a i $IL-1\beta$ za diskriminaciju GDM i zdravih trudnica. ROC kriva dobijena analizom kombinovanog korišćenja parametara miR-29a i $IL-1\beta$, AUC=0,734 (0,610-0,859, P=0,001).



Slika 18. Dijagnostički potencijal ekspresije $TNF-\alpha$ za diskriminaciju GH i zdravih trudnica. ROC kriva dobijena analizom $TNF-\alpha$, AUC=0,613(0,474-0,751, P=0,122).

4.1.5. Analize korelacije ekspresije miR-29a i *IL-1 β* kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom

Analizom povezanosti pokazano je da između ekspresije miR-29a i analiziranih kliničkih parametara i nivoa ekspresije pojedinačnih analiziranih citokina i miRNK nema značajnih korelacija u GDM grupi (tabela 14). Daljom analizom ustanovljeno je postojanje statistički značajne pozitivne korelacije između ekspresije dva citokina, *IL-1 β* i *TNF- α* kod trudnica sa dijabetesom ($r=0,819$, $P=1,83E-08$; tabela 15). Ostali analizirani parametri nisu značajno korelisani sa nivoom ekspresije *IL-1 β* .

Tabela 14. Analiza korelacije ekspresije miR-29a i merenih kliničkih parametara, citokina i miRNK kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom

| Parametar | miR-29a | |
|-------------------------------------|---------|-------|
| | r | P |
| Nedelja gestacije | 0,228 | 0,225 |
| Godine života | 0,148 | 0,427 |
| BMI pre trudnoće, kg/m ² | -0,134 | 0,472 |
| Trenutni BMI, kg/m ² | -0,071 | 0,706 |
| Procenat povećanja telesne mase, % | 0,175 | 0,345 |
| Sistolni krvni pritisak (mm Hg) | -0,105 | 0,575 |
| Dijastolni krvni pritisak (mm Hg) | 0,087 | 0,641 |
| <i>IL-1β</i> | -0,092 | 0,624 |
| <i>TNF-α</i> | 0,055 | 0,770 |
| <i>IL-6</i> | -0,161 | 0,386 |
| <i>IL-17</i> | 0,050 | 0,791 |
| miR-17 | 0,255 | 0,167 |
| miR-181a | 0,311 | 0,088 |

r - Pirsonov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost

Tabela 15. Analiza korelacije ekspresije *IL-1 β* gena i merenih kliničkih parametara, citokina i miRNK kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom

| Parametar | <i>IL-1β</i> | |
|-------------------------------------|-------------------------------|--------------------|
| | r | P |
| Nedelja gestacije | -0,019 | 0,919 |
| Godine života | 0,217 | 0,241 |
| BMI pre trudnoće, kg/m ² | 0,042 | 0,826 |
| Trenutni BMI, kg/m ² | -0,08 | 0,674 |
| Procenat povećanja telesne mase, % | 0,167 | 0,379 |
| Sistolni krvni pritisak (mm Hg) | 0,194 | 0,545 |
| Dijastolni krvni pritisak (mm Hg) | 0,499 | 0,142 |
| <i>TNF-α</i> | 0,819 | 1,83E-08*** |
| <i>IL-6</i> | -0,13 | 0,485 |
| <i>IL-17</i> | 0,184 | 0,32 |
| miR-17 | 0,058 | 0,755 |
| miR-29a | -0,092 | 0,624 |
| miR-181a | 0,023 | 0,9 |

r - Pirsonov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost. Statistički značajne vrednosti su boldovane, a nivo značajnosti označen brojem zvezdica: ***p<0,001.

4.1.6. Analiza korelacije ekspresije *TNF- α* kod trudnica sa gestacijskom hipertenzijom

Kako je kod trudnica sa hipertenzijom utvrđen značajno viši nivo ekspresije *TNF- α* ispitana je asociranost ovog citokina sa kliničkim parametrima, ostalim analiziranim citokinima i miRNK u GH grupi. Dobijeni rezultati ukazuju da postoji značajna pozitivna korelacija između *TNF- α* i citokina *IL-1 β* (r=0,445, P=0,014) i *IL-17* (r=0,616, P=0,0003). Takođe, pokazano je da je *TNF- α* značajno negativno korelisan sa miR-181a (r=-0,473, P=0,008; tabela 16). Utvrđeno je da ostali analizirani parametri nisu značajno povezani sa nivoom ekspresije *TNF- α* .

Tabela 16. Korelacija ekspresije *TNF- α* i merenih kliničkih parametara, citokina i miRNK kod trudnica sa gestacijskom hipertenzijom

| Parametar | <i>TNF-α</i> | |
|-------------------------------------|--------------------------------|------------------|
| | r | P |
| Nedelja gestacije | 0,189 | 0,336 |
| Godine života | 0,101 | 0,595 |
| BMI pre trudnoće, kg/m ² | -0,066 | 0,738 |
| Trenutni BMI, kg/m ² | -0,089 | 0,653 |
| Procenat povećanja telesne mase, % | -0,259 | 0,182 |
| Sistolni krvni pritisak (mm Hg) | 0,026 | 0,896 |
| Dijastolni krvni pritisak (mm Hg) | 0,213 | 0,286 |
| <i>IL-1β</i> | 0,445 | 0,014* |
| <i>IL-6</i> | 0,203 | 0,283 |
| <i>IL-17</i> | 0,616 | 0,0003*** |
| miR-17 | -0,33 | 0,075 |
| miR-29a | -0,249 | 0,185 |
| miR-181a | -0,473 | 0,008** |

r - Pirsonov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost. Statistički značajne vrednosti su boldovane, a nivo značajnosti označen brojem zvezdica: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.2. Rezultati druge faze studije

4.2.1. Kliničke karakteristike ispitanica

Kliničke karakteristike trudnica uključenih u drugu fazu studije prikazane su u tabeli 17. Ispitivane grupe (GDM i GH) i kontrolna grupa bile su adekvatno uparene za starosnu dob ($P_1=0,502$, $P_2=0,249$). Trudnice iz GDM i GH grupe imale su značajno viši BMI pre trudnoće u odnosu na zdrave trudnice ($P_1=0,013$, $P_2=0,0001$). BMI u trenutku uključivanja u istraživanje, kao i sistolni i dijastolni krvni pritisak bili su značajno viši kod ispitanica sa hipertenzijom u poređenju sa kontrolom (P vrednosti, redom, 0,002, 0,0001, 0,00001). Prema preporuci lekara trudnice iz GH grupe uzimale su antihipertenzivnu terapiju (Metildopa). Trudnice iz GDM i kontrolne grupe nisu uzimale medikamente u toku trudnoće. Sve trudnice uključene u studiju uzimale su vitaminske suplemente u trudnoći. Prema anamnezi sve trudnice koje su konzumirale cigarete u trudnoći konzumirale su do 20 cigareta dnevno.

Tabela 17. Kliničke karakteristike trudnica uključenih u drugu fazu studije i poređenje analiziranih grupa trudnica u odnosu na kontrolne trudnice (CG – kontrolna grupa, GDM – gestacijski dijabetes, GH – gestacijska hipertenzija)

| Parametar i broj ispitanica | CG (N=28) | GDM (N=37) | GH (N=21) | P ₁ | P ₂ |
|--|------------|------------|----------------|----------------|-------------------|
| Godine starosti ^a | 31 (20-44) | 33 (24-40) | 32 (23-38) | 0,502 | 0,249 |
| BMI pre trudnoće, kg/m ² | 21,22±1 | 24,11±3 | 27,11±6 | 0,013* | 0,0001*** |
| Trenutni BMI, kg/m ² | 23,98±2 | 27,5±4 | 30,55±6 | 0,063 | 0,002** |
| Procenat povećanja telesne mase, % | 13±5 | 14,1±7 | 13,83±10 | 0,747 | 0,847 |
| Medikamentozna terapija ^b | / | / | 21 (Metildopa) | / | / |
| Konsumacija cigareta (pušači/nepušači) | 0/28 | 9/28 | 7/14 | 0,747 | 0,518 |
| Sistolni krvni pritisak (mm Hg) | 117±9 | 107±17 | 128±24 | 0,193 | 0,0001*** |
| Dijastolni krvni pritisak (mm Hg) | 78±8 | 67±13 | 81±11 | 0,146 | 0,00001*** |

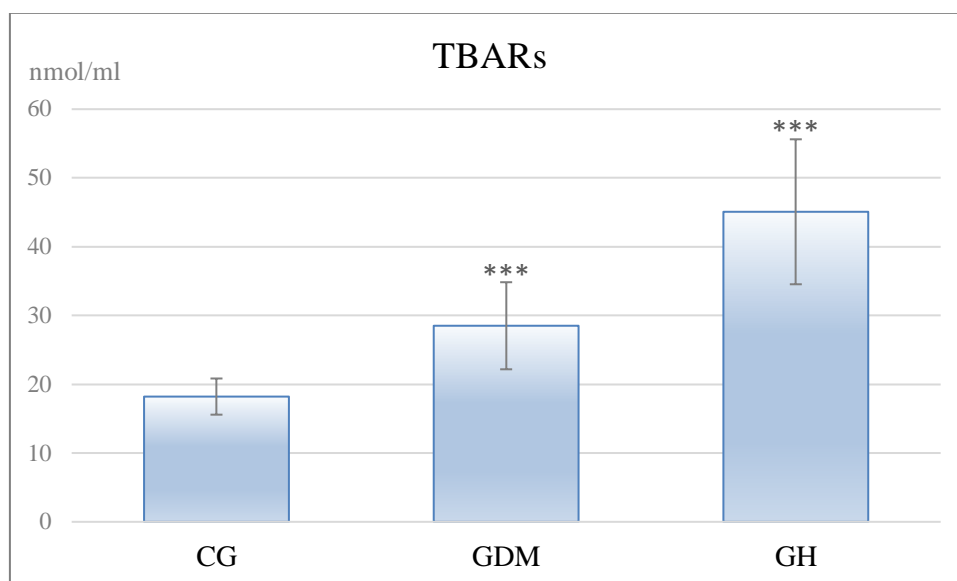
BMI – indeks telesne mase; P₁, P₂ vrednost – P vrednost dobijena poređenjem GDM (P₁), odnosno GH grupe (P₂), redom, sa CG grupom; ^aVrednosti su prikazane kao srednji broj godina ispitanika iz odgovarajuće grupe (min-max); ^bVrednosti su prikazane kao broj trudnica iz odgovarajuće grupe koje su uzimale medikamentoznu terapiju. Statistički značajne vrednosti su boldovane, a nivo značajnosti označen brojem zvezdica: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.2.2. Nivo parametara oksidativnog stresa kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom i gestacijskom hipertenzijom

4.2.2.1. Nivo lipidne peroksidacije

Nivo lipidne peroksidacije analiziran je merenjem TBARs koji predstavlja ekvivalent malondialdehida. Srednje vrednosti nivoa TBARs za svaku od ispitivanih grupa predstavljene su na slici 19. U obe ispitivane grupe (GDM i GH) nivo TBARs bio je statistički značajno viši nego u

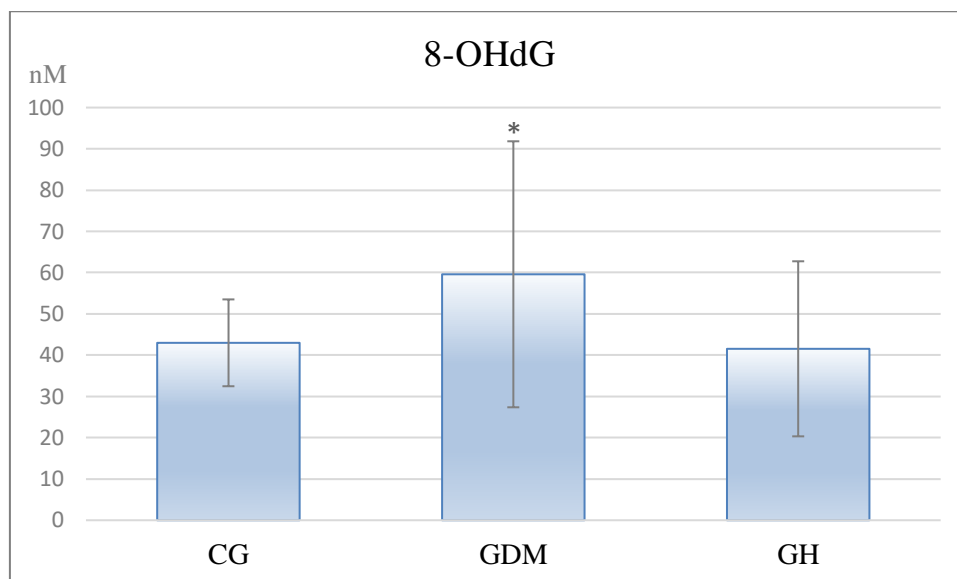
kontrolnoj grupi ($P_1=0,0001$, $P_2=0,0001$). Najviši nivo TBARs zabeležen je u plazmi trudnica sa gestacijskom hipertenzijom, čak 2,47 puta viši nego kod zdravih trudnica i 1,58 puta viši u odnosu na trudnice sa dijabetesom.



Slika 19. Nivo TBARs u CG, GDM i GH grupi trudnica. Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti (nmol/ml uzorka) \pm standardna devijacija. Statistički značajne razlike ispitivane grupe u poređenju sa kontrolom označene su zvezdicama: *** $p<0,001$.

4.2.2.2. Nivo oštećenja DNK molekula

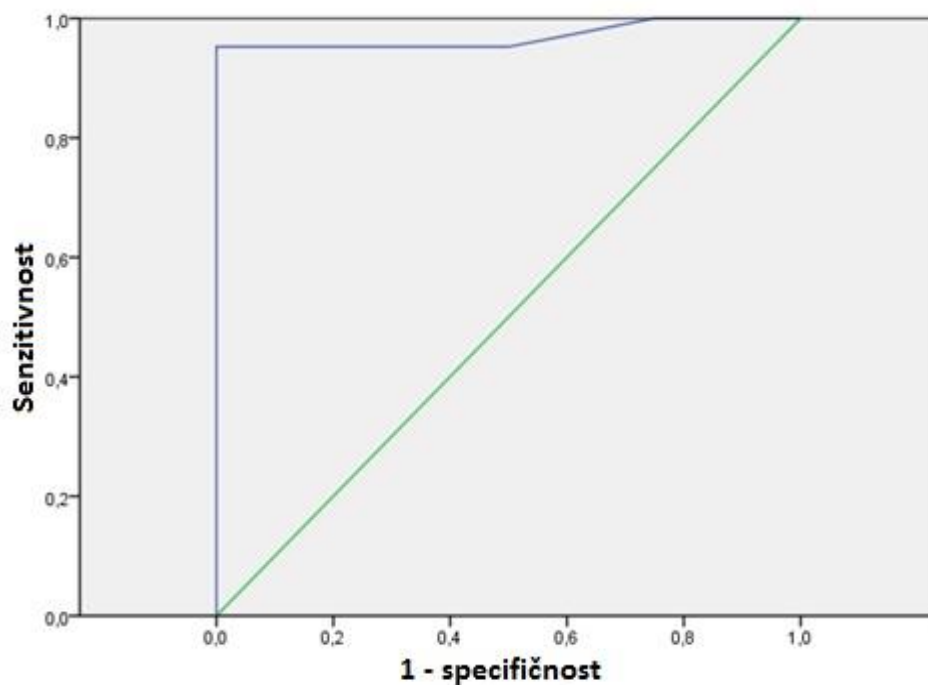
Nivo oštećenja DNK molekula procenjen je merenjem 8-OHdG u plazmi trudnica. Dobijeni rezultati predstavljeni su na slici 20. Nivo 8-OHdG bio je značajno viši kod GDM trudnica u odnosu na kontrolnu grupu ($P=0,021$). Kod trudnica sa hipertenzijom nije uočena značajna promena u nivou 8-OHdG u odnosu na zdrave trudnice ($P=0,412$).



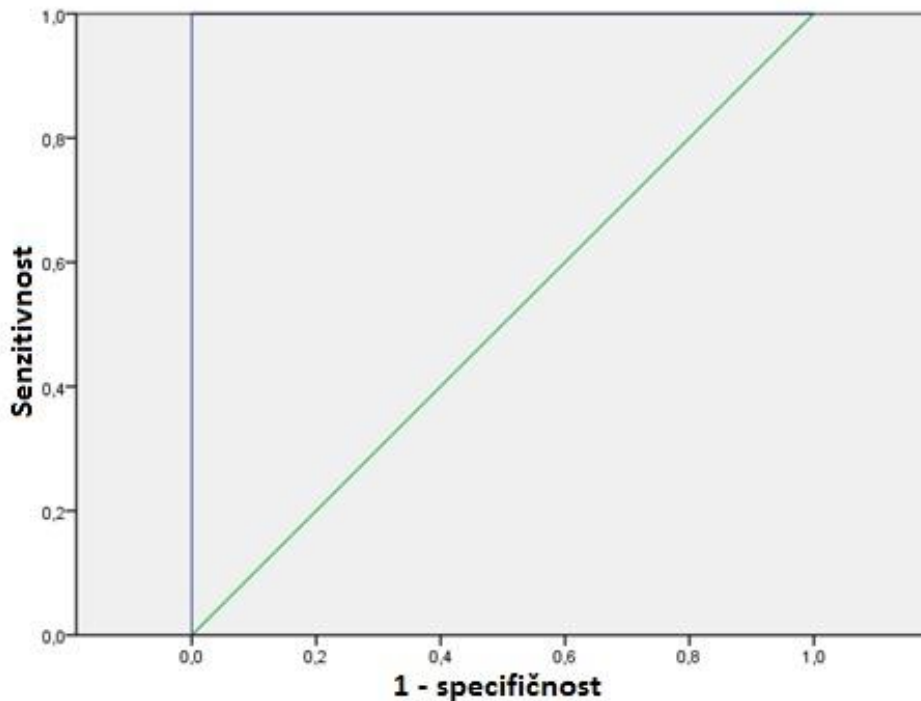
Slika 20. Nivo 8-OHdG u CG, GDM i GH grupama trudnica. Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti (nM) \pm standardna devijacija. Statistički značajne razlike ispitivane grupe u poređenju sa kontrolom označene su zvezdicom: * $p < 0,05$.

