

# RASPODJELA LIMFOCITA I NJIHOVA POVEZANOST S LUČENJEM PROUPALNIH I PROTUUPALNIH CITOKINA KOD TRUDNICA S GESTACIJSKIM DIJABETESOM

---

Omazić, Jelena

Doctoral thesis / Disertacija

2025

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:934982>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Jelena Omazić

**RASPODJELA LIMFOCITA I NJIHOVA POVEZANOST  
S LUČENJEM PROUPALNIH I PROTUUPALNIH  
CITOKINA KOD TRUDNICA S GESTACIJSKIM  
DIJABETESOM**

Doktorska disertacija

Osijek, 2025.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Jelena Omazić

**RASPODJELA LIMFOCITA I NJIHOVA POVEZANOST  
S LUČENJEM PROUPALNIH I PROTUUPALNIH  
CITOKINA KOD TRUDNICA S GESTACIJSKIM  
DIJABETESOM**

Doktorska disertacija

Osijek, 2025.

Rad je ostvaren na Klinici za ginekologiju i porodništvo KBC-a Osijek, na Zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek, Odjelu za laboratorijsku i transfuzijsku medicinu NMB-e Vukovar te u Laboratoriju za medicinsku genetiku pri Katedri za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Mentor rada: prof. dr. sc. Jasenka Wagner Kostadinović, mag. med. biochem.

Komentor rada: izv. prof. dr. sc. Andrijana Muller, dr. med.

Rad ima 104 stranice i 38 tablica.

## PREDGOVOR

Ovo je istraživanje napravljeno u sklopu projekata *Analiza limfocitnih subpopulacija kod trudnica s gestacijskim dijabetesom, Specifičnosti imunološkog profila u gestacijskom dijabetesu* i *Pospartalne promjene metaboličkog profila kod trudnica s gestacijskim dijabetesom* pod vodstvom moje mentorice prof. dr. sc. Jasenke Wagner Kostadinović.

Veliko hvala mentorici prof. dr. sc. Jasenki Wagner Kostadinović i komentorici izv. prof. dr. sc. Andrijani Muller na svim poticajima i ohrabrivanju, stručnim i prijateljskim savjetima, vremenu i trudu uloženom u izradu ove disertacije.

Hvala izv. prof. dr. sc. Vatroslavu Šeriću koji me je uvijek usmjeravao i poticao na učenje i napredovanje te oblikovao u biokemičarku koja sam postala.

Zahvaljujem svim kolegama i suradnicima koji su mi nesebično pomagali u istraživanju. Posebno hvala mojim kolegicama Blaži i Barbari te mojoj prijateljici Matei jer bi bez njihove pomoći i podrške bilo znatno teže doći do cilja.

Hvala mojoj prijateljici Matei Sukić na lektoriranju doktorske disertacije i svim mojim prijateljicama koje su mi bile podrška i usmjeravale zdrave trudnice u istraživanje.

Zahvaljujem se Nikolini i Petri koje su skriveno bogatstvo mog dokorskog studija.

Najveće hvala mojoj obitelji koja me pratila na putu mog školovanja. Mom bratu na svim savjetima, roditeljima koji su me školovali i podržavali u mojim izborima te mojoj nezaboravnoj baki koja se veselila svakom mom uspjehu.

„Ma nosio ja u glavi  
i sve fakultete,  
kad odrastem jako velik  
ja ću ostat' dijete.“

*Enes Kišević*

## Sadržaj

Sadržaj .....	I
Popis kratica .....	III
Popis tablica .....	V
1. UVOD.....	1
1.1. Povijesni pregled gestacijskog dijabetesa.....	1
1.2. Definicija gestacijskog dijabetesa .....	2
1.3. Dijagnostički kriteriji za gestacijski dijabetes.....	3
1.4. Patofiziologija trudnoće.....	5
1.5. Imunološka regulacija u gestacijskom dijabetesu .....	7
1.6. B-limfociti .....	7
1.7. T-limfociti.....	9
1.8. NK-stanice .....	11
1.9. NKT-stanice .....	12
1.10. Proupalni čimbenici u gestacijskom dijabetesu .....	13
1.10.1. TNF- $\alpha$ .....	14
1.10.2. Interleukin 6.....	15
1.11. Protuupalni čimbenici u gestacijskom dijabetesu.....	16
1.11.1. Adiponektin i leptin .....	16
1.11.2. Interleukin 10.....	17
1.12. Varijante gena za TNF- $\alpha$ , IL-6, adiponektin i IL-10 u gestacijskom dijabetesu	19
1.13. Rutinski biokemijski parametri u gestacijskom dijabetesu .....	20
1.14. Hormoni u gestacijskom dijabetesu .....	20
1.15. Liječenje gestacijskog dijabetesa .....	22
1.16. Važnost ranog prepoznavanja gestacijskog dijabetesa.....	23
2. HIPOTEZA .....	25
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	26
4. MATERIJALI I METODE .....	27
4.1. Ustroj studije .....	27
4.2. Ispitanici.....	27
4.3. Metode.....	28
4.4. Statističke metode .....	32
5. REZULTATI .....	34

5.1. Opća i klinička obilježja ispitanica .....	34
5.2. Hematološki i biokemijski parametri ispitanica.....	39
5.3. Analiza varijanti gena <i>IL-6</i> , <i>IL-10</i> , <i>TNF-<math>\alpha</math></i> i <i>AdipoQ</i> .....	46
5.4. Razlike u općim i kliničkim obilježjima između četiri skupine ispitanica .....	51
6. RASPRAVA .....	69
6.1. Opća i klinička obilježja trudnica .....	70
6.2. Hematološki i biokemijski parametri.....	72
6.3. Povezanost NKT/NK stanica, B1/B2 limfocita, te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s hematološkim i biokemijskim pokazateljima .....	76
6.4. Učestalost genotipova i alela analiziranih genskih varijanti između skupine ispitanica s gestacijskim dijabetesom i zdravih ispitanica.....	81
6.5. Razlike u vrijednostima <i>IL-6</i> , <i>IL-10</i> , <i>TNF-<math>\alpha</math></i> i adiponektina s obzirom na genotipove analiziranih genskih varijanti .....	82
6.6. Razlike u omjerima s obzirom na genotipove analiziranih genskih varijanti....	82
6.7. Prednosti i ograničenja istraživanja .....	83
7. ZAKLJUČAK .....	85
8. SAŽETAK.....	87
9. SUMMARY .....	88
10. LITERATURA.....	89
11. ŽIVOTOPIS.....	103

## Popis kratica

ADA	Američka udruga za dijabetes (od engl. <i>American Diabetes Association</i> )
BAFF	faktor aktivacije B-stanica (od engl. <i>B-cell activating factor</i> )
BCR	receptor B-limfocita (od engl. <i>B cells receptor</i> )
CD	diferencijacijski biljeg (od engl. <i>Cluster of Differentiation</i> )
CRH	kortikotropni otpuštajući hormon (od engl. <i>corticotropin-releasing hormone</i> )
CRP	C-reaktivni protein
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (od engl. <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
GD	gestacijski dijabetes
HAPO studija	međunarodno istraživanje (od engl. <i>Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes</i> )
HbA1c	glikolizirani hemoglobin (hemoglobin A1c)
HDGO	Hrvatsko društvo ginekologa i opstetričara
HKMB	Hrvatska komora medicinskih biokemičara
HOMA-IR	homeostatski model za procjenu inzulinske rezistencije (od engl. <i>homeostatic model assesment for insuline resistance</i> )
HRP	peroksidaza iz hrena (od engl. <i>Horseradish peroxidase</i> )
hsCRP	visoko osjetljivi C-reaktivni protein (od engl. <i>high sensitive C reactive protein</i> )
IADP-SG	međunarodna radna grupa za dijabetes u trudnoći (od engl. <i>International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group</i> )
ICA	antitijela na stanice otočića gušterače (od engl. <i>islet cell antibody</i> )
IFN	interferon
Ig	imunoglobulin
IGF	faktor rasta sličan inzulinu (od engl. <i>Insulin-like growth factor</i> )
IL	interleukin
IRS	supstrat inzulinskog receptora (od engl. <i>insulin receptor substrat</i> )
ITM	indeks tjelesne mase
JAK	janus kinaza (od engl. <i>janus kinase</i> )



NDDG	Nacionalna udruga za dijabetes (od engl. <i>National Diabetes Data Group</i> )
NF-kB	nukleolarni faktor kapa B (od engl. <i>nucleolar factor kappa B</i> )
NICE	Nacionalni institut za zdravlje i izvrsnost u njezi (od engl. <i>National Institute for Health and Care Excellence</i> )
NIH	Nacionalni institut za zdravlje (od engl. <i>National Institut of Health</i> )
NK	stanice ubojice (od engl. <i>natural killer</i> )
NKT	T-stanice ubojice (od engl. <i>natural killer T</i> )
OGTT	oralni test tolerancije glukoze (od engl. <i>oral glucose tolerance test</i> )
PAPP-A	plazmatski protein A povezan s trudnoćom (od engl. <i>pregnancy-associated plasma protein A</i> )
PCR	lančana reakcija polimerazom (od engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
SHBG	protein koji veže spolne hormone (od engl. <i>sex hormone binding globulin</i> )
SLE	sistemska eritemski lupus (od engl. <i>systemic lupus erythematosus</i> )
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (od engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
STAT	prijenosnik signala i aktivator transkripcije (od engl. <i>signal transducer and activator of transcription</i> )
SZO	Svjetska zdravstvena organizacija
T1DM	dijabetes tip 1 (od engl. <i>type 1 diabetes mellitus</i> )
T2DM	dijabetes tip 2 (od engl. <i>type 2 diabetes mellitus</i> )
TLR	receptori sličnu Tollu (od engl. <i>Toll like receptor</i> )
TMB	tetrametilbenzidin
TNF	čimbenik tumorske nekroze (od engl. <i>tumor necrosis factor</i> )
TYK	tirozin kinaza (od engl. <i>tyrosine kinaze</i> )

## Popis tablica

Tablica 1. Opća obilježja ispitanica .....	34
Tablica 2. Životni stil ispitanica .....	35
Tablica 3. Povijest bolesti .....	36
Tablica 4. Ginekološka i opstetrička anamneza .....	37
Tablica 5. Razlike u vrijednostima OGTT-a .....	38
Tablica 6. Komplikacije u aktualnoj trudnoći .....	38
Tablica 7. Hematološki pokazatelji .....	39
Tablica 8. Biokemijski pokazatelji .....	40
Tablica 9. Povezanost omjera proupalnih i protuupalnih faktora s omjerom NKT/NK- stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita kod svih ispitanica te u kontrolnoj skupini ili kod gestacijskog dijabetesa .....	41
Tablica 10. Povezanost NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s hematološkim i biokemijskim pokazateljima kod svih ispitanica .....	42
Tablica 11. Povezanost NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s hematološkim i biokemijskim pokazateljima kod ispitanica kontrolne skupine .....	43
Tablica 12. Povezanost NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s hematološkim pokazateljima ispitanica s gestacijskim dijabetesom .....	44
Tablica 13. Povezanost NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s biokemijskim pokazateljima ispitanica s gestacijskim dijabetesom .....	45
Tablica 14. Učestalost genotipova i alela rs1800796 ( <i>IL-6</i> ) između skupine ispitanica s gestacijskim dijabetesom i zdravih ispitanica .....	46
Tablica 15. Učestalost genotipova i alela rs1800896 ( <i>IL-10</i> ) između skupine ispitanica s gestacijskim dijabetesom i zdravih ispitanica .....	46
Tablica 16. Učestalost genotipova i alela rs1800629 ( <i>TNF-<math>\alpha</math></i> ) između skupine ispitanica s gestacijskim dijabetesom i zdravih ispitanica .....	47
Tablica 17. Učestalost genotipova i alela rs266729 ( <i>AdipoQ</i> ) između skupine ispitanica s gestacijskim dijabetesom i zdravih ispitanica .....	47

Tablica 18. Razlike u vrijednostima IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ i adiponektina s obzirom na genotipove analiziranih SNP-ova kod kontrola i ispitanica s gestacijskim dijabetesom .....	48
Tablica 19. Razlike u omjerima s obzirom na genotipove rs1800796 ( <i>IL-6</i> ) i rs1800896 ( <i>IL – 10</i> ) kod kontrola i ispitanica s gestacijskim dijabetesom .....	49
Tablica 20. Razlike u omjerima s obzirom na genotipove rs1800629 ( <i>TNF-<math>\alpha</math></i> ) i rs266729 ( <i>AdipoQ</i> ) kod kontrola i ispitanica s gestacijskim dijabetesom .....	50
Tablica 21. Opća obilježja ispitanica prema skupinama .....	51
Tablica 22. Životni stil ispitanica u odnosu na skupine .....	52
Tablica 23. Raspodjela ispitanica prema povijesti bolesti i skupinama .....	53
Tablica 24. Ginekološka i opstetrička anamneza prema skupinama .....	54
Tablica 25. Razlike u vrijednostima OGTT-a i povećanju tjelesne težine prema skupinama .....	55
Tablica 26. Komplikacije u aktualnoj trudnoći prema skupinama .....	56
Tablica 27. Hematološki pokazatelji prema skupinama .....	57
Tablica 28. Biokemijski pokazatelji prema skupinama .....	58
Tablica 29. Povezanost proupalnih i protuupalnih faktora s omjerom NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita prema skupinama .....	59
Tablica 30. Povezanost NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s hematološkim i biokemijskim pokazateljima kod zdravih ispitanica .....	60
Tablica 31. Povezanost NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s hematološkim i biokemijskim pokazateljima zdravih ispitanica s komplikacijama .....	61
Tablica 32. Povezanost NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s hematološkim i biokemijskim pokazateljima kod ispitanica s gestacijskim dijabetesom .....	62
Tablica 33. Povezanost NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s hematološkim i biokemijskim pokazateljima ispitanica s gestacijskim dijabetesom i komplikacijama .....	63
Tablica 34. Razlike u omjerima NKT/NK-stanica, pomagačkih/citotoksičnih limfocita i B1/B2-limfocita s obzirom na rs1800796 ( <i>IL-6</i> ) .....	64
Tablica 35. Razlike u omjerima NKT/NK-stanica, pomagačkih/citotoksičnih limfocita i B1/B2-limfocita s obzirom na rs1800796 ( <i>IL – 10</i> ) .....	65

Tablica 36. Razlike u omjerima NKT/NK-stanica, pomagačkih/citotoksičnih limfocita i B1/B2-limfocita s obzirom na rs1800629 ( <i>TNF-<math>\alpha</math></i> ) .....	66
Tablica 37. Razlike u omjerima NKT/NK-stanica, pomagačkih/citotoksičnih limfocita i B1/B2-limfocita s obzirom na rs266729 ( <i>AdipoQ</i> ) .....	67
Tablica 38. Razlike u vrijednostima IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ i adiponektina s obzirom na genotipove analiziranih SNP-ova u pojedinoj skupini ispitanica .....	68

## 1. UVOD

### 1.1. Povijesni pregled gestacijskog dijabetesa

Na staroegipatskom Ebersovom papirusu 1552. godine prije Krista, liječnik Hesy-Ra opisao je bolest učestalog mokrenja za koju se smatra da je dijabetes. Aretej od Kapadocije prihvatio je starogrčka otkrića i medicinske zapise, ponajviše Hipokratove i Pitagorine, te je opisao bolest naziva *diabetes*, što u prijevodu s grčkog znači proticanje. Bolest je opisao kao rijetko kronično stanje koje dovodi do otapanja mesa i udova u urin, karakteriziranu neutaživom žeđi, izrazitim izmokravanjem, ispućalim ustima, suhim tijelom i kratkim životnim vijekom. S obzirom na to da se do 11. stoljeća dijagnoza dijabetesa temeljila na okusu urina, dobio je i svoj pridjev *mellitus* što na latinskom jeziku znači med (1).

Prvi zapis o dijabetesu u trudnoći datira iz 1824. godine kada je Bennewitz opisao slučaj trudnice s intenzivnom žeđu i ponavljajućim glikozurijama u trudnoćama te fetalnom makrosomijom. Sličan slučaj 1846. godine opisao je i Lever (2).

Europski znanstvenici von Mering i Minkowski su 1889. godine dokazali da odstranjenje gušterače kod pasa dovodi do dijabetesa, te su oni zaslužni za otkriće uloge gušterače u regulaciji glukoze (1).

Godine 1892. Duncan je izvijestio o ishodima trudnoće kod 16 žena s 22 trudnoće kod kojih su bile prisutne visoke stope mortaliteta majke (60 %) i novorođenčadi (47 %). Opažanja su ga dovela do zaključaka da se dijabetes može razviti tijekom trudnoće, da dijabetes može prestati prekidom trudnoće, dijabetes se može razviti ubrzo nakon poroda te da dijabetes može dovesti do smrti fetusa (2, 3). Brocard je 1898. prvi put demonstrirao razliku između tolerancije na glukozu kod trudnica i žena koje nisu trudne; otkrio je prisutnost glikozurije 2 sata nakon uzimanja 50 g glukoze u 50 % trudnica u usporedbi s 11 % žena koje nisu trudne (2). Godine 1909. Williams je opisao kliničku važnost glikozurije u trudnoći razlikujući prolaznu glikozuriju koja se javlja krajem trudnoće i stalnu glikozuriju koja se javlja početkom trudnoće, a koja je ujedno i intenzivnija i ima lošiji utjecaj na trudnoću, a kod poznate dijagnoze dijabetesa perzistira i nakon trudnoće (4). Prvu hipotezu o poremećenoj hormonskoj ravnoteži kod trudnica s dijabetesom iznijela je dijabetologinja Priscilla White koja je i klasificirala

## 1. Uvod

dijabetes, dok su Karlsson i Kjellmer pokazali povezanost glukoze trudnice s perinatalnom smrtnosti (1).

Pojam gestacijski dijabetes (GD) prvi puta spominje O'Sullivan šezdesetih godina te definira prve kriterije za oralni test tolerancije glukoze (OGTT, engl. *oral glucose tolerance test*) za dijagnozu GD-a (5).

1965. godine Pedersen i Molsted-Pedersen postavili su hipotezu placentarnog prijenosa glukoze koji uzrokuje fetalnu hiperinzulinemiju zbog koje dolazi do ulaska glukoze u fetalne stanice, glikogenogeneze i lipogeneze te naposljetku vidljive fetalne makrosomije (6).

Danas, kada je prošlo 200 godina od prvih spoznaja o dijabetesu u trudnoći, on je još uvijek aktualna i nepotpuno istražena znanstvena tema, a s epidemijom pretilosti raste njegova prevalencija i potreba za dodatnim znanjima.

### 1.2. Definicija gestacijskog dijabetesa

Gestacijski dijabetes (GD) definiran je kao hiperglikemija koja se prepoznaje prvi put tijekom trudnoće, povezan je s homeostazom glukoze uslijed disfunkcije  $\beta$ -stanica gušterače te ovako definiran uključuje slučajeve nedijagnosticiranog dijabetesa tipa 2 (T2DM, engl. *type 2 diabetes mellitus*) u ranoj trudnoći i pravi GD koji se razvija kasnije (7). Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (SZO), hiperglikemijski poremećaji u trudnoći klasificiraju se kao GD i dijabetes u trudnoći koji obuhvaća dijabetes tip 1 (T1DM, engl. *type 1 diabetes mellitus*) i T2DM (8). GD predstavlja najčešći metabolički poremećaj u trudnoći i najčešću medicinsku komplikaciju u trudnoći, a učestalost hiperglikemije i dijabetesa u populaciji trudnica je u porastu (9).

Poznato je više čimbenika rizika za razvoj GD-a, od kojih se kao najznačajniji smatra GD u prethodnoj trudnoći s obzirom na to da je vjerojatnost ponovnog razvoja GD-a veća od 84 % (10). Drugi rizični čimbenici za razvoj GD-a dob su majke, pretilost ili povećana tjelesna težina prije trudnoće, sindrom policističnih jajnika, fetalna makrosomija u prethodnoj trudnoći, blizanačka trudnoća, dijabetes u obiteljskoj anamnezi, fizička neaktivnost, nepravilna prehrana, značajno povećanje tjelesne težine tijekom trudnoće, uzimanje lijekova kao što su glukokortikoidi i antipsihotici te hipertenzija (10, 11).

## 1. Uvod

Učestalost GD-a razlikuje se u literaturnim podacima ovisno o demografskim osobinama populacije i dijagnostičkim kriterijima za GD koji nisu jedinstveni, a ide čak do 42 % (7,12). Prema dostupnim podacima oko 35 % žena koje su imale GD razvit će dijabetes tijekom života (13).

### 1.3. Dijagnostički kriteriji za gestacijski dijabetes

Unatoč porastu učestalosti GD-a ne postoje standardizirane preporuke ni konsenzus za njegovu dijagnozu. Više je različitih radnih skupina i udruženja izdalo vlastite smjernice za dijagnozu GD-a, a te se smjernice razlikuju i u kriterijima za odabir trudnica koje je potrebno testirati i definiciji GD-a prema dobivenim vrijednostima glukoze.