4.2.2.3. Analiza prediktivnih i diskriminatornih mogućnosti parametara oksidativnog stresa

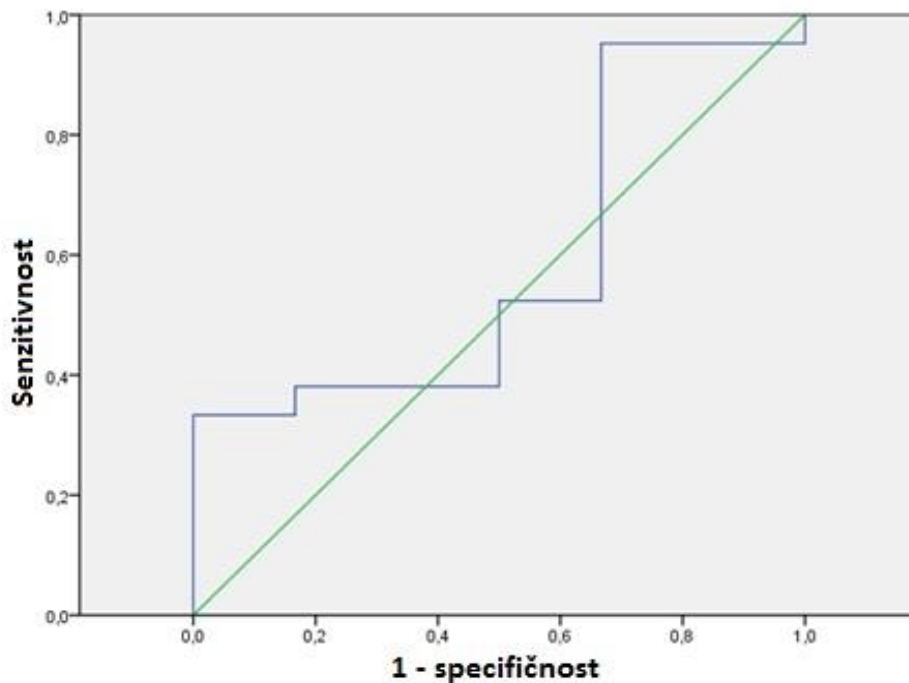
Diskriminatorne i prediktivne mogućnosti parametara oksidativnog stresa za detekciju žena sa ispitivanim perinatskim komplikacijama procenjene su analizom ROC krive. Pokazano je da TBARs ima visoku dijagnostičku vrednost za diskriminaciju trudnica sa GDM-om (AUC=0,970, 95% CI: 0,000-1,000, $P=1,3E-07$, granična vrednost: 20,938, senzitivnost: 95%, specifičnost: 100%, slika 21), kao i GH-om (AUC=1,000, 95% CI: 0,000-1,000, $P=1,85E-08$, granična vrednost: 24,063, senzitivnost: 100%, specifičnost: 100%, slika 22) od zdravih trudnica. Iako je kod trudnica sa dijabetesom uočen značajno viši nivo parametara DNK oštećenja u poređenju sa kontrolom, 8-OHdG nije imao zadovoljavajuću dijagnostičku vrednost za detekciju trudnica sa dijabetesom (AUC=0,587, 95% CI: 0,401-0,774, $P=0,353$) (slika 23).



Slika 21. Dijagnostički potencijal parametra lipidne peroksidacije za diskriminaciju GDM i zdravih trudnica. ROC kriva dobijena analizom TBARs, AUC=0,970 (95% CI: 0,000-1,000, P=1,3E-07, granična vrednost: 20,938, senzitivnost: 95%, specifičnost: 100%).



Slika 22. Dijagnostički potencijal parametra lipidne peroksidacije za diskriminaciju GH i zdravih trudnica. ROC kriva dobijena analizom TBARs, AUC=1,000 (95% CI: 0,000-1,000, P=1,85E-08, granična vrednost: 24,063, senzitivnost: 100%, specifičnost: 100%).



Slika 23. Dijagnostički potencijal parametra DNK oštećenja za diskriminaciju GDM i zdravih trudnica. ROC kriva dobijena analizom 8-OHdG, AUC=0,587 (95% CI: 0,401-0,774, P=0,353).

4.2.2.4. Analiza korelacije parametara oksidativnog stresa u grupi trudnica sa gestacijskim dijabetesom

Analizom povezanosti markera lipidne peroksidacije (TBARs) i oštećenja DNK (8-OHdG) nije utvrđena asociranost navedenih parametara u grupi trudnica sa gestacijskim dijabetesom ($r=0,06$, $P=0,797$). Daljom analizom pokazano je da u grupi ispitanica sa GDM-om nivo markera lipidne peroksidacije nije značajno korelisan sa životnom dobi trudnica, indeksom telesne mase u trudnoći, niti pre trudnoće, procentom povećanja telesne mase, kao ni nedeljom gestacije (tabela 18). Postojanje značajne negativne korelacije utvrđeno je jedino između 8-OHdG i nedelje gestacije ($r=-0,482$, $P=0,027$). Ostali klinički parametri nisu bili značajno povezani sa 8-OHdG (tabela 19).

Tabela 18. Rezultati povezanosti nivoa TBARs sa kliničkim parametrima trudnica sa GDM

| Parametar | TBARs | |
|-------------------------------------|--------|-------|
| | r | P |
| Godine života | 0,238 | 0,300 |
| BMI pre trudnoće, kg/m ² | 0,217 | 0,345 |
| Trenutni BMI, kg/m ² | 0,164 | 0,477 |
| Procenat povećanja telesne mase, % | -0,102 | 0,661 |
| Nedelja gestacije | -0,057 | 0,805 |

r - Pirsonov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost

Tabela 19. Rezultati povezanosti nivoa 8-OHdG sa kliničkim parametrima trudnica sa GDM

| Parametar | 8-OHdG | |
|-------------------------------------|--------|---------------|
| | r | P |
| Godine života | -0,008 | 0,974 |
| BMI pre trudnoće, kg/m ² | -0,173 | 0,453 |
| Trenutni BMI, kg/m ² | -0,263 | 0,249 |
| Procenat povećanja telesne mase, % | -0,262 | 0,251 |
| Nedelja gestacije | -0,482 | 0,027* |

r - Pirsonov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost. Statistički značajne vrednosti su boldovane, a nivo značajnosti označen brojem zvezdica: *p<0,05.

4.2.2.5. Analiza korelacije lipidne peroksidacije u grupi trudnica sa gestacijskom hipertenzijom

U grupi trudnica sa hipertenzijom nije utvrđena asociranost između TBARs i 8-OHdG (r=0,057, P=0,834). Takođe, nije utvrđena povezanost markera lipidne peroksidacije sa merenim kliničkim parametrima trudnica (tabela 20). Kako se nivo 8-OHdG nije značajno razlikovao u grupi trudnica sa hipertenzijom u odnosu na kontrolu, korelacija ovog markera sa kliničkim parametrima nije ispitana.

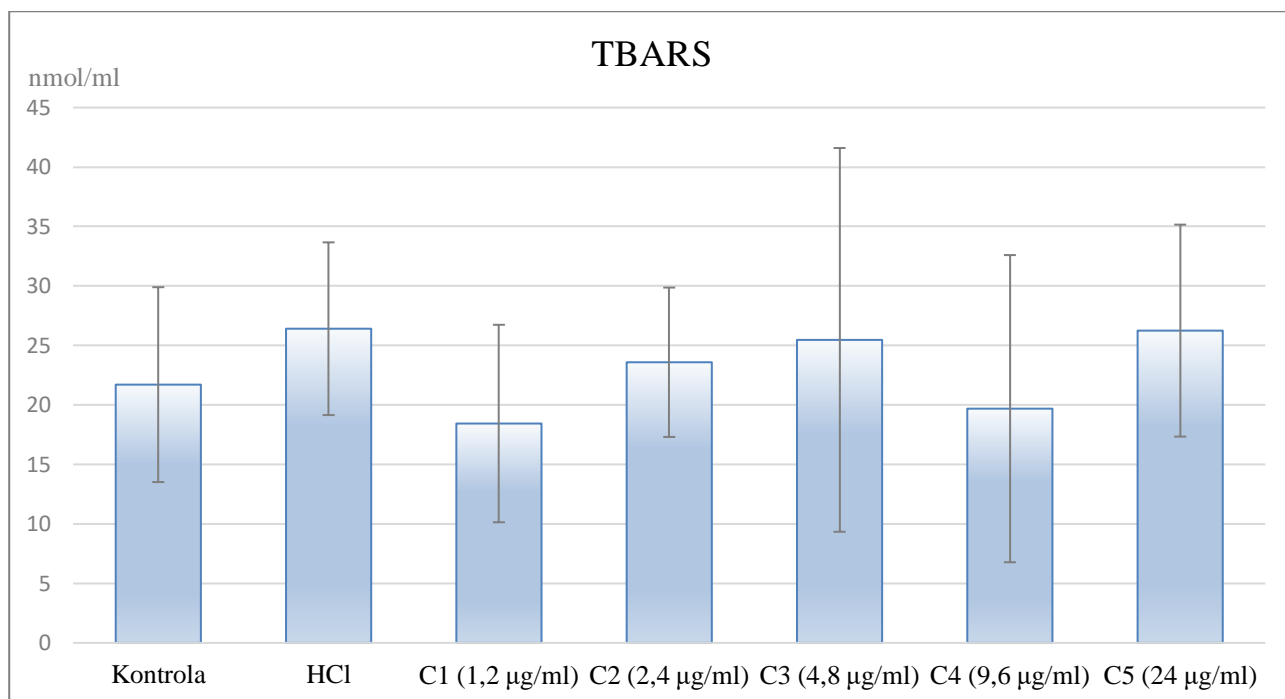
Tabela 20. Rezultati povezanosti TBARs sa kliničkim parametrima trudnica sa GH

| Parametar | TBARs | |
|-------------------------------------|--------|-------|
| | r | P |
| Godine života | 0,338 | 0,200 |
| BMI pre trudnoće, kg/m ² | -0,223 | 0,407 |
| Trenutni BMI, kg/m ² | -0,340 | 0,198 |
| Procenat povećanja telesne mase, % | -0,221 | 0,411 |
| Nedelja gestacije | -0,431 | 0,096 |

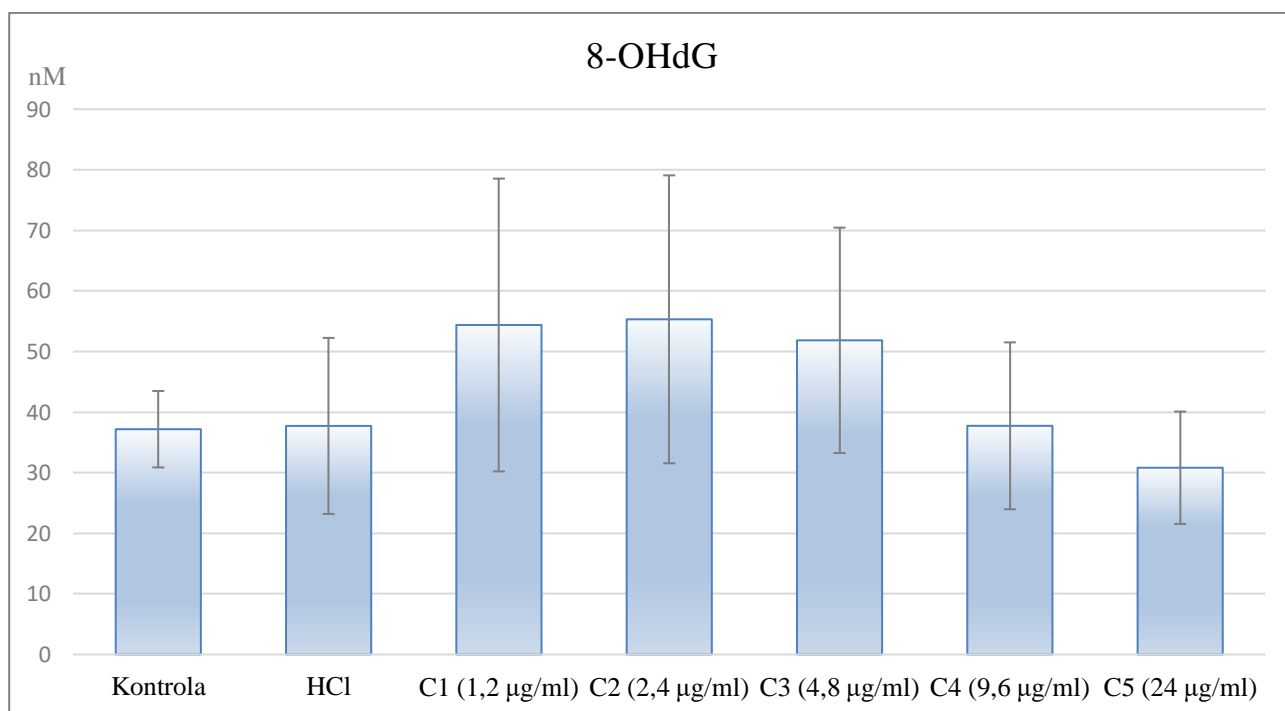
r - Pirsonov koeficijent korelacije; p - statistička značajnost

4.2.3. Rezultati *in vitro* ispitivanja leka Metildopa

Kako bi se isključio mogući uticaj medikamentozne terapije koju su uzimale trudnice iz GH grupe na nivo DNK oštećenja i lipidne peroksidacije, *in vitro* je ispitan potencijalni efekat leka Metildopa na nivo oksidativnog stresa. Nivo TBARS i 8-OHdG meren je u supernatantu kultura ćelija periferne krvi zdravih trudnica nakon tretmana u trajanju od 72 sata različitim koncentracijama leka Metildopa. Dobijeni rezultati prikazani su na slikama 24 i 25. Nivoi TBARs nisu se značajno razlikovali između tretiranih i netretiranih kultura ($P_{HCl}=0,699$, $P_{C1}=0,098$, $P_{C2}=0,604$, $P_{C3}=0,541$, $P_{C4}=0,184$, $P_{C5}=0,144$), kao ni nivoi 8-OHdG ($P_{HCl}=0,484$, $P_{C1}=0,705$, $P_{C2}=0,876$, $P_{C3}=0,773$, $P_{C4}=0,507$, $P_{C5}=0,271$).



Slika 24. Koncentracije TBARS u kulturama ćelija tretiranih različitim dozama leka Metildopa i kontroli. Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti (nmol/ml uzorka) ± standardna devijacija.



Slika 25. Koncentracije 8-OHdG u kulturama ćelija tretiranih različitim dozama leka Metildopa i kontroli. Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti (nM) ± standardna devijacija.

5. DISKUSIJA

Gestacijski dijabetes i gestacijska hipertenzija se mogu dijagnostikovati tek krajem drugog ili tokom trećeg trimestra trudnoće, nakon pojave kliničkih znakova poremećaja. U trenutku postavljanja dijagnoze, pokrenuti patofiziološki mehanizmi su potencijalno već doveli do dugoročnih negativnih efekata. Dodatno, molekuli čiji su nivoi izmenjeni u periodu kada su GDM i GH već klinički manifestovani predstavljaju kandidate za biomarkere navedenih perinatoloških komplikacija i potencijalno ukazuju na njihove rane molekularne mehanizme. Otkriće biomarkera i razvoj adekvatnog skrininga za GDM i GH imao bi višestruku korist, kako za trudnice kod kojih se utvrdi povišen rizik, tako i za trudnice kod kojih se proceni da je rizik za razvoj komplikacija nizak. Detekcija žena sa niskim rizikom za razvoj patoloških stanja u trudnoći značajno bi smanjila nivo anksioznosti ovih trudnica, te im sa psihološkog aspekta olakšala dalji tok trudnoće (Mavreli i sar, 2021). S druge strane, rana detekcija trudnica sa povišenim rizikom omogućila bi adekvatan monitoring i efikasniji klinički pristup čime bi se potencijalno sprečio razvoj daljih komplikacija. Procenjuje se da bi razvoj visoko efikasnog skrininga značajno smanjio i troškove lečenja bilo u toku trudnoće, bilo kasnije u životu majke i njenih potomaka, pa su identifikacija biomarkera i razvoj visokopouzdanih prediktivnih testova od izuzetnog značaja kako za pojedinca tako i za društvo (Xu i sar, 2017; Modzelewski i sar, 2022).

Prikazani rezultati ukazuju na brojne promene molekularnih mehanizama koje se dešavaju prilikom razvoja gestacijskog dijabetesa i gestacijske hipertenzije. Rezultati ispitivanja daju uvid u nivo ekspresije odabranih miRNK i proinflatornih citokina i ukazuju na povišen nivo oksidativnog stresa kod oba patološka stanja. Prema uvidu u literaturu, međusobna korelacija analiziranih miRNK i citokina kod trudnica sa GDM i GH po prvi put je ispitana u našoj studiji.

5.1. Ekspresija miRNK kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom i gestacijskom hipertenzijom

Dobijeni rezultati ukazuju da je ekspresija miR-29a snižena kod trudnica koje su razvile gestacijski dijabetes. Trudnice sa GDM-om imale su skoro četiri puta nižu ekspresiju analizirane miRNK u poređenju sa zdravim trudnicama. Razlika u nivou ekspresije između navedenih grupa bila je statistički značajna ($P=0,031$), a nakon korekcije za godine starosti trudnice, nedelju gestacije i procenat povećanja telesne mase razlika je bila još značajnija ($P=0,006$). Poznato je da miR-29a predstavlja značajan regulator glukoneogeneze i glikolize (Zhao i sar, 2011; Liang i sar, 2013; Abbas i sar, 2021). Jedan od ciljnih gena za miR-29a, *Insig1* (engl. *insulin-induced gene 1*), preko transkripcionih faktora SREBPs (engl. *sterol regulatory element-binding proteins*) reguliše fosfoenolpiruvat karboksilazu 2 (PCK2), enzim uključen u metabolizam glukoze (Krapivner i sar, 2007). Pokazano je da niža ekspresija miR-29a u HepG2 ćelijama za posledicu ima povećanje ekspresije *Insig1* proteina i *PCK2* iRNK što može uzrokovati povećanje nivoa glukoze, te ukazuje da miR-29a predstavlja negativan regulator nivoa glukoze u serumu (Zhao i sar, 2011). Deng i saradnici (2020) su pokazali da je nivo ekspresije miR-29a pozitivno korelisan sa nivoom insulina natašte i negativno korelisan sa nivoom glukoze u plazmi trudnica natašte, nivoom glukoze 2h nakon primene 75g glukoze i nivoom HbA1c. Navedeno ukazuje da je miR-29a uključena u razvoj insulinske rezistencije i potvrđuje prethodno pretpostavljenu ulogu pomenute miRNK kao negativnog regulatora glukoznog metabolizma. Iako se nivo miR-29a dovodi u vezu sa razvojem patoloških stanja u trudnoći, smatra se da on nije povezan sa težinom neonatusa na rođenju, prevremenim porođajem i asfiksijom (Deng i sar, 2020). Kako je u obe navedene studije utvrđen niži nivo ekspresije miR-29a u serumu trudnica sa GDM-om u poređenju sa zdravim trudnicama, rezultati ove teze u skladu su sa rezultatima prikazanim od strane Zhao i saradnika (2011), kao i Denga i saradnika (2020). Suprotno

tome, nekoliko grupa autora pokazalo je povišen nivo miR-29a kod različitih tipova dijabetesa u poređenju sa kontrolom (Bagge i sar, 2012; Sørensen i sar, 2021). Kako su pokazali Bagge-a i saradnici (2012), povišen nivo glukoze dovodi do pojačane ekspresije miR-29a u kulturi humanih ćelija Langerhansovih ostrvaca i INS-1E β -ćelijama pacova, što dalje vodi smanjenju sekrecije insulina i potencijalno razvoju dijabetesa tipa 2. Dalje, miR-29a predstavlja negativan regulator kanabinoidnog receptora tipa 1 i ekspresije proinflamatornih citokina, IL-1 β , TNF- α i IL-6, što ima ulogu u sprečavanju fibroze glomerula bubrega usled dijabetesa (Tung i sar, 2019). Ipak, suprotno Tungovoj studiji (2019) rađenoj na miševima, ovim istraživanjem nije utvrđena povezanost miR-29a i iRNK analiziranih citokina (IL-1 β , TNF- α , IL-6 i IL-17), kao ni ostalih analiziranih parametara. Korišćenjem ROC krive u ovoj disertaciji pokazano je da nivo ekspresije miR-29a ima dovoljnu dijagnostičku vrednost za detekciju žena sa GDM-om (AUC=0,645), te predstavlja potencijalni biomarker dijabetesa u trudnoći.