Većini istraživanja temelj su prvi kriteriji koje je postavio O'Sullivan 1964. godine. Nacionalna udruga za dijabetes (NDDG, engl. *National Diabetes Data Group*) modificirala je 1979. godine kriterije koje je postavio O'Sullivan prema enzimskoj metodi određivanja glukoze u punoj venskoj krvi i kapilarnom uzorku krvi te u plazmi gdje su vrijednosti bile 15 % više (14). Carpenter-Coustan u svojoj su studiji modificirali granične vrijednosti glukoze za dijagnozu GD-a s razvojem mjernih metoda, to jest s razvojem danas najzastupljenije enzimske metode s heksokinazom (15).

SZO je 1985. godine predložila kriterije za korištenje OGTT testa gdje je GD definiran vrijednošću glukoze 7,8 mmol/L i natašte i 2h nakon opterećenja sa 75 g glukoze (16). Godine 1999. SZO je spustila graničnu vrijednost glukoze natašte na 7,0 mmol/L (17). Zbog raznih kriterija i uviđanja važnosti prepoznavanja GD-a učinjena je velika, međunarodna, prospektivna i opservacijska studija o hiperglikemiji i neželjenim ishodima trudnoće (HAPO studija, engl. *Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes*) tijekom šest godina te je obuhvatila preko 25 000 trudnica, a njezini su rezultati objavljeni 2008. godine (18). Studija je procijenila odnos između vrijednosti glukoze u 75 g 2-satnom OGTT-u obavljenom između 24. i 32. gestacijskog tjedna i primarnih perinatalnih ishoda (porođajna težina, porod carskim rezom, neonatalna hipoglikemija i vrijednost C-peptida u pukovini) te sekundarnih ishoda (preeklampsija, prijevremeni porod, distocija ramena ili porođajna ozljeda, hiperbilirubinemija i prijem novorođenčeta na jedinicu intenzivne njege). Rezultati su pokazali pozitivnu povezanost primarnih i sekundarnih perinatalnih ishoda s majčinom razinom glukoze.

## 1. Uvod

HAPO studija pokazala je da i niže koncentracije majčine glukoze mogu biti povezane s nepovoljnim ishodima trudnoće.

S obzirom na to da je HAPO studija ukazala da još ne postoje dobri dijagnostički kriteriji za GD, 2008. godine održana je međunarodna konferencija pod pokroviteljstvom međunarodne udruge *International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group* (IADP-SG) s ciljem definiranja i standardizacije novih kriterija za dijagnozu GD-a. Danas se GD najčešće dijagnosticira prema tada donesenim preporukama IADP-SG-a (19). Prema navedenim smjernicama u prvom tromjesečju trudnoće svim trudnicama treba napraviti mjerenje glukoze ili glikoziliranog hemoglobina (HbA1c) natašte. Trudnice s normoglikemijom trebale bi između 24. i 28. tjedna trudnoće napraviti OGTT u tri točke mjerenja za dijagnosticiranje gestacijskog dijabetesa. GD se dijagnosticira ako je glukoza u OGTT-u natašte jednaka ili viša od 5,1 mmol/L, nakon prvog sata jednaka ili viša od 10 mmol/L ili ako je glukoza nakon drugog sata 8,5 mmol/L ili viša. Te su preporuke prihvatili SZO i Američka udruga za dijabetes (ADA, engl. *American Diabetes Association*) (20,21). Međutim, Nacionalni institut za zdravlje (NIH, engl. *National Institute of Health*) i Američko udruženje opstetričara i ginekologa nije prihvatilo ove kriterije navodeći očekivani porast prevalencije GD-a, troškova i intervencija u kontekstu nedostatka dokaza za povezano poboljšanje perinatalnih ishoda, već navedene organizacije preporučavaju NDDG i Carpenter-Coustanove kriterije 3-satnog OGTT-a (10,22). Također, IADP-SG kriterije nije prihvatio ni britanski Nacionalni institut za zdravlje i izvrsnost u njezi (NICE, engl. *National Institute for Health and Care Excellence*) koji preporuča selektivni pristup probiru, pri čemu se ženama s čimbenicima rizika za GD preporučuje da prođu dijagnostički 75 g 2-satni OGTT između 26. i 28. tjedna trudnoće, a dijagnostički pragovi glukoze viši su od IADP-SG dijagnostičkih kriterija za GD (23).

Važnost ranog otkrivanja GD-a posebno se istaknula u Njemačkoj gdje je 2016. godine donesena Berlinska deklaracija koja za cilj ima prevenciju, rano otkrivanje, ranu kontrolu i rani pristup odgovarajućim mjerama u svrhu smanjenja osobnog, socijalnog i ekonomskog tereta GD-a i T2DM-a (24).

Hrvatsko društvo ginekologa i opstetričara (HDGO) i Hrvatska komora medicinskih biokemičara (HKMB) prihvatili su IADP-SG dijagnostičke kriterije za dijagnozu GD-a, na temelju kojih su napravljene smjernice za izvođenje OGTT-a između 24. i 28. gestacijskog tjedna zdravim trudnicama (25, 26).



## 1. Uvod

### 1.4. Patofiziologija trudnoće

Prva faza zdrave trudnoće, koja obuhvaća prva dva tromjesečja trudnoće, anabolička je jer trudnica stvara zalihe energije potrebne za rast i razvoj ploda povećavajući skladištenje lipida u tkivima. Nasuprot tome, druga je faza trudnoće katabolička jer fetus raste i ima sve veće metaboličke potrebe te dolazi do razgradnje lipida zbog oksidacije masnih kiselina kako bi se uštedjela glukoza potrebna za rast fetusa (27). Promjene se događaju u više različitih tkiva istovremeno, pa se povećava i bazalni metabolizam trudnice. Važnost metaboličkih promjena tijekom trudnoće dvostruka je - majka mora zadovoljiti vlastite energetske potrebe, ali i potrebe rastućeg fetusa. Da bi to učinila, majka mora vlastiti metabolizam ugljikohidrata, bjelančevina i masti prilagoditi potrebama fetusa.

Trudnoća je stanje fiziološke inzulinske rezistencije koja se primarno razvija pod utjecajem hormona placente (humani placentni laktogen, progesteron, estrogen), ali i prolaktina i kortizola. Inzulinska rezistencija polagano raste tijekom trudnoće, doseže svoj vrhunac između 24.-og i 28.-og tjedna i zatim se stabilizira. Trudnice s dijabetesom imaju veći stupanj inzulinske rezistencije u odnosu na fiziološku inzulinsku rezistenciju koja se javlja tijekom trudnoće (28).

Sve što majka pojede prenosi se do fetusa preko placente (glukoza, aminokiseline i slobodne masne kiseline). To je važno jer je fetus hormonski autonoman (proteini ne prolaze placentarnu barijeru), ali izravno ovisi o majci za svoje metaboličke supstrate. Iz tog razloga fetalna potrošnja glukoze, sinteza vlastitih proteina, masti i glikogena ovisi o majčinom unosu. Ako ne postoji periferna inzulinska rezistencija, majka skladišti glukozu u jetri, mišićima i adipocitima te je to evolucijska prilagodba za preživljavanje fetusa. Kao posljedicu inzulinske rezistencije kod majki može se naći prolazna postprandijalna hiperglikemija. Na taj način glukoza iz majčine krvi može prijeći posteljicu i biti izvor supstrata za fetus, a ne metaboličko gorivo za potrebe majke. Fetus ima stalnu potrebu za glukozom, pa majka noću troši svoje zalihe, a ujutro razvija hipoglikemiju natašte. Zbog povišene inzulinske rezistencije perifernih tkiva gušterača proizvodi sve više inzulina, što rezultira hipertrofijom  $\beta$ -stanica i hiperinzulinemijom. Smatra se da  $\beta$ -stanice propadaju zbog pretjerane proizvodnje inzulina kao odgovor na otpornost perifernog tkiva (29).

Majka tijekom 9 mjeseci trudnoće dobiva na tjelesnoj težini, što je uglavnom posljedica zadržavanja vode i stvaranja zaliha proteina i masti. Majčino bijelo masno tkivo prolazi

## 1. Uvod

ekspanziju tijekom rane trudnoće osiguravajući energetske zalihe masti kao gorivo za kasnije faze trudnoće. Visoke razine inzulina mogu povećati *de novo* lipogenezu, potisnuti lipolizu masnog tkiva i smanjiti cirkulaciju slobodnih masnih kiselina. Budući da se značajna količina glukoze koristi tijekom rane faze trudnoće, inzulin povećava transport glukoze iz seruma i povećava se glikoliza. Prethodno je utvrđeno da tijekom trudnoće, povećani plazmatski protein A povezan s trudnoćom (PAPP-A, engl. *pregnancy-associated plasma protein A*) stimulira proteolizu faktora rasta sličnog inzulinu (IGF, engl. *Insulin-like growth factor*) -5, koji oslobađa IGF-1 i potiče širenje masnog tkiva i njegovu proliferaciju kako bi se omogućilo skladištenje energije i spriječilo prekomjerno ektopično taloženje lipida negdje drugdje u tijelu. Širenje masnog tkiva može se postići i preko hipertrofičnih adipocita ili hiperplazije, koja je proizvodnja novih adipocita iz njegovih prekursora. Međutim, svi oblici širenja masnog tkiva nisu jednaki; hiperplazija je povezana s boljom kontrolom glukoze, dok je hipertrofija povezana s većom inzulinskom rezistencijom i upalama (27). Na kraju drugog tromjesečja trudnoće dolazi do prijelaza iz anaboličke u kataboličku fazu te u tom trenutku nastupa učinak humanog placentnog laktogena. To je neglikozilirani polipeptid čija je glavna uloga stimulacija lipolize. S obzirom na to da se zalihe masti stvaraju tijekom prvih dvaju tromjesečja, u zadnjem tromjesečju dolazi do promjene u metaboličkoj potrošnji goriva. Fetus postaje sve veći s rastućim metaboličkim potrebama, a majčina glukoza prenosi se na njega. Majka je izložena ubrzanom gladovanju, iako hranu unosi i svoje potrebe mora podmirivati iz drugog energetskog supstrata, a to su masti. Pod utjecajem humanog placentnog laktogena aktivira se lipoliza triglicerida u adipocitima stimulacijom hormonski ovisne lipaze, što će rezultirati stvaranjem slobodnih masnih kiselina. Oni će se koristiti kao majčin izvor energije. Ako taj mehanizam ne funkcionira, majka koja je izložena gladovanju povećala bi proizvodnju ketonskih tijela u jetri, što bi rezultiralo ketonemijom i ketonurijom. Ketoza je izravno toksična za fetus jer ketonska tijela prolaze kroz placentu. Fetus ih djelomično može koristiti kao izvor energije (poput mozga), no ako ih ima u suvišku, izravno toksično djeluju na središnji živčani sustav, kardiomiocite, razvoj nepca i gastrointestinalnog sustava i može dovesti do iznenadne smrti fetusa. GD je povezan sa smanjenom diferencijacijom i hipertrofijom adipocita, što uz inzulinsku rezistenciju otežava odgovor na inzulin (30).

## 1. Uvod

### 1.5. Imunološka regulacija u gestacijskom dijabetesu

Tijekom trudnoće dolazi do velikih prilagodbi majčina imunološkog sustava kako bi se zaštitila majka i plod. Kronična upala čimbenik je u etiologiji inzulinske rezistencije, a poremećaji imunološkog sustava igraju ključnu ulogu tijekom razvoja upale. Limfociti, makrofagi i eozinofili uključeni su u abnormalnu imunološku regulaciju (31). Limfociti su imunosne stanice koje specifično prepoznaju imunogen i na njega reagiraju imunosnom reakcijom. Dijele se u tri subpopulacije: limfocite T, limfocite B i stanice ubojice (NK-stanice, engl. *natural killer*). Imunosni odgovor ovisi o limfocitima T i B.

### 1.6. B-limfociti

B-limfociti (CD19+) jedna su od glavnih populacija limfocita i imaju važnu ulogu u urođenom i adaptivnom imunitetu proizvodnjom antitijela i lučenjem citokina. Funkciju B-limfocita 1960. godine otkrio je Max Cooper koji je pokazao da je proizvodnja antitijela u potpunosti osiromašena u ozračenih pilića nakon kirurškog uklanjanja primarnog mjesta razvoja B-limfocita kod ptica, nazvanog Fabriciusova Bursa (32), stoga se danas koristi naziv B-limfociti. Razvoj B-limfocita odvija se u koracima koji su strogo kontrolirani ekspresijom i funkcijom receptora B-limfocita (BCR, engl. *B cells receptor*). U koštanoj srži B-razvojna loza uključuje fenotipski različite vrste stanica u njihovim različitim razvojnim fazama. Uspješno preuređenje lakih i teških lanca neophodno je za napredovanje u ranim fazama razvojnog puta i za izlaz B-limfocita na periferiju. B-limfociti emigriraju iz koštane srži kao prijelazni B-limfociti koji izražavaju BCR, sastavljen od antitijela vezanih na membranu, sposobnih za prepoznavanje antigena, povezanog s B-staničnim signalnim modulom predstavljenim Ig $\alpha$ -Ig $\beta$  heterodimerom. Prijelazni B-limfociti, koji na površini stanice izražavaju imunoglobulin (Ig) M i IgD, predstavljaju međufazu između nezrelih i zrelih cirkulirajućih B-limfocita i nalaze se i u koštanoj srži i u perifernoj krvi (33). U periferiji B-limfociti nastavljaju svoj razvojni put. Prijelazni B-limfociti kratkog su vijeka i brzo diferenciraju u zrele B-limfocite koji predstavljaju glavnu populaciju u perifernoj krvi, limfnim čvorovima i slezeni. Oni kontinuirano cirkuliraju s limfom i krvlju te ako naiđu na antigen koji njihov BCR prepoznaje, sljedeća faza razvoja započinje u germinativnim centrima. Aktivirani B-limfociti proliferiraju, uvode mutacije u svoje imunoglobulinske gene i odabrani su

## 1. Uvod

zbog svog afiniteta prema antigenu. Samo B-limfociti visokog afiniteta postaju ili memorijski B-limfociti ili plazma stanice. Alternativni put neovisan o T-limfocitima i germinativnom centru vodi do stvaranja urođene IgM memorije B-limfocita u slezeni.

Prijašnja su istraživanja ukazala da B-limfociti infiltriraju visceralno masno tkivo prije T-limfocita i reguliraju inzulinsku rezistenciju zajedno s neutrofilima, granulocitima i makrofagima. Laboratorijsko istraživanje na miševima hranjenima hranom bogatom masnoćama dokazalo je povišene vrijednosti B-limfocita, što ukazuje na aktivaciju imunološke reakcije (34). Adaptivna imunološka reakcija, koja uključuje B-limfocite, regulira razvoj pretilosti i inzulinske rezistencije, a B-limfociti utječu na aktivnost T-limfocita i inzulinsku rezistenciju lučenjem citokina, uključujući interleukin (IL) -6, IL-10 i leptin, i proizvodnjom antitijela (35). Glavna uloga B-limfocita proizvodnja je antitijela koja mogu dovesti do nastanka i razvoja upalnih i autoimunih bolesti. Istraživanja su pokazala da pretilost i hiperglikemija mogu izravno utjecati na proizvodnju antitijela što modulira razinu inzulinske rezistencije (36).

B-limfociti dijele se u dvije glavne klase: B1 (CD19+CD5+) i B2 (CD19+CD5-) limfocite na temelju podrijetla, razvoja, anatomije i potrebe T-limfocita za proizvodnju antitijela (37, 38).

B1 limfociti jesu B-limfociti urođenog imunološkog sustava, proizvode antitijela u odsutnosti antigena te daju imunološki odgovor neovisno o T-limfocitima. B1 limfociti prevladavaju u peritonealnim i pleuralnim šupljinama, a čine 25 – 27 % B-limfocita periferne krvi.

B2 limfociti jesu B-limfociti koji nastaju iz progenitora u koštanoj srži, a sazrijevaju u slezeni i limfnim čvorovima diferencirajući se u B-limfocite marginalne zone i folikularne B-limfocite, a čine 75 – 80 % B-limfocita periferne krvi. B-limfociti marginalne zone nalaze se unutar marginalnog sinusa slezene i sudjeluju u prvoj liniji obrane od krvlju prenosivih patogena. Folikularni B-limfociti aktiviraju se stimulacijom antigenom i folikularnim pomagačkim T-limfocitima i diferenciraju se u memorijske B-limfocite ili plazma stanice te kao takvi sudjeluju u humoralnoj imunosti.

Osim odgovora posredovanih antitijelima B-limfociti mogu regulirati imunološki odgovor i lučenjem citokina. B-limfociti koji luče protuupalne citokine kao što je IL-10 nazivaju se regulatorni B-limfociti i to su funkcionalno drugačiji B-limfociti izvedeni iz B1 i B2 limfocita. Regulatorni B-limfociti mogu potisnuti pomagačke T-limfocite (Th1 i

## 1. Uvod

Th2), inhibirati makrofage i dendritičke stanice te proizvodnju proupalnih citokina što objašnjava imunoregulacijsku funkciju B-limfocita neovisnu o antitijelima.

Istraživanja su pokazala kako je manji omjer B1/B2-limfocita u koštanoj srži, slezeni i subkutanom masnom tkivu nego u viscelarnom masnom tkivu koje je odgovorno za razvoj metaboličkog sindroma i inzulinske rezistencije te je takav sniženi omjer pronađen kod T2DM (39).

Zdrava trudnoća karakterizirana je smanjenim postotkom B-limfocita, ali povećanim omjerom regulatornih B-limfocita s protektivnom ulogom i protuupalnom ulogom. Kod GD-a uočen je povećan postotak B-limfocita i njegova pozitivna povezanost s inzulinskom rezistencijom i ekspresijom visokih koncentracija IgA koji je povezan s upalom adipoznog tkiva i poremećajem homeostaze glukoze kod pretilosti (40,41).

### 1.7. T-limfociti

T-limfociti glavne su stanične komponente adaptivnog imunološkog sustava, odgovorne za stanično posredovanje imunološke reakcije. T-limfociti izražavaju receptor s potencijalom prepoznavanja različitih antigena od patogena, tumora i okoliša te također održavaju imunološko pamćenje i samotoleranciju. T-limfociti također se smatraju glavnim pokretačima mnogih upalnih i autoimunih bolesti. *In vivo* funkcionalna uloga T-limfocita u imunitetu i imunopatologiji uglavnom je razjašnjena na mišjim modelima što je dovelo do razvoja i napretka imunoterapije kod ljudi (42).

T-limfociti razvijaju se u koštanoj srži te migriraju u timus gdje se razvijaju, selektiraju i pripremaju za periferiju. Dijele se u CD4+ i CD8+  $\alpha\beta$  T-stanice,  $\gamma\delta$  T-stanice i T-stanice prirodne ubojice (NKT-stanice, engl. *natural killer T*). Apsolutni broj i postotak T-limfocita u trudnoći nepromijenjen je tijekom napredovanja trudnoće, ali je niži od onoga prije trudnoće (43).

Imunološki odgovor započinje kada se naivni T-limfociti susretnu s antigenom i kostimulatorom liganda predstavljenim dendritskim stanicama, što rezultira proizvodnjom IL-2, proliferacijom i diferencijacijom do efektorskih stanica koje migriraju na različita mjesta radi uklanjanja patogena. Aktivirane efektorske stanice kratkog su životna vijeka iako dio njih preživi kao memorijski T-limfociti koji opstaju kao heterogena podskupina na temelju migracije, lokalizacije u tkivima i sposobnosti

## 1. Uvod

samoobnavljanja (42). Memorijski T-limfociti mogu sudjelovati u dugotrajnoj imunosti i povratnoj zaštitnoj reakciji iako njihovo porijeklo nije posve razjašnjeno.

Prevladavanje populacije T-limfocita mijenja se rastom i razvojem, tako u djetinjstvu prevladavaju većinom naivni T-limfociti tek nastali iz timusa te su zastupljeni i regulatorni T-limfociti (Treg). Tijekom te faze, kada se nailazi na najveći broj novih antigena, naivni T-limfociti igraju ključnu zaštitnu ulogu u obrani od patogena, dok su Treg limfociti ključni za razvoj tolerancije na bezopasne antigene te se u ovoj fazi uspostavljaju i dugoročne rezerve memorijskih T-limfocita. Promjena u prevladavanju T-limfocita od naivnih do memorijskih T-limfocita nakon djetinjstva i održavanje imuniteta tijekom odrasle dobi ukazuje na ulogu T-limfocita. Glavna uloga T-limfocita u odrasloj dobi održavanje je homeostaze i imunoregulacije u kontaktu sa stranim antigenima (42).

CD4+ pomagački T-limfociti (Th) heterogena su skupina T-limfocita koja igra središnju ulogu u gotovo svim aspektima imunološkog odgovora. CD4+ T-limfocite može se aktivirati i diferencirati u nekoliko podskupova kao što su Th1, Th2, Treg, folikularni pomagački T-limfociti (Tfh), Th17, Th9, Th22 i CD4+ citotoksični T-limfociti.

Th1 limfociti jesu limfociti koji imaju proupalno djelovanje za razliku od Th2 limfocita koji imaju protuupalno djelovanje. Th1 limfociti pretežno posreduju intracelularni imunološki odgovor posredovan fagocitima izlučivanjem IL-2, čimbenika tumorske nekroze (TNF, engl. *tumor necrosis factor*)  $\beta$  i interferona (IFN)  $\gamma$ , dok Th2 limfociti štite od izvanstaničnih patogena proizvodnjom IL-4 i IL-5. Prevalencija Th2 limfocita karakteristična je za normalnu trudnoću kako bi se sačuvala majka i plod te je povezana s dobrim ishodom trudnoće. Međutim, u slučaju gestacijskog dijabetesa, inzulinske rezistencije ili preeklampsije dolazi do prevalencije Th1 limfocita koji svojim proupalnim djelovanjem mogu dovesti do fatalnih ishoda trudnoće (44, 45).