Prikazani rezultati pokazuju da ekspresija miR-17 nije značajno izmenjena kod ispitanica sa GDM-om u odnosu na kontrolu (P=0,789). Uloga miR-17 u patogenezi različitih tipova dijabetesa do sada je slabo ispitana, a dobijeni rezultati su prilično heterogeni. Nekolicina do sada objavljenih studija pokazala je da nema statistički značajne razlike u ekspresiji miR-17 kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom u poređenju sa trudnicama bez komplikacija (Lamadrid-Romero i sar, 2018; Pheiffer i sar, 2018; Tagoma i sar, 2018; Hromadnikova i sar, 2022), a rezultati prikazani u ovoj tezi u skladu su sa navedenim istraživanjima. *In vitro* eksperimentima na INS-1 ćelijama Liu i saradnici (2021) su utvrdili smanjenu ekspresiju miR-17 i sekreciju insulina u uslovima hiperglikemije, kao i smanjenu ekspresiju pomenute miRNK kod dijabetičnih miševa. Kako je nakon indukovane ekspresije i transfekcije miR-17 snižen nivo glukoze u krvi i poboljšana glukozna tolerancija u cirkulaciji miševa, navedeni rezultati ukazuju na moguć protektivni i terapijski efekat ove nekodirajuće RNK (Liu i sar, 2021). U placentama iz GDM trudnoća takođe je utvrđena niža ekspresija miR-17 (Jiang i sar, 2022). Prema Jiangu, miR-17 stimuliše preuzimanje glukoze od strane HTR8/SVneo trofoblastnih ćelija preko TXNIP/NLRP3. NLRP3 (engl. *Nod-like receptor protein 3*) predstavlja deo unutarćelijskog proteinskog kompleksa koji se naziva inflamazom, a koji stimuliše ekspresiju citokina uključenih u razvoj insulinske rezistencije, IL-1 β i IL-18 (Stienstra i sar, 2011). TXNIP (engl. *thioredoxin-interacting protein*) se vezuje za NLRP3 i aktivira ga, a ekspresija samog TXNIP negativno je regulisana od strane miR-17. Jiang i saradnici (2022) objašnjavaju da u uslovima povišenog nivoa glukoze dolazi do smanjene ekspresije miR-17 u placenti, usled čega se povećava ekspresija NLRP3, aktivira se inflamazom i pospešuje razvoj insulinske rezistencije. Suprotno tome, Cao i saradnici (2017) su utvrdili povišen nivo ekspresije miR-17 u drugom i trećem trimestru GDM trudnoća u poređenju sa kontrolnim trudnicama odgovarajuće gestacijske starosti. Dodatna ispitivanja su neophodna kako bi se razjasnila moguća uloga miR-17 u razvoju gestacijskog dijabetesa.

Ekspresija miR-181a nije se statistički značajno razlikovala između GDM i kontrolne grupe (P=0,326). Iako se navedena miRNK dovodi u vezu sa insulinskom rezistencijom i dijabetesom tipa 1 i 2 (Nielsen i sar, 2012; Zhou i sar, 2012), o njenoj eventualnoj ulozi u razvoju dijabetesa u trudnoći malo je poznato. Hromadnikova i saradnici (2022) utvrdili su povišen nivo ekspresije miR-181a u uzorcima pune krvi trudnica koje su kasnije u trudnoći razvile GDM u poređenju sa trudnicama iste gestacijske starosti kod kojih do kraja trudnoće nije došlo do razvoja perinatalnih komplikacija. U navedenom istraživanju uzorci periferne krvi prikupljeni su tokom prvog trimestra bez praćenja promene njihove ekspresije do kraja trudnoće, te je razlika u ovde prikazanim i rezultatima Hromadnikove i saradnika verovatna posledica uzorkovanja krvi u različitom periodu trudnoće. Takođe, korišćenje različitih vrsta uzoraka za analizu (uzorci pune krvi u studiji Hromadnikove i uzorci plazme u ovom istraživanju) dodatno otežavaju poređenje dobijenih rezultata. Prilikom razvoja različitih patoloških stanja u trudnoći povećava se nivo maternalnog stresa i aktivira inflamatorni odgovor trudnice, prilikom čega dolazi do sinteze većeg broja proteina u leukocitima periferne krvi majke (Hromadnikova i sar, 2016). miRNK regulisu ekspresiju proteina, a promenu nivoa ovih nekodirajućih RNK majke u odgovoru na stresne uslove, poput razvoja GDM-a ili GH-a, moguće je

pratiti u uzorcima pune krvi. S druge strane, plazma periferne krvi trudnice pored ekstracelularne RNK maternalnog porekla sadrži i RNK placentnog porekla, te uzorci pune krvi i plazme ne moraju odražavati isti nivo ekspresije miRNK (Hromadnikova i sar, 2016). Collares i saradnici (2013) su poredili nivoe ekspresije većeg broja miRNK u mononukleusnim ćelijama periferne krvi kod osoba koje boluju od različitih tipova dijabetesa. Utvrdili su da je ekspresija miR-181a snižena u slučaju gestacijskog dijabetesa u poređenju sa dijabetesom tipa 1 i 2. Takođe, u krvi dobijenoj odmah nakon porođaja iz umbilikalne vene neonatusa iz GDM trudnoća utvrđen je niži nivo ekspresije miR-181a u poređenju sa nivoom ekspresije kod neonatusa zdravih trudnica sugerišući uključenost ove miRNK u razvoj gestacijskog dijabetesa (Marcondes i sar, 2018). Kao i miR-17, miR-181a se dovodi u vezu sa poremećajima funkcije adipoznog tkiva, razvojem dijabetesa tipa 2 i drugih bolesti asociranih sa gojaznošću (Klötting i sar, 2009), te Marcondes i saradnici (2018) navode miR-181a kao jedan od potencijalnih biomarkera za kasniji razvoj gojaznosti neonatusa. Ipak, zbog malog broja dosadašnjih studija, različite vrste uzoraka korišćenih za analizu i perioda trudnoće kada su ispitivanja rađena moguća povezanost miR-181a i dijabetesa u trudnoći nije razjašnjena. Prema uvidu u literaturu, rezultati ove teze po prvi put prikazuju nivo ekspresije navedene miRNK u uzorcima plazme trudnica sa GDM-om.

Prikazani rezultati pokazuju da se ekspresija analiziranih miRNK ne razlikuje značajno između GH i zdravih trudnica. Iako je u GH grupi uočena niža ekspresija miR-29a nego u kontroli, ova razlika nije bila statistički značajna ($P=0,196$). Istraživanje Hromadnikove i saradnika na trudnicama kod kojih je već dijagnostikovano GH u skladu su sa rezultatima ovog istraživanja (Hromadnikova i sar, 2016), a ista grupa autora je u svojoj drugoj studiji (Hromadnikova i sar, 2022) utvrdila da ni kod trudnica gestacijske starosti 10-13 nedelja koje su naknadno razvile GH nema statistički značajne razlike u ekspresiji miR-29a u poređenju sa kontrolom. Za razliku od navedenih rezultata, Khaliq i grupa autora (2018) utvrdili su značajno višu ekspresiju miR-29a u serumu trudnica sa GH nego kod zdravih trudnica. Pretpostavlja se da je miR-29a asocirana sa vaskularnom disfunkcijom kod osoba sa gestacijskom hipertenzijom ili preeklampsijom. Naime, preko fosfatidilinozitol-3 kinaze (PI3K), miR-29a dovodi do smanjene aktivnosti AKT proteina koji ima značajnu ulogu u održavanju normalnog ćelijskog metabolizma. Smanjena aktivnost AKT-a vodi povećanju solubilnog endoglina (sEng), inhibiciji angiogenih faktora i narušavanju diferencijacije i proliferacije endotelnih ćelija (Khaliq i sar, 2018). Ipak, smanjena aktivnost AKT-a je potvrđena samo u placenti trudnica sa PE, dok je suprotno tome u placenti GH trudnica utvrđena značajno viša aktivnost AKT proteina u odnosu na kontrolu (Khaliq i sar, 2018). S druge strane, kako se miR-29a vezuje za 3'UTR region iRNK *PTEN* (engl. *Phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten*) koji je inhibitor PI3K/AKT puta, pokazano je da povišena ekspresija miR-29a u glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova pacova dovodi do inhibicije *PTEN* i posledične aktivacije PI3K/AKT puta, usled čega se favorizuje razvoj hipertenzije (Ming i sar, 2019). Zbog malog broja publikovanih radova i različitih vrsta uzoraka korišćenih za analizu neophodna su dalja, opsežnija istraživanja na većim kohortama, kako bi se utvrdila moguća povezanost miR-29a i gestacijske hipertenzije.

U GH grupi utvrđena je skoro 2 puta niža ekspresija miR-17 u poređenju sa kontrolnom grupom, ali razlika nije imala statističku značajnost ($P=0,191$). Prema uvidu u literaturu, samo nekoliko studija ispituje povezanost ove miRNK sa razvojem različitih tipova hipertenzije u trudnoći, a prikazano istraživanje je prvo u kojoj je analizirana ekspresija miR-17 u plazmi trudnica sa GH. Hromadnikova i saradnici su pokazali da ni kod žena koje će kasnije u trudnoći razviti GH, kao ni kod onih kod kojih je već dijagnostikovano ovaj poremećaj nema značajne razlike u ekspresiji miR-17 u odnosu na zdrave trudnice (Hromadnikova i sar, 2016; Hromadnikova i sar, 2022), što je u skladu sa ovde prikazanim rezultatima.

Rezultati ove disertacije pokazuju da miR-181a nije asocirana sa razvojem gestacijske hipertenzije ($P=0,603$). U lizatu ćelija periferne krvi trudnica sa GH pokazano je da nema statistički značajne razlike u ekspresiji miR-181a u poređenju sa kontrolom (Hromadnikova i sar, 2016), što je u skladu s rezultatima ove teze. Ipak, ista grupa autora pokazala je da u periodu prvog trimestra,

između 10. i 13. nedelje gestacije, postoji značajno viši nivo ekspresije ove miRNK kod trudnica koje će kasnije u trudnoći razviti GH u odnosu na trudnice koje do kraja trudnoće nisu razvile bilo kakve komplikacije (Hromadnikova i sar, 2022). Kako ekspresija miRNK nije stabilna tokom cele trudnoće različit period trudnoće u kom su rađena ispitivanja u našoj i drugoj navedenoj studiji predstavlja verovatan razlog za postojanje različitosti dobijenih rezultata. Khaliq i saradnici (2018) pokazali su značajno višu ekspresiju miR-181a u serumu trudnica sa gestacijskom hipertenzijom u odnosu na zdrave trudnice. Hipertenzivne trudnice uključene u ovu studiju su u trenutku uzorkovanja krvi bile na terapiji antihipertenzivnim lekom Metildopa, a visina krvnog pritiska bila je u granicama normale. Kako antihipertenzivni lekovi mogu uticati na ekspresiju miRNK (Ye i sar, 2013), dejstvo medikamentozne terapije, kao i različita vrsta uzoraka korišćenih za analizu, mogući su razlozi nepodudaranja naših i Khaliq-ovih rezultata.

5.2. Ekspresija citokina kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom i gestacijskom hipertenzijom

Prema dobijenim rezultatima, *IL-1 β* ima čak 4,5 puta višu ekspresiju u krvi trudnica sa gestacijskim dijabetesom u poređenju sa zdravim trudnicama ($P=0,002$), a nakon korekcije za udružene varijable razlika je ostala značajna ($P=0,036$). Ovaj citokin prepoznat je kao jedan od važnih faktora uključenih u uspostavljanje i održavanje inflamatornog odgovora ćelija pankreasa, zatim regulaciji drugih inflamatornih faktora i, u slučaju njegove prekomerne ekspresije, oštećenju β -ćelija pankreasa i inhibiciji sekrecije insulina (Liu i sar, 2020). Dobijeni rezultati u skladu su sa rezultatima Liu i saradnika (2020) koji su utvrdili povišen nivo proteina *IL-1 β* u serumu trudnica sa GDM u poređenju sa kontrolnom grupom trudnica. Vitoratos i saradnici (2008) su ispitivali nivo *IL-1 β* u serumu trudnica sa GDM tokom drugog trimestra trudnoće i tri dana nakon porođaja korišćenjem ELISA metode. Prema njihovim rezultatima, nivo *IL-1 β* opada nakon porođaja trudnica sa GDM, ali je i tokom drugog trimestra i tri dana nakon porođaja nivo ovog citokina bio statistički značajno viši nego kod kontrolnih trudnica što je u skladu sa našom studijom. Kako placenta tokom trudnoće predstavlja značajan izvor *IL-1 β* , povišen nivo ekspresije *IL-1 β* kod trudnica sa GDM-om moguća je posledica disfunkcije placente u slučaju GDM trudnoća (Vitoratos i sar, 2008). Pokazano je da nivo ekspresije *IL-1 β* ima zadovoljavajuću dijagnostičku vrednost za diskriminaciju žena sa GDM-om i zdravih trudnica ($AUC=0,713$), te se ovaj citokin može potencijalno koristiti kao biomarker gestacijskog dijabetesa. Iako je analiza miR-29a i *IL-1 β* pokazala da oba molekula pojedinačno gledano imaju dovoljnu prediktivnu i dijagnostičku vrednost za detekciju žena sa GDM, daljom analizom ispitan je efekat njihovog udruženog korišćenja. Dobijeni rezultati ukazuju da, u kombinaciji, nivo genske ekspresije miR-29a i *IL-1 β* ima najveći dijagnostički značaj ($AUC=0,734$). Prikazani rezultati nedvosmisleno ukazuju na uključenost *IL-1 β* u razvoj gestacijskog dijabetesa.

Rezultati analize *TNF- α* ukazuju da nema razlike u ekspresiji ovog citokina između GDM i kontrolne grupe trudnica ($P=0,954$), što je u skladu sa nekoliko prethodno objavljenih radova (Saucedo i sar, 2011; Braga i sar, 2019). Takođe, Gauster i kolege (2011) nisu utvrdili postojanje statistički značajne razlike u ekspresiji *TNF- α* u plazmi periferne krvi trudnica sa GDM-om, niti plazmi iz umbilikalne vene i uzorcima plazme kontrolnih trudnica, te rezultati navedene studije potvrđuju prikazane rezultate. Suprotno tome, Wei i Zhang (2020) ukazuju na povišen nivo *TNF- α* u serumu GDM trudnica u poređenju sa kontrolom. Razlike u metodološkom pristupu (detekcija proteina *TNF- α* ELISA metodom u serumu trudnica u radu Wei i Zhang-a i detekcija iRNK *TNF- α* u leukocitima u našoj studiji) predstavlja moguće objašnjenje za postojanje diskrepance među navedenim rezultatima. Iako *TNF- α* predstavlja jedan od najčešće ispitivanih citokina kod trudnica sa GDM-om, jasno je da postoje neslaganja i suprotnosti u zaključcima dosadašnjih istraživanja, pa tako nekoliko grupa autora ukazuje na uključenost *TNF- α* u razvoj gestacijskog dijabetesa i insulinske rezistencije (Rui i sar, 2001; Mohammed i sar, 2018; Wei i Zhang, 2020). Pored uloge *TNF- α* u

fosforilaciji IRS-1 i razvoju insulinske rezistencije prethodno opisane u sekciji 1.2.2.2. ove disertacije, a predložene od strane Rui i saradnika (2001), smatra se da TNF- α smanjuje ekspresiju adiponektina što dodatno pogoršava stanje insulinske rezistencije (Mohammed i sar, 2018). Dalje, dobijeni rezultati ukazuju na postojanje statistički značajne pozitivne korelacije između *IL-1 β* i TNF- α u GDM grupi. Kako je poznato, adipokin visfatin, koji se dovodi u vezu sa insulinskom rezistencijom, može indukovati produkciju oba navedena citokina (de Mendonça i sar, 2022), dok sam TNF- α može indukovati produkciju drugih citokina, među kojima je *IL-1 β* (Abo-Zaid i sar, 2022), te navedeno predstavlja moguća objašnjenja za postojanje utvrđene korelacije. Izuzev TNF- α , ostali analizirani parametri nisu pokazali značajnu asociranost sa *IL-1 β* u grupi trudnica sa dijabetesom.

Iako je u GDM grupi utvrđena 2,4 puta viša ekspresija *IL-6* nego u kontroli, zbog velike varijanse dobijenih rezultata ova razlika nije imala statističku značajnost ($P=0,180$). Özyer i saradnici (2014), kao i Braga i saradnici (2019), pokazali su odsustvo statistički značajne razlike u ekspresiji *IL-6* krajem drugog i početkom trećeg trimestra zdravih i GDM trudnica, što je u skladu sa rezultatima ove disertacije. Suprotno tome, Tutar i kolege (2022) su pokazali da je u serumu žena sa GDM-om povišen nivo *IL-6*, a logističkom regresijom utvrdili su da se radi o nezavisnom faktoru rizika asociranom sa gestacijskim dijabetesom. Takođe, Zhao i saradnici (2018) su utvrdili da je povišen nivo *IL-6* kod GDM trudnoća u poređenju sa kontrolnom grupom, kao i da postoji značajna pozitivna korelacija između navedenog citokina i povišenog rizika za razvoj GDM-a, međutim nakon korekcije za godine trudnoće i BMI navedena korelacija više nije bila statistički značajna. Kako Kim i saradnici (2009) objašnjavaju, povezanost *IL-6* i insulinske rezistencije ogleda se u tome što u stanju hronične inflamacije, povišen nivo ovog citokina u ćelijama jetre indukuje razvoj insulinske rezistencije i dijabetesa, dok je u adipoznom tkivu, prema *in vitro* studijama, *IL-6* uključen u negativnu regulaciju metabolizma glukoze i signalnog puta insulina. Ipak, značajan je broj ispitivanja koje ne potvrđuju asociranost *IL-6* i GDM-a. Možemo pretpostaviti da pored različitih metodoloških pristupa, postojanje razlike u kriterijumima za postavljanje dijagnoze GDM-a dodatno doprinosi diverzitetu do sada publikovanih rezultata.