Treg limfociti igraju ključnu ulogu u rastu i preživljavanju fetusa djelovanjem na majčin imunološki sustav da izbjegne prepoznavanje očeva polualogenih tkiva.

CD8+ T-limfociti imaju ulogu u borbi protiv intracelularnih patogena i u eliminiranju malignih stanica. Nakon stimulacije antigenom CD8+ T-limfociti šire se kako bi se stvorili citotoksični T-limfociti i memorijski T-limfociti. Citotoksični CD8+ T-limfociti mogu izravno inducirati smrt ciljane stanice, dok memorijski CD8+ T-limfociti pružaju brzu i jaku zaštitu nakon ponovnog susreta s antigenom, što je ključno za dugoročni imunitet.

## 1. Uvod

### 1.8. NK-stanice

Istraživanja usmjerena na karakterizaciju citotoksičnosti T-limfocita otkrila su postojanje prirodnog citotoksičnog limfocita s intrinzičnim i urođenim antitumorskim svojstvima, danas poznate kao stanice prirodne ubojice (46). NK-stanice „prirodno“ su citotoksične i, za razliku od citotoksičnih T-limfocita, ne zahtijevaju prethodnu izloženost antigenu kako bi posredovale svoje antitumorske učinke (47, 48).

Aktivnost NK-stanica prvi je put opažena u mononuklearnim stanicama periferne krvi čovjeka, no poznato je da se nalaze i u višestrukim limfoidnim i nelimfoidnim tkivima uključujući koštanu srž, limfne čvorove, kožu, crijeva, krajnike, jetru i pluća (49–51). NK-stanice čine 5 – 20 % cirkulirajućih limfocita, a eksprimiraju aktivirajući Fc receptor, CD16, a većina eksprimira i CD56 (52). Dosadašnja su istraživanja pokazala smanjenu funkciju NK-stanica kada su izložene hiperglikemiji kod pacijenata s dijabetesom te povezanost sa smanjenom tjelesnom aktivnošću i lošim metaboličkim statusom. Pacijenti s T1DM i T2DM imaju niži postotak NK-stanica od zdrave populacije (53).

Periferne NK-stanice prolaze kroz značajne promjene izazvane trudnoćom te je pojačan imunološki odgovor cirkulirajućih NK-stanica, s većom učestalosti NK-stanica koje eksprimiraju biljeg CD107a, marker citolitičke aktivnosti, i povećanu ekspresiju IFN- $\gamma$ . Povećana ekspresija površinskih biljega CD38 i NKp46, markera aktivacije i citotoksičnosti očita je u perifernim NK-stanicama trudnica u odnosu na žene koje nisu trudne pokazujući time njihovu imunološku zaštitnu ulogu u trudnoći. NK-stanice nalaze se u decidui placente i neophodne su za uspješan razvoj spiralne arterije i implantaciju fetusa u prvom tromjesečju trudnoće (43). U prvom trimestru trudnoće NK-stanice čine 70 % svih limfocita u maternici (54). Istraživanja su pokazala kako se postotak NK-stanica smanjuje u trećem tromjesečju trudnoće. NK-stanice i monociti majke imaju povećanu ekspresiju proteina imunološke kontrolne točke TIM-3 u trudnoći, što je potencijalno izazvano visokim razinama IL-4 i niskim IFN- $\gamma$ . TIM-3 važan je za proizvodnju IFN- $\gamma$  posredovanu NK-stanicama i može pridonijeti povećanju fagocitoze u trudnoći (43).

Kod GD-a uočen je povišen broj NK-stanica s citotoksičnom ulogom u odnosu na trudnice koje nemaju GD (45).

## 1. Uvod

### 1.9. NKT-stanice

Prirodne ubojice T (NKT) stanice su T-stanice koje dijele zajednička svojstva stanica prirodnih ubojica (NK) i klasičnih T-stanica te čine 0,2 % svih cirkulirajućih T-limfocita i prepoznaju specifičnu CD1d molekulu šećernih lipida i polipeptide histokompatibilnim kompleksima. One su važan dio prirodne imunosti te reguliraju autoimuni, alergijski, antimikrobni i antitumorski imunološki odgovor, a njihova povećana aktivnost povezuje se s pretilošću i dijabetesom (55).

NKT-stanice dijele se u tri skupine prema antigenskoj specifičnosti i ekspresiji njihova T-staničnog receptora: iNKT, tip II NKT i limfociti slični NKT-stanicama. iNKT stanice predstavljaju većinu NKT-stanica i imaju sposobnost prepoznavanja glikosfingolipida i glikoceramida. Nakon aktivacije, oni stupaju u interakciju s NK-stanicama, dendritičkim stanicama, T- i B-limfocitima, putem brze proizvodnje citokina i ekspresije površinskih markera stanica (56). Funkcija NKT-stanica nalazi se na granici između urođenog i adaptivnog imunološkog sustava, s nejasnoćama njihove uloge u trudnoći i djelovanju visokih razina estrogena i progesterona na njih.

NKT-stanice manje su važne tijekom trudnoće, što je najvjerojatnije posljedica njihova malog postotka u perifernoj krvi. Nakupljaju se u decidualnom tkivu, gdje je pronađen deset puta veći njihov broj u odnosu na perifernu krv trudnice te proizvode IFN- $\gamma$  i IL-4 što doprinosi zaštitnoj ulozi u fetalno-majčinoj barijeri i održavanju omjera Th1 i Th2 limfocita. Međutim, njihova pretjerana stimulacija može dovesti do spontanog pobačaja. U zadnjem trimestru trudnoće povećana je aktivacija perifernih NKT-stanica koje pojačano luče IL-4.

Podskupine NKT-stanica pokazuju različite učinke na upalu izazvanu pretilošću, gdje one mogu inducirati inzulinsku rezistenciju upalnim lučenjem citokina, osobito kao odgovor na višak lipida izazvan pretilošću, ali mogu i poticati osjetljivost na inzulinsko lučenje Th2 tip citokina (45).



## 1. Uvod

### 1.10. Proupalni čimbenici u gestacijskom dijabetesu

Razvoj GD-a uključuje niz etioloških i patofizioloških čimbenika povezanih s upalnim procesima. Dva su glavna upalna puta GD-a opisana: nuklearni faktor kapa B (NF- $\kappa$ B) i putem prijenosnika signala i aktivatora transkripcije STAT3 (engl. *signal transducer and activator of transcription*).

NF- $\kappa$ B signalni put djeluje u primarnoj regulaciji upalnog odgovora, u kontroli urođenog i adaptivnog imunološkog sustava te u staničnim procesima diferencijacije i proliferacije. Taj signalni sustav strogo je reguliran; međutim, njegova disregulacija ima implikacije na upalne i patološke procese, ovisno o povećanoj ekspresiji proupalnih čimbenika, uključujući citokine, kemokine i adhezijske molekule. Opisana su dva načina aktivacije tog signalnog sustava; prvi aktiviraju receptori slični Tollu (TLR, engl. *Toll like receptor*) i proupalni citokini IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$ . Drugi je način aktivacije ligandom CD40, citokinima iz obitelji limfotoksina (TNF- $\beta$ ) i faktorom aktivacije B-stanica (BAFF, engl. *B-cell activating factor*).

STAT3 upalni put, nakon nuklearne stimulacije i translokacije, može se eksprimirati u različitim metaboličkim tkivima, aktivirajući se fosforilacijom tirozina 705 i tirozina 727, kao odgovor na ekspresiju adipokina, proupalnih citokina i faktora rasta. Usporedno s aktivacijom STAT3 puta, aktiviraju se i drugi putevi, poput supresora signalizacije citokina 3, potencijalnog inhibitora negativne povratne sprege djelovanja proupalnih citokina, koji mogu imati pro- i protuupalne učinke. Najvažniji proupalni čimbenici tog puta jesu IL-6 i adipokin visfatin koji je prisutan u viscelarnom masnom tkivu te inducira proizvodnju IL-6, IL- $\beta$  i TNF- $\alpha$ . IL-6 inducira inzulinsku rezistenciju u jetri aktivacijom STAT3 i naknadnom indukcijom SOCS3 supresora. SOCS3 inhibira inzulinsko signaliziranje nekolicinom različitih mehanizama uključujući inhibiciju inzulinskog receptora, blokirajući njegovu aktivaciju i potičući njegovu razgradnju (57).

Pretilost, rizični čimbenik GD-a, kronična je i heterogena bolest koja nerazmjerno pogađa žene i trudnice. Za masno se tkivo izvorno vjerovalo da je pasivno skladište energije, a danas se smatra endokrinim organom koji luči adipokine uključujući adiponektin i leptin kao i brojne citokine (TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-1) koji imaju niz metaboličkih učinaka. Osim adipocita makrofagi iz masnog tkiva također luče proupalne adipokine. Postoji veza između proupalnih citokina, makrofaga i monocita u prisutnosti povećanih adipocita. Posteljica također lučenjem proupalnih citokina doprinosi upali i inzulinskoj rezistenciji (58).

## 1. Uvod

### 1.10.1. TNF- $\alpha$

Kahektin, poznatiji kao TNF- $\alpha$ , proupalni je citokin, protein molekularne mase od 17 kDa, koji pretežno aktiviraju makrofagi i T-limfociti, a pripada populaciji Th1 limfocita. Kodiran je na kromosomu 6, a biološki aktivan u trimernom obliku. TNF- $\alpha$  se može eksprimirati u posteljici, masnom tkivu, imunološkim stanicama kao što su mastociti, B-limfociti, NK-stanice, neutrofil i endotelne stanice. Ovaj citokin regulira brojne stanične funkcije uključujući staničnu proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu (59).

TNF-receptori članovi su velike obitelji proteina i postoje u gotovo svim vrstama stanica koje su uključene u imunološke i upalne odgovore. Ti se receptori pojavljuju kao trimeri u citoplazmatskoj membrani čak i nakon vezanja s TNF-om. TNF- $\alpha$  djeluje vežući se na dva različita receptora na staničnim površinama, TNF receptor I i TNF receptor II. Osim što izaziva upalu, TNF- $\alpha$  smanjuje osjetljivost na inzulin ometanjem translokacije prijenosnika glukoze GLUT-4 i prijenos inzulinskog signala. TNF- $\alpha$  inhibira i supstrat inzulinskog receptora-1 (IRS-1, engl. *insulin receptor substrat-1*) i fosforilaciju tirozina na inzulinskom receptoru što dovodi do smanjenog ulaska glukoze u stanice (60).

TNF- $\alpha$  u trudnoći je najčešće placentarnog porijekla i njegova proizvodnja raste razvojem trudnoće. Povećane vrijednosti TNF- $\alpha$  mogu pogoršati inzulinsku rezistenciju koja je normalna u trudnoći što pogoduje razvoju GD-a. Ova se karakteristika objašnjava inhibicijom aktivnosti tirozin-kinaze inzulinskog receptora u adipocitima i smanjenom fosforilacijom i aktivacijom IRS-1 koji inhibira inzulinski signalni put (59). Stoga su istraživanja pokazala kako su vrijednosti TNF- $\alpha$  povišene kod trudnica s GD u usporedbi sa zdravim trudnicama kao posljedica povećanog oksidativnog stresa i upale povezane s oštećenim metabolizmom glukoze (61). Povišene vrijednosti TNF- $\alpha$  pronađene su i u posteljici i masnom tkivu žena s GD-om i nekontroliranom hiperglikemijom u usporedbi s onima s dobro kontroliranim GD-om. Prema autorima, ova opažanja sugeriraju da tkiva žena s GD-om povećavaju otpuštanje TNF- $\alpha$  kao odgovor na hiperglikemiju. Budući da je TNF- $\alpha$  uključen u metaboličku regulaciju glukoze, lipida i inzulinske rezistencije, ti su podatci u skladu s hipotezom da je TNF- $\alpha$  uključen u razvoj GD-a (62,63).

## 1. Uvod

### 1.10.2. Interleukin 6

IL-6 je proupalni citokin koji djeluje samostalno ili povišenjem drugih proupalnih čimbenika, a djelovanje mu je slično kao TNF- $\alpha$  u induciranju upalne reakcije. Oko 30 % cirkulirajućeg IL-6 potječe iz masnog tkiva. IL-6 je protein molekularne mase 26 kDa koji proizvode brojne stanice uključujući T- i B-limfocite, makrofage, dendritične stanice, fibroblaste, endotelne stanice, glijalne stanice i keratinocite. Sincitio i ekstravilozni trofoblasti, glavni sastojci posteljice, također izražavaju IL-6. Kinetika endometrijske ekspresije IL-6 otkriva koliko je taj proces dobro sinkroniziran tijekom ljudskog menstrualnog ciklusa i u trudnoći, što ukazuje na ulogu u funkciji endometrija i implantaciji (64). IL-6 inducira unutarstanične signale putem aktivacije transmembranskog receptorskog lanca gp130, koji je zajednički s drugim članovima obitelji IL-6, i specifičnog lanca IL-6 receptora (IL-6R). Oba lanca IL-6R prisutna su u tkivima majke i fetusa tijekom implantacije i placentacije. U tim tkivima postoji topljivi oblik receptora (sIL-6R), a oba se oblika receptora povećavaju tijekom sekretorne faze menstruacijskog ciklusa. Tijekom prvih 10 tjedana trudnoće prevladavaju topljivi receptori, dok je tijekom drugog tromjesečja progresivni porast receptora vezanih za membranu (65). Za intracelularnu signalizaciju IL-6 koristi JAK/STAT signalni put. IL-6 stimulira aktivnost prijenosnika aminokiselina sustava A u primarnih stanica trofoblasta putem fosforilacije STAT3 na svom ostatku tyr705 i povećava ekspresiju natrij vezajućeg neutralnog transportera 2 aminokiselina (66). U osoba koje nisu trudne više cirkulirajuće koncentracije IL-6 povezane su s povišenim indeksom tjelesne mase i masom tjelesne masti, a ovaj citokin identificiran je kao potencijalni medijator povezujući kroničnu upalu niskog stupnja uzrokovanu pretilošću unutar inzulinske rezistencije. U trudnoći se smatra da izlučivanje IL-6 pogoršava inzulinsku rezistenciju i sudjeluje u patogenezi GD-a (67). Mnoga su istraživanja IL-6 u GD-u pokazala njihovu pozitivnu korelaciju jer IL-6 djeluje na povećanu proizvodnju glukoze u jetri i time potiče inzulinsku rezistenciju. IL-6 djeluje i antagonistički na adiponektin. Vrijednosti IL-6 u serumu žena s GD-om, u dosadašnjim istraživanjima, bile su značajno više u usporedbi s kontrolnim skupinama ispitanica.

## 1. Uvod

### 1.11. Protuupalni čimbenici u gestacijskom dijabetesu

#### 1.11.1. Adiponektin i leptin

Adiponektin je protein od 30 kD, produkt *AdipoQ* gena čiji je glavni izvor masno tkivo. Humani protein adiponektin sadrži 244 aminokiseline i četiri strukturne domene: aminoterminalnu signalnu domenu, varijabilnu regiju, kolagensku domenu i karboksilnu terminalnu globularnu domenu. Prisutan je u oblicima monomera, trimera, heksamera i multimera. Ekspresija *AdipoQ*-a regulirana je transkripcijski i epigenetski. Receptor aktiviran proliferatorom peroksisoma pojačava ekspresiju *AdipoQ*, dok proupalni signali poput  $\text{TNF-}\alpha$  smanjuju njegovu ekspresiju, a hipermetilacija *AdipoQ* povezana je s promijenjenom ekspresijom gena i tolerancijom glukoze (27). Adiponektin je protuupalni protein s antidijabetogenom i zaštitnom ulogom, koji može pojačati lučenje inzulina signalizacijom ekspresije inzulinskog gena i egzocitozom inzulinskih granula, a njegov je cilj kaskadnim reakcijama dovesti do veće dostupnosti GLUT-4 receptora na membranama stanica. Dokazano je da potiče i oksidaciju masnih kiselina. Adiponektin inhibira proizvodnju proupalnih citokina. Kod GD-a on je najbolje istražen adipokin te je dokazano da je negativno povezan s GD-om i pretilošću (58). Smanjene koncentracije adiponektina povezane su s pretilošću, hipertenzijom, poremećajima metabolizma masti, aterosklerotskim promjenama krvnih žila, masnom jetrom i T2DM. U trudnoći se koncentracija adiponektina najvjerojatnije progresivno smanjuje kao odgovor na smanjenu osjetljivost na inzulin. Istraživanja su pokazala snižene razine adiponektina između 24. i 28. gestacijskog tjedana kod trudnica s GD-om u usporedbi sa zdravim trudnicama povezujući niske razine adiponektina s pojavom inzulinske rezistencije i smanjenom funkcijom gušterače (68). Niže vrijednosti adiponektina prije trudnoće i u prvom trimestru trudnoće povezane su s većim rizikom za razvoj GD-a te je stoga adiponektin često razmatran i kao potencijalni rani biljeg GD-a (69–71). Postoje dva receptora za adiponektin, AdipoR1 i AdipoR2. AdipoR1 se eksprimira u skeletnim mišićima, dok se AdipoR2 eksprimira u jetri i placenti. Adiponektin senzibilizira tkiva na djelovanja inzulina te je nekoliko polimorfizama jednog nukleotida (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) u genu za adiponektin u ljudskoj populaciji povezano s većom učestalošću dijabetesa uključujući rs2241766 i rs266729 SNP koji su povezani s GD-om.

## 1. Uvod

Leptin je citokin aktivan u adipocitima, ali se također nalazi i u jajnicima, mozgu, placenti, gastrointestinalnom traktu, skeletnim mišićima i imunološkim stanicama. Leptin regulira energetske homeostazu uključujući regulaciju inzulinske osjetljivosti i apetita, prolazeći krvno-moždanu barijeru i djelujući na hipotalamus za promicanje sitosti i regulaciju potrošnje energije. Ime je dobio po grčkoj riječi *leptos* što označava mršavost, s obzirom na to da ima sposobnost smanjenja nakupina masnog tkiva (72). Leptin može djelovati i na periferne organe kao što su masno tkivo, mišići, gušterača i jetra gdje poboljšava osjetljivosti na inzulin, smanjuje lipolizu, smanjuje apsorpciju aminokiselina u crijevima, povećava unos glukoze u mišiće i smanjuje glukoneogenezu u jetri. Povećane razine leptina uočene su kod osoba s povećanom tjelesnom težinom, pretilih osoba i hiperinzulinemije te ukazuju na otpornost na leptin (68). Kao rezultat placentalne proizvodnje tijekom trudnoće, koncentracije leptina veće su u trudnica nego u žena koje nisu trudne. Kod GD-a vidi se značajniji porast koncentracije leptina iako su ti podaci dvosmisleni zbog proizvodnje leptina i u jajnicima i u posteljici (12,58). Ograničenje je istraživanjima i mjera adipoznosti, s obzirom na to da i leptin i adiponektin potječu prvenstveno iz adipocita. Za razliku od leptina adiponektin ne proizvode jajnici i placenta te ne prelazi u fetalnu cirkulaciju.

### 1.11.2. Interleukin 10

IL-10 je protuupalni citokin koji igra ključnu, a često i bitnu ulogu u sprječavanju upalnih i autoimunih patologija. Humani IL-10 je homodimer koji je sastavljen od dvaju nekovalentno vezanih monomera te ima molekularnu masu 35 kDa. Prvobitno je opisan kao citokin izveden iz Th2 stanica, međutim proizvodi se u gotovo svim leukocitima: pomagačkim i citotoksičnim T-limfocitima, B-limfocitima, NK-stanicama, monocitima, makrofagima i dendritičkim stanicama, mastocitima i granulocitima poput neutrofila i eozinofila (73). Neimuni tipovi stanica, kao što su epitelne stanice i keratinociti te tumorske stanice, također su sposobni proizvesti IL-10 kao odgovor na infekciju ili oštećenje tkiva (74).

Aktivacija pro-IL-10 vrši se cijepanjem signalnog peptida sastavljenog od 18 aminokiselina. IL-10 obavlja svoje djelovanje preko odgovarajućih receptora (IL-10R). Dokazano je da se IL-10R sastoji od  $\alpha$ - i  $\beta$ -lanaca. Nekoliko se unutarstaničnih

## 1. Uvod

signalnih putova može aktivirati vezanjem IL-10 na receptore, to jest dolazi do aktivacije janus kinazom 1 (JAK-1, engl. *janus kinase*) i tirozin kinazom 2 (TYK-2, engl. *tyrosine kinaze*) koje pozitivnom povratnom spregom fosforilaju IL-10R. Fosforilirani dio receptora služi kao vezno mjesto za STAT3. Aktivirana JAK-1 dovodi do fosforilacije STAT3 i njegova ulaska u jezgru gdje se STAT3 veže za regulatorne sekvence gena te tako inducira ili inhibira transkripciju gena (75). Gen za IL-10 nalazi se na kromosomu 1 te su brojni polimorfizmi pronađeni u promotorskoj regiji gena.