Rezultati ispitivanja pokazuju da *IL-17* nije asociran sa razvojem gestacijskog dijabetesa ($P=0,590$). Do danas, mali broj studija ispitivao je povezanost *IL-17* i GDM-a. Nekoliko istraživanja pokazalo je da se nivo ekspresije *IL-17* ne razlikuje značajno između GDM i zdravih trudnica što je u skladu sa prikazanim rezultatima (Kuźmicki i sar, 2014; Yang i sar, 2022). Suprotno tome, Cao i saradnici (2018) su utvrdili viši nivo iRNK i proteina *IL-17* kod GDM trudnica u poređenju sa kontrolnom grupom. Dodatno, ispitivanja na miševima pokazala su da niži nivo *IL-17* dovodi do povećane glukozne tolerancije i osjetljivosti na insulin, te da *IL-17* predstavlja negativan regulator glukoznog metabolizma (Zúñiga i sar, 2010). Iako nekoliko objavljenih radova govori u prilog našim rezultatima, s obzirom na mali broj dosadašnjih istraživanja koja ispituju ulogu *IL-17* u razvoju GDM-a dodatne studije su neophodne kako bi se izneo konačan i jasan zaključak.

Ekspresija *IL-1 β* u našem istraživanju nije se značajno razlikovala između zdravih i trudnica sa hipertenzijom ($P=0,180$), što je u skladu sa prethodno objavljenim radovima (Tangerås i sar, 2015; Adela i sar, 2017). Tangerås i saradnici (2015) su analizirali nivo *IL-1 β* u serumu trudnica koje su naknadno razvile gestacijsku hipertenziju. Ispitivanja su rađena tokom prvog trimestra trudnoće, između 12. i 14. nedelje gestacije, a rezultati ovog ispitivanja potvrđuju njihove. Takođe, utvrđen je viši nivo ekspresije *IL-1 β* kod žena koje će naknadno razviti GH u poređenju sa onima koje će razviti PE, što, kako autori navode, ukazuje na postojanje sistemskog stresa i inflamacije u ranom periodu GH trudnoća (Tangerås i sar, 2015). Kada je u pitanju preeklampsija dobijeni rezultati se razlikuju, te prema nekim studijama nema razlike u ekspresiji *IL-1 β* između PE i zdravih trudnica, dok nekoliko grupa istraživača ukazuje na povišen nivo ovog citokina u slučaju PE (Szarka i sar, 2010; Tangerås i sar, 2015; Chandrasekaran i sar, 2020; Dogan i sar, 2021). Iako razlika u ekspresiji *IL-1 β* između CG i GH grupe nije bila statistički značajna, važno je napomenuti da je uočen trend povećanja ekspresije ovog citokina u ispitivanoj grupi u odnosu na kontrolu.

U prikazanoj disertaciji ekspresija *TNF- α* bila je značajno viša u grupi trudnica sa hipertenzivnim poremećajem nego kod normotenzivnih trudnica ($P=0,030$), što je u skladu sa prethodnim studijama (Peraçoli i sar, 2007; Zhang i sar, 2019). Li i saradnici (2016) su takođe pokazali da je nivo *TNF- α* u serumu trudnica sa HDP-om značajno povišen u odnosu na kontrolu. Eksperimenti na gravidnim pacovima pokazali su da povišen nivo *TNF- α* indukuje aktivaciju NK ćelija, povećanje ROS-a u mitohondrijama placente i bubrega, poremećaj funkcije mitohondrija i razvoj hipertenzije, te je predloženo da bi inhibitori *TNF- α* mogli predstavljati potencijalne agense za lečenje preeklampsije (Jayaram i sar, 2021). Iako se oba poremećaja, GH i PE, dovode u vezu sa povišenim nivoom ekspresije *TNF- α* , kako je kod trudnica sa PE njegova ekspresija značajno viša nego kod GH trudnica, smatra se da je nivo ekspresije ovog citokina povezan sa težinom poremećaja (Peraçoli i sar, 2007). Ovaj citokin ima važnu ulogu u aktivaciji ćelija endotela i leukocita, te njegov povišen nivo doprinosi formiranju endotelnih oštećenja kod PE (Briana i Malamitsi-Puchner, 2009), ali ne treba isključiti mogućnost da je isti mehanizam odgovoran za nastanak disfunkcije endotela kod GH trudnica. Za razliku od navedenog, Adela i saradnici (2017) ukazuju da između trudnica sa GH i zdravih trudnica nema značajne razlike u ekspresiji *TNF- α* . Ovde prikazanim eksperimentima utvrđena je povezanost *TNF- α* sa drugim ispitivanim citokinima i miRNK u GH grupi. Značajna pozitivna korelacija pokazana je između *TNF- α* i *IL-1 β* , kao i *IL-17*, dok *IL-6* nije bio asociran sa *TNF- α* . Poznato je da u makrofagima ekspresija *TNF- α* i *IL-1 β* može biti indukovana od strane *IL-17*, a kako je već pomenuto, *TNF- α* aktivira sekreciju *IL-1 β* , što može biti uzrok postojanja navedenih korelacija (Jovanovic i sar, 1998; Abo-Zaid i sar, 2022). Analizom asociranosti *TNF- α* i nekodirajućih RNK utvrđena je značajna negativna korelacija između faktora nekroze tumora i miR-181a, dok ostale miRNK nisu pokazale značajnu asociranost. S obzirom da se miR-181a vezuje za 3'UTR *TNF- α* smanjujući njegovu ekspresiju, može se zaključiti da miR-181a ima anti-inflamatornu ulogu i predstavlja negativan regulator *TNF- α* (Zhu i sar, 2017; Liu i sar, 2022), što objašnjava postojanje detektovane korelacije. Navedeno ukazuje na mogućnost korišćenja miR-181a kao potencijalnog terapeutika u regulaciji inflamacije (Liu i sar, 2022). Iako većina dosadašnjih istraživanja, uključujući i ovu tezu, ukazuju da je ekspresija *TNF- α* asocirana sa razvojem gestacijske hipertenzije, utvrđeno je da ovaj citokin nema dovoljnu dijagnostičku vrednost za detekciju trudnica sa GH (AUC=0,613), te se ne može koristiti kao biomarker navedenog poremećaja u trudnoći.

Hipertenzivne i zdrave trudnice uključene u ovo istraživanje nisu se značajno razlikovale kada je u pitanju ekspresija *IL-6* ($P=0,640$), što je u skladu sa rezultatima dobijenim od strane Tangeranga-a i saradnika (2015). Kako su dosadašnji rezultati prilično heterogeni, veza između *IL-6* i gestacijske hipertenzije do danas nije razjašnjena. U jednoj publikaciji utvrđen je značajno niži nivo, dok su, suprotno tome, dve grupe autora pokazale viši nivo ekspresije ovog citokina kod trudnica sa gestacijskom hipertenzijom u poređenju sa kontrolnom grupom (Adela i sar, 2017; Zhang i sar, 2019; Gencheva i sar, 2022). Važno je napomenuti da su se poslednje tri navedene studije razlikovale u metodološkom pristupu u poređenju sa prikazanim istraživanjem, te su prilikom analize detektovani proteini iz seruma što može biti razlog nepodudaranja sa rezultatima ove disertacije. Dalje, kako je usled korišćenja antihipertenzivne terapije većina trudnica imala normalan nivo krvnog pritiska u trenutku uključivanja u prikazanu studiju, a poznato je da *IL-6* pozitivno koreliše sa visinom sistolnog krvnog pritiska kod hipertenzivnih osoba (Kong i sar, 2018; Zhang i sar, 2019), primenjena antihipertenzivna terapija mogla je uticati na dobijene rezultate. Povišen nivo *IL-6* se dovodi u vezu sa oštećenjem endotela kod žena sa PE usled njegove sposobnosti da indukuje produkciju faktora rasta i povećanje odnosa tromboksana A2 i prostaciklina u korist tromboksana (Briana i Malamitsi-Puchner, 2009). Kako narušena funkcija endotela predstavlja zajedničku karakteristiku GH i PE, dalja ispitivanja su potrebna kako bi se razjasnila moguća uloga ovog citokina u nastanku endotelne disfunkcije usled gestacijske hipertenzije.

U ovom istraživanju po prvi put je ispitivan nivo iRNK *IL-17* u leukocitima trudnica sa gestacijskom hipertenzijom, a rezultati ukazuju da *IL-17* nije povezan sa razvojem navedene komplikacije ($P=0,560$), što potvrđuje istraživanje Adela i saradnika (2017). Pokazano je da se u

prvom trimestru trudnoće, između 12. i 14. nedelje gestacije, nivo IL-17A ne razlikuje značajno između zdravih i trudnica koje će kasnije u trudnoći razviti GH, što je u skladu s ovde prikazanim rezultatima (Tangerås i sar, 2015). IL-17 se dovodi u vezu sa razvojem drugih tipova hipertenzije (Shahaway i sar, 2019; Darmochwal-Kolarz i Chara, 2022; Yang i sar, 2022). IL-17A uzrokuje povećanje ekspresije i fosforilacije SGK1 kinaze (engl. *serum/glucocorticoid regulated kinase 1*) u ćelijama bubrega što utiče na aktivnost transportera natrijuma, NHE3 u proksimalnim i NCC u distalnim tubulama, te povećava apsorpciju soli i vode i dovodi do povećanja krvnog pritiska (Norlander i sar, 2016). Poznato je da IL-17 pozitivno koreliše sa visinom sistolnog krvnog pritiska kod žena sa PE, a prilikom normalizacije krvnog pritiska dolazi do smanjenja nivoa IL-17 (Shahaway i sar, 2019; Darmochwal-Kolarz i Chara, 2022). Stoga, ne može se isključiti mogućnost da je primena antihipertenzivne terapije i posledična normalizacija krvnog pritiska uticala na nivo ekspresije IL-17.

5.3. Oksidativni stres kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom i gestacijskom hipertenzijom

Prikazani rezultati ukazuju na povišen nivo oksidativnog stresa kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom. Nivo TBARs (ekvivalent MDA) bio je značajno viši u plazmi GDM trudnica nego u kontrolnoj grupi ($P=0,0001$), što ukazuje na povezanost lipidne peroksidacije i hiperglikemije u trudnoći. Analizom asociranosti pokazano je da nivo lipidne peroksidacije nije povezan sa životnom dobi trudnica, indeksom telesne mase u trudnoći, niti pre trudnoće, procentom povećanja telesne mase, kao ni nedeljom gestacije. Dobijeni rezultati u skladu su sa drugim radovima (Arribas i sar, 2016; Jaya i sar, 2019; Renugasundari i sar, 2023). Arribas i saradnici (2016) utvrdili su značajno viši serumski nivo MDA već u prvom i drugom trimestru GDM trudnoća, dok je u trećem trimestru zabeležen viši nivo lipidne peroksidacije u poređenju sa kontrolnim trudnicama, ali bez statističke značajnosti. Iako veći broj istraživanja govori u prilog našim rezultatima, nekoliko studija nije utvrdilo značajnu razliku u nivou peroksidacije lipida između GDM i zdravih trudnica (Sobki i sar, 2004; Dey i sar, 2008). Prethodno je pokazano postojanje pozitivne korelacije između MDA i HbA1c, što govori u prilog tome da je kod osoba sa neadekvatnom glikemijskom kontrolom povišen nivo lipidne peroksidacije i oksidativnog stresa (Biri i sar, 2006; Lappas i sar, 2011; Arribas i sar, 2016). Peroksidacija lipida može narušiti sintezu prostaglandina koji su značajni za normalan rast i razvoj fetusa (Arribas i sar, 2016), a MDA se smatra nezavisnim faktorom rizika za ishod GDM trudnoća (Ma i sar, 2021). Takođe, novija saznanja ukazuju da MDA pozitivno koreliše sa nivoom stresa i postnatalne depresije kod osoba sa gestacijskim dijabetesom (Renugasundari i sar, 2023). Poznato je da depresija i stres tokom trudnoće mogu negativno uticati na ishod trudnoće, kao i zdravlje majke i potomaka, a navedeni podaci daju značajan uvid u moguću povezanost oksidativnog stresa GDM trudnica i njihovih psiholoških karakteristika (Renugasundari i sar, 2023). Zbog širokog spektra negativnih posledica koji oksidativni stres može imati po dalji tok trudnoće, sve veći broj autora traga za mogućim agensima koji bi smanjili nivo ROS-a i oksidativnog stresa u trudnoći. Pokazano je da konzumacija suplemenata koji sadrže magnezijum, cink, kalcijum i vitamin D dva puta dnevno tokom šest nedelja GDM trudnoća značajno smanjuje nivo C-reaktivnog proteina i MDA, dok istovremeno dovodi do značajnog povećanja antioksidativnih kapaciteta ćelije, čime se smanjuje nivo inflamacije i oksidativnog stresa, a primećena je i niža stopa makrozomije fetusa (Jamilian i sar, 2019).

Dobijeni rezultati pokazali su da je nivo 8-OHdG značajno viši kod trudnica sa dijabetesom nego kod zdravih trudnica ($P=0,021$), što ukazuje na povezanost DNK oštećenja i razvoja GDM-a. Daljom analizom utvrđeno je da nivo 8-OHdG negativno koreliše sa nedeljom gestacije, dok ostali analizirani parametri (životna dob, indeks telesne mase pre trudnoće i u trudnoći, procenat povećanja telesne mase) nisu pokazali značajnu asociranost sa nivoom oštećenja DNK. Nekoliko grupa istraživača pokazalo je povišen nivo DNK oksidacije u krvi i urinu trudnica sa GDM-om što je u skladu s rezultatima ove teze (Qiu i sar, 2011; Gelaleti i sar, 2015; Erbağcı i sar, 2021). Prethodno je

pokazano da između nivoa 8-OHdG, feritina i nivoa glukoze u prvom satu oralnog testa tolerancije na glukozu kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom postoji značajna pozitivna korelacija, što govori u prilog povezanosti hiperglikemije, nivoa gvožđa i oštećenja DNK (Erbağcı i sar, 2021). Gelaleti i saradnici (2016) su utvrdili postojanje značajne pozitivne korelacije između nivoa glukoze u krvi trudnice i nivoa oštećenja DNK njihovih potomaka, ukazujući na značaj kontrole i lečenja hiperglikemije majke u cilju održanju stabilnosti DNK fetusa. Pored navedenog, povišen nivo 8-OHdG u urinu trudnica se dovodi u vezu sa prevremenim porođajem i zastojem u rastu ploda (Murata i sar, 2021; Murata i sar, 2024). Iako antioksidativna terapija ima pozitivan efekat na nivo oksidativnog stresa i inflamacije, još uvek nije jasno da li njena primena utiče na nivo DNK oštećenja. Za sada se pretpostavlja da kontrola nivoa glukoze ima najveći značaj u očuvanju integriteta DNK molekula (Urbaniak i sar, 2020). Analize nivoa MDA ekvivalenta i 8-OHdG u ovde analiziranim grupama trudnica, zajedno sa drugim prikazanim publikacijama, nedvosmisleno ukazuju na uključenost oksidativnog stresa u razvoj GDM-a. Za razliku od TBARs, 8-OHdG se zbog svoje niske dijagnostičke vrednosti ne može koristiti kao biomarker gestacijskog dijabetesa.

Rezultati ispitivanja pokazali su značajno viši nivo TBARs, odnosno MDA, u GH grupi u odnosu na kontrolu ($P=0,0001$), što su ranije utvrdili Babu i saradnici (2012). Dobijeni rezultati ukazuju na povišen nivo lipidne peroksidacije i oksidativnog stresa kod trudnica sa gestacijskom hipertenzijom. Klinički parametri analizirani u ovoj studiji (životna dob, nedelja gestacije, indeks telesne mase pre trudnoće i u trudnoći, procenat povećanja telesne mase) nisu pokazali značajnu asociranost sa nivoom lipidne peroksidacije u GH grupi. Kako većina dosadašnjih istraživanja uključuje trudnice sa PE ili HDP-om, veza između GH i oksidativnog stresa slabo je ispitana. Babu i saradnici (2012) su pokazali da i GH i PE odlikuje značajno povišen nivo lipidne peroksidacije u poređenju sa kontrolom, ali je nivo MDA značajno viši u serumu trudnica sa PE nego u GH grupi. Miranda Guisado i kolege (2012) su ispitivali nivo oksidativnog stresa i antioksidativnih parametara kod trudnica sa različitim tipovima hipertenzije. Iako je kod svih ispitivanih grupa (GH, PE, hronična hipertenzija) utvrđen viši nivo oksidativnog stresa i niži antioksidativni kapacitet u poređenju sa kontrolnom grupom, nije uočena značajna razlika u nivou MDA između grupa, što autori objašnjavaju malom veličinom uzorka (Miranda Guisado i sar, 2012). Povišen nivo MDA utvrđen je u krvi umbilikalne vene neonatusa iz PE/hipertenzivnih trudnoća u poređenju sa kontrolnom grupom, a između koncentracije MDA u umbilikalnoj veni i hipertenzije je utvrđena značajna pozitivna korelacija (Surmiak i sar, 2022). U grupi trudnica sa PE/hipertenzijom pokazano je da je nivo MDA značajno viši kod fetusa sa zastojem u rastu (telesna masa na rođenju ispod 10-tog percentila) nego kod onih koji su imali adekvatan rast za datu gestaciju (Surmiak i sar, 2022). Dodatna, opsežnija istraživanja neophodna su kako bi se potvrdili naši rezultati, ali jasno je da bi lipidna peroksidacija mogla predstavljati značajan faktor rizika za razvoj gestacijske hipertenzije. Prema dobijenim rezultatima, TBARs bi mogao predstavljati potencijalni biomarker gestacijskog dijabetesa i gestacijske hipertenzije.

Nivo 8-OHdG nije se značajno razlikovao između GH i CG grupe ($P=0,412$), ukazujući da gestacijska hipertenzija ne uzrokuje povišen nivo DNK oštećenja. Uvidom u literaturu, prikazano istraživanje je prvo koja ispituje nivo 8-OHdG u krvi trudnica sa GH. Do sada je objavljen samo jedan rad koji je uključivao trudnice sa GH, a u kome je ispitivan nivo placentalnog 8-OHdG. Nekolicina autora ispitivala je povezanost PE i oksidativnih oštećenja DNK, a dobijeni rezultati većinom ukazuju na njihovu povezanost (Kimura i sar, 2013; Negi i sar, 2014; Akinci i sar, 2017). Owaki i saradnici (2021) su utvrdili povišen nivo 8-OHdG u placenti trudnica sa gestacijskom hipertenzijom u poređenju sa zdravim trudnicama. Pored toga što je različita vrsta tkiva korišćena za analizu u našem i pomenutom radu, važno je napomenuti da je u istraživanje Owakija i saradnika (2021) uključeno samo 13 GH trudnica i 16 kontrola, te je mala ispitivana grupa mogla dodatno doprineti nepodudaranju rezultata. Takođe, poznato je da čak i kada je nivo 8-OHdG u tkivu visok, ukoliko reparacioni DNK mehanizmi nisu dovoljno efikasni, nivo ovog biomarkera u serumu/plazmi može ostati nizak (Sova i sar, 2010). Stoga bi se moglo pretpostaviti da je snižena efikasnost

reparacionih mehanizama kod trudnica sa GH, a ne nizak nivo ROS-a i oksidativnog stresa, mogući razlog odsustva razlike u 8-OHdG između hipertenzivnih i zdravih trudnica u našoj studiji. U prilog tome govore i dobijeni rezultati koji se tiču MDA, a koji ukazuju na povišen nivo oksidativnog stresa u GH grupi. Ipak, za potvrdu ove hipoteze neophodna su dalja ispitivanja koja bi analizirala efikasnost reparacionih DNK mehanizama kod osoba sa gestacijskom hipertenzijom.

5.4. Efekat leka Metildopa na nivo oksidativnog stresa *in vitro*

Rezultati *in vitro* ispitivanja pokazuju da između tretiranih i netretiranih kultura ćelija lekom Metildopa nema značajne razlike u nivou TBARs i 8-OHdG. Do sada je pokazano da primena antihipertenzivne terapije i posledična normalizacija krvnog pritiska imaju pozitivan efekat na nivo oksidativnog stresa kod osoba sa hipertenzijom. Donmez i saradnici (2002) su pokazali da primena losartana ili enalapрила kod obolelih od hronične hipertenzije nakon 9 nedelja dovodi do značajnog smanjenja sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, ali i malondialdehida. Takođe, uočeno je značajno povećanje koncentracije NO, nitrata i glutationa u plazmi ispitanika. S druge strane, rezultati Lee-ja i saradnika (2005) ukazuju da nisu svi lekovi koji se koriste u lečenju hipertenzije efikasni u smanjenju oksidativnog stresa. Primena karvedilola ili hidrohlorotiazida kod hipertenzivnih osoba tokom dva meseca pokazala je da karvedilol, ali ne i hidrohlorotiazid, dovodi do značajnog smanjenja 8-OHdG u plazmi hipertenzivnih osoba (Lee i sar, 2005). Kako lek Metildopa *in vitro* nije imao značajan efekat na nivo oksidativnog stresa u ćelijskoj kulturi, možemo zaključiti da primena antihipertenzivne terapije nije značajno uticala na nivo lipidne peroksidacije, niti nivo DNK oštećenja kod trudnica sa gestacijskom hipertenzijom.

Prikazana studija ukazuje na povišen nivo oksidativnog stresa u obe ispitivane grupe, GDM i GH. Povišen nivo oksidativnog stresa kod trudnica sa dijabetesom verovatna je posledica hiperglikemije u trudnoći, a prethodna istraživanja pokazuju da i blaga hiperglikemija može uzrokovati oštećenja DNK molekula majke (Urbaniak i sar, 2020), što potvrđuju i naši rezultati. Povišen nivo ROS-a i oksidativnog stresa u trudnoći mogu dovesti do daljeg razvoja patoloških stanja i pogoršanja hiperglikemije, odnosno hipertenzije trudnica. Pored toga, inflamatorni procesi igraju važnu ulogu u razvoju kako dijabetesa, tako i hipertenzije u trudnoći (Jiménez-Osorio i sar, 2023), a naše istraživanje ukazuje na izmenjen profil ekspresije citokina kod trudnica sa GDM-om i GH-om. Povišena aktivnost citokina u trudnoći, između ostalog, može narušiti funkciju insulinskih receptora, indukovati razvoj insulinske rezistencije ili uzrokovati disfunkciju endotela (Briana i Malamitsi-Puchner, 2009; Jiménez-Osorio i sar, 2023). Pored izmenjene ekspresije citokina, promene koje prate razvoj GDM-a prema prikazanim rezultatima uključuju i male nekodirajuće RNK.

Brojna dosadašnja ispitivanja imala su za cilj identifikaciju “idealnog biomarkera” različitih patoloških stanja u trudnoći. Ipak, veliki broj različitih molekula koji leže u osnovi patofizioloških mehanizama perinatalnih komplikacija, kao i njihov širok spektar dejstva otežavaju detekciju biomarkera dovoljne specifičnosti i senzitivnosti za dato patološko stanje. Kako većina procesa koji dovode do razvoja GDM-a ili GH-a nisu specifični isključivo za jednu od ove dve komplikacije, korišćenje kombinacije nekoliko biomarkera verovatan je preduslov za razvoj dovoljno efikasnog skrininga (Mavreli i saradnici, 2021). Prema prikazanim rezultatima, miR-29a i *IL-1β* predstavljaju potencijalne biomarkere gestacijskog dijabetesa, dok analizirani parametar lipidne peroksidacije predstavlja potencijalni biomarker oba ispitivana patološka stanja. Novina ovog istraživanja ogleda se u kombinovanom korišćenju miRNK i citokina u cilju detekcije trudnica sa GDM-om. Ipak, kako bi se definitivno procenio dijagnostički i prognostički značaj miR-29a i *IL-1β* u detekciji GDM-a neophodne su dodatne, opsežnije studije koje bi ispitale njihov nivo i u ranom periodu trudnoće. Analiza nivoa citokina i miRNK između 12. i 14. nedelje gestacije dala bi uvid u rane molekularne

mehanizme koji leže u osnovi gestacijskog dijabetesa i potencijalno omogućila razvoj adekvatnog skrininga u cilju prevencije mogućih negativnih posledica hiperglikemije u trudnoći.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu postavljenih ciljeva i dobijenih rezultata doktorske disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

1. Kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom dolazi do značajnog sniženja ekspresije miR-29a, dok nema promena u ekspresiji miR-17 i miR-181a u odnosu na kontrolu. Kod trudnica sa gestacijskom hipertenzijom nije promenjena ekspresija nijedne od analiziranih miRNK.
2. U stanjima gestacijskog dijabetesa i gestacijske hipertenzije citokini se diferencijalno ekspimiraju. Kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom se ekspresija *IL-1 β* povećava, dok se kod trudnica sa gestacijskom hipertenzijom povećava nivo ekspresije *TNF- α* . Ni kod jedne od ispitivanih perinataloških komplikacija ne dolazi do promene ekspresije citokina *IL-6* i *IL-17*.
3. Pozitivna korelacija je utvrđena između ekspresije *IL-1 β* i *TNF- α* gena (kod GDM trudnica) i *TNF- α* i *IL-1 β* , odnosno *IL-17* (kod GH trudnica). Jedina negativna korelacija je utvrđena između ekspresije *TNF- α* i *miR-181a* gena. Kod ispitivanih trudnica sa perinataloškim komplikacijama ne postoji veza između kliničkih parametara (nedelja gestacije, starost trudnice, BMI pre trudnoće i u trenutku uključivanja u studiju, procenat povećanja telesne mase, visina sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska) i nivoa ekspresije ispitivanih gena.
4. miR-29a i *IL-1 β* imaju pojedinačno potencijal da budu korišćeni kao biomarkeri gestacijskog dijabetesa, dok njihovo kombinovano korišćenje ima još bolje prediktivne i diskriminatorne mogućnosti za detekciju GDM-a. Za gestacijsku hipertenziju ekspresija analiziranih gena se nije dovoljno razlikovala između analiziranih grupa, te nije utvrđen pouzdan biomarker za ovo stanje.
5. Gestacijski dijabetes i gestacijska hipertenzija su stanja koja se odlikuju povećanim oksidativnim stresom. Na to ukazuju povećani parametri lipidne peroksidacije kod obe grupe trudnica, i povećani parametar DNK oštećenja kod GDM trudnica.
6. Kod trudnica sa komplikacijama ne postoji veza između kliničkih parametara (nedelja gestacije, starost trudnice, BMI pre trudnoće i u trenutku uključivanja u studiju, procenat povećanja telesne mase) i nivoa parametara oksidativnog stresa. Jedino je kod GDM trudnica utvrđena negativna korelacija između nivoa oštećenja DNK molekula i nedelje gestacije.
7. Analizirani marker lipidne peroksidacije se shodno svojoj visokoj diskriminatornoj vrednosti za detekciju trudnica sa GDM-om ili GH-om potencijalno može koristiti kao biomarker ispitivanih perinataloških komplikacija. Diskriminatorna vrednost markera oksidativnog oštećenja DNK molekula nije se pokazala dovoljnom za dijagnostički biomarker za GDM.
8. Kako lek Metildopa *in vitro* nema značajan efekat na nivo lipidne peroksidacije i oštećenja DNK u kulturi limfocita periferne krvi, može se zaključiti da primena antihipertenzivne terapije kod trudnica sa gestacijskom hipertenzijom ne utiče na nivo oksidativnog stresa kod GH trudnica.

7. LITERATURA

A technical guide to identifying miRNA normalizers using TaqMan™ Advanced miRNA Assays White Paper (Pub. No. COL31302 0916), Thermo Fisher Scientific Inc. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/GSD/Reference-Materials/identifying-mirna-normalizers-white-paper.pdf>, 2016 (poslednji put posećeno: 16.2.2024.).

Abbas U, Imdad B, Mughal SA, Baloch IA, Khan AM, Kamran DE. Differential expression of micro RNA-29 family in non-diabetic adults of diabetic and non-diabetic parents. *BMC Res Notes*. 2021;14(1):294. doi: 10.1186/s13104-021-05703-8.

Abdelazim SA, Shaker OG, Aly YAH, Senousy MA. Uncovering serum placental-related non-coding RNAs as possible biomarkers of preeclampsia risk, onset and severity revealed MALAT-1, miR-363 and miR-17. *Sci Rep*. 2022;12(1):1249. doi: 10.1038/s41598-022-05119-9.

Abdel-Moneim A, Bakery HH, Allam G. The potential pathogenic role of IL-17/Th17 cells in both type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*. 2018;101:287-292. doi: 10.1016/j.biopha.2018.02.103.

Abo-Zaid MA, Mohammed SS, Ismail AH. Evaluation of Some Inflammatory Cytokines Levels as A Marker for Diabetes. *Int J Immunol Immunother*. 2022;9:065. doi: 10.23937/2378-3672/1410065.

Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol*. 2007;8(9):942-9. doi: 10.1038/ni1496.

Adela R, Borkar RM, Mishra N, Bhandi MM, Vishwakarma G, Varma BA, Ragampeta S, Banerjee SK. Lower Serum Vitamin D Metabolite Levels in Relation to Circulating Cytokines/Chemokines and Metabolic Hormones in Pregnant Women with Hypertensive Disorders. *Front Immunol*. 2017;8:273. doi: 10.3389/fimmu.2017.00273.

Aguilar Diaz De Leon J, Borges CR. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *J Vis Exp*. 2020;(159):10.3791/61122. doi: 10.3791/61122.

Akinci S, Özcan HC, Balat Ö, Uğur MG, Öztürk E, Taysi S, Sucu S. Assessment of β -hydroxydeoxyguanosine levels in patients with preeclampsia: a prospective study. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2017;44(2):226-229.

Alfadul H, Sabico S, Al-Daghri NM. The role of interleukin-1 β in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:901616. doi: 10.3389/fendo.2022.901616.

Alijotas-Reig J, Esteve-Valverde E, Ferrer-Oliveras R, Llurba E, Gris JM. Tumor Necrosis Factor-Alpha and Pregnancy: Focus on Biologics. An Updated and Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;53(1):40-53. doi: 10.1007/s12016-016-8596-x.

American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care*. 2021;44(Suppl 1):S15-S33.

Amsen D, de Visser KE, Town T. Approaches to determine expression of inflammatory cytokines. *Methods Mol Biol*. 2009;511:107-42. doi: 10.1007/978-1-59745-447-6_5.

- Arribas L, Almansa I, Miranda M, Muriach M, Romero FJ, Villar VM. Serum Malondialdehyde Concentration and Glutathione Peroxidase Activity in a Longitudinal Study of Gestational Diabetes. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155353. doi: 10.1371/journal.pone.0155353.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438. doi: 10.1155/2014/360438.
- Babu MS, Bobby Z, Habeebullah S. Increased inflammatory response and imbalance in blood and urinary oxidant-antioxidant status in South Indian women with gestational hypertension and preeclampsia. *Clin Biochem*. 2012;45(10-11):835-8. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.04.018.
- Bagge A, Clausen TR, Larsen S, Ladefoged M, Rosenstjerne MW, Larsen L, Vang O, Nielsen JH, Dalgaard LT. MicroRNA-29a is up-regulated in beta-cells by glucose and decreases glucose-stimulated insulin secretion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;426(2):266-72. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.08.082.
- Baradaran A, Nasri H, Rafieian-Kopaei M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *J Res Med Sci*. 2014;19(4):358-67.
- Beech A, Mangos G. Management of hypertension in pregnancy. *Aust Prescr*. 2021;44(5):148-152. doi: 10.18773/austprescr.2021.039.
- Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams D. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2009; 373(9677):1773-9. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60731-5.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9-19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
- Biri A, Onan A, Devrim E, Babacan F, Kavutcu M, Durak I. Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes. *Placenta*. 2006;27(2-3):327-32. doi: 10.1016/j.placenta.2005.01.002.
- Braga FO, Negrato CA, Matta MFB, Carneiro JRI, Gomes MB. Relationship between inflammatory markers, glycated hemoglobin and placental weight on fetal outcomes in women with gestational diabetes. *Arch Endocrinol Metab*. 2019;63(1):22-29. doi: 10.20945/2359-3997000000099.
- Bravi MC, Pietrangeli P, Laurenti O, Basili S, Cassone-Faldetta M, Ferri C, De Mattia G. Polyol pathway activation and glutathione redox status in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism*. 1997;46(10):1194-8. doi: 10.1016/s0026-0495(97)90216-x.
- Briana DD, Malamitsi-Puchner A. Reviews: adipocytokines in normal and complicated pregnancies. *Reprod Sci*. 2009;16(10):921-37. doi: 10.1177/1933719109336614.
- Burgos-Morón E, Abad-Jiménez Z, Marañón AM, Iannantuoni F, Escribano-López I, López-Domènech S, Salom C, Jover A, Mora V, Roldan I, Solá E, Rocha M, Víctor VM. Relationship Between Oxidative Stress, ER Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetes: The Battle Continues. *J Clin Med*. 2019;8(9):1385. doi: 10.3390/jcm8091385.
- Cao W, Wang X, Chen T, Xu W, Feng F, Zhao S, Wang Z, Hu Y, Xie B. Maternal lipids, BMI and IL-17/IL-35 imbalance in concurrent gestational diabetes mellitus and preeclampsia. *Exp Ther Med*. 2018;16(1):427-435. doi: 10.3892/etm.2018.6144.

- Cao YL, Jia YJ, Xing BH, Shi DD, Dong XJ. Plasma microRNA-16-5p, -17-5p and -20a-5p: Novel diagnostic biomarkers for gestational diabetes mellitus. *J Obstet Gynaecol Res* 2017;43(6):974-981. doi: 10.1111/jog.13317.
- Chandrasekaran S, Hunt H, Melhorn S, Gammill HS, Schur EA. Adipokine profiles in preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2020;33(16):2812-2817. doi: 10.1080/14767058.2018.1562542.
- Chatterjee P, Chiasson VL, Bounds KR, Mitchell BM. Regulation of the Anti-Inflammatory Cytokines Interleukin-4 and Interleukin-10 during Pregnancy. *Front Immunol.* 2014;5:253. doi: 10.3389/fimmu.2014.00253.
- Chatzakis C, Sotiriadis A, Tsakmaki E, Papagianni M, Paltoglou G, Dinas K, Mastorakos G. The Effect of Dietary Supplements on Oxidative Stress in Pregnant Women with Gestational Diabetes Mellitus: A Network Meta-Analysis. *Nutrients.* 2021;13(7):2284. doi: 10.3390/nu13072284.
- Chiarello DI, Abad C, Rojas D, Toledo F, Vázquez CM, Mate A, Sobrevia L, Marín R. Oxidative stress: Normal pregnancy versus preeclampsia. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2020;1866(2):165354. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.12.005.
- Chung HY, Baek BS, Song SH, Kim MS, Huh JI, Shim KH, Kim KW, Lee KH. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age (Omaha).* 1997;20(3):127-40. doi: 10.1007/s11357-997-0012-2.
- Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, Pedersen O, Jensen DM, Lauenborg J, Schmidt L, Damm P. Overweight and the metabolic syndrome in adult offspring of women with diet-treated gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(7):2464-70. doi: 10.1210/jc.2009-0305.
- Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, Pedersen O, Jensen DM, Lauenborg J, Damm P. High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia. *Diabetes Care.* 2008;31(2):340-6. doi: 10.2337/dc07-1596.
- Collares CV, Evangelista AF, Xavier DJ, Rassi DM, Arns T, Foss-Freitas MC, Foss MC, Puthier D, Sakamoto-Hojo ET, Passos GA, Donadi EA. Identifying common and specific microRNAs expressed in peripheral blood mononuclear cell of type 1, type 2, and gestational diabetes mellitus patients. *BMC Res Notes.* 2013;6:491. doi: 10.1186/1756-0500-6-491.
- Costé É, Rouleux-Bonnin F. The crucial choice of reference genes: identification of miR-191-5p for normalization of miRNAs expression in bone marrow mesenchymal stromal cell and HS27a/HS5 cell lines. *Sci Rep.* 2020;10(1):17728. doi: 10.1038/s41598-020-74685-7.
- Coughlan MT, Oliva K, Georgiou HM, Permezel JM, Rice GE. Glucose-induced release of tumour necrosis factor-alpha from human placental and adipose tissues in gestational diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2001;18(11):921-7. doi: 10.1046/j.1464-5491.2001.00614.x.
- Dal Bo M, Bomben R, Hernández L, Gattei V. The MYC/miR-17-92 axis in lymphoproliferative disorders: A common pathway with therapeutic potential. *Oncotarget.* 2015;6(23):19381-92. doi: 10.18632/oncotarget.4574.
- Dalgaard LT, Sørensen AE, Hardikar AA, Joglekar MV. The microRNA-29 family: role in metabolism and metabolic disease. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2022;323(2):C367-C377. doi: 10.1152/ajpcell.00051.2022.