IL-10 posebno je intrigantan citokin. Kod ljudi je karakteriziran kao pleiotropan i s dvostrukom imunološkom funkcijom. Ta dvostruka funkcija znači da je i stimulirajuća i proturegulativna (imunosupresivna), što je isključuje iz paradigme Th1/Th2 iako je prvobitno opisan kao citokin izveden iz Th2 stanica. IL-10 u trudnoći prvobitno je istraživao na miševima, gdje se vidjelo da primjena IL-10 smanjuje sklonost pobačaja kod miševa sklonim pobačajima. Snižene vrijednosti IL-10 kasnije su pronađene i u posteljicama trudnica sklonih pobačaju u odnosu na zdrave trudnice. U posteljici zdravih trudnica imunohistokemijska analiza u kombinaciji s imunokemijskim određivanjem IL-10 pokazala je niže vrijednosti IL-10 u trećem trimestru trudnoće u odnosu na prva dva trimestra trudnoće (76). IL-10 je ključni citokin na početku trudnoće jer je uključen u razne važne događaje uključujući stvaranje posteljice. IL-10 ima zaštitni učinak na fetalno-placentalnu jedinicu jer inhibira izlučivanje upalnih citokina, kao što su IL-6, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  te zajedno s IL-4 i IL-13 modulira trofoblastičnu invaziju (59). Na kraju trudnoće mijenja se profil citokina progresivnim opadanjem lučenja IL-10 i prevladavanjem povećane koncentracije upalnih citokina što je neophodno za poticanje spontanog poroda (77).

Više je različitih istraživanja povezalosnižene vrijednosti IL-10 s nepovoljnim ishodima trudnoće kao što su rekurentni spontani pobačaj, prijevremeni porod i preeklampsija. Snižene vrijednosti IL-10 pronađene su kod T2DM, pretilosti i metaboličkog sindroma te su stoga novija istraživanja GD-a uključila i ovaj citokin, međutim nije još potvrđen njegov značaj kod GD-a. Mehanizmi koji mogu dovesti do smanjene proizvodnje IL-10 kod trudnica nisu do kraja istraženi, ali polimorfizmi u promotorskoj regiji gena za IL-10 povezuju se s njegovom nereguliranom proizvodnjom i navedenim bolestima (76, 78, 79).

## 1. Uvod

### 1.12. Varijante gena za TNF- $\alpha$ , IL-6, adiponektin i IL-10 u gestacijskom dijabetesu

Tijekom posljednjeg desetljeća više se puta pokušalo procijeniti odnose između varijanti gena za TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 ili adiponektin (*AdipoQ*) i rizika od razvoja GD-a, no odnosi među tim genskim varijantama i rizik od GD-a i dalje su nerazjašnjeni. Pretpostavlja se da varijante u genima TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 i *AdipoQ* gena mogu promijeniti aktivnost transkripcije TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 i *AdipoQ* u raznim stanjima uključujući GD.

Istraživanja nisu pokazala pozitivnu povezanost između genskih varijanti za TNF- $\alpha$  rs361525 i rs1800629 i GD-a (80, 81). Međutim, kod istraživanja na azijskoj populaciji, utvrđeno je da nema povezanosti između GD-a i SNP rs361525 i rs1799724 za TNF- $\alpha$ , dok je rs1800629 uočen kao faktor rizika za razvoj GD-a (81, 82).

Istraživanja su pokazala da nije bilo pozitivne povezanosti ni između SNP za IL-6 rs1800795 koji je povezan s T2DM i T1DM (80,83). Za razliku od njega kod SNP rs1800796 pronađena je povezanost alela G s T2DM i GD-om (81, 84).

Kod IL-10 nije pronađena pozitivna povezanost između GD-a i SNP za rs1800871, rs1800872, dok su za rs1800896 kontradiktorni rezultati od kojih neki pokazuju povezanost s GD-om, dok ju drugi nisu pokazali (80, 81). Dokazana je i povezanost SNP rs1800896 s T2DM (85).

Rezultati prijašnjih kvantitativnih analiza pokazali su da je SNP rs2241766 u genu *AdipoQ* značajno povezan s ukupnim rizikom za razvoj GD-a, dok SNP rs1501299 nije pokazao povezanost s GD-om. Analize za SNP rs2241766 u genu *AdipoQ* temeljile su se na više od 3000 istraživanja i nije bilo očite heterogenosti među prihvatljivim studijama (80). Istraživanja su pokazala kako G-alel rs266729 u genu *AdipoQ* povećava rizik od T2DM i GD-a te da ovaj SNP može igrati ulogu u razvoju kardiovaskularnih bolesti i metaboličkog sindroma utječući na razine HDL-a i inzulina (86–89). Zanimljivo je da je istraživanje na američkoj populaciji pokazalo da navedeni alel u njihovoj populaciji smanjuje rizik od GD-a (86).

S obzirom na složenu interakciju gena i okoliša u razvoju GD-a istraživanja genetičkih varijacija i njihove povezanosti s GD-om predstavljaju dinamično područje istraživanja s brojnim otvorenim pitanjima.

## 1. Uvod

### 1.13. Rutinski biokemijski parametri u gestacijskom dijabetesu

Mnogi su rutinski biokemijski i hematološki parametri proučavani kod GD-a, posebno u svrhu prediktivne vrijednosti i ranog prepoznavanja GD-a.

Najčešće ispitivan biljeg plazmatska je koncentracija glukoze natašte, međutim autori su pokazali različite granične vrijednosti koncentracije glukoze za dijagnozu i predviđanje GD-a. Tako su se granične koncentracije glukoze natašte u prvom tromjesečju kretale od iznad 5 mmol/L (90) preko 4,7 mmol/L (91) do 4,5 mmol/L za optimalnu specifičnost i osjetljivost za predviđanje GD-a (92). Koncentracija glukoze u plazmi natašte pokazala se točnija od drugih tradicionalnih čimbenika rizika, kao što su indeks tjelesne mase (ITM) ili dob, kada se koristila za predviđanje GD-a, ali je bila manje točna od OGTT-a (90, 93).

C-reaktivni protein (CRP) i visoko osjetljivi C-reaktivni protein (hs-CRP, engl. *high sensitive C reactive protein*) upalni su markeri, a povišeni su u trudnoći. Trudnice s GD-om pokazuju čak i više koncentracije u usporedbi sa zdravim trudnicama, no ako se uključi i ITM i pretilost, odnos između CRP-a i GD-a postaje slabiji ili nestaje (94). Stoga je zbog niske specifičnosti malo vjerojatno da CRP može biti koristan kao neovisni i specifični marker za GD.

Procjena homeostatskog modela za inzulinsku rezistenciju (HOMA-IR, od engl. *homeostatic model assesment for insuline resistance*) izračunava se iz vrijednosti glukoze natašte i inzulina natašte ili C-peptida. HOMA-IR zbog većeg lučenja inzulina i viših vrijednosti glukoze očekivano je dobar biljeg GD-a, međutim istraživanja su umanjila njegov značaj u usporedbi s drugim parametrima ili pokazala da nema razlike između zdravih trudnica i trudnica s GD-om, stoga je njegov značaj i dalje nejasan (12).

### 1.14. Hormoni u gestacijskom dijabetesu

Inzulin je najvažniji hormon u regulaciji homeostaze glukoze i slobodnih masnih kiselina te svojim djelovanjem sprječava pojavu ketonskih spojeva. Sintetizira se u  $\beta$ -stanicama Langerhansovih otočića u gušterači te potiče ulazak glukoze u stanice mišićnog i masnog tkiva. Stimulira glikolizu, proteolizu i ketogenezu, a njegov se učinak



## 1. Uvod

smanjuje 50 – 70 % u zadnjem tromjesečju trudnoće, zbog čega se kod zdravih trudnica pojačano luči inzulin te povećava inzulinska rezistencija.

C-peptid marker je funkcije  $\beta$ -stanica gušterače te se sintetizira u ekvivalentnim količinama kao i inzulin i može se koristiti za procjenu njegova endogenog lučenja. U kliničkoj je praksi koristan za razlikovanje T1DM i T2DM, otkrivanje apsolutnog nedostatka inzulina i može se koristiti u praćenju prognoze dijabetesa. C-peptid nije samo marker za izlučivanje inzulina, već i biološki aktivni peptid. Pronađena je pozitivna povezanost njegove serumske vrijednosti i GD-a (95, 96).

Humani placentarni laktogen hormon je koji proizvodi posteljica tijekom trudnoće, a ima djelovanje suprotno inzulinu te tako smanjuje iskoristivost glukoze, povisuje mobilizaciju masnih kiselina i potiče lipolizu. Primarna mu je uloga priprema za dojenje i opskrbu novorođenčeta hranjivim tvarima, stoga najviše koncentracije ima u zadnjem tromjesečju trudnoće. Njegova razina raste za vrijeme gladovanja (97). Visoke koncentracije humanog placentarnog laktogena u trudnoći mogu dovesti do nastanka GD-a.

Protein koji veže spolne hormone (SHBG, engl. *sex hormone binding globulin*) glikoprotein je koji proizvodi jetra. Njegovu proizvodnju i koncentraciju u plazmi kontroliraju inzulin, estrogen i progesterin. SHBG ima obrnut odnos s inzulinskom rezistencijom i stoga je predložen kao prediktivni marker za GD. Sintezu SHBG-a stimulira estradiol, što znači da visoke koncentracije estrogena tijekom trudnoće povećavaju njegovu koncentraciju (98, 99). Testosteron smanjuje sintezu SHBG-a, a niske koncentracije SHBG-a s visokim koncentracijama testosterona povezane su s T2DM. Niže vrijednosti SHBG-a prije trudnoće i u ranoj trudnoći povezane su s povećanim rizikom od GD-a (100).

Progesteron je hormon čija je primarna uloga u održavanju menstrualnog ciklusa i trudnoće. To je steroid koji stabilizira trudnoću, a također značajno utječe na homeostazu glukoze u trudnoći. Progesteron (čiji su receptori prisutni u  $\beta$ -stanicama) prvenstveno je dijabetogeni steroid koji djeluje supresijom ekspresije GLUT-4 transportera. Povećana aktivnost gušterače u zadnjem trimestru trudnoće povezana je s povišenim razinama progesterona i adaptivni je odgovor na sve veće energetske potrebe fetusa koje zahtijevaju povećani unos glukoze i lipida. Progesteron djeluje u kombinaciji s drugim hormonima i vjerojatno je središnji regulator proliferacije  $\beta$ -stanica gušterače kao odgovor na metaboličke izazove kao što je inzulinska rezistencija (101).

## 1. Uvod

Tijekom trudnoće razine inzulina u plazmi rastu zajedno s povećanjem estradiola. Estrogeni sudjeluju u brzom negenomskoj i u sporom genomskoj regulaciji lučenja inzulina. Što se tiče negenomskih učinaka estrogena, estradiol se veže na estrogenske receptore, dok je kod genomске regulacije to putem aktivacije membranski iniciranih signalnih puteva (101).

Kortizol je najvažniji ljudski glukokortikoid koji se proizvodi u kori nadbubrežne žlijezde odraslih, a njegovu proizvodnju kontrolira osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda. Također je poznato da kortizol potiskuje imunološki odgovor i utječe na homeostazu glukoze. Fetus proizvodi kortizol u sličnoj zoni poznatoj kao prijelazna zona fetalne nadbubrežne žlijezde, ali njegova proizvodnja uvelike ovisi o placentalnom kortikotropin-otpuštajućem hormonu (CRH, engl. *corticotropin-releasing hormone*), s kojim kortizol može generirati pozitivnu povratnu spregu. Trudnoća je proupalno stanje te visoke razine CRH u majčinoj krvi stimuliraju placentalnu proizvodnju proupalnih citokina kao što su TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-8. Kortizol, čije lučenje stimulira CRH, ima protuupalni učinak koji je povezan s inzulinskom rezistencijom te tako smanjuje proupalno djelovanje izazvano visokim vrijednostima CRH. Kortizol se kod GD-a spominje i u kontekstu povećanja kao hormon stresa i poremećajima prilagodbe na stres s kojim može biti povezana patogeneza GD-a (101).

Prolaktin i posteljini laktogen uključeni su u prilagodbe stanica povezanih s trudnoćom, kao i kod periferne inzulinske rezistencije i povećane lipolize (27).

### 1.15. Liječenje gestacijskog dijabetesa

Vodeću ulogu u prevenciji i liječenju GD-a ima životni stil koji uključuje uravnoteženu prehranu, redovitu tjelesnu aktivnost, normalan ITM i kontroliran porast tjelesne mase u trudnoći. Promjena životnog stila najčešće se primjenjuje u liječenju GD-a te je s njom moguće postići zadovoljavajuće glikemijske ciljeve u trudnoći kod 80 – 90 % trudnica (102). Prema ADA smjernicama za uspješnu regulaciju glukoze u trudnoći potrebno je da glukoza natašte bude  $\leq 5,3$  mmol/L, glukoza jedan sat nakon obroka  $\leq 7,8$  mmol/L te glukoza dva sata nakon obroka  $\leq 6,7$  mmol/L (103).

Prvi je korak kod trudnica s GD-om pokušati dijetoterapijom postići normoglikemiju osiguravši pri tom odgovarajući prirast tjelesne mase kako bi se osiguralo zdravlje majke i ploda te spriječiti nastanak ketoze. Trudnice bi se trebale pridržavati plana

## 1. Uvod

prehrane, koji uključuje tri glavna obroka i međuobroke, te određenog kalorijskog unosa. Potreban kalorijski unos određuje se ovisno o ITM-u te je on za trudnice normalnog ITM-a 30 kcal po kilogramu tjelesne mase, a porastom ITM-a opada broj potrebnih kalorija (102). Uz pridržavanje plana prehrane potrebna je i samokontrola glukoze u krvi, najmanje četiri puta dnevno. Stoga se najčešće trudnicama izvodi profil glukoze u zdravstvenoj ustanovi pod liječničkim nadzorom, kako bi se prepoznale trudnice kojima je potrebno medikamentno liječenje. Osim trudnicama kojima nije uspostavljena regulacija normoglikemije dijetoterapijom, medikamentna se terapija uključuje i trudnicama koje su imale značajno povišene koncentracije glukoze.

Prvi izbor u liječenju GD-a je inzulin, s obzirom na to da ne postoje podatci o dugoročnoj sigurnosti oralnih antihyperglikemika (22, 103). Terapija inzulinom oponaša fiziološku ulogu inzulina na metabolizam i homeostazu glukoze te se tako održava normoglikemija. Prilikom doziranja inzulina potreban je individualni pristup trudnici, s obzirom na njezinu samokontrolu i napredovanje trudnoće. Tijekom primjene terapije inzulinom nužna je i samokontrola glukoze u krvi (102).

Primjena metformina je danas učestalija u terapijskim protokolima i kliničkoj primjeni zbog dobrih perinatalnih ishoda, dok je primjena derivata sulfonilureje gliburida u svrhu liječenja GD-a kontroverzna te su potrebna daljnja istraživanja na ovu temu jer nema jasnih podataka koliko je navedena terapija negativna za majku i plod (22, 102, 103).

### 1.16. Važnost ranog prepoznavanja gestacijskog dijabetesa

GD uzrokuje kratkoročne i dugoročne komplikacije za majku i dijete, s obzirom na zdravlje majke. Žene kojima je dijagnosticiran GD imaju znatno veću vjerojatnost da će kasnije u životu razviti T2DM. Gotovo 10 % žena s GD-om razvije ubrzo nakon poroda T2DM, a 20 – 60 % trudnica koje su imale GD razvije T2DM unutar 5 – 10 godina nakon trudnoće. Rizik od prenatalnih problema koje donosi GD znatno je manji od vjerojatnosti da majka razvije T2DM, stoga se za GD može reći da je predijabetes i sličan intoleranciji glukoze u osoba koje nisu trudne (104).

Majčina hiperglikemija rezultira fetalnom hiperglikemijom jer glukoza prolazi u posteljicu olakšanom difuzijom. Fetalna hiperglikemija dovodi do fetalne hiperinzulinemije, anabolizma, porasta adipoznog tkiva i ubrzanog rasta fetusa i naposljetku makrosomije (10). Vaginalni porod bit će veći izazov ako je čedo veliko. U

## 1. Uvod

mnogim slučajevima GD-a, često se mora poroditi kirurški zbog povećanog rizika od naknadnih problema trudnoće, kao što su prijevremeni porod i hipertenzija. Obilno krvarenje i postporođajno krvarenje mogu se pojaviti kao posljedica nepravilne kontrakcije mišića maternice. Kirurški porod povećava rizik i od porođajnih trauma za novorođenče, ozljeda ramena, prijeloma brahijalnog pleksusa i perinatalne asfiksije. Fetalna hiperinzulinemija povećava i rizik od sindroma respiratornog distresa, neonatalne hipoglikemije i hiperbilirubinemije. Djeca čije su majke imale GD imaju veći rizik za kogenitalne anomalije, pretilost, poremećenu toleranciju glukoze i razvoj kardiovaskularnih bolesti (9). Povišene koncentracije glukoze prvih 10 tjedana trudnoće najznačajnije su s obzirom na to da se tada odvija organogeneza te one dovode do embriopatije, posebice encefalopatije, mikrocefalije, kogenitalnih srčanih bolesti i renalnih anomalija (105).

Trudnice kojima je dijagnosticiran GD imaju veći rizik za razvoj drugih komplikacija, kao što su preeklampsija i hipertenzija u trudnoći, od zdravih trudnica. Kasnije u životu, osim što imaju veći rizik od razvoja T2DM, žene koje su u trudnoći razvile GD imaju i veći rizik za pretilost, dislipidemiju, hipertenziju i razvoj kardiovaskularnih bolesti (106, 107). Zbog svih navedenih rizičnih čimbenika ADA je izdala nove preporuke prema kojima se već u pubertetu trebaju održati konzultacije s dijabetičarima i potencijalnim dijabetičarima, treba se razgovarati s liječnikom o planiranju obitelji te održavati vrijednosti HbA1c u granicama normale (105).

Iako su postignuti značajni napreci u dijagnostici i liječenju GD-a, još uvijek postoje brojne nejasnoće u njegovoj patofiziologiji, te su potrebna dodatna istraživanja kako bi bolje razumjeli mehanizme nastanka GD-a, identificirali nove biljege za njegovu ranu dijagnostiku, razvili personalizirane pristupe liječenju te smanjili rizik od razvoja kroničnih bolesti u kasnijem životu majke i djeteta. Potreban je multidisciplinarni pristup GD-u zbog složenosti ovog zdravstvenog stanja, njegove patofiziologije koja je rezultat međudjelovanja hormonalnih, metaboličkih i genetičkih čimbenika te zbog širokih implikacija GD-a. Raspodjela limfocita i njihova povezanost s lučenjem proupalnih i protuupalnih citokina kod trudnica s GD-om nije u potpunosti razjašnjena, te bi nova saznanja mogla dovesti do ranije dijagnoze i personaliziranog pristupa trudnicama s GD-om.

## 2. Hipoteza

### **2. HIPOTEZA**

Trudnice s gestacijskim dijabetesom imaju veći omjer NKT/NK-stanica i omjer B1/B2-limfocita te manji omjer pomagačkih/citotoksičnih limfocita u odnosu na zdrave trudnice.

Navedeni omjeri u gestacijskom dijabetesu koreliraju s povišenim vrijednostima proupalnih faktora (IL-6 i TNF- $\alpha$ ), odnosno sniženim protuupalnim faktorima (IL-10 i adiponektin) i njihovim polimorfizmima te u skupini trudnica s gestacijskim dijabetesom postoje razlike ovisno o dodatnim komplikacijama u trudnoći.

### 3. Ciljevi istraživanja

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni je cilj utvrditi postoje li razlike u omjerima NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita između trudnica s gestacijskim dijabetesom i zdravih trudnica.

Specifični ciljevi:

1. odrediti vrijednosti proupalnih (IL-6 i TNF- $\alpha$ ) i protuupalnih faktora (IL-10 i adiponektin)
2. odrediti genotipove za polimorfizme jednog nukleotida: rs1800629 (TNF- $\alpha$ ), rs1800796 (IL-6), rs1800896 (IL-10) i rs266729 (ADIPQ)
3. odrediti udio hematoloških parametara protočnom citometrijom te izračunati omjere NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita
4. ispitati korelaciju dobivenih omjera s vrijednostima proupalnih i protuupalnih faktora te razinu povezanosti sa specifičnim varijantama njihovih gena i usporediti dobivene rezultate između zdravih trudnica bez komplikacija i s komplikacijama i trudnica s gestacijskim dijabetesom bez drugih komplikacija i s drugim komplikacijama
5. ispitati korelaciju dobivenih omjera s vrijednostima rutinskih hematoloških (brojem eritrocita, leukocita, trombocita, koncentracijom hemoglobina, te postotkom neutrofila, limfocita, monocita, eozinofila, bazofila, T-limfocita, pomagačkih T-limfocita, citotoksičnih T-limfocita, B-limfocita, B1-limfocita, NK-stanica, NKT-stanica), biokemijskih (glukoza, glikirani hemoglobin, CRP, imunoglobulini, željezo, feritin, kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, trigliceridi) i imunokemijskih parametara (inzulin, C-peptid, HOMA-IR, vitamin B12, folna kiselina, NT-proBNP).

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Ustroj studije postavljen je kao presječno istraživanje. Istraživanje je učinjeno u skladu s Nürnberškim kodeksom i najnovijom revizijom Helsinške deklaracije (108), Zakonom o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN121/03) i Zakonom o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04) te su poštivana sva etička načela. Osigurana je privatnost i zaštita tajnosti podataka svih ispitanica uključenih u istraživanje. Sve su ispitanice pročitale opis istraživanja i potpisale informirani pristanak.