- Darmochwal-Kolarz D, Chara A. The Association of IL-17 and PIGF/sENG Ratio in Pre-Eclampsia and Adverse Pregnancy Outcomes. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;20(1):768. doi: 10.3390/ijerph20010768.
- Darmochwal-Kolarz D, Michalak M, Kolarz B, Przegalinska-Kalamucka M, Bojarska-Junak A, Sliwa D, Oleszczuk J. The Role of Interleukin-17, Interleukin-23, and Transforming Growth Factor- β in Pregnancy Complicated by Placental Insufficiency. *Biomed Res Int*. 2017;2017:6904325. doi: 10.1155/2017/6904325.
- de Mendonça ELSS, Fragoso MBT, de Oliveira JM, Xavier JA, Goulart MOF, de Oliveira ACM. Gestational Diabetes Mellitus: The Crosslink among Inflammation, Nitroxidative Stress, Intestinal Microbiota and Alternative Therapies. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(1):129. doi: 10.3390/antiox11010129.
- Deng L, Huang Y, Li L, Chen H, Su J. Serum miR-29a/b expression in gestational diabetes mellitus and its influence on prognosis evaluation. *J Int Med Res* 2020;48(9):300060520954763. doi: 10.1177/0300060520954763.
- Dey P, Gupta P, Acharya NK, Rao SN, Ray S, Chakrabarty S, Ramprasad S, Kurian TA, Mawroh A, Kundu A, Bhaktha G, Joseph CP, Kumar P, Rai L, Rao A. Antioxidants and lipid peroxidation in gestational diabetes--a preliminary study. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2008;52(2):149-56.
- Dhillion P, Wallace K, Herse F, Scott J, Wallukat G, Heath J, Mosely J, Martin JN Jr, Dechend R, LaMarca B. IL-17-mediated oxidative stress is an important stimulator of AT1-AA and hypertension during pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012;303(4):R353-8. doi: 10.1152/ajpregu.00051.2012.
- Dias S, Pfeiffer C, Abrahams Y, Rheeder P, Adam S. Molecular Biomarkers for Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2018;19(10):2926.
- Dikalov SI, Ungvari Z. Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;305(10):H1417-27. doi: 10.1152/ajpheart.00089.2013.
- Dogan K, Kural A, Oztoprak Y, Dogan M. Interleukin-1 β and uric acid as potential second-trimester predictive biomarkers of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2021;40(3):186-192. doi: 10.1080/10641955.2021.1921793.
- Donmez G, Derici U, Erbas D, Arinsoy T, Onk A, Sindel S, Hasanoglu E. The effects of losartan and enalapril therapies on the levels of nitric oxide, malondialdehyde, and glutathione in patients with essential hypertension. *Jpn J Physiol*. 2002;52(5):435-40. doi: 10.2170/jjphysiol.52.435.
- Dooley J, Garcia-Perez JE, Sreenivasan J, Schlenner SM, Vangoitsenhoven R, Papadopoulou AS, Tian L, Schonefeldt S, Serneels L, Deroose C, Staats KA, Van der Schueren B, De Strooper B, McGuinness OP, Mathieu C, Liston A. The microRNA-29 Family Dictates the Balance Between Homeostatic and Pathological Glucose Handling in Diabetes and Obesity. *Diabetes* 2016;65(1):53-61. doi: 10.2337/db15-0770.
- Draganovic D, Lucic N, Jojic D. Oxidative Stress Marker and Pregnancy Induced Hypertension. *Med Arch*. 2016;70(6):437-440. doi: 10.5455/medarh.2016.70.437-440.
- Drejza MA, Rylewicz K, Majcherek E, Gross-Tyrkin K, Mizgier M, Plagens-Rotman K, Wójcik M, Panecka-Mysza K, Pisarska-Krawczyk M, Kędzia W, Jarzabek-Bielecka G. Markers of Oxidative Stress in Obstetrics and Gynaecology-A Systematic Literature Review. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(8):1477. doi: 10.3390/antiox11081477.

- El Shahaway AA, Abd Elhady RR, Abdelrhman AA, Yahia S. Role of maternal serum interleukin 17 in preeclampsia: diagnosis and prognosis. *J Inflamm Res.* 2019;12:175-180. doi: 10.2147/JIR.S206800.
- Erbağcı MO, Tuna G, Köse S, Dal-Bekar NE, Akış M, Kant M, Altunyurt S, İşlekel GH. Association between early oxidative DNA damage and iron status in women with gestational diabetes mellitus. *Reprod Toxicol.* 2021;103:171-180. doi: 10.1016/j.reprotox.2021.05.009.
- Fogarasi E, Croitoru MD, Fülöp I, Muntean DL. Is the oxidative stress really a disease? *Acta Med Marisiensis.* 2016;62(1):112-120. doi: 10.1515/amma-2015-0070.
- Formichi C, Fignani D, Nigi L, Grieco GE, Brusco N, Licata G, Sabato C, Ferretti E, Sebastiani G, Dotta F. Circulating microRNAs Signature for Predicting Response to GLP1-RA Therapy in Type 2 Diabetic Patients: A Pilot Study. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17):9454. doi: 10.3390/ijms22179454.
- Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829-37, 837a-837d. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.
- Gao D, Ren L, Hao YD, Schaduangrat N, Liu XW, Yuan SS, Yang YH, Wang Y, Shoombuatong W, Ding H. The role of ncRNA regulatory mechanisms in diseases-case on gestational diabetes. *Brief Bioinform.* 2023;25(1):bbad489. doi: 10.1093/bib/bbad489.
- Gauster M, Hiden U, van Poppel M, Frank S, Wadsack C, Hauguel-de Mouzon S, Desoye G. Dysregulation of placental endothelial lipase in obese women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes.* 2011;60(10):2457-64. doi: 10.2337/db10-1434.
- Gelaleti RB, Damasceno DC, Lima PH, Salvadori DM, Calderon Ide M, Peraçoli JC, Rudge MV. Oxidative DNA damage in diabetic and mild gestational hyperglycemic pregnant women. *Diabetol Metab Syndr.* 2015;7:1. doi: 10.1186/1758-5996-7-1.
- Gelaleti RB, Damasceno DC, Santos DP, Calderon IM, Rudge MV. Increased DNA Damage is Related to Maternal Blood Glucose Levels in the Offspring of Women With Diabetes and Mild Gestational Hyperglycemia. *Reprod Sci.* 2016;23(3):318-23. doi: 10.1177/1933719115602766.
- Gelen V, Şengül E, Atila G, Uslu H, Makav M. Association of Gestational Diabetes and Proinflammatory Cytokines (IL-6, TNF- α and IL-1 β). *Journal of Embryology* 2017; 1(1):6-11.
- Gencheva D, Nikolov F, Uchikova E, Mihaylov R, Pencheva B, Vasileva M. Interleukin-6 and its correlations with maternal characteristics and echocardiographic parameters in pre-eclampsia, gestational hypertension and normotensive pregnancy. *Cardiovasc J Afr.* 2022;33(2):65-73. doi: 10.5830/CVJA-2021-040.
- Geraldes P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res.* 2010;106(8):1319-31. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.217117.
- Gestational Hypertension and Preeclampsia: ACOG Practice Bulletin, Number 222. *Obstet Gynecol.* 2020;135(6):e237-e260. doi: 10.1097/AOG.0000000000003891.
- Ghosh R, Mitchell DL. Effect of oxidative DNA damage in promoter elements on transcription factor binding. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(15):3213-8. doi: 10.1093/nar/27.15.3213.
- Gomes CP, Torloni MR, Gueuvoghlian-Silva BY, Alexandre SM, Mattar R, Daher S. Cytokine levels in gestational diabetes mellitus: a systematic review of the literature. *Am J Reprod Immunol.* 2013;69(6):545-57. doi: 10.1111/aji.12088.

- González P, Lozano P, Ros G, Solano F. Hyperglycemia and Oxidative Stress: An Integral, Updated and Critical Overview of Their Metabolic Interconnections. *Int J Mol Sci.* 2023;24(11):9352. doi: 10.3390/ijms24119352.
- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature.* 2010;466(7308):835-40. doi: 10.1038/nature09267.
- HAPO Study Cooperative Research Group; Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, Hadden DR, McCance DR, Hod M, McIntyre HD, Oats JJ, Persson B, Rogers MS, Sacks DA. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med.* 2008;358(19):1991-2002. doi: 10.1056/NEJMoa0707943.
- Hilali N, Kocyigit A, Demir M, Camuzcuoglu A, Incebiyik A, Camuzcuoglu H, Vural M, Taskin A. DNA damage and oxidative stress in patients with mild preeclampsia and offspring. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;170(2):377-80. doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.07.031.
- Hromadnikova I, Kotlabova K, Hympanova L, Krofta L. Gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction induce dysregulation of cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs in maternal whole peripheral blood. *Thromb Res.* 2016;137:126-140. doi: 10.1016/j.thromres.2015.11.032.
- Hromadnikova I, Kotlabova K, Krofta L. Cardiovascular Disease-Associated MicroRNAs as Novel Biomarkers of First-Trimester Screening for Gestational Diabetes Mellitus in the Absence of Other Pregnancy-Related Complications. *Int J Mol Sci* 2022;23(18):10635. doi: 10.3390/ijms231810635.
- Hromadnikova I, Kotlabova K, Krofta L. Cardiovascular Disease-Associated MicroRNA Dysregulation during the First Trimester of Gestation in Women with Chronic Hypertension and Normotensive Women Subsequently Developing Gestational Hypertension or Preeclampsia with or without Fetal Growth Restriction. *Biomedicines.* 2022;10(2):256. doi: 10.3390/biomedicines10020256.
- Huang X, Wu L, Zhang G, Tang R, Zhou X. Elevated MicroRNA-181a-5p Contributes to Trophoblast Dysfunction and Preeclampsia. *Reprod Sci.* 2019;26(8):1121-1129. doi: 10.1177/1933719118808916.
- Hussain T, Murtaza G, Metwally E, Kalhoro DH, Kalhoro MS, Rahu BA, Sahito RGA, Yin Y, Yang H, Chughtai MI, Tan B. The Role of Oxidative Stress and Antioxidant Balance in Pregnancy. *Mediators Inflamm.* 2021;2021:9962860. doi: 10.1155/2021/9962860.
- Ibarra A, Vega-Guedes B, Brito-Casillas Y, Wägner AM. Diabetes in Pregnancy and MicroRNAs: Promises and Limitations in Their Clinical Application. *Noncoding RNA.* 2018;4(4):32. doi: 10.3390/ncrna4040032.
- Idonije O. B, Festus O, Okhiai O, Akpamu U. A Comparative Study of the Status of Oxidative Stress in Pregnant Nigerian Women. *Research Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2011;4:28-36. doi: 10.3923/rjog.2011.28.36.
- Indrieri A, Carrella S, Carotenuto P, Banfi S, Franco B. The Pervasive Role of the miR-181 Family in Development, Neurodegeneration, and Cancer. *Int J Mol Sci.* 2020;21(6):2092. doi: 10.3390/ijms21062092.
- Jamilian M, Mirhosseini N, Eslahi M, Bahmani F, Shokrpour M, Chamani M, Asemi Z. The effects of magnesium-zinc-calcium-vitamin D co-supplementation on biomarkers of inflammation, oxidative stress and pregnancy outcomes in gestational diabetes. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2019;19(1):107. doi: 10.1186/s12884-019-2258-y.

Janaszak-Jasiecka A, Płoska A, Wierońska JM, Dobrucki LW, Kalinowski L. Endothelial dysfunction due to eNOS uncoupling: molecular mechanisms as potential therapeutic targets. *Cell Mol Biol Lett*. 2023;28(1):21. doi: 10.1186/s11658-023-00423-2.

Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*. 1990;9(6):515-40. doi: 10.1016/0891-5849(90)90131-2.

Jarmund AH, Giskeødegård GF, Ryssdal M, Steinkjer B, Stokkeland LMT, Madssen TS, Stafne SN, Stridsklev S, Moholdt T, Heimstad R, Vanky E, Iversen AC. Cytokine Patterns in Maternal Serum From First Trimester to Term and Beyond. *Front Immunol*. 2021;12:752660. doi: 10.3389/fimmu.2021.752660.

Jaya B, Devi MRR, Karthikeyan E, Saikumar P. A comparative study of oxidative stress among gestational diabetics and normal pregnancy. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol* 2019;9(1):86-89. doi: 10.5455/njppp.2019.1135029112018.

Jayaram A, Deer E, Amaral LM, Campbell N, Vaka VR, Cunningham M, Ibrahim T, Cornelius DC, LaMarca BB. The role of tumor necrosis factor in triggering activation of natural killer cell, multi-organ mitochondrial dysfunction and hypertension during pregnancy. *Pregnancy Hypertens*. 2021;24:65-72. doi: 10.1016/j.preghy.2021.02.006.

Jensen DM, Damm P, Sørensen B, Mølsted-Pedersen L, Westergaard JG, Korsholm L, Ovesen P, Beck-Nielsen H. Proposed diagnostic thresholds for gestational diabetes mellitus according to a 75-g oral glucose tolerance test. Maternal and perinatal outcomes in 3260 Danish women. *Diabet Med*. 2003;20(1):51-7. doi: 10.1046/j.1464-5491.2003.00857.x.

Jiang Y, Wei L, Zhang H, Chen Y, Gao P, Zhang J, Zhou X, Zhu S, Du Y, Fang C, Li J, Feng L, He M, Wang S, Yu J. miR-17-5p Promotes Glucose Uptake of HTR8/SVneo Trophoblast Cells by Inhibiting TXNIP/NLRP3 Inflammasome Pathway. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2022;15:3361-3374. doi: 10.2147/DMSO.S385774.

Jiménez-Osorio AS, Carreón-Torres E, Correa-Solís E, Ángel-García J, Arias-Rico J, Jiménez-Garza O, Morales-Castillejos L, Díaz-Zuleta HA, Baltazar-Tellez RM, Sánchez-Padilla ML, Flores-Chávez OR, Estrada-Luna D. Inflammation and Oxidative Stress Induced by Obesity, Gestational Diabetes, and Preeclampsia in Pregnancy: Role of High-Density Lipoproteins as Vectors for Bioactive Compounds. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12(10):1894. doi: 10.3390/antiox12101894.

Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicœur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol*. 1998;160(7):3513-21.

Kaneto H, Xu G, Song KH, Suzuma K, Bonner-Weir S, Sharma A, Weir GC. Activation of the hexosamine pathway leads to deterioration of pancreatic beta-cell function through the induction of oxidative stress. *J Biol Chem*. 2001;276(33):31099-104. doi: 10.1074/jbc.M104115200.

Khaliq OP, Murugesan S, Moodley J, Mackraj I. Differential expression of miRNAs are associated with the insulin signaling pathway in preeclampsia and gestational hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 2018;40(8):744-751. doi: 10.1080/10641963.2018.1431257.

Kim C, Ye Z, Weyand CM, Goronzy JJ. miR-181a-regulated pathways in T-cell differentiation and aging. *Immun Ageing*. 2021;18(1):28. doi: 10.1186/s12979-021-00240-1.

Kim JH, Bachmann RA, Chen J. Interleukin-6 and insulin resistance. *Vitam Horm*. 2009;80:613-33. doi: 10.1016/S0083-6729(08)00621-3.

- Kimura C, Watanabe K, Iwasaki A, Mori T, Matsushita H, Shinohara K, Wakatsuki A. The severity of hypoxic changes and oxidative DNA damage in the placenta of early-onset preeclamptic women and fetal growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013;26(5):491-6. doi: 10.3109/14767058.2012.733766.
- Klötting N, Berthold S, Kovacs P, Schön MR, Fasshauer M, Ruschke K, Stumvoll M, Blüher M. MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PLoS One.* 2009;4(3):e4699. doi: 10.1371/journal.pone.0004699.
- Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004;21(4):467-76. doi: 10.1016/j.immuni.2004.08.018.
- Kong D, Wang H, Liu Y, Li H, Wang H, Zhu P. Correlation between the expression of inflammatory cytokines IL-6, TNF- α and hs-CRP and unfavorable fetal outcomes in patients with pregnancy-induced hypertension. *Exp Ther Med.* 2018;16(3):1982-1986. doi: 10.3892/etm.2018.6393.
- Kramer CK, Campbell S, Retnakaran R. Gestational diabetes and the risk of cardiovascular disease in women: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia.* 2019;62(6):905-914. doi: 10.1007/s00125-019-4840-2.
- Krapivner S, Chernogubova E, Ericsson M, Ahlbeck-Glader C, Hamsten A, van 't Hooft FM. Human evidence for the involvement of insulin-induced gene 1 in the regulation of plasma glucose concentration. *Diabetologia.* 2007;50(1):94-102. doi: 10.1007/s00125-006-0479-x.
- Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics.* 2012;44(4):237-44. doi: 10.1152/physiolgenomics.00141.2011.
- Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent? *Diabetes.* 2005;54 Suppl 2:S114-24. doi: 10.2337/diabetes.54.suppl_2.s114.
- Kurlak LO, Green A, Loughna P, Broughton Pipkin F. Oxidative stress markers in hypertensive states of pregnancy: preterm and term disease. *Front Physiol.* 2014;5:310. doi: 10.3389/fphys.2014.00310.
- Kuźmicki M, Telejko B, Lipińska D, Pliszka J, Wilk J, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Zielińska A, Sobota A, Krętowski A, Górska M, Szamatowicz J. The IL-6/IL-6R/sgp130 system and Th17 associated cytokines in patients with gestational diabetes. *Endokrynol Pol.* 2014;65(3):169-75. doi: 10.5603/EP.2014.0023.
- Lamadrid-Romero M, Solís KH, Cruz-Reséndiz MS, Pérez JE, Díaz NF, Flores-Herrera H, García-López G, Perichart O, Reyes-Muñoz E, Arenas-Huertero F, Eguía-Aguilar P, Molina-Hernández A. Central nervous system development-related microRNAs levels increase in the serum of gestational diabetic women during the first trimester of pregnancy. *Neurosci Res.* 2018;130:8-22. doi: 10.1016/j.neures.2017.08.003.
- Lappas M, Hiden U, Desoye G, Froehlich J, Hauguel-de Mouzon S, Jawerbaum A. The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(12):3061-100. doi: 10.1089/ars.2010.3765.
- Lee J, Lee M, Kim JU, Song KI, Choi YS, Cheong SS. Carvedilol reduces plasma 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in mild to moderate hypertension: a pilot study. *Hypertension.* 2005;45(5):986-90. doi: 10.1161/01.HYP.0000164569.63160.24.

- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.
- Li D, Cai Z, Pan Z, Yang Y, Zhang J. The effects of vitamin and mineral supplementation on women with gestational diabetes mellitus. *BMC Endocr Disord*. 2021;21(1):106. doi: 10.1186/s12902-021-00712-x.
- Li H, Ge Q, Guo L, Lu Z. Maternal plasma miRNAs expression in preeclamptic pregnancies. *Biomed Res Int*. 2013;2013:970265. doi: 10.1155/2013/970265.
- Li H, Yin Q, Li N, Ouyang Z, Zhong M. Plasma Markers of Oxidative Stress in Patients with Gestational Diabetes Mellitus in the Second and Third Trimester. *Obstet Gynecol Int*. 2016;2016:3865454. doi: 10.1155/2016/3865454.
- Li Y, Wang Y, Ding X, Duan B, Li L, Wang X. Serum Levels of TNF- α and IL-6 Are Associated With Pregnancy-Induced Hypertension. *Reprod Sci*. 2016;23(10):1402-8. doi: 10.1177/1933719116641760.
- Liang J, Liu C, Qiao A, Cui Y, Zhang H, Cui A, Zhang S, Yang Y, Xiao X, Chen Y, Fang F, Chang Y. MicroRNA-29a-c decrease fasting blood glucose levels by negatively regulating hepatic gluconeogenesis. *J Hepatol*. 2013;58(3):535-42. doi: 10.1016/j.jhep.2012.10.024.
- Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Adv Sci (Weinh)*. 2021;8(15):e2004433. doi: 10.1002/advs.202004433.
- Liu D, Chen R, Ni H, Liu H. miR-181a Improved Renal Inflammation by Targeting TNF- α in a Diabetic Nephropathy Animal Model. *Nephron*. 2022;146(6):637-646. doi: 10.1159/000525050.
- Liu L, Wang Y, Fan H, Zhao X, Liu D, Hu Y, Kidd AR 3rd, Bao J, Hou Y. MicroRNA-181a regulates local immune balance by inhibiting proliferation and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2012;30(8):1756-70. doi: 10.1002/stem.1156.
- Liu S, Tang G, Duan F, Zeng C, Gong J, Chen Y, Tan H. MiR-17-5p Inhibits TXNIP/NLRP3 Inflammasome Pathway and Suppresses Pancreatic β -Cell Pyroptosis in Diabetic Mice. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:768029. doi: 10.3389/fcvm.2021.768029.
- Liu T, Deng JM, Liu YL, Chang L, Jiang YM. The relationship between gestational diabetes mellitus and interleukin 1beta gene polymorphisms in southwest of China. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(43):e22679. doi: 10.1097/MD.00000000000022679.
- Lo CCW, Lo ACQ, Leow SH, Fisher G, Corker B, Batho O, Morris B, Chowaniec M, Vladutiu CJ, Fraser A, Oliver-Williams C. Future Cardiovascular Disease Risk for Women With Gestational Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Heart Assoc*. 2020;9(13):e013991. doi: 10.1161/JAHA.119.013991.
- Ma H, Qiao Z, Li N, Zhao Y, Zhang S. The relationship between changes in vitamin A, vitamin E, and oxidative stress levels, and pregnancy outcomes in patients with gestational diabetes mellitus. *Ann Palliat Med*. 2021;10(6):6630-6636. doi: 10.21037/apm-21-1036.
- Marcondes JPC, Andrade PFB, Sávio ALV, Silveira MAD, Rudge MVC, Salvadori DMF. BCL2 and miR-181a transcriptional alterations in umbilical-cord blood cells can be putative biomarkers for obesity. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2018;836(Pt B):90-96. doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.06.009.

- Margaryan S, Kriegova E, Fillerova R, Smotkova Kraiczova V, Manukyan G. Hypomethylation of IL1RN and NFKB1 genes is linked to the dysbalance in IL1 β /IL-1Ra axis in female patients with type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2020;15(5):e0233737. doi: 10.1371/journal.pone.0233737.
- Martínez-García EA, Chávez-Robles B, Sánchez-Hernández PE, Núñez-Atahualpa L, Martín-Máquez BT, Muñoz-Gómez A, González-López L, Gámez-Nava JI, Salazar-Páramo M, Dávalos-Rodríguez I, Petri MH, Zúñiga-Tamayo D, Vargas-Ramírez R, Vázquez-Del Mercado M. IL-17 increased in the third trimester in healthy women with term labor. *Am J Reprod Immunol*. 2011;65(2):99-103. doi: 10.1111/j.1600-0897.2010.00893.x.
- Mavreli D, Theodora M, Kolialexi A. Known biomarkers for monitoring pregnancy complications. *Expert Rev Mol Diagn*. 2021;21(11):1115-1117. doi: 10.1080/14737159.2021.1971078.
- McDonald MK, Ajit SK. MicroRNA biology and pain. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;131:215-49. doi: 10.1016/bs.pmbts.2014.11.015.
- McIntyre HD, Catalano P, Zhang C, Desoye G, Mathiesen ER, Damm P. Gestational diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):47. doi: 10.1038/s41572-019-0098-8.
- Melton E, Qiu H. Interleukin-1 β in Multifactorial Hypertension: Inflammation, Vascular Smooth Muscle Cell and Extracellular Matrix Remodeling, and Non-Coding RNA Regulation. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16):8639. doi: 10.3390/ijms22168639.
- Mengstie MA, Chekol Abebe E, Behaile Teklemariam A, Tilahun Mulu A, Agidew MM, Teshome Azezew M, Zewde EA, Agegnehu Teshome A. Endogenous advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic diabetic complications. *Front Mol Biosci*. 2022;9:1002710. doi: 10.3389/fmolb.2022.1002710.
- Menzel A, Samouda H, Dohet F, Loap S, Ellulu MS, Bohn T. Common and Novel Markers for Measuring Inflammation and Oxidative Stress Ex Vivo in Research and Clinical Practice-Which to Use Regarding Disease Outcomes? *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(3):414. doi: 10.3390/antiox10030414.
- Metoki H, Iwama N, Hamada H, Satoh M, Murakami T, Ishikuro M, Obara T. Hypertensive disorders of pregnancy: definition, management, and out-of-office blood pressure measurement. *Hypertens Res*. 2022;45(8):1298-1309. doi: 10.1038/s41440-022-00965-6.
- Ming X, Wu Y, Zhang K. miR-29 a regulates VSMC cell proliferation and its roles in the pathogenesis of hypertension through targeting PTEN. *Int J Clin Exp Med*. 2019;12(6):7164-7172.
- Miranda Guisado ML, Vallejo-Vaz AJ, García Junco PS, Jiménez Jiménez L, García Morillo S, Muñoz Grijalvo O, Alfaro Lara V, Villar Ortiz J, Pamies-Andréu E. Abnormal levels of antioxidant defenses in a large sample of patients with hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Res*. 2012;35(3):274-8. doi: 10.1038/hr.2011.200.
- miRNeasy Serum/Plasma Handbook, Qiagen, <https://www.qiagen.com> (poslednji put posećeno: 16.2.2024.).
- Modzelewski R, Stefanowicz-Rutkowska MM, Matuszewski W, Bandurska-Stankiewicz EM. Gestational Diabetes Mellitus-Recent Literature Review. *J Clin Med*. 2022;11(19):5736. doi: 10.3390/jcm11195736.
- Mohammed A, Aliyu IS, Manu M. Correlation between circulating level of tumor necrosis factor-alpha and insulin resistance in Nigerian women with gestational diabetes mellitus. *Ann Afr Med*. 2018;17(4):168-171. doi: 10.4103/aam.aam_53_16.

- Morino K, Maegawa H. Role of O-linked N-acetylglucosamine in the homeostasis of metabolic organs, and its potential links with diabetes and its complications. *J Diabetes Investig.* 2021;12(2):130-136. doi: 10.1111/jdi.13359.
- Moura J, Børsheim E, Carvalho E. The Role of MicroRNAs in Diabetic Complications-Special Emphasis on Wound Healing. *Genes (Basel)* 2014;5(4):926-56. doi: 10.3390/genes5040926.
- Munaut C, Tebache L, Blacher S, Noël A, Nisolle M, Chantraine F. Dysregulated circulating miRNAs in preeclampsia. *Biomed Rep.* 2016;5(6):686-692. doi: 10.3892/br.2016.779.
- Munjas J, Sopić M, Stefanović A, Košir R, Ninić A, Joksić I, Antonić T, Spasojević-Kalimanovska V, Prosenč Zmrzljak U. Non-Coding RNAs in Preeclampsia-Molecular Mechanisms and Diagnostic Potential. *Int J Mol Sci.* 2021;22(19):10652. doi: 10.3390/ijms221910652.
- Murata T, Kyojuka H, Fukuda T, Endo Y, Kanno A, Yasuda S, Yamaguchi A, Sato A, Ogata Y, Shinoki K, Hosoya M, Yasumura S, Hashimoto K, Nishigori H, Fujimori K; Japan Environment and Children's Study (JECS) Group. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels and small-for-gestational age infants: a prospective cohort study from the Japan Environment and Children's Study. *BMJ Open.* 2021;11(12):e054156. doi: 10.1136/bmjopen-2021-054156.
- Murata T, Kyojuka H, Fukuda T, Imaizumi K, Isogami H, Kanno A, Yasuda S, Yamaguchi A, Sato A, Ogata Y, Shinoki K, Hosoya M, Yasumura S, Hashimoto K, Nishigori H, Fujimori K; Japan Environment and Children's Study (JECS) Group. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels and preterm births: a prospective cohort study from the Japan Environment and Children's Study. *BMJ Open.* 2024;14(2):e063619. doi: 10.1136/bmjopen-2022-063619.
- National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, Gene ID: 3553. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3553>. (poslednji put posećeno: 4.12.2023).
- National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, Gene ID: 7124. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124>. (poslednji put posećeno: 11.2.2024).
- National Library of Medicine, National Center for Biotechnology Information, Gene ID: 3569. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3569>. (poslednji put posećeno: 11.2.2024).
- Negi R, Pande D, Karki K, Kumar A, Khanna RS, Khanna HD. Association of oxidative DNA damage, protein oxidation and antioxidant function with oxidative stress induced cellular injury in pre-eclamptic/eclamptic mothers during fetal circulation. *Chem Biol Interact.* 2014;208:77-83. doi: 10.1016/j.cbi.2013.11.010.
- Nejad C, Stunden HJ, Gantier MP. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses. *FEBS J.* 2018;285(20):3695-3716. doi: 10.1111/febs.14482.
- Nielsen LB, Wang C, Sørensen K, Bang-Berthelsen CH, Hansen L, Andersen ML, Hougaard P, Juul A, Zhang CY, Pociot F, Mortensen HB. Circulating levels of microRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression. *Exp Diabetes Res.* 2012;2012:896362. doi: 10.1155/2012/896362.
- Norlander AE, Saleh MA, Kamat NV, Ko B, Gnecco J, Zhu L, Dale BL, Iwakura Y, Hoover RS, McDonough AA, Madhur MS. Interleukin-17A Regulates Renal Sodium Transporters and Renal Injury in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Hypertension.* 2016;68(1):167-74. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07493.

- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:402. doi: 10.3389/fendo.2018.00402.
- Owaki Y, Watanabe K, Iwasaki A, Saitou T, Matsushita H, Wakatsuki A. Placental hypoplasia and maternal organic vascular disorder in pregnant women with gestational hypertension and preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2021;34(3):353-359. doi: 10.1080/14767058.2019.1608175.
- Özyer Ş, Engin-Üstün Y, Uzunlar Ö, Katar C, Danışman N. Inflammation and glycemic tolerance status in pregnancy: the role of maternal adiposity. *Gynecol Obstet Invest*. 2014;78(1):53-8. doi: 10.1159/000362230.
- Peraçoli JC, Rudge MV, Peraçoli MT. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2007;57(3):177-85. doi: 10.1111/j.1600-0897.2006.00455.x.
- Pescador N, Pérez-Barba M, Ibarra JM, Corbatón A, Martínez-Larrad MT, Serrano-Ríos M. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential type 2 diabetes and obesity biomarkers. *PLoS One*. 2013;8(10):e77251. doi: 10.1371/journal.pone.0077251.
- Pheiffer C, Dias S, Rheeder P, Adam S. Screening for Gestational Diabetes Mellitus: The Potential of MicroRNAs, 2018. doi: 10.5772/intechopen.82102.
- Phoswa WN, Khaliq OP. The Role of Oxidative Stress in Hypertensive Disorders of Pregnancy (Preeclampsia, Gestational Hypertension) and Metabolic Disorder of Pregnancy (Gestational Diabetes Mellitus). *Oxid Med Cell Longev*. 2021;2021:5581570. doi: 10.1155/2021/5581570.
- Phoswa WN. Dopamine in the Pathophysiology of Preeclampsia and Gestational Hypertension: Monoamine Oxidase (MAO) and Catechol-O-methyl Transferase (COMT) as Possible Mechanisms. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:3546294. doi: 10.1155/2019/3546294.
- Pullen TJ, da Silva Xavier G, Kelsey G, Rutter GA. miR-29a and miR-29b contribute to pancreatic beta-cell-specific silencing of monocarboxylate transporter 1 (Mct1). *Mol Cell Biol* 2011;31(15):3182-94. doi: 10.1128/MCB.01433-10.
- Qiu C, Hevner K, Abetew D, Enquobahrie DA, Williams MA. Oxidative DNA damage in early pregnancy and risk of gestational diabetes mellitus: A pilot study. *Clin Biochem*. 2011;44(10-11):804-8. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.04.023.
- Ranchoux B, Meloche J, Paulin R, Boucherat O, Provencher S, Bonnet S. DNA Damage and Pulmonary Hypertension. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6):990. doi: 10.3390/ijms17060990.
- Regazzi R. MicroRNAs as therapeutic targets for the treatment of diabetes mellitus and its complications. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(2):153-160. doi: 10.1080/14728222.2018.1420168.
- Renugasundari M, Pal GK, Chaturvedula L, Nanda N, Harichandrakumar KT, Durgadevi T. Inflammation and decreased cardiovagal modulation are linked to stress and depression at 36th week of pregnancy in gestational diabetes mellitus. *Sci Rep*. 2023;13(1):10348. doi: 10.1038/s41598-023-37387-4.
- Riise HKR, Sulo G, Tell GS, Igland J, Nygård O, Iversen AC, Daltveit AK. Association Between Gestational Hypertension and Risk of Cardiovascular Disease Among 617 589 Norwegian Women. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(10):e008337. doi: 10.1161/JAHA.117.008337.

- Rodrigo R, González J, Paoletto F. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. *Hypertens Res.* 2011;34(4):431-40. doi: 10.1038/hr.2010.264.
- Rodrigues F, de Lucca L, Neme WS, Gonçalves TL. Influence of gestational diabetes on the activity of δ -aminolevulinic acid dehydratase and oxidative stress biomarkers. *Redox Rep.* 2018;23(1):63-67. doi: 10.1080/13510002.2017.1402981.
- Rui L, Aguirre V, Kim JK, Shulman GI, Lee A, Corbould A, Dunaif A, White MF. Insulin/IGF-1 and TNF- α stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser307 via distinct pathways. *J Clin Invest.* 2001;107(2):181-9. doi: 10.1172/JCI10934.
- Saucedo R, Zarate A, Basurto L, Hernandez M, Puello E, Galvan R, Campos S. Relationship between circulating adipokines and insulin resistance during pregnancy and postpartum in women with gestational diabetes. *Arch Med Res.* 2011;42(4):318-23. doi: 10.1016/j.arcmed.2011.06.009.
- Scialò F, Fernández-Ayala DJ, Sanz A. Role of Mitochondrial Reverse Electron Transport in ROS Signaling: Potential Roles in Health and Disease. *Front Physiol.* 2017;8:428. doi: 10.3389/fphys.2017.00428.
- Sharma AK, Singh S, Singh H, Mahajan D, Kolli P, Mandadapu G, Kumar B, Kumar D, Kumar S, Jena MK. Deep Insight of the Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Cells.* 2022;11(17):2672. doi: 10.3390/cells11172672.
- Simone S, Gorin Y, Velagapudi C, Abboud HE, Habib SL. Mechanism of oxidative DNA damage in diabetes: tuberin inactivation and downregulation of DNA repair enzyme 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine-DNA glycosylase. *Diabetes.* 2008;57(10):2626-36. doi: 10.2337/db07-1579.
- Simon-Szabo Z, Fogarasi E, Nemes-Nagy E, Denes L, Croitoru M, Szabo B. Oxidative stress and peripartum outcomes (Review). *Exp Ther Med.* 2021;22(1):771. doi: 10.3892/etm.2021.10203.
- Simó-Servat O, Planas A, Ciudin A, Simó R, Hernández C. Assessment of advanced glycation end-products as a biomarker of diabetic outcomes. *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed).* 2018;65(9):540-545. English, Spanish. doi: 10.1016/j.endinu.2018.06.003.
- Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2014;18(1):1-14. doi: 10.4196/kjpp.2014.18.1.1.
- Sljivancanin Jakovljevic T, Kontic-Vucinic O, Nikolic N, Carkic J, Soldatovic I, Milasin J. Glutathione-S-transferase M1 polymorphism and pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor- α and interleukin-1 β are associated with preeclampsia in Serbian women. *Am J Reprod Immunol.* 2019;81(5):e13105. doi: 10.1111/aji.13105.
- Sobki SH, Al-Senaigy AM, Al-Shammari TA, Inam SS, Al-Gwiser AA, Bukhari SA. Impact of gestational diabetes on lipid profiling and indices of oxidative stress in maternal and cord plasma. *Saudi Med J.* 2004;25(7):876-80.
- Sørensen AE, van Poppel MNM, Desoye G, Damm P, Simmons D, Jensen DM, Dalgaard LT; The DALI Core Investigator Group. The Predictive Value of miR-16, -29a and -134 for Early Identification of Gestational Diabetes: A Nested Analysis of the DALI Cohort. *Cells* 2021;10(1):170. doi: 10.3390/cells10010170.
- Sova H, Morin-Papunen L, Puistola U, Karihtala P. Distinctively low levels of serum 8-hydroxydeoxyguanosine in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2010;94(7):2670-3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.03.049.

- Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2009;78(6):539-52. doi: 10.1016/j.bcp.2009.04.029.
- Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, Zaki MH, van de Veerdonk FL, Perera D, Neale GA, Hooiveld GJ, Hijmans A, Vroegrijk I, van den Berg S, Romijn J, Rensen PC, Joosten LA, Netea MG, Kanneganti TD. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(37):15324-9. doi: 10.1073/pnas.1100255108.
- Sudharshana Murthy KA, Bhandiwada A, Chandan SL, Gowda SL, Sindhusree G. Evaluation of Oxidative Stress and Proinflammatory Cytokines in Gestational Diabetes Mellitus and Their Correlation with Pregnancy Outcome. *Indian J Endocrinol Metab.* 2018;22(1):79-84. doi: 10.4103/ijem.IJEM_232_16.
- Surmiak P, Wojnarowicz O, Szymkowiak M. Malondialdehyde and Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as Markers of Oxidative Stress in Small for Gestational Age Newborns from Hypertensive and Preeclamptic Pregnancies. *Biomed Res Int.* 2022;2022:9246233. doi: 10.1155/2022/9246233.
- Swets JA. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science.* 1988;240(4857):1285-93. doi: 10.1126/science.3287615.
- Szarka A, Rigó J Jr, Lázár L, Beko G, Molvarec A. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol.* 2010;11:59. doi: 10.1186/1471-2172-11-59.
- Tagoma A, Alnek K, Kirss A, Uibo R, Haller-Kikkatalo K. MicroRNA profiling of second trimester maternal plasma shows upregulation of miR-195-5p in patients with gestational diabetes. *Gene.* 2018;672:137-142. doi: 10.1016/j.gene.2018.06.004.
- Tangerås LH, Austdal M, Skråstad RB, Salvesen KÅ, Austgulen R, Bathen TF, Iversen AC. Distinct First Trimester Cytokine Profiles for Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015;35(11):2478-85. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.305817.
- TaqMan® Advanced miRNA Assays USER GUIDE, Pub. No 100027897, Rev. C. 2016. <https://assets.thermofisher.com>.
- Toboła-Wróbel K, Pietryga M, Dydowicz P, Napierała M, Brażert J, Florek E. Association of Oxidative Stress on Pregnancy. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:6398520. doi: 10.1155/2020/6398520.
- Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2002;57(5):609-13. doi: 10.1046/j.1365-2265.2002.01638.x.
- Tung CW, Ho C, Hsu YC, Huang SC, Shih YH, Lin CL. MicroRNA-29a Attenuates Diabetic Glomerular Injury through Modulating Cannabinoid Receptor 1 Signaling. *Molecules.* 2019;24(2):264. doi: 10.3390/molecules24020264.
- Tutar D, Çintesun FNİ, Güneç O, Çetinkaya ÇD. The association of interleukin-6, interleukin-27, and body roundness index with gestational diabetes mellitus. *J Obstet Gynaecol.* 2022;42(6):1728-1733. doi: 10.1080/01443615.2022.2036956.
- Urbaniak SK, Boguszevska K, Szewczuk M, Kaźmierczak-Barańska J, Karwowski BT. 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) as a Potential Biomarker for Gestational Diabetes Mellitus (GDM) Development. *Molecules.* 2020;25(1):202. doi: 10.3390/molecules25010202.

- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009;27(2):120-39. doi: 10.1080/10590500902885684.
- Vilotić A, Nacka-Aleksić M, Pirković A, Bojić-Trbojević Ž, Dekanski D, Jovanović Krivokuća M. IL-6 and IL-8: An Overview of Their Roles in Healthy and Pathological Pregnancies. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23):14574. doi: 10.3390/ijms232314574.
- Vitoratos N, Valsamakis G, Mastorakos G, Boutsiadis A, Salakos N, Kouskouni E, Creatsas G. Pre- and early post-partum adiponectin and interleukin-1beta levels in women with and without gestational diabetes. *Hormones (Athens).* 2008;7(3):230-6. doi: 10.14310/horm.2002.1202.
- Vrachnis N, Belitsos P, Sifakis S, Dafopoulos K, Siristatidis C, Pappa KI, Iliodromiti Z. Role of adipokines and other inflammatory mediators in gestational diabetes mellitus and previous gestational diabetes mellitus. *Int J Endocrinol.* 2012;2012:549748. doi: 10.1155/2012/549748.
- Wang H, Li N, Chivese T, Werfalli M, Sun H, Yuen L, Hoegfeldt CA, Elise Powe C, Immanuel J, Karuranga S, Divakar H, Levitt N, Li C, Simmons D, Yang X; IDF Diabetes Atlas Committee Hyperglycaemia in Pregnancy Special Interest Group. IDF Diabetes Atlas: Estimation of Global and Regional Gestational Diabetes Mellitus Prevalence for 2021 by International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group's Criteria. *Diabetes Res Clin Pract* 2022;183:109050. doi: 10.1016/j.diabres.2021.109050.
- Wang W, Feng L, Zhang H, Hachy S, Satohisa S, Laurent LC, Parast M, Zheng J, Chen DB. Preeclampsia up-regulates angiogenesis-associated microRNA (i.e., miR-17, -20a, and -20b) that target ephrin-B2 and EPHB4 in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(6):E1051-9. doi: 10.1210/jc.2011-3131.
- Wei W, Zhang X. Expression of ADP and TNF- α in patients with gestational diabetes mellitus and its relationship with pregnancy outcomes. *Exp Ther Med.* 2020;20(3):2184-2190. doi: 10.3892/etm.2020.8952.
- Xu T, Dainelli L, Yu K, Ma L, Silva Zolezzi I, Detzel P, Fang H. The short-term health and economic burden of gestational diabetes mellitus in China: a modelling study. *BMJ Open.* 2017;7(12):e018893. doi: 10.1136/bmjopen-2017-018893.
- Yang Y, Zeng H, Yin P, Wang Z. Comparison of serum cytokines between gestational diabetes mellitus and normal pregnancy women: a pilot study. *Int J Diabetes Dev Ctries.* 2022;42 (4):642–646. doi: 10.1007/s13410-022-01060-9.
- Yang ZJ, Wang TT, Wang BY, Gao H, He CW, Shang HW, Lu X, Wang Y, Xu JD. Deeper insight into the role of IL-17 in the relationship between hypertension and intestinal physiology. *J Inflamm (Lond).* 2022;19(1):14. doi: 10.1186/s12950-022-00311-0.
- Ye H, Ling S, Castillo AC, Thomas B, Long B, Qian J, Perez-Polo JR, Ye Y, Chen X, Birnbaum Y. Nebivolol induces distinct changes in profibrosis microRNA expression compared with atenolol, in salt-sensitive hypertensive rats. *Hypertension.* 2013;61(5):1008-13. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00892.
- Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev.* 2011;111(10):5944-72. doi: 10.1021/cr200084z.
- Yockey LJ, Iwasaki A. Interferons and Proinflammatory Cytokines in Pregnancy and Fetal Development. *Immunity.* 2018;49(3):397-412. doi: 10.1016/j.immuni.2018.07.017.

- Zhang JY, Cao XX, Wen HX, Zhang HY. Correlation analysis of levels of inflammatory cytokines and nitric oxide in peripheral blood with urine proteins and renal function in patients with gestational hypertension. *Exp Ther Med*. 2019;17(1):657-662. doi: 10.3892/etm.2018.7004.
- Zhao C, Dong J, Jiang T, Shi Z, Yu B, Zhu Y, Chen D, Xu J, Huo R, Dai J, Xia Y, Pan S, Hu Z, Sha J. Early second-trimester serum miRNA profiling predicts gestational diabetes mellitus. *PLoS One* 2011;6(8):e23925. doi: 10.1371/journal.pone.0023925.
- Zhao X, Liu J, Shen L, Wang A, Wang R. Correlation between inflammatory markers (hs-CRP, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18), glucose intolerance, and gestational diabetes mellitus in pregnant women. *Int J Clin Exp Med*. 2018;11:8310–6.
- Zhou B, Li C, Qi W, Zhang Y, Zhang F, Wu JX, Hu YN, Wu DM, Liu Y, Yan TT, Jing Q, Liu MF, Zhai QW. Downregulation of miR-181a upregulates sirtuin-1 (SIRT1) and improves hepatic insulin sensitivity. *Diabetologia*. 2012;55(7):2032-43. doi: 10.1007/s00125-012-2539-8.
- Zhou C, Zou QY, Li H, Wang RF, Liu AX, Magness RR, Zheng J. Preeclampsia Downregulates MicroRNAs in Fetal Endothelial Cells: Roles of miR-29a/c-3p in Endothelial Function. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(9):3470-3479. doi: 10.1210/jc.2017-00849.
- Zhou Q, Wu Y, Zhang D. Exploring the role of T helper subgroups and their cytokines in the development of pregnancy-induced hypertension. *Front Immunol*. 2023;14:1126784. doi: 10.3389/fimmu.2023.1126784.
- Zhu D, Pan C, Li L, Bian Z, Lv Z, Shi L, Zhang J, Li D, Gu H, Zhang CY, Liu Y, Zen K. MicroRNA-17/20a/106a modulate macrophage inflammatory responses through targeting signal-regulatory protein α . *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(2):426-36.e8. doi: 10.1016/j.jaci.2013.02.005.
- Zhu J, Wang FL, Wang HB, Dong N, Zhu XM, Wu Y, Wang YT, Yao YM. TNF- α mRNA is negatively regulated by microRNA-181a-5p in maturation of dendritic cells induced by high mobility group box-1 protein. *Sci Rep*. 2017;7(1):12239. doi: 10.1038/s41598-017-12492-3.
- Zhu Y, Tian F, Li H, Zhou Y, Lu J, Ge Q. Profiling maternal plasma microRNA expression in early pregnancy to predict gestational diabetes mellitus. *Int J Gynaecol Obstet*. 2015;130(1):49-53. doi: 10.1016/j.ijgo.2015.01.010.
- Zúñiga LA, Shen WJ, Joyce-Shaikh B, Pyatnova EA, Richards AG, Thom C, Andrade SM, Cua DJ, Kraemer FB, Butcher EC. IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *J Immunol*. 2010;185(11):6947-59. doi: 10.4049/jimmunol.1001269.

8. PRILOZI

Prilog 1



GINEKOLOŠKO-AKUŠERSKA KLINIKA "NARODNI FRONT"

Kraljice Natalije 62, Beograd

SAGLASNOST ZA UČEŠĆE U KLINIČKOM ISTRAŽIVANJU

Poštovane trudnice,

U cilju unapređivanja praćenja trudnoće molimo Vas da date svoj pristanak za učešće u kliničkom istraživanju koje je odobrio etički komitet Ginekološko-akušerske klinike „Narodni front“. Popunjavanjem upitnika koji se odnosi na Vašu ličnu anamnezu i tekuću trudnoću i svojim učešćem u istraživanju omogućićete nam da sakupimo važne informacije koje mogu biti od koristi svim budućim trudnicama. Popunjavanje ankete i pristupanje istraživanju su dobrovoljni, a identitet ispitanika neće biti povezan sa rezultatima istraživanja. Cilj našeg ispitivanja je unapređivanje ranog otkrivanja komplikacija koje se mogu javiti u trudnoći.

Hvala na saradnji!

Ginekološko-akušerska klinika "Narodni front"

Ja _____ potvrđujem da sam saglasna da se uzeti uzorak krvi iskoristi u kliničkom istraživanju Ginekološko-akušerske klinike „Narodni front“, kao i da me u slučaju potrebe za dodatnim informacijama o ishodu trudnoće lekar pozove nakon porođaja.

Kontakt telefon: _____

Datum

Potpis

Ime i prezime pacijenta: _____

I deo (popunjavanje pacijent)

1. Godine starosti _____
2. Zanimanje _____
3. Visina _____
4. Trenutna težina _____
5. Težina pre trudnoće _____
6. Da li ste pušač?
DA NE
Prosečan broj cigareta koje dnevno konzumirate:
a) 2-3 b) do 10 c) 10-20 d) 20-30 e) više od 30 cigareta dnevno

Koliko godina ste pušač? _____

7. Da li ste pre trudnoće imali neko hronično oboljenje (zaokružiti i/ili dopuniti):

- a) dijabetes
- b) povišen krvni pritisak
- c) poremećaje rada štitne žlezde
- d) trombofiliju
- e) _____

f) nisam imala nijedno hronično oboljenje

8. Ukoliko je odgovor na prethodno pitanje DA navesti lekove koje ste koristili:

- a) - pre trudnoće: _____
- tokom trudnoće: _____

b) ne uzimam terapiju za pomenuto hronično oboljenje

9. Koliko dece imate? _____

10. Prethodni porođaji su bili (zaokružiti i/ili dopuniti):

I porođaj:

- vaginalni / carskim rezom;
- u _____ nedelji trudnoće;
- težina deteta na rođenju:

_____;

- ocena koju je dete dobilo na rođenju: _____;

- dete je zdravo / dete boluje od _____;

II porođaj:

- vaginalni / carskim rezom;
- u _____ nedelji trudnoće;
- težina deteta na rođenju:

_____;

- ocena koju je dete dobilo na rođenju: _____;

- dete je zdravo / dete boluje od _____;

III porođaj:

- vaginalni / carskim rezom;
- u _____ nedelji trudnoće;

- težina deteta na rođenju:

_____;

- ocena koju je dete dobilo na rođenju: _____;

- dete je zdravo / dete boluje od _____;

11. Da li ste do sada imali pobačaj?

a) DA

I pobačaj je bio u ____ nedelji trudnoće;

II pobačaj je bio u ____ nedelji trudnoće;

III pobačaj je bio u ____ nedelji trudnoće;

b) NE

12. Da li je tokom prethodnih trudnoća otkriven (zaokružiti i dopuniti):

a) Povišen krvni pritisak DA NE

- u ____ nedelji prve/druge/treće trudnoće;

b) Gestacioni dijabetes DA NE

- u ____ nedelji prve/druge/treće trudnoće;

c) Preeklampsija/eklampsija DA NE

- u ____ nedelji prve/druge/treće trudnoće;

d) Intrauterini zastoj u razvoju ploda DA NE

- u ____ nedelji prve/druge/treće trudnoće;

13. Tekuća trudnoća je nastala:

a) Spontano

b) Vantelesnom oplodnjom

14. Koja ste nedelja trudnoće? _____

15. Da li Vam je poznat pol fetusa? Muški Ženski

16. Navesti koje ste suplemente uzimali kao dodatak ishrani tokom tekuće trudnoće (folnu kiselinu, vitamine, gvožđe...)

17. Da li je tokom tekuće trudnoće otkriven (zaokružiti i/ili dopuniti):

a) Povišen krvni pritisak (140/90mm Hg) DA NE

- u ____ nedelji trudnoće;

b) Gestacioni dijabetes DA NE

- u ____ nedelji trudnoće;

c) Preeklampsija/eklampsija DA NE

- u ____ nedelji trudnoće;

d) Intrauterini zastoj u razvoju ploda DA NE

- u ____ nedelji trudnoće;

e) _____

- u ____ nedelji trudnoće;

Navesti lekove koje ste koristili: _____

II deo (popunjavanje lekar)

1. Nedelja trudnoće prema datumu poslednje menstruacije: _____
2. Nedelja trudnoće prema ultrazvučnom nalazu: _____
3. Visina krvnog pritiska: _____
4. Dopler uteroplacentnog protoka: _____
5. Glikemijski test:

6. Laboratorijski parametri:
 - a. Proteinurija: _____
 - b. Proteinemija: _____
 - a. Trombociti: _____
 - b. Hgb, Er _____
 - c. AST _____
 - d. ALT _____
 - e. LDH _____
 - f. Mokraćna kiselina _____
 - g. Kreatinin _____
 - h. Diureza manja od 500 ml/dan (oligurija) DA NE
 - i. Lekovi



Београд, Краљице Наталије 62
 Број: 05006-2020-18832
 Датум: 2.12.2020. године

На основу Закона о здравственој заштити Републике Србије („Сл.гласник РС“, бр.107/2005, 72/2009-др.закон, 88/2010,99/2010, 57/2011, 119/2012,45/2013-др.закон, 93/2014, 96/2015 и 106/2015), Закона о лековима и медицинским средствима („Сл.гласник РС“,бр.30/2010 и 107/2012), Парвилника о условима и начину клиничког испитивања лека, поступку и садржају документације за одобрење клиничког испитивања лека (Службени гласник РСбр.64/2011), Статута ГАК „Народни фронт“, Пословника о раду Етичког одбора Гинеколошко акушерске Клинике „Народни фронт“ број 24/461, од 07.04.2016. године, поступајући у складу са начелима Добре клиничке праксе (GCP), на редовној седници Етичког одбора Гинеколошко акушерске клинике „Народни фронт“ одржаној 30.11.2020. године, донета је следећа

ОДЛУКУ

ОДОБРАВА СЕ клиничко истраживање, специјалисти биологу Мини Тољић стално запосленој у Лабораторији ГАК „Народни фронт“. Назив клиничког истраживања:

„Одређивање нивоа генске експресије miR-17, miR-29a, miR-181a, проинфламаторних цитокина и параметара оксидативног оштећења у крви пацијентиња са гестацијским дијабетесом и гестацијском артеријском хипертензијом“.

Циљ истраживања је испитивање патолошких механизма укључених у развој гестацијског дијабетеса и гестацијске артеријске хипертензије, процена значаја параметара оксидативног оштећења ДНК и липидне пероксидације, проинфламаторних цитокина и miRNK у развоју наведених компликација у трудноћи, као и њихов дијагностички потенцијал.

Циљна група су пацијенткиње између 24. и 36. недеље гестације, са са гестацијским дијабетесом и гестацијском артеријском хипертензијом, а које су хоспитализоване на Одељењу високоризичних трудноћа ГАК „Народни фронт“. Током редовног вађења крви за лабораториске анализе била би узета додатна количина од 5ml за наведено истраживање. Број пацијенткиња обухваћених клиничким истраживањем је 200.

Ментори: Проф др Јелена Милашин, Соматолошки факултет, Универзитета у Београду
 Др сци др Ивана Јоксић, воши научни сарадник, ГАК „Народни фронт“

Доц Марија Савић Веселиновић, Биолошки факултет, Универзитета у Београду

Трошкови истраживања би били покривени новцем из пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Владе Републике Србије „Генетичка контрола и молекуларни механизми у малигним, инфламаторним и развојним патологијама орофацијалне регије“.

ПРЕДСЕДНИК ЕТИЧКОГ ОДБОРА

Проф Др Бранка Николић



(Handwritten signature of Prof. Dr. Branka Nikolic)

Biografija autora

Specijalista biolog Mina Ž. Toljić rođena je 4. maja 1989. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija upisala je 2008. godine, a završila 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,50. Godinu dana kasnije završava master studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, modul Biofizika, sa prosečnom ocenom 9,83 odbranivši master rad pod nazivom „Antitumorski efekat metanolnih ekstrakata transformisanih korenova biljke *Gentiana dinarica* na U251 ćelije humanog glioma“.

Odbranom specijalističkog rada na temu „Učestalost mikronukleusa, nukleoplazmatskih mostova i nukleusnih pupoljaka u limfocitima periferne krvi trudnica sa gestacijskim dijabetesom i gestacijskom arterijskom hipertenzijom“, pod mentorstvom dr Ivane Joksić, 2015. godine završila je specijalističke akademske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer Genetika, sa prosečnom ocenom 10,00. Iste godine upisuje doktorske akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Genetika.

Od avgusta 2013. godine zaposlena je na Odseku za medicinsku genetiku, Ginekološko-akušerke klinike „Narodni front“ u Beogradu gde se bavi prenatalnom dijagnostikom. Takođe, od 2013. do 2015. godine bila je spoljni saradnik na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu, u okviru projekata „Uloga autofagije u regulaciji smrti tumorskih ćelija“ pod rukovodstvom dr Ljubice Harhaji-Trajković.

Do sada je bila autor i koautor 6 naučnih publikacija u časopisima međunarodnog značaja, od čega jedan u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti, kao i preko 10 saopštenja sa skupova od međunarodnog značaja.

Изјава о ауторству

Потписани-а Мина Ж. Тољић

број индекса Б3039/2015

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Ниво ванћелијских miR-17, miR-29a, miR-181a, проинфламаторних цитокина и параметара оксидативног оштећења у крви пацијенткиња са гестацијским дијабетесом и гестацијском артеријском хипертензијом

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Мина Ж. Тољић

Број индекса Б3039/2015

Студијски програм Биологија

Наслов рада Ниво ванћелијских miR-17, miR-29a, miR-181a, проинфламаторних цитокина и параметара оксидативног оштећења у крви пацијенткиња са гестацијским дијабетесом и гестацијском артеријском хипертензијом

Ментор др сци др Ивана Јоксић, др Марија Савић Веселиновић

Потписани/а Мина Ж. Тољић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Ниво ванћелијских miR-17, miR-29a, miR-181a, проинфламаторних цитокина и параметара оксидативног оштећења у крви пацијенткиња са гестацијским дијабетесом и гестацијском артеријском хипертензијом

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.