Prikupljanje i obradu biološkog materijala te prikupljanje medicinske dokumentacije odobrilo je Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Osijeku (kl: 602-04/23-08/03, br: 2158-61-46-23-142), Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Osijek (br: R1-8243/2023) te Etičko povjerenstvo Nacionalne memorijalne bolnice „dr. Jurjaj Njavro“ Vukovar (kl: 510-05/23, br: 107-16-23-08-04).

### 4.2. Ispitanici

U istraživanje su uključene 162 trudnice u trećem trimestru trudnoće podijeljene u 4 skupine: trudnice s gestacijskim dijabetesom bez komplikacija koje mogu utjecati na imunološki profil trudnice, trudnice s gestacijskim dijabetesom i dodatnim komplikacijama koje mogu utjecati na imunološki profil trudnice, kontrolna skupina trudnica (koje nisu razvile gestacijski dijabetes) bez komplikacija koje mogu utjecati na imunološki profil trudnice i kontrolna skupina trudnica (trudnice koje nisu razvile gestacijski dijabetes) s komplikacijama koje mogu utjecati na imunološki profil trudnice. Gestacijski dijabetes u trudnoći definiran je prema HKMB-u i HDGO-u, odnosno IADP-SG-u (19, 25, 26).

Kriteriji za uključivanje ispitanica bili su:

- trudnice u trećem trimestru trudnoće (27. – 40. gestacijski tjedan)
- trudnice koje u aktualnoj trudnoći imaju normalne vrijednosti glukoze, HbA1c i uredan nalaz OGTT testa, nemaju gestacijski dijabetes ili drugu patologiju trudnoće, nemaju

#### 4. Materijali i metode

dijabetes niti poznate autoimune ili metaboličke bolesti izvan trudnoće, uvrštene su u skupinu zdravih ispitanica bez komplikacija

- trudnice koje imaju u aktualnoj trudnoći normalne vrijednosti glukoze, HbA1c i uredan nalaz OGTT testa, ali su imale gestacijski dijabetes u prethodnoj trudnoći ili imaju autoimune bolesti, poremećaje krvnog tlaka, sindrom policističnih jajnika, pretilost izvan trudnoće ili su se neki od navedenih komorbiditeta razvili u trudnoći, uvrštene su u skupinu zdravih ispitanica s komplikacijama
- trudnice kojima je tijekom aktualne trudnoće dijagnosticiran GD prema IADP-SG smjernicama i nemaju drugih komplikacija u trudnoći, uvrštene su u skupinu trudnica s GD-om
- trudnice kojima je tijekom aktualne trudnoće dijagnosticiran GD prema IADP-SG smjernicama i imaju preeklampsiju, visoki krvni tlak ili neku bolest imunološkog sustava izvan trudnoće ili u aktualnoj trudnoći, uvrštene su u skupinu trudnica s GD-om s komplikacijama.

Kriteriji za isključivanje ispitanica iz istraživanja:

- nepotpisivanje informiranog pristanka
- dijagnoza dijabetesa izvan trudnoće
- poznate druge metaboličke bolesti izvan trudnoće.

#### 4.3. Metode

Klinički dio znanstvenog istraživanja proveden je u Klinici za ginekologiju i porodništvo KBC-a Osijek, a laboratorijski dio proveden je na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek, Odjelu za laboratorijsku i transfuzijsku medicinu NMB-a Vukovar te u Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Svaka ispitanica uključena u istraživanje bila je upoznata sa svrhom i metodologijom istraživanja, a pristanak na sudjelovanje u istraživanju potvrdila je davanjem pisane informirane suglasnosti.

Gestacijska dob svih ispitanica određena je prvim danom zadnjeg menstrualnog ciklusa te potvrđena ultrazvučnim nalazom prvog tromjesečja. U slučaju da je došlo do nepodudaranja termina poroda s obzirom na prvi dan zadnjeg menstrualnog ciklusa



#### 4. Materijali i metode

i ultrazvučnog nalaza, izvršila se korekcija gestacijske dobi prema ultrazvučnom nalazu (109).

Sociodemografski i klinički podatci prikupljeni su u suradnji s trudnicama, a koristila se i dostupna medicinska dokumentacija o trudnoći. Prikupljeni su podatci vezani uz fizikalni status ispitanica prije i tijekom trudnoće, obiteljsku i osobnu anamnezu ispitanica, prehrambene navike i životni stil trudnice te prethodne događaje u trudnoći. Opći podatci obuhvaćali su dob i stručnu spremu trudnice. Prikupljeni su podatci visine i težine prije trudnoće iz čega je izračunat ITM prije trudnoće. Svaka je trudnica dala podatke o svom životnom stilu koji su uključivali podatke o pušenju, konzumaciji kave i alkohola, dnevnoj fizičkoj aktivnosti i raznolikosti prehrane. Od svake trudnice uključene u istraživanje prikupljena je i osobna anamneza koja je uključivala povijest bolesti (endokrine, metaboličke, gastrointestinalne i neurološke bolesti te poremećaji koagulacije i tromboembolijske bolesti) i prisutnost šećerne bolesti u obitelji. Ginekološka i opstetrijska anamneza koja je prikupljana obuhvaćala je podatke o dobi prilikom prve mjesečnice, podatke o menstrualnom ciklusu, policističnim jajnicima, problemima sa zanošenjem te podatke o prijašnjim trudnoćama. Ako je neka od prethodnih trudnoća završila pobačajem, prikupljeni su podatci o tjednu pobačaja. Zabilježeni su podatci o GD-u u prethodnoj trudnoći, tjelesnoj težini novorođenčeta, povišenom krvnom tlaku i poremećajima štitnjače za svaku prijašnju trudnoću ispitanica uključenih u istraživanje.

Venska krv trudnica uzorkovala se jednokratno, nakon dobivenog informiranog pristanka, u trećem trimestru trudnoće. Svakoj se trudnici uzorkovalo dvije epruvete periferne venske krvi u BD Vacutainer (Beckton Dickinson, New Jersey, SAD) s antikoagulansom K<sub>3</sub>EDTA i jedna serumska epruveta periferne venske krvi u BD Vacutainer (Beckton Dickinson, New Jersey, SAD). Analize su učinjene u uzorcima svježe pune krvi i seruma. Serum je pripremljen centrifugiranjem serumske epruvete 10 minuta na 3000 g na sobnoj temperaturi.

Krvna slika i diferencijalna krvna slika određeni su iz venskog uzorka pune krvi (izvađenog u epruvetu s antikoagulansom K<sub>3</sub>EDTA) na hematološkom analizatoru ADVIA 2120i (Siemens Healthineers, Erlangen, Njemačka) na Odjelu za laboratorijsku i transfuzijsku medicinu NMB-a Vukovar. U istraživanje su uvršteni rezultati broja

#### 4. Materijali i metode

leukocita, eritrocita i trombocita, koncentracija hemoglobina te postotci neutrofila, limfocita, monocita, eozinofila i bazofila dobiveni analizom na hematološkom brojaču.

Analize glukoze, inzulina, C-peptida, triglicerida, ukupnog kolesterola, HDL i LDL kolesterola, CRP-a, IgA, IgM, IgG, HbA1c, NT-proBNP, IL-6, željeza, feritina, vitamina B12 i folne kiseline učinjene su na automatiziranom analizatoru cobasPro (Roche Diagnostic, Basel, Švicarska) na Odjelu za laboratorijsku i transfuzijsku medicinu u NMB-u Vukovar. Inzulin, C-peptid, IL-6, NT-proBNP, vitamin B12 i folna kiselina određeni su imunokemijskom metodom elektrokemiluminescencije. Glukoza je učinjena referentnom enzimatskom metodom s heksokinazom. Kolorimetrijskom metodom s ferozinom određeno je željezo, a enzimatskim kolorimetrijskim metodama određeni su i trigliceridi, ukupni kolesterol te HDL i LDL kolesterol. CRP, feritin i imunoglobulini određeni su metodom turbidimetrije. Turbidimetrijska imunokemijska inhibicijska metoda korištena je za određivanje HbA1c u uzorcima ispitanica.

Analize IL-10 i TNF- $\alpha$  učinjene su kemiluminescentnim imunokemijskim metodama krute faze u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek na analizatoru Immulite 2000 (Siemens Healthineers, Erlangen, Njemačka).

Profil B-limfocita, pomagačkih i citotoksičnih limfocita te NK i NKT stanica određen je u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Osijek svim ispitanicama metodom protočne citometrije na analizatoru BD FACSLyric (Beckton Dickinson, Njemačka) iz uzorka pune EDTA krvi. Analize su učinjene određivanjem razine izražaja staničnih diferencijacijskih biljega (CD, engl. *cluster of differentiation*) biljega (antigena) na površini stanica pomoću komercijalnih reagensa koji sadrže specifična monoklonska protutijela obilježena fluorokromom: BD Multitest CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, BD Multitest CD3 FITC/CD16+56 PE/CD45 PerCP/CD19 APC (Beckton Dickinson, Njemačka).

Uzorci su pripremljeni za analizu prema uputama proizvođača reagensa. 100  $\mu$ L pune EDTA krvi ispitanice i 20  $\mu$ L antitijela dodani su u čistu epruvetu te vorteksirani. Smjesa je inkubirana 20 minuta na sobnoj temperaturi u mraku te je zatim dodano 2 mL BD Lyse Solution otopine i ponovljena je inkubacija u mraku na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 minuta. Smjesa je zatim centrifugirana 5 minuta na 300 g te je odvojen supernatant. U talog je dodano 2 mL BD Wash otopine te se ponovilo centrifugiranje

#### 4. Materijali i metode

od 5 minuta na 300 g. Nakon centrifugiranja odvojen je supernatant i u talog je dodano 250  $\mu$ L BD Wash otopine i vorteksirano te je takav uzorak postavljen na analizator BD FACSLyric.

Adiponektin je svim trudnicama određen u serumu ELISA metodom (BioVendor R&D, Brno, Češka). Komercijalni standardi, kontrole kvalitete u dvije razine te uzorci ispitanica inkubirani su na ELISA pločici obloženoj rekombinantnim adiponektinom ljudskog podrijetla, zajedno s poliklonalnim antitijelima na adiponektin konjugiranim s peroksidazom hrena (HRP, engl. *Horseradish peroxidase*). Nakon ispiranja dodan je na kompleks adiponektina i HRP konjugata tetrametilbenzidin (TMB) supstrat te je reakcija nakon 15 minuta zaustavljena kiselom STOP otopinom. Apsorbancija je izmjerena spektrofotometrijski na 450 nm i kontrolno na 630 nm. Absorbancija je obrnuto proporcionalna koncentraciji adiponektina u uzorcima. Standardna krivulja napravljena je uz pomoć poznatih vrijednosti i dobivenih absorbancija komercijalnih standarda u programu Microsoft Excel te su iz nje očitane vrijednosti uzoraka ispitanica.

Genomska deoksiribonukleinska kiselina (DNA, engl. *Deoxyribonucleic Acid*) izolirana je upotrebom komercijalnog kita prema protokolu proizvođača (QIAamp DNA Blood Midi Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Izolacija DNA započela je inkubacijom smjese koja je sadržavala 200  $\mu$ L pune krvi ispitanice, 200  $\mu$ L pufera za liziranje te 20  $\mu$ L proteinaze K. Smjesa je inkubirana 10 minuta na temperaturi 56 °C. Dodatkom 1000  $\mu$ L 100 %-tnog etanola došlo je do precipitacije DNA koja je zatim prebačena na silika-membranu unutar kolone. Smjesa je centrifugirana jednu minutu na 6000 g te se centrifugiranjem DNA vezala za membranu. Izolirana se DNA dodatno pročistila dodavanjem 500  $\mu$ L AW1 pufera i centrifugiranjem na 6000 g jednu minutu. *QIAamp Mini spin* kolona se nakon toga prebacila u novu epruvetu te joj je dodano 500  $\mu$ L pufera AW2 i centrifugirana je na 20 000 g tri minute. *QIAamp Mini spin* prebačena je u novu epruvetu te je dodano 100  $\mu$ L AE pufera i smjesa se inkubirala na sobnoj temperaturi jednu minutu, a zatim centrifugirala na 6000 g jednu minutu. Izolirana DNA čuvala se pohranjena na - 20 °C u AE puferu do analize. Koncentracija izolirane DNA određena je fluorometrijski na uređaju Qubit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD).

#### 4. Materijali i metode

Nakon izolacije i kvantifikacije DNA učinjena je genotipizacija polimorfizma jednog nukleotida metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (PCR engl. *real-time Polymerase Chain Reaction*). Za provođenje genotipizacije lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu korišten je uređaj 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) podešen na program za genotipizaciju uz uporabu TaqMan sonda (TaqMan SNP Genotyping Assays, Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD). Određeni su genotipovi za SNP-ove (SNV-ove) rs1800629 (*TNF- $\alpha$* ), rs1800796 (*IL-6*), rs1800896 (*IL-10*) i rs266729 (*AdipoQ*).

SNP rs1800629 u intronskoj regiji gena za *TNF- $\alpha$*  na lokaciji chr6:31575254 (GRCh38.p14) najčešće sadrži alel G koji može biti zamijenjen alelom A. Na kromosomu 7 nalazi se gen za *IL-6*, točnije na poziciji chr7:22726627 (GRCh38.p14) nalazi se SNV rs1800796 kod kojega se mogu naći aleli G>A / G>C, dok se gen za *IL-10* nalazi na kromosomu 1 te na poziciji chr1:206773552 (GRCh38.p14) nalazi se SNV rs1800896 kod kojeg može doći do varijanti alela T>C. Na lokaciji chr3:186841685 (GRCh38.p14) u genu za adiponektin nalazi se rs266729 kod kojeg može doći do zamjena alela C>A/ C>G / C>T.

TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Foster City, California, USA) i TaqMan™ SNP Genotyping Assays (Thermo Fisher Scientific, Foster City, California, USA) korišteni su za PCR reakciju. Ukupni reakcijski volumen po svakoj jažici bio je 25 mikrolitara i sadržavao je 1 mikrolitar DNA izolata.

#### 4.4. Statističke metode

Za statističku analizu korišten je statistički paket *MedCalc Statistical Software version 14.12.0* (*MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2014*) i *SPSS Statistics 23* (*IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.*), a dobiveni rezultati prikazani su tablično.

Kategorijski podatci predstavljeni su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike kategorijskih varijabli testirane su Hi-kvadrat testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlike numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Mann-Whitneyevim U-testom. Razlike normalno raspodijeljenih

#### 4. Materijali i metode

numeričkih varijabli za više od dvije nezavisne skupine testirane su Kruskal-Wallisovim testom (post hoc Conover) ili Friedmanovim testom (post hoc Conover) kod ponavljanih mjerenja. Povezanost numeričkih varijabli ocijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije  $\rho$  (rho). Statistička snaga alelnog testa povezanosti polimorfizma izračunata je *Genetic Power* kalkulatorom (<http://zzz.bwh.harvard.edu/gpc/cc2.html>), a testiranje Hardy-Weinberg ekvilibrija genotipskih frekvencija ( $\chi^2$  testom  $df = 1$ ) Hardy-Weinberg equilibrium kalkulatorom (<https://wpcalc.com/en/equilibrium-hardy-weinberg/>). Sve su P vrijednosti dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na 0,05.

## 5. REZULTATI

### 5.1. Opća i klinička obilježja ispitanica

Istraživanje je provedeno na 162 ispitanice podijeljene u četiri skupine: po 40 (25 %) ispitanica je u skupinama zdravih, zdravih s komplikacijama koje mogu utjecati na imunološki profil i u skupini ispitanica s GD-om i komplikacijama koje mogu utjecati na imunološki profil, dok su 42 (26 %) ispitanice u skupini samo s GD-om. Medijan dobi ispitanica je 31 godina, u rasponu od najmanje 19 do najviše 48 godina. Značajno su starije ispitanice s GD-om (Mann-Whitney U-test,  $P = 0,005$ ). Srednju stručnu spremu ili visoku stručnu spremu imaju 64 (40 %) ispitanice. U kontrolnoj skupini značajnije je više ispitanica visoke stručne spreme, dok je u skupini s GD-om značajnije više ispitanica srednje stručne spreme ( $\chi^2$  test,  $P = 0,02$ ). ITM prije trudnoće viši od  $30 \text{ kg/m}^2$  značajnije je više prisutan u skupini ispitanica s GD-om (Fisherov egzaktni test,  $P < 0,001$ ) (tablica 1).

Tablica 1. Opća obilježja ispitanica

	Broj (%) ispitanica			P
	kontrola (n = 80)	GD (n = 82)	ukupno (n = 162)	
skupine				
zdrave	40 (50)	0	40 (25)	
zdrave + komplikacije	40 (50)	0	40 (25)	
GD	0	42 (51)	42 (26)	-
GD+ komplikacije	0	40 (49)	40 (25)	
dob (godine) [medijan (interkvartilni raspon)]	30 (27 - 33)	32 (29 - 36)	31 (28 - 35)	<b>0,005<sup>†</sup></b>
razina obrazovanja				
SSS	23 (29)	41 (50)	64 (40)	
VŠS	21 (26)	13 (16)	34 (21)	<b>0,02*</b>
VSS	36 (45)	28 (34)	64 (40)	
ITM prije trudnoće				
< 19	6 (8)	1 (1)	7 (4)	
19 – 24,9	56 (70)	28 (34)	84 (52)	
25 – 29,9	15 (19)	26 (32)	41 (25)	
> 30	3 (4)	27 (33)	30 (19)	<b>&lt;0,001<sup>‡</sup></b>

\* $\chi^2$  test; <sup>‡</sup>Fisherov egzaktni test; <sup>†</sup>Mann-Whitney U-test; GD-gestacijski dijabetes, SSS-srednja stručna sprema, VŠS-viša stručna sprema, VSS-visoka stručna sprema, ITM-indeks tjelesne mase

## 5. Rezultati

S obzirom na životni stil 64 (40 %) ispitanice puši, 126 (78 %) ih konzumira kavu, i to značajnije više ispitanice s GD-om (Mann-Whitney U-test,  $P = 0,004$ ). Povremeno se fizičkom aktivnosti bave 63 (39 %) ispitanice, a dnevnu aktivnost manju od 30 minuta navodi 116 (72 %) ispitanica. Da im je prehrana raznolika, navele su 144 (89 %) ispitanice (tablica 2).

Tablica 2. Životni stil ispitanica

	Broj (%) ispitanica			<i>P</i>
	kontrola (n = 80)	GD (n = 82)	ukupno (n = 162)	
pušenje	26 (33)	38 (46)	64 (40)	0,07*
kava	60 (75)	66 (81)	126 (78)	0,40*
kava (broj šalica) [medijan (IQR)]	1 (1 – 2) [raspon 1 do 3]	2 (1 – 2) [raspon 1 do 4]	2 (1 – 2) [raspon 1 do 4]	<b>0,004†</b>
fizička aktivnost				
nikada	6 (8)	5 (6)	11 (7)	0,37‡
rijetko	25 (31)	34 (41)	59 (36)	
povremeno	31 (39)	32 (39)	63 (39)	
redovito	18 (23)	11 (13)	29 (18)	
dnevna aktivnost				
< 30 minuta	55 (69)	61 (74)	116 (72)	0,43*
> 30 minuta	25 (31)	21 (26)	46 (28)	
raznolika prehrana	73 (91)	71 (87)	144 (89)	0,35*

\* $\chi^2$  test; ‡Fisherov egzaktni test; †Mann-Whitney U-test; GD-gestacijski dijabetes

## 5. Rezultati

Šećerna bolest u obitelji bilježi se kod 30 (19 %) ispitanica, značajno više u skupini ispitanica s GD-om ( $\chi^2$  test,  $P = 0,005$ ) gdje 22 (27 %) ispitanice imaju šećernu bolest u obitelji. Lijekove izvan trudnoće uzimaju 33 (20 %) ispitanice, a u trudnoći njih 30 (19 %). Endokrine bolesti prisutne su kod 23 (14 %) ispitanice, a druge bolesti kod manjeg broja ispitanica (tablica 3).

Tablica 3. Povijest bolesti

	Broj (%) ispitanica			P
	kontrola (n = 80)	GD (n = 82)	ukupno (n = 162)	
šećerna bolest u obitelji	8 (10)	22 (27)	30 (19)	<b>0,005 *</b>
lijekovi izvan trudnoće	12 (15)	21 (26)	33 (20)	0,09 *
lijekovi u trudnoći	11 (14)	19 (23)	30 (19)	0,12 *
anemija	5 (6)	5 (6)	10 (6)	> 0,99 <sup>†</sup>
poremećaji koagulacije i tromboembolijski poremećaji	4 (5)	3 (4)	7 (4)	0,72 <sup>†</sup>
endokrine bolesti	10 (13)	13 (16)	23 (14)	0,54 *
gastrointestinalne bolesti	9 (11)	4 (5)	13 (8)	0,14 *
migrene	3 (4)	1 (1)	4 (2)	0,36 <sup>†</sup>
šum na srcu	1 (1)	0	1 (1)	0,49 <sup>†</sup>
povišeni lipidi	1 (1)	2 (2)	3 (2)	> 0,99 <sup>†</sup>
povišen krvni tlak	1 (1)	7 (9)	1 (1)	0,06 <sup>†</sup>
bubrežne bolesti	0	1 (1)	1 (1)	> 0,99 <sup>†</sup>

\* $\chi^2$  test; <sup>†</sup>Fisherov egzaktni test; GD-gestacijski dijabetes

Medijan dobi prilikom prve mjesečnice je 13 godina, u rasponu od 11 do 17 godina. Uredne cikluse imalo je 115 (71 %) ispitanica, a tragove krvarenja između ciklusa bilježi se kod 5 (3 %) ispitanica. Policistične jajnike ima 25 (16 %) ispitanica, a probleme sa zanošenjem 19 (12 %) ispitanica, značajnije više ispitanice u skupini s GD-om (Fisherov egzaktni test,  $P = 0,009$ ). Broj dosadašnjih poroda kreće se od 0 do 4, broj pobačaja od 0 do 3, a kod žena koje su pobacile medijan tjedna pobačaja bio je šesti gestacijski tjedan. U prethodnoj trudnoći povišen tlak značajnije je više imalo 11 (23 %)



## 5. Rezultati

ispitanica iz skupine s GD-om (Fisherov egzaktni test,  $P = 0,003$ ). Poremećaji rada štitnjače u prethodnoj trudnoći bilježe se kod 13 (14 %) ispitanica, a GD u prethodnoj trudnoći kod 15 (17 %) ispitanica. Novorođenče teže od 4000 g u prethodnoj trudnoći imalo je 14 (16 %) ispitanica (tablica 4).

Tablica 4. Ginekološka i opstetrička anamneza

	Broj (%) ispitanica			P
	kontrola (n = 80)	GD (n = 82)	ukupno (n = 162)	
dob (godine) prilikom prve mjesečnice [Medijan (IQR)]	13 (12 – 14) [raspon 11 do 17]	13 (12 – 14) [raspon 11 do 17]	13 (12 – 14) [raspon 11 do 17]	0,61 <sup>†</sup>
ciklusi				
uredni	57 (71)	58 (71)	115 (71)	
obilni	15 (19)	13 (16)	28 (17)	0,16 *
oskudni	3 (4)	0	3 (2)	
neredoviti	5 (6)	11 (13)	16 (10)	
spotting između ciklusa	3 (4)	2 (2)	5 (3)	0,68 *
policistični jajnici	14 (18)	11 (13)	25 (16)	0,45 *
problemi sa zanošenjem	4 (5)	15 (18)	19 (12)	<b>0,009 *</b>
broj poroda do sada [medijan (IQR)]	1 (0 – 1) [raspon 0 do 4]	1 (0 – 1) [raspon 0 do 3]	1 (0 – 1) [raspon 0 do 4]	0,92 <sup>†</sup>
broj pobačaja [medijan (IQR)]	0 (0 – 0) [raspon 0 do 2]	0 (0 – 1) [raspon 0 do 3]	0 (0 – 1) [raspon 0 do 3]	0,48 <sup>†</sup>
tjedan pobačaja (n = 15/21) [medijan (IQR)]	8 (6 – 10) [raspon 6 do 11]	8 (7 – 10) [raspon 0 do 23]	8 (6 – 9) [raspon 0 do 23]	0,18 <sup>†</sup>
povišen krvni tlak u prethodnoj trudnoći	1 (2)	11 (23)	12 (13)	<b>0,003 *</b>
poremećaji štitnjače u prethodnoj trudnoći	8 (19)	5 (11)	13 (14)	0,28 *
GD u prethodnoj trudnoći	4 (9)	11 (23)	15 (17)	0,07 *
novorođenče teže od 4000 g u prethodnoj trudnoći	7 (16)	7 (15)	14 (16)	0,89 *

IQR – interkvartilni raspon; \*Fisherov egzaktni test; <sup>†</sup>Mann-Whitney U-test; GD-gestacijski dijabetes

## 5. Rezultati

Značajno su više vrijednosti OGTT-a u skupini s GD-om u svim trima mjerenjima (Mann-Whitney U-test,  $P < 0,001$ ). Također, u svakoj skupini ispitanica značajna je razlika u vrijednostima OGTT-a između mjerenja (Friedmanov test,  $P < 0,001$ ). Razlika u kilogramima (između 1. i 3. trimestra) značajno je veća u kontrolnoj skupini, s medijanom 11 kg (Mann-Whitney U-test,  $P = 0,005$ ) (tablica 5).

Tablica 5. Razlike u vrijednostima OGTT-a

	Medijan (interkvartilni raspon)		$P^*$	$P^*$	Razlika (95 % raspon pouzdanosti)	$P^\dagger$
	kontrola (n = 80)	GD (n = 82)				
OGTT1	4,5 (4,23 - 4,7)	5,2 (4,7 - 5,7)			0,8 (0,6 – 1,0)	<b>&lt; 0,001</b>
OGTT2	7,1 (6,1 - 8,48)	10,3 (8,95 - 11)	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	2,9 (2,2 – 3,5)	<b>&lt; 0,001</b>
OGTT3	5,7 (5,3 - 7,08)	8,6 (6,9 - 10)			2,4 (1,7 – 3,1)	<b>&lt; 0,001</b>
razlika u kilogramima (1. i 3. trimestar)	11 (8 - 14,5)	10 (5 - 13)			-2 (-4 do -1)	<b>0,005</b>

\*Friedmanov test;  $^\dagger$ Mann-Whitney U-test; GD-gestacijski dijabetes, OGTT-oralni test tolerancije glukoze (engl. *oral glucose tolerance test*)

Terapiju za GD ima 17 (17 %) ispitanica i to najčešće dijetu, inzulin je, nakon uzorkovanja krvi, uveden kod njih 13 (16 %), a jedna ispitanica terapijski je dobila metformin. Druge komplikacije ( $\chi^2$  test,  $P = 0,001$ ), povišen krvni tlak ( $\chi^2$  test,  $P = 0,001$ ) i terapija u trudnoći ( $\chi^2$  test,  $P = 0,006$ ) značajnije su prisutne kod ispitanica s GD-om. Poremećaj rada štitnjače u trenutnoj trudnoći imaju 32 (20 %) ispitanice, bez značajne razlike u odnosu na skupine (tablica 6).

Tablica 6. Komplikacije u aktualnoj trudnoći

	Broj (%) ispitanica			$P$
	kontrola (n = 80)	GD (n = 82)	ukupno (n = 162)	
GD	0	79 (97,5)	79 (49)	-
terapija GD	0	17 (22)	17 (17)	-
koja terapija				
inzulin	0	13 (18)	13 (16)	-
metformin	0	1 (1)	1 (1)	-
dijeta	0	40 (54)	40 (53)	-
druge komplikacije	22 (28)	44 (54)	66 (41)	<b>0,001*</b>
povišen krvni tlak	1 (1)	13 (16)	14 (9)	<b>0,001*</b>
poremećaji štitnjače	12 (15)	20 (24)	32 (20)	0,14*
upale mokraćnog sustava	3 (4)	10 (12)	13 (8)	0,05*
upala rodnice	1 (1)	5 (6)	6 (4)	0,21 $^\dagger$
anemija	10 (13)	12 (15)	22 (14)	0,72*
terapija u trudnoći	23 (29)	41 (51)	64 (40)	<b>0,006*</b>

\* $\chi^2$  test;  $^\dagger$ Fisherov egzakti test; GD-gestacijski dijabetes

## 5. Rezultati

### 5.2. Hematološki i biokemijski parametri ispitanica

Vrijednosti eozinofila (Mann-Whitney U-test,  $P = 0,02$ ) i bazofila (Mann-Whitney U-test,  $P = 0,006$ ) značajnije su niže u skupini s GD-om. Značajno više vrijednosti kod ispitanica s GD-om u odnosu na kontrolnu skupinu pronađene su kod: inzulina (Mann-Whitney U-test,  $P = 0,04$ ), C-peptida (Mann-Whitney U-test,  $P = 0,002$ ), HbA1c (Mann-Whitney U-test,  $P = 0,002$ ), CRP-a (Mann-Whitney U-test,  $P = 0,003$ ), željeza (Mann-Whitney U-test,  $P = 0,03$ ), HDL-kolesterola (Mann-Whitney U-test,  $P = 0,003$ ) i triglicerida (Mann-Whitney U-test,  $P < 0,001$ ) (tablica 7 i tablica 8).

Tablica 7. Hematološki pokazatelji

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95 % raspon pouzdanosti	P*
	kontrola (n = 80)	GD (n = 82)			
eritrociti	3,93 (3,78 - 4,28)	4,03 (3,74 - 4,29)	0,03	-0,09 do 0,15	0,64
hemoglobin	120 (114 - 129)	121,5 (114 - 127,25)	1,0	-3,0 do 4,0	0,74
trombociti	221,5 (182,25 - 259,5)	235 (202,5 - 283,3)	17	0 do 35	0,05
leukociti	9,5 (8,33 - 11,18)	9,2 (7,88 - 10,9)	-0,3	-1 do 0,5	0,45
neutrofili	70 (66 - 75)	72 (67 - 77)	2	0 do 4	0,09
limfociti	22 (19 - 26)	21 (17 - 26)	-1	-3 do 1	0,20
monociti	5,5 (4,25 - 6)	5 (4 - 6)	0	-1 do 0	0,28
eozinofili	1 (1 - 2)	1 (0,5 - 2)	0	-1 do 0	<b>0,02</b>
bazofili	0 (0 - 0) [min 0 max 2]	0 (0 - 0) [min 0 max 1]	0	0 do 0	<b>0,006</b>
Limfociti - protočni citometar	17 (14 - 20,75)	16 (13 - 20)	-1	-2 do 1	0,28
T-limfociti	78,15 (73,75 - 81,6)	78,15 (73 - 82,1)	0,3	-1,6 do 2,2	0,79
pomagački T-limfociti	44,75 (41,35 - 49,58)	46,4 (41,23 - 52,03)	1,2	-1,1 do 3,4	0,31
citotoksični T-limfociti	29 (25,9 - 33,08)	28,4 (23,95 - 32,13)	-0,8	-2,8 do 1,0	0,39
pomagački/citotoksični limfociti	1,52 (1,26 - 1,97)	1,6 (1,32 - 2,1)	0,07	-0,09 do 0,23	0,37
NK-stanice	10,75 (8,13 - 14)	9,3 (7,1 - 13,75)	-0,9	-2,2 do 0,5	0,20
NKT-stanice	6 (3,88 - 9,15)	7 (4,2 - 11,05)	0,6	-0,7 do 2,1	0,41
NKT/NK	0,564 (0,308 - 1,04)	0,675 (0,38 - 1,45)	0,11	-0,04 do 0,27	0,15
B-limfociti	8,8 (7 - 11,58)	9,35 (6,9 - 12,8)	0,5	-0,6 do 1,6	0,38
B1-limfociti (ograda svi limfociti)	1,8 (1,1 - 2,48)	1,7 (1 - 2,5)	0	-0,3 do 0,3	0,89
B1-limfociti (ograda svi B-limfociti)	18,9 (12,48 - 28,25)	18,75 (12 - 29,53)	0	-3,1 do 3,2	0,98
B2-limfociti (ograda svi B-limfociti)	81,1 (71,8 - 87,5)	81,3 (70,5 - 88,0)	0	-3,2 do 3,1	0,98
B1/B2 limfociti	0,233 (0,143 - 0,393)	0,231 (0,136 - 0,419)	0	-0,046 do 0,047	0,98

\*Mann-Whitney U-test; GD-gestacijski dijabetes; NK-engl. *natural killer*, H

## 5. Rezultati

Tablica 8. Biokemijski pokazatelji

	Medijan (interkvartilni raspon)		Razlika	95 % raspon pouzdanosti	P*
	kontrola (n = 80)	GD (n = 82)			
glukoza	4,5 (4,2 - 4,7)	4,5 (4,1 - 4,83)	0	-0,2 do 0,1	0,92
inzulin	10,55 (7,8 - 14,1)	12,5 (7,9 - 18,83)	1,9	0,1 do 3,9	<b>0,04</b>
C-PEPTID	0,79 (0,64 - 1)	0,96 (0,72 - 1,25)	0,15	0,05 do 0,24	<b>0,002</b>
HOMA IR	2 (2 - 3)	2,5 (1,75 - 4)	0	0 do 1,0	0,07
HbA1c	34 (32,25 - 37)	36 (34 - 38)	2	1 do 3	<b>0,002</b>
CRP	3,35 (1,8 - 5,08)	4,8 (2,5 - 8,78)	1,5	0,5 do 2,7	<b>0,003</b>
imunoglobulin G	8,66 (7,68 - 10,12)	8,41 (7,54 - 10,1)	0	-0,55 do 0,5	0,97
imunoglobulin M	1,01 (0,83 - 1,45)	1,03 (0,84 - 1,42)	-0,02	-0,15 do 0,11	0,78
imunoglobulin A	1,68 (1,31 - 2,12)	1,53 (1,19 - 2,05)	-0,09	-0,27 do 0,09	0,31
željezo	14 (9 - 21)	16 (13 - 24)	3	0 do 5	<b>0,03</b>
feritin	15 (11 - 28)	20 (10 - 32)	3	-1 do 6	0,16
B12 vitamin	219,5 (173 - 282)	211,5 (163 - 264,3)	-11	-36 do 11	0,32
folna kiselina	35,55 (21,93 - 43,88)	33,8 (20,58 - 51,88)	0,3	-5,2 do 6,5	0,90
kolesterol	6,8 (6,03 - 7,98)	6,85 (5,9 - 7,73)	-0,2	-0,6 do 0,3	0,44
HDL-kolesterol	2 (1,8 - 2,3)	1,8 (1,5 - 2,03)	-0,2	-0,3 do -0,1	<b>0,003</b>
LDL-kolesterol	4,25 (3,7 - 5,28)	4,1 (3,08 - 4,8)	-0,3	-0,7 do 0,1	0,12
trigliceridi	2,4 (1,93 - 3)	3 (2,4 - 3,63)	0,6	0,3 do 0,8	<b>&lt; 0,001</b>
NT-proBNP	31 (19,5 - 52)	28 (19 - 47)	-3	-9 do 4	0,39
IL-6	2,5 (1,9 - 3,7)	2,7 (2 - 3,73)	0,1	-0,2 do 0,5	0,42
IL-10	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0	0 do 0	> 0,99
TNF- $\alpha$	0 (0 - 4,74)	4,26 (0 - 5,37)	0	0 do 0,48	0,10
adiponektin	9,95 (4,43 - 24,85)	17,25 (6,2 - 28,13)	3,1	-0,5 do 7,4	0,09

\*Mann-Whitney U-test; GD-gestacijski dijabetes; HOMA-IR-engl.*Homeostatic Model Assesment for Insulin Resistance*, HbA1c-glikirani hemoglobin, CRP-C-reaktivni protein, IL-interleukin, TNF-engl.*tumor necrosis factor*

Spearmanovim koeficijentom korelacije ispitala se povezanost omjera proupalnih i protuupalnih faktora s omjerom NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita kod svih ispitanica te u kontrolnoj skupini ili kod GD-a, i uočava se da u skupini svih ispitanica što je veći omjer NKT/NK -stanica ( $Rho = 0,163$ ) to su više vrijednosti IL-6. U skupini kontrolnih ispitanica uz viši omjer NKT/NK-stanica više su vrijednosti IL-6 ( $Rho = 0,284$ ), a uz više vrijednosti omjera pomagačkih/citotoksičnih limfocita ( $Rho = -0,305$ ) niže su vrijednosti IL-6. Kod ispitanica s GD-om što je viši omjer B1/B2, niže su vrijednosti adiponektina ( $Rho = -0,253$ ) (tablica 9).

## 5. Rezultati

Tablica 9. Povezanost omjera proupalnih i protuupalnih faktora s omjerom NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita kod svih ispitanica te u kontrolnoj skupini ili kod gestacijskog dijabetesa

	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P-vrijednost)		
	NKT/NK	pomagački/citotoksični limfociti	B1/B2-limfociti
sve ispitanice			
IL-6	<b>0,163 (0,04)</b>	-0,083 (0,30)	-0,053 (0,51)
IL-10	-	-	-
TNF- $\alpha$	0,001 (0,99)	0,029 (0,71)	0,036 (0,65)
adiponektin	-0,047 (0,55)	0,129 (0,10)	-0,125 (0,11)
kontrolna skupina			
IL-6	<b>0,284 (0,01)</b>	<b>-0,305 (0,01)</b>	-0,038 (0,74)
IL-10	-	-	-
TNF- $\alpha$	0,103 (0,36)	0,026 (0,82)	0,082 (0,47)
adiponektin	-0,106 (0,35)	0,106 (0,35)	0,033 (0,77)
GD			
IL-6	0,020 (0,86)	0,124 (0,27)	-0,063 (0,58)
IL-10	-	-	-
TNF- $\alpha$	-0,120 (0,29)	0,035 (0,75)	-0,027 (0,81)
adiponektin	-0,026 (0,82)	0,148 (0,18)	<b>-0,253 (0,02)</b>

GIL-interleukin, TNF-engl. *tumor necrosis factor*, GD-gestacijski dijabetes

Kod povezanosti biokemijskih pokazatelja i omjera uočava se u skupini svih ispitanica da je omjer NKT/NK-stanica u pozitivnoj i značajnoj vezi s postotcima T-limfocita (Rho = 0,331), citotoksičnih T-limfocita (Rho = 0,504), NKT-stanica (Rho = 0,821) te s koncentracijama C-peptida (Rho = 0,226) i triglicerida (Rho = 0,207), dok je veza negativna s postotkom NK-stanica (Rho = -0,531) i koncentracijom HDL-kolesterola (Rho = -0,232). Omjer pomagačkih/citotoksičnih limfocita u negativnoj je i značajnoj vezi s postotkom NKT-stanica (Rho = -0,456) te koncentracijama inzulina (Rho = -0,235), C-peptida (Rho = -0,190) i s izračunatim HOMA-IR (Rho = -0,200). Omjer B1/B2 u značajnoj je negativnoj vezi s postotkom T-limfocita (Rho = -0,166), a u pozitivnoj i značajnoj vezi s postotcima B-limfocita (Rho = 0,316) i B1-limfocita (Rho = 0,872) (tablica 10).

## 5. Rezultati

Tablica 10. Povezanost NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s hematološkim i biokemijskim pokazateljima kod svih ispitanica

	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P-vrijednost)		
	NKT/NK	pomagački/citotoksični limfociti	B1/B2-limfociti
eritrociti	-0,065 (0,41)	-0,008 (0,92)	0,116 (0,14)
hemoglobin	-0,087 (0,27)	0,015 (0,85)	0,130 (0,10)
trombociti	-0,052 (0,51)	0,148 (0,06)	-0,090 (0,26)
leukociti	-0,037 (0,64)	0,063 (0,43)	-0,091 (0,25)
neutrofili	-0,063 (0,43)	-0,113 (0,15)	0,008 (0,92)
limfociti	0,077 (0,33)	0,102 (0,20)	-0,034 (0,67)
monociti	-0,019 (0,82)	0,001 (0,99)	0,098 (0,21)
eozinofili	0,060 (0,45)	0,073 (0,36)	-0,019 (0,81)
bazofili	-0,022 (0,78)	0,007 (0,93)	-0,146 (0,06)
limfociti (%) – protočni citometar	0,040 (0,62)	0,042 (0,59)	-0,028 (0,72)
T-limfociti (%) CD3+	<b>0,331 (&lt; 0,001)</b>	0,056 (0,48)	<b>-0,166 (0,03)</b>
pomagački T-limfociti (%) CD3+CD4+	-0,141 (0,08)	<b>0,845 (&lt; 0,001)</b>	-0,127 (0,11)
citotoksični T-limfociti (%) CD3+CD8+	<b>0,504 (&lt; 0,001)</b>	<b>-0,901 (&lt; 0,001)</b>	-0,011 (0,89)
NK-stanice (%) CD3-CD16+56+	<b>-0,531 (&lt; 0,001)</b>	-0,046 (0,56)	0,111 (0,16)
NKT-stanice (%) CD3+CD16+56+	<b>0,821 (&lt; 0,001)</b>	<b>-0,456 (&lt; 0,001)</b>	0,017 (0,83)
B-limfociti (%) CD19+20+	0,023 (0,77)	-0,076 (0,34)	<b>0,316 (&lt; 0,001)</b>
B1-limfociti (%) CD19+CD5+ (ograda svi limfociti)	-0,009 (0,91)	-0,057 (0,47)	<b>0,872 (&lt; 0,001)</b>
glukoza	0,018 (0,82)	-0,005 (0,95)	0,034 (0,67)
inzulin	0,145 (0,07)	<b>-0,235 (&lt; 0,001)</b>	0,080 (0,31)
C-PEPTID	<b>0,226 (&lt; 0,001)</b>	<b>-0,190 (0,02)</b>	0,001 (0,99)
HOMA-IR	0,119 (0,13)	<b>-0,200 (0,01)</b>	0,091 (0,25)
HbA1c	0,036 (0,65)	0,017 (0,83)	-0,006 (0,94)
CRP	0,140 (0,08)	-0,081 (0,31)	0,027 (0,74)
imunoglobulin G	0,051 (0,52)	-0,104 (0,19)	-0,003 (0,97)
imunoglobulin M	-0,084 (0,29)	-0,031 (0,70)	0,001 (0,99)
imunoglobulin A	0,023 (0,77)	-0,010 (0,90)	-0,019 (0,81)
željezo	-0,104 (0,19)	-0,075 (0,34)	-0,107 (0,18)
feritin	0,061 (0,44)	0,049 (0,54)	-0,097 (0,22)
B12 vitamin	-0,119 (0,13)	-0,047 (0,56)	0,021 (0,79)
folna kiselina	-0,149 (0,06)	0,105 (0,18)	0,020 (0,80)
kolesterol	0,013 (0,87)	-0,009 (0,91)	0,016 (0,84)
HDL-kolesterol	<b>-0,232 (&lt; 0,001)</b>	0,102 (0,20)	0,036 (0,65)
LDL-kolesterol	0,018 (0,82)	-0,044 (0,58)	-0,020 (0,80)
trigliceridi	<b>0,207 (0,01)</b>	-0,046 (0,56)	-0,032 (0,69)
NT-proBNP	-0,112 (0,16)	0,139 (0,08)	-0,054 (0,50)

GD-gestacijski dijabetes; NK-engl.*natural killer*, HOMA-IR-engl.*Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*, HbA1c-glikirani hemoglobin, CRP-C-reaktivni protein

## 5. Rezultati

Značajne povezanosti omjera s biokemijskim pokazateljima kontrolne skupine prikazane su u tablici 11.

Tablica 11. Povezanost NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s hematološkim i biokemijskim pokazateljima kod ispitanica kontrolne skupine

Kontrolna skupina	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P vrijednost)		
	NKT/NK	pomagački/citotoksični limfociti	B1/B2-limfociti
eritrociti	-0,004 (0,97)	-0,098 (0,39)	0,061 (0,59)
hemoglobin	-0,073 (0,52)	-0,045 (0,69)	0,049 (0,67)
trombociti	0,069 (0,54)	0,088 (0,44)	-0,094 (0,41)
leukociti	0,072 (0,53)	-0,023 (0,84)	-0,045 (0,69)
neutrofili	0,094 (0,41)	<b>-0,256 (0,02)</b>	-0,087 (0,44)
limfociti	-0,081 (0,47)	0,211 (0,06)	0,042 (0,71)
monociti	-0,009 (0,94)	0,091 (0,42)	0,207 (0,07)
eozinofili	0,129 (0,26)	0,084 (0,46)	0,056 (0,62)
bazofili	-0,128 (0,26)	0,136 (0,23)	-0,215 (0,06)
limfociti (%) - protočni citometar	-0,056 (0,62)	0,050 (0,66)	0,081 (0,47)
T-limfociti (%) CD3+	<b>0,346 (&lt; 0,001)</b>	0,004 (0,97)	-0,122 (0,28)
pomagački T-limfociti (%) CD3+CD4+	-0,125 (0,27)	<b>0,840 (&lt; 0,001)</b>	-0,018 (0,87)
citotoksični T-limfociti (%) CD3+CD8+	<b>0,517 (&lt; 0,001)</b>	<b>-0,921 (&lt; 0,001)</b>	-0,040 (0,72)
NK-stanice (%) CD3-CD16+56+	<b>-0,509 (&lt; 0,001)</b>	-0,051 (0,65)	0,102 (0,37)
NKT-stanice (%) CD3+CD16+56+	<b>0,831 (&lt; 0,001)</b>	<b>-0,456 (&lt; 0,001)</b>	0,027 (0,81)
B-limfociti (%) CD19+20+	0,005 (0,97)	-0,014 (0,91)	0,159 (0,16)
B1-limfociti (%) CD19+CD5+ (ograda svi limfociti)	0,082 (0,47)	-0,038 (0,73)	<b>0,805 (&lt; 0,001)</b>
glukoza	-0,092 (0,42)	0,089 (0,43)	0,038 (0,74)
inzulin	0,041 (0,72)	-0,215 (0,06)	-0,034 (0,77)
C-PEPTID	0,197 (0,08)	-0,193 (0,09)	-0,050 (0,66)
HOMA IR	0,004 (0,97)	-0,176 (0,12)	0,013 (0,91)
HbA1c	-0,055 (0,63)	0,018 (0,88)	-0,007 (0,95)
CRP	<b>0,292 (0,01)</b>	-0,203 (0,07)	0,035 (0,76)
imunoglobulin G	0,040 (0,72)	-0,024 (0,83)	0,038 (0,74)
imunoglobulin M	-0,168 (0,14)	0,117 (0,30)	0,043 (0,70)
imunoglobulin A	0,006 (0,96)	0,015 (0,90)	-0,023 (0,84)
željezo	-0,034 (0,76)	-0,209 (0,06)	-0,120 (0,29)
feritin	0,195 (0,09)	-0,096 (0,40)	-0,136 (0,23)
B12 vitamin	-0,055 (0,63)	-0,054 (0,63)	-0,154 (0,17)
folna kiselina	-0,086 (0,45)	-0,032 (0,78)	-0,091 (0,42)
kolesterol	-0,023 (0,84)	-0,020 (0,86)	0,125 (0,27)
HDL-kolesterol	<b>-0,238 (0,03)</b>	0,139 (0,22)	0,112 (0,32)
LDL-kolesterol	-0,028 (0,80)	0,016 (0,89)	0,063 (0,58)
trigliceridi	0,203 (0,07)	<b>-0,237 (0,03)</b>	-0,041 (0,72)
NT-proBNP	-0,082 (0,48)	0,216 (0,06)	0,076 (0,51)

GD-gestacijski dijabetes; NK-engl.*natural killer*, HOMA-IR-engl.*Homeostatic Model Assesment for Insulin Resistance*, HbA1c-glikirani hemoglobin, CRP-C-reaktivni protein

## 5. Rezultati

Kod povezanosti biokemijskih pokazatelja i omjera u skupini ispitanica s GD-om uočava se da je omjer NKT/NK-stanica u pozitivnoj i značajnoj vezi s postotcima limfocita (Rho = 0,249), T-limfocita (Rho = 0,318), citotoksičnih T-limfocita (Rho = 0,527), NKT-stanica (Rho = 0,514) i s koncentracijom C-peptida (Rho = 0,232), dok je veza negativna s brojem trombocita (Rho = -0,227), postotcima neutrofila (Rho = -0,243) i NK-stanica (Rho = -0,514). Omjer pomagačkih/citotoksičnih limfocita u negativnoj je i značajnoj vezi s postotkom NKT-stanica (Rho = -0,471), koncentracijom inzulina (Rho = -0,276) i s HOMA-IR (Rho = -0,243), dok je u pozitivnoj vezi s folnom kiselinom (Rho = 0,234). Omjer B1/B2-limfocita u značajnoj je pozitivnoj vezi s postotkom B-limfocita (Rho = 0,441) i B1-limfocita (ograda svi limfociti) (Rho = 0,915) (tablica 12 i tablica 13).

Tablica 12. Povezanost NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s hematološkim pokazateljima ispitanica s gestacijskim dijabetesom

GDM	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P-vrijednost)		
	NKT/NK	pomagački/citotoksični limfociti	B1/B2-limfociti
eritrociti	-0,092 (0,41)	0,034 (0,76)	0,189 (0,09)
hemoglobin	-0,103 (0,36)	0,073 (0,51)	0,210 (0,06)
trombociti	<b>-0,227 (0,04)</b>	0,200 (0,07)	-0,105 (0,35)
leukociti	-0,105 (0,35)	0,147 (0,19)	-0,155 (0,16)
neutrofili	<b>-0,243 (0,03)</b>	0,007 (0,95)	0,102 (0,36)
limfociti	<b>0,249 (0,03)</b>	0,012 (0,92)	-0,107 (0,34)
monociti	-0,029 (0,80)	-0,068 (0,55)	-0,004 (0,97)
eozinofili	0,035 (0,76)	0,096 (0,39)	-0,099 (0,38)
bazofili	0,190 (0,09)	-0,138 (0,21)	-0,114 (0,31)
limfociti (%) – protočni citometar	0,147 (0,19)	0,050 (0,65)	-0,122 (0,27)
T-limfociti (%) CD3+	<b>0,318 (&lt; 0,001)</b>	0,092 (0,41)	-0,200 (0,07)
pomagački T-limfociti (%) CD3+CD4+	-0,185 (0,10)	<b>0,857 (&lt; 0,001)</b>	-0,211 (0,06)
citotoksični T-limfociti (%) CD3+CD8+	<b>0,527 (&lt; 0,001)</b>	<b>-0,879 (&lt; 0,001)</b>	0,032 (0,77)
NK-stanice (%) CD3-CD16+56+	<b>-0,514 (&lt; 0,001)</b>	-0,025 (0,83)	0,124 (0,27)
NKT-stanice (%) CD3+CD16+56+	<b>0,816 (&lt; 0,001)</b>	<b>-0,471 (&lt; 0,001)</b>	-0,008 (0,94)
B-limfociti (%) CD19+20+	0,012 (0,91)	-0,132 (0,24)	<b>0,441 (&lt; 0,001)</b>
B1-limfociti (%) CD19+CD5+ (ograda svi limfociti)	-0,087 (0,44)	-0,076 (0,50)	<b>0,915 (&lt; 0,001)</b>

GD-gestacijski dijabetes; NK-engl. *natural killer*



## 5. Rezultati

Tablica 13. Povezanost NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s biokemijskim pokazateljima ispitanica s gestacijskim dijabetesom

GDM	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P-vrijednost)		
	NKT/NK	pomagački/citotoksični limfociti	B1/B2-limfociti
glukoza	0,099 (0,38)	-0,078 (0,49)	0,016 (0,89)
inzulin	0,208 (0,06)	<b>-0,276 (0,01)</b>	0,164 (0,14)
C-peptid	<b>0,232 (0,04)</b>	-0,208 (0,06)	0,040 (0,72)
HOMA-IR	0,195 (0,08)	<b>-0,243 (0,03)</b>	0,138 (0,22)
HbA1c	0,113 (0,32)	-0,049 (0,66)	-0,035 (0,76)
CRP	-0,032 (0,78)	0,008 (0,94)	0,044 (0,70)
imunoglobulin G	0,06 (0,59)	-0,182 (0,10)	-0,032 (0,77)
imunoglobulin M	0,011 (0,92)	-0,170 (0,13)	-0,039 (0,73)
imunoglobulin A	0,055 (0,62)	-0,013 (0,91)	-0,014 (0,90)
željezo	-0,200 (0,07)	0,018 (0,87)	-0,095 (0,40)
feritin	-0,087 (0,44)	0,137 (0,22)	-0,061 (0,59)
B12 vitamin	-0,183 (0,10)	-0,040 (0,72)	0,165 (0,14)
folna kiselina	-0,208 (0,06)	<b>0,234 (0,03)</b>	0,115 (0,30)
kolesterol	0,049 (0,66)	0,011 (0,92)	-0,073 (0,51)
HDL-kolesterol	-0,171 (0,13)	0,095 (0,40)	-0,020 (0,86)
LDL-kolesterol	0,085 (0,45)	-0,070 (0,53)	-0,092 (0,41)
trigliceridi	0,128 (0,25)	0,079 (0,48)	-0,016 (0,88)
NT-proBNP	-0,128 (0,25)	0,101 (0,37)	-0,145 (0,19)

GD-gestacijski dijabetes; NK-engl.*natural killer*, HOMA-IR-engl.*Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*, HbA1c-glikirani hemoglobin, CRP-C-reaktivni protein

## 5. Rezultati

### 5.3. Analiza varijanti gena *IL-6*, *IL-10*, *TNF- $\alpha$* i *AdipoQ*

Tablice 14., 15., 16. i 17. prikazuju učestalost i raspodjelu genotipova i alela analiziranih SNP-ova u skupinama kontrola te u skupinama ispitanica s GD-om.

Tablica 14. Učestalost genotipova i alela rs1800796 (*IL-6*) između skupine ispitanica s gestacijskim dijabetesom i zdravih ispitanica

<i>IL-6</i>		Genotip [n (%)]		Omjer izgleda (95 % raspon pouzdanosti)	P
		kontrola	GD		
kodominantno	<b>GG</b>	72 (90)	70 (85)	1,0	0,39*
	<b>CG</b>	8 (10)	11 (14)	1,41 (0,54 – 3,72)	
	<b>CC</b>	0	1 (1)	-	
alel	<b>G</b>	152 (95)	151 (92)	1,64 (0,66 – 4,06)	0,29†
	<b>C</b>	8 (5)	13 (8)		
dominantno	<b>GG</b>	72 (90)	70 (85)	1,0	0,37*
	<b>CG - CC</b>	8 (10)	12 (15)	1,54 (0,59 – 4,0)	
recesivno	<b>GG-CG</b>	80 (100)	81 (99)	1,0	0,24*
	<b>CC</b>	0	1 (1)	-	
superdominantno	<b>GG - CC</b>	72 (90)	71 (87)	1,0	0,50*
	<b>CG</b>	8 (10)	11 (13)	1,39 (0,53 – 3,67)	

Hardy-Weinberg equilibrium – Kontrola = 1,0; Hardy-Weinberg equilibrium – GD = 0,4

\* $\chi^2$  test; †Fisherov egzaktni test; SNP-polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphysm*), IL-interleukin, GD-gestacijski dijabetes

Tablica 15. Učestalost genotipova i alela rs1800896 (*IL-10*) između skupine ispitanica s gestacijskim dijabetesom i zdravih ispitanica

<i>IL-10</i>		Genotip [n (%)]		Omjer izgleda (95 % raspon pouzdanosti)	P*
		kontrola	GD		
kodominantno	<b>TT</b>	30 (38)	30 (36)	1,0	0,95
	<b>TC</b>	35(43)	35 (43)	1,0 (0,50 - 1,99)	
	<b>CC</b>	15 (19)	17 (21)	1,13 (0,48 – 2,68)	
alel	<b>T</b>	95 (59)	95 (58)	1,06 (0,68 – 1,65)	0,79
	<b>C</b>	65 (41)	69 (42)		
dominantno	<b>TT</b>	30 (37)	30 (37)	1,0	0,90
	<b>TC - CC</b>	50 (63)	52 (63)	1,04 (0,55 – 1,97)	
recesivno	<b>TT - TC</b>	65 (81)	65 (79)	1,0	0,89
	<b>CC</b>	15 (19)	17 (21)	1,13 (0,52 – 2,46)	
superdominantno	<b>TT - CC</b>	45 (56)	47 (57)	1,0	0,89
	<b>TC</b>	35 (44)	35 (43)	0,96 (0,51 – 1,78)	

Hardy-Weinberg equilibrium – Kontrola = 0,49; Hardy-Weinberg equilibrium – Dijabetes = 0,26

\* $\chi^2$  test; †Fisherov egzaktni test; SNP-polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphysm*), IL-interleukin, GD-gestacijski dijabetes

## 5. Rezultati

Tablica 16. Učestalost genotipova i alela rs1800629 (*TNF-α*) između skupine ispitanica s gestacijskim dijabetesom i zdravih ispitanica

<i>TNF-α</i>		Genotip [n (%)]		Omjer izgleda (95 % raspon pouzdanosti)	P
		kontrola	GD		
kodominantno	<b>GG</b>	57 (71)	63 (77)	1,0	0,70*
	<b>AG</b>	20 (25)	16 (20)	0,72 (0,34 – 1,53)	
	<b>AA</b>	3 (4)	3 (4)	0,90 (0,18 – 4,66)	
alel	<b>G</b>	134 (84)	142 (87)	0,79 (0,43 – 1,48)	0,47 <sup>†</sup>
	<b>A</b>	26 (16)	22 (13)		
dominantno	<b>GG</b>	57 (71)	63 (77)	1,0	0,70*
	<b>AA - AA</b>	3 (4)	3 (4)	0,90 (0,18 – 4,66)	
recesivno	<b>GG-AG</b>	77 (96)	79 (96)	1,0	0,98*
	<b>AA</b>	3 (4)	3 (4)	0,97 (0,19 – 4,98)	
superdominantno	<b>GG - AA</b>	60 (75)	66 (81)	1,0	0,40*
	<b>AG</b>	20 (25)	16 (19)	0,73 (0,35 – 1,53)	

Hardy-Weinberg equilibrium – Kontrola = 0,42; Hardy-Weinberg equilibrium – Dijabetes = 0,15

\* $\chi^2$  test; <sup>†</sup>Fisherov egzaktni test; SNP-polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphysm*), TNF-engl. *tumor necrosis factor*, GD-gestacijski dijabetes

Tablica 17. Učestalost genotipova i alela rs266729 (*AdipoQ*) između skupine ispitanica s gestacijskim dijabetesom i zdravih ispitanica

<i>AdipoQ</i>		Genotip [n (%)]		Omjer izgleda (95 % raspon pouzdanosti)	P*
		kontrola	GD		
kodominantno	<b>CC</b>	31 (39)	43 (53)	1,0	0,09
	<b>CG</b>	44 (55)	31 (38)	0,51 (0,26 – 0,97)	
	<b>GG</b>	5 (6)	8 (9)	1,15 (0,34 – 3,86)	
alel	<b>C</b>	106 (66)	117 (47)	0,79 (0,49 – 1,26)	0,32
	<b>G</b>	54 (34)	47 (29)		
dominantno	<b>CC</b>	31 (39)	43 (53)	1,0	0,08
	<b>CG - GG</b>	49 (61)	39 (47)	0,57 (0,31 – 1,07)	
recesivno	<b>CC-CG</b>	75 (94)	74 (90)	1,0	0,41
	<b>GG</b>	5 (6)	8 (10)	1,62 (0,51 – 5,19)	
superdominatno	<b>CC - GG</b>	36 (45)	51 (62)	1,0	<b>0,03</b>
	<b>CG</b>	44 (55)	31 (38)	0,50 (0,27 – 0,93)	

Hardy-Weinberg equilibrium – Kontrola = **0,04**; Hardy-Weinberg equilibrium – Dijabetes = 0,59

\* $\chi^2$  test; <sup>†</sup>Fisherov egzaktni test; SNP-polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphysm*), GD-gestacijski dijabetes

## 5. Rezultati

Nema značajnih razlika u vrijednostima IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i adiponektina s obzirom na genotipove analiziranih SNP-ova kod kontrola i ispitanica s GD-om (tablica 18).

Tablica 18. Razlike u vrijednostima IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i adiponektina s obzirom na genotipove analiziranih SNP-ova kod kontrola i ispitanica s gestacijskim dijabetesom

		Medijan (interkvartilni raspon)			P*
<b>rs1800796 (IL-6)</b>		<b>CC</b>	<b>CG</b>	<b>GG</b>	
IL-6	kontrola	-	2,3 (1,65 – 3,68)	2,6 (1,9 – 3,7)	0,55
	GD	6,5 (n = 1)	2,9 (1,5 – 5,6)	2,7 (2,2 – 3,6)	0,33
<b>rs1800896 (IL-10)</b>		<b>CC</b>	<b>TC</b>	<b>TT</b>	
IL - 10	kontrola	-	-	-	-
	GD	-	-	-	-
<b>rs1800629 (TNF-<math>\alpha</math>)</b>		<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	
TNF- $\alpha$	kontrola	0 (0 – 9,8)	0 (0 – 5,4)	0 (0 – 4,7)	0,99
	GD	0 (0 – 4,1)	0 (0 – 6,1)	4,6 (0 – 5,7)	0,09
<b>rs266729 (AdipoQ)</b>		<b>CC</b>	<b>CG</b>	<b>GG</b>	
adiponektin	kontrola	9,8 (4,4 – 27,7)	9,9 (4,4 – 26,7)	20,2 (3,9 – 24,3)	0,97
	GD	18,0 (5,3 – 30,1)	15,4 (9,1 – 23,3)	20,3 (8,7 – 28,5)	0,83

\*Kruskal-Wallisov test; IL-interleukin, TNF-engl. *tumor necrosis factor*, GD-gestacijski dijabetes

## 5. Rezultati

Nema značajnih razlika u vrijednostima omjera NKT/NK-stanica, pomagačkih/citotoksičnih T-limfocita i B1/B2-limfocita s obzirom na genotipove analiziranih SNP-ova za *IL-6* i *IL-10* kod kontrola i ispitanica s GD-om (tablica 19).

Tablica 19. Razlike u omjerima s obzirom na genotipove rs1800796 (*IL-6*) i rs1800896 (*IL-10*) kod kontrola i ispitanica s gestacijskim dijabetesom

rs1800796 ( <i>IL-6</i> )	Medijan (interkvartilni raspon)			P*
	CC	CG	GG	
sve ispitanice				
NKT/NK	3,44 (n =1)	0,56 (0,38 – 0,56)	0,60 (0,33 – 1,24)	0,20
pomagački/citotoksični limfociti	1,28 (n =1)	1,86 (1,34 - 2,25)	1,55 (1,28 - 1,97)	0,42
B1/B2-limfociti	0,321 (n =1)	0,23 (0,14 - 0,47)	0,23 (0,14 - 0,4)	0,84
kontrola				
NKT/NK	-	0,49 (0,36 – 0,94)	0,58 (0,31 – 1,04)	0,99
pomagački/citotoksični limfociti	-	1,83 (1,45 - 1,96)	1,48 (1,24 - 1,98)	0,25
B1/B2 limfociti	-	0,22 (0,13 - 0,55)	0,23 (0,15 - 0,38)	0,98
GD				
NKT/NK	3,44 (n =1)	0,88 (0,41 – 1,63)	0,65 (0,38 – 1,43)	0,19
pomagački/citotoksični limfociti	1,28 (n =1)	1,92 (1,23 - 2,3)	1,6 (1,32 - 1,99)	0,60
B1/B2-limfociti	0,321 (n =1)	0,23 (0,14 - 0,47)	0,23 (0,13 - 0,42)	0,84
rs1800896 ( <i>IL-10</i> )	CC	TC	TT	
sve ispitanice				
NKT/NK	0,47 (0,29 – 1,07)	0,63 (0,33 – 1,26)	0,68 (0,43 – 1,36)	0,48
pomagački/citotoksični limfociti	1,65 (1,29 - 2,08)	1,62 (1,31 - 2,02)	1,46 (1,26 - 1,89)	0,54
B1/B2-limfociti	0,28 (0,14 - 0,45)	0,23 (0,15 - 0,43)	0,2 (0,14 - 0,33)	0,24
kontrola				
NKT/NK	0,42 (0,26 – 0,78)	0,57 (0,29 – 1,08)	0,65 (0,41 - 1,02)	0,55
pomagački/citotoksični limfociti	1,66 (1,18 - 2,1)	1,69 (1,31 - 2)	1,41 (1,25 - 1,78)	0,34
B1/B2-limfociti	0,27 (0,16 - 0,4)	0,3 (0,14 - 0,44)	0,21 (0,14 - 0,29)	0,25
GD				
NKT/NK	0,56 (0,36 – 1,29)	0,68 (0,38 – 1,39)	0,72 (0,45 – 1,53)	0,70
pomagački/citotoksični limfociti	1,63 (1,35 - 2,07)	1,59 (1,32 - 2,16)	1,58 (1,27 - 2,23)	0,88
B1/B2-limfociti	0,3 (0,11 - 0,56)	0,23 (0,15 - 0,42)	0,19 (0,13 - 0,39)	0,58

\*Kruskal-Wallisov test; IL-interleukin, GD-gestacijski dijabetes

## 5. Rezultati

Omjer pomagačkih/citotoksičnih limfocita u slučaju rs1800629 (*TNF- $\alpha$* ) ima značajno niže vrijednosti u slučaju genotipa GG (Kruskal-Wallisov test,  $P = 0,03$ ) kod svih ispitanica i u slučaju ispitanica kontrolne skupine (Kruskal-Wallisov test,  $P = 0,02$ ) (tablica 20).

Tablica 20. Razlike u omjerima s obzirom na genotipove rs1800629 (*TNF- $\alpha$* ) i rs266729 (*AdipoQ*) kod kontrola i ispitanica s gestacijskim dijabetetsom

rs1800629 ( <i>TNF-<math>\alpha</math></i> )	Medijan (interkvartilni raspon)			$P^*$
	AA	AG	GG	
ve ispitanice				
NKT/NK	0,86 (0,23 – 1,11)	0,58 (0,38 – 1,05)	0,65 (0,33 – 1,42)	0,97
pomagački/citotoksični limfociti	2,15 (1,2 - 2,4)	1,89 (1,37 - 2,33)	1,51 (1,26 - 1,84)	<b>0,03</b>
B1/B2-limfociti	0,22 (0,14 - 0,38)	0,22 (0,13 - 0,37)	0,23 (0,15 - 0,43)	0,79
kontrola				
NKT/NK	0,63 (0,22 – 0,97)	0,48 (0,27 – 1,04)	0,57 (0,31 – 1,03)	0,72
pomagački/citotoksični limfociti	1,93 (1,23 - 2,44)	1,94 (1,41 - 2,33)	1,46 (1,21 - 1,77)	<b>0,02</b>
B1/B2-limfociti	0,18 (0,14 - 0,39)	0,19 (0,13 - 0,29)	0,26 (0,16 - 0,42)	0,29
GD				
NKT/NK	1,11 (0,45 – 1,47)	0,74 (0,53 – 1,15)	0,66 (0,34 – 1,45)	0,87
pomagački/citotoksični limfociti	2,36 (1,09 - 2,38)	1,89 (1,33 - 2,36)	1,59 (1,32 - 1,92)	0,56
B1/B2-limfociti	0,26 (0,12 - 0,38)	0,31 (0,12 - 0,47)	0,22 (0,14 - 0,43)	0,86
rs266729 ( <i>AdipoQ</i> )	CC	CG	GG	
ve ispitanice				
NKT/NK	0,62 (0,35 – 1,23)	0,57 (0,31 – 1,28)	0,68 (0,43 – 1,15)	0,90
pomagački/citotoksični limfocti	1,6 (1,3 - 1,95)	1,5 (1,23 - 2,08)	1,66 (1,32 - 2,68)	0,81
B1/B2-limfociti	0,27 (0,14 - 0,45)	0,22 (0,14 - 0,35)	0,22 (0,18 - 0,27)	0,44
kontrola				
NKT/NK	0,60 (0,29 – 1,08)	0,51 (0,31 – 1,01)	0,77 (0,45 – 1,11)	0,71
pomagački/citotoksični limfocti	1,65 (1,28 - 1,98)	1,45 (1,23 - 2)	1,66 (1,05 - 1,93)	0,83
B1/B2-limfociti	0,29 (0,18 - 0,45)	0,2 (0,13 - 0,33)	0,28 (0,21 - 0,4)	0,06
GD				
NKT/NK	0,65 (0,43 – 1,39)	0,69 (0,30 – 1,53)	0,65 (0,43 – 1,39)	0,83
pomagački/citotoksični limfocti	1,6 (1,37 - 1,94)	1,63 (1,24 - 2,3)	1,64 (1,32 - 3,56)	0,81
B1/B2-limfociti	0,26 (0,12 - 0,46)	0,23 (0,16 - 0,48)	0,2 (0,13 - 0,24)	0,35

\*Kruskal-Wallisov test; TNF-engl. *tumor necrosis factor*; GD-gestacijski dijabetes

## 5. Rezultati

### 5.4. Razlike u općim i kliničkim obilježjima među četirima skupinama ispitanica

Značajno su mlađe ispitanice koje su zdrave u odnosu na ispitanice s GD-om i s GD-om s komplikacijama (Kruskal-Wallisov test,  $P = 0,01$ ). Značajno veći ITM prije trudnoće imaju ispitanice koje imaju GD s komplikacijama u odnosu na ostale skupine (Fisherov egzaktni test,  $P < 0,001$ ) (tablica 21).

Tablica 21. Opća obilježja ispitanica prema skupinama

	Broj (%) ispitanica				P	
	zdrave (1)	zdrave + komplikacije (2)	GD (3)	GD + komplikacije (4)		ukupno
dob (godine) [medijan (IQR)]	29 (28 – 32)	31 (27 – 35)	33 (29 – 37)	31 (29 – 36)	31 (28 – 35)	<b>0,01<sup>†§</sup></b>
razina obrazovanja						
SSS	9 (23)	14 (35)	22 (52)	19 (48)	64 (40)	
VŠS	11 (28)	10 (25)	5 (12)	8 (20)	34 (21)	0,12*
VSS	20 (50)	16 (40)	15 (36)	13 (33)	64 (40)	
ITM prije trudnoće						
< 19	3 (8)	3 (8)	1 (2)	0	7 (4)	
19 – 24,9	36 (90)	20 (50)	18 (43)	10 (25)	84 (52)	
25 – 29,9	1 (3)	14 (35)	11 (26)	15 (38)	41 (25)	<b>&lt; 0,001<sup>‡</sup></b>
> 30	0	3 (8)	12 (29)	15 (38)	30 (19)	

IQR – interkvartilni raspon (od engl. *Interquartil range*); \* $\chi^2$  test; ‡Fisherov egzaktni test; †Kruskal-Wallisov test (post hoc Conover); §na razini  $P < 0,05$  značajne su razlike (1) vs. (3, 4); GD-gestacijski dijabetes, SSS-srednja stručna sprema, VŠS-viša stručna sprema, VSS-visoka stručna sprema, ITM-indeks tjelesne mase

## 5. Rezultati

Veće količine kave značajnije više konzumiraju ispitanice s GD-om i komplikacijama u odnosu na zdrave ispitanice ili zdrave s komplikacijama (Kruskal-Wallisov test,  $P = 0,004$ ). Značajno najmanje ispitanica iz skupine s GD-om i s komplikacijama navodi raznoliku prehranu (Fisherov egzaktni test,  $P = 0,04$ ) (tablica 22).

Tablica 22. Životni stil ispitanica u odnosu na skupine

	Broj (%) ispitanica				ukupno	<i>P</i>
	zdrave	zdrave + komplikacija	GD	GD + komplikacije		
	(1)	(2)	(3)	(4)		
pušenje	12 (30)	14 (35)	16 (38)	22 (55)	64 (40)	0,12*
kava	31 (78)	29 (73)	36 (86)	30 (75)	126 (78)	0,50*
kava (broj šalice)[medijan (IQR)]	1 (1 – 2) [raspon 1 do 3]	1 (1 – 2) [raspon 1 do 3]	2 (1 – 2) [raspon 1 do 3]	2 (1 – 2) [raspon 1 do 4]	2 (1 – 2) [raspon 1 do 4]	<b>0,004</b> <sup>†§</sup>
fizička aktivnost						
nikada	2 (5)	4 (10)	2 (5)	3 (8)	11 (7)	0,08 <sup>‡</sup>
rijetko	8 (20)	17 (43)	15 (36)	19 (48)	59 (36)	
povremeno	18 (45)	13 (33)	16 (38)	16 (40)	63 (39)	
redovito	12 (30)	6 (15)	9 (21)	2 (5)	29 (18)	
dnevna aktivnost						
< 30 minuta	25 (63)	30 (75)	29 (69)	32 (80)	116 (72)	0,34*
> 30 minuta	15 (38)	10 (25)	13 (31)	8 (20)	46 (28)	
raznolika prehrana	38 (95)	35 (88)	40 (95)	31 (78)	144 (89)	<b>0,04</b> <sup>‡</sup>

IQR – interkvartilni raspon (od engl. *Interquartil range*)

\* $\chi^2$  test; <sup>†</sup>Fisherov egzaktni test; <sup>‡</sup>Kruskal-Wallisov test (post hoc Conover); <sup>§</sup>na razini  $P < 0,05$  značajne su razlike (4) vs. (1, 2); GD-gestacijski dijabetes



## 5. Rezultati

Ispitanice s GD-om i komplikacijama značajnije više imaju šećernu bolest u obitelji ( $\chi^2$  test,  $P = 0,01$ ), koriste lijekove izvan ( $\chi^2$  test,  $P < 0,001$ ) i u trudnoći ( $\chi^2$  test,  $P < 0,001$ ), boluju od endokrinih bolesti ( $\chi^2$  test,  $P < 0,001$ ) te imaju povišen krvni tlak (Fisherov egzaktni test,  $P < 0,001$ ) (tablica 23).

Tablica 23. Raspodjela ispitanica prema povijesti bolesti i skupinama

	Broj (%) ispitanica				P	
	zdrave	zdrave + komplikacije	GD	GD + komplikacije		ukupno
šećerna bolest u obitelji	1 (3)	7 (18)	10 (24)	12 (31)	30 (19)	<b>0,01*</b>
lijekovi izvan trudnoće	3 (8)	9 (23)	2 (5)	19 (48)	33 (20)	<b>&lt; 0,001*</b>
lijekovi u trudnoći	2 (5)	9 (23)	2 (5)	17 (43)	30 (19)	<b>&lt; 0,001*</b>
anemija	4 (10)	1 (3)	3 (7)	2 (5)	10 (6)	0,62 <sup>†</sup>
poremećaji koagulacije i tromboembolijski poremećaji	3 (8)	1 (3)	1 (2)	2 (5)	7 (4)	0,67 <sup>†</sup>
endokrine bolesti	0	10 (25)	1 (2)	12 (30)	23 (14)	<b>&lt; 0,001*</b>
gastrointestinalne bolesti	5 (13)	4 (10)	1 (2)	3 (8)	13 (8)	0,32 <sup>†</sup>
migrene	1 (3)	2 (5)	0	1 (3)	4 (2)	0,50 <sup>†</sup>
šum na srcu	1 (3)	0	0	0	1 (1)	0,74 <sup>†</sup>
povišeni lipidi	1 (3)	0	0	2 (5)	3 (2)	0,33 <sup>†</sup>
povišen krvni tlak	0	1 (3)	0	7 (18)	8 (5)	<b>&lt; 0,001<sup>†</sup></b>
bubrežne bolesti	0	0	1 (2)	0	1 (1)	> 0,99 <sup>†</sup>

\* $\chi^2$  test; <sup>†</sup>Fisherov egzaktni test; GD-gestacijski dijabetes

Probleme sa zanošenjem (Fisherov egzaktni test,  $P = 0,009$ ), povišen krvni tlak u prijašnjoj trudnoći (Fisherov egzaktni test,  $P < 0,001$ ) te poremećaje štitnjače u prethodnoj trudnoći (Fisherov egzaktni test,  $P < 0,001$ ) imaju značajno više ispitanice s GD-om i komplikacijama u odnosu na druge skupine (tablica 24).

## 5. Rezultati

Tablica 24. Ginekološka i opstetrička anamneza prema skupinama

	Broj (%) ispitanica					P
	zdrave	zdrave + komplikacije	GD	GD + komplikacije	ukupno	
	(1)	(2)	(3)	(4)		
dob (godine) prilikom prve mjesečnice [medijan (IQR)]	13 (12 – 14) [raspon 11 do 16]	13 (12 – 14) [raspon 11 do 17]	13 (12 – 14) [raspon 10 do 17]	12 (12 – 14) [raspon 11 do 16]	13 (12 – 14) [raspon 11 do 17]	0,17 <sup>†</sup>
ciklusi						
uredni	28 (70)	29 (73)	31 (74)	27 (68)	115 (71)	0,48 <sup>‡</sup>
obilni	9 (23)	6 (15)	5 (12)	8 (20)	28 (17)	
oskudni	2 (5)	1 (3)	0	0	3 (2)	
neredoviti	1 (3)	4 (10)	6 (14)	5 (13)	16 (10)	
spotting između ciklusa	2 (5)	1 (3)	0	2 (5)	5 (3)	0,48 <sup>‡</sup>
policistični jajnici	8 (20)	6 (15)	5 (12)	6 (15)	25 (16)	0,79 <sup>*</sup>
problemi sa zanošenjem	2 (5)	2 (5)	4 (10)	11 (28)	19 (12)	<b>0,009<sup>‡</sup></b>
broj poroda do sada [medijan (IQR)]	0 (0 – 1) [raspon 0 do 2]	1 (0 – 1) [raspon 0 do 4]	1 (0 – 1) [raspon 0 do 3]	0 (0 – 1) [raspon 0 do 3]	1 (0 – 1) [raspon 0 do 4]	0,11 <sup>†</sup>
broj pobačaja [medijan (IQR)]	0 (0 – 0) [raspon 0 do 2]	0 (0 – 1) [raspon 0 do 3]	0 (0 – 0) [raspon 0 do 3]	0 (0 – 1) [raspon 0 do 3]	0 (0 – 1) [raspon 0 do 3]	0,45 <sup>†</sup>
tjedan pobačaja (n = 15/21) [medijan (IQR)]	7 (6 – 9) [raspon 6 do 11]	8 (6 – 10) [raspon 6 do 11]	9 (5 – 16) [raspon 0 do 23]	8 (7 – 9) [raspon 3 do 17]	8 (6 – 9) [raspon 0 do 23]	0,92 <sup>†</sup>
povišen krvni tlak u prethodnoj trudnoći	0	1 (4)	1 (4)	10 (53)	12 (13)	<b>&lt;0,001<sup>‡</sup></b>
poremećaji štitnjače u prethodnoj trudnoći	0	8 (33)	0	5 (26)	13 (14)	<b>&lt;0,001<sup>‡</sup></b>
GD u prethodnoj trudnoći	0	4 (17)	8 (29)	3 (16)	15 (17)	0,06 <sup>‡</sup>
novorođenče teže od 4000 g u prethodnoj trudnoći	1 (5)	6 (25)	3 (11)	4 (21)	14 (16)	0,26 <sup>‡</sup>

IQR – interkvartilni raspon (od engl. *Interquartil range*); \* $\chi^2$  test; <sup>‡</sup>Fisherov egzaktni test; <sup>†</sup>Kruskal-Wallisov test; GD-gestacijski dijabetes

## 5. Rezultati

Vrijednosti OGTT-a između mjerenja i prema skupinama prikazane su u tablici 25. Značajno su više vrijednosti OGTT-a kod trudnica s GD-om u odnosu na zdrave trudnice (neovisno o komplikacijama) u svim trima mjerenjima (Mann-Whitney U-test,  $P < 0,001$ ). Također, u svakoj skupini ispitanica značajna je razlika u vrijednostima OGTT-a između mjerenja (Friedmanov test,  $P < 0,001$ ). Razlika u kilogramima (između 1. i 3. trimestra) značajno je veća kod zdravih trudnica s komplikacijama u odnosu na trudnice s GD-om neovisno o komplikacijama (Mann-Whitney U-test,  $P = 0,005$ ).

Tablica 25. Razlike u vrijednostima OGTT-a i povećanju tjelesne težine prema skupinama

	Medijan (interkvartilni raspon)				$P^{\dagger}$
	zdrave	zdrave + komplikacije	GD	GD + komplikacije	
	(1)	(2)	(3)	(4)	
OGTT1	4,5 (4,2 – 4,6)	4,5 (4,3 – 4,8)	5,1 (4,6 – 5,6)	5,4 (4,8 – 5,7)	<b>&lt; 0,001<sup>§</sup></b>
OGTT2	7,1 (6,7 – 8,3)	7,5 (6,6 – 8,7)	10,2 (9,4 – 11,1)	9,9 (8,2 – 11,3)	<b>&lt; 0,001<sup>§</sup></b>
OGTT3	5,6 (5,1 – 6,4)	6,0 (5,3 – 7,4)	8,7 (7,4 – 10,1)	8,3 (6,6 – 9,9)	<b>&lt; 0,001<sup>§</sup></b>
* $P$ vrijednost (između mjerenja)	<b>&lt; 0,001<sup>‡</sup></b>	<b>&lt; 0,001<sup>‡</sup></b>	<b>&lt; 0,001<sup>‡</sup></b>	<b>&lt; 0,001<sup>‡</sup></b>	
Razlika u kilogramima (1. i 3. trimestar)	10 (8 – 13)	12 (9 – 16)	8 (5 – 13)	10 (5 – 13)	<b>0,03<sup>  </sup></b>

GD-gestacijski dijabetes, OGTT-oralni test tolerancije glukoze (engl. *oral glucose tolerance test*); \*Friedmanov test (post hoc Conover); <sup>†</sup>Mann-Whitney U-test

<sup>‡</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju (OGTT1) vs. (OGTT2,OGTT3); (OGTT2) vs. (OGTT3)

<sup>§</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju (1) vs. (3,4); (2) vs. (3,4)

<sup>||</sup>na razini  $P < 0,05$  značajno se razlikuju 2) vs. (3,4)

## 5. Rezultati

U aktualnoj trudnoći ispitanice s GD-om i komplikacijama imaju značajno više drugih komplikacija, povišen krvni tlak, poremećaj štitnjače i imaju terapiju u trudnoći (Fisherov egzaktni test,  $P < 0,001$ ) u odnosu na ostale skupine ispitanica (tablica 26).

Tablica 26. Komplikacije u aktualnoj trudnoći prema skupinama

	Broj (%) ispitanica				ukupno	P
	zdrave	zdrave + komplikacije	GD	GD + komplikacije		
gestacijski dijabetes	-	-	40 (98)	39 (98)	79 (49)	-
terapija GD	-	-	4 (10)	13 (33)	17 (17)	-
koja terapija						
inzulin	-	-	3 (8)	10 (29)	13 (16)	-
metformin	-	-	0	1 (3)	1 (1)	-
dijeta	-	-	24 (65)	16 (43)	40 (53)	-
druge komplikacije	8 (21)	14 (35)	10 (24)	34 (85)	66 (41)	<b>&lt;0,001*</b>
povišen krvni tlak	0	1 (3)	0	13 (33)	14 (9)	<b>&lt;0,001*</b>
poremećaji štitnjače	0	12 (30)	0	20 (50)	32 (20)	<b>&lt;0,001*</b>
upale mokraćnog sustava	2 (5)	1 (3)	4 (10)	6 (15)	13 (8)	0,19 <sup>†</sup>
upala rodnice	0	1 (3)	3 (7)	2 (5)	6 (4)	0,52 <sup>†</sup>
anemija	7 (18)	3 (8)	6 (14)	6 (15)	22 (14)	0,58*
terapija u trudnoći	8 (21)	15 (38)	9 (22)	32 (80)	64 (40)	<b>&lt;0,001*</b>

\* $\chi^2$  test; <sup>†</sup>Fisherov egzaktni test; GD-gestacijski dijabetes

## 5. Rezultati

Razlike hematoloških i biokemijskih pokazatelja prema skupinama prikazane su u tablicama 27 i 28.

Tablica 27. Hematološki pokazatelji prema skupinama

	Medijan (interkvartilni raspon)				P*
	zdrave	zdrave + komplikacije	GD	GD + komplikacije	
	(1)	(2)	(3)	(4)	
eritrociti	4,07 (3,77 - 4,4)	3,88 (3,78 - 4,1)	3,9 (3,7 - 4,1)	4,2 (3,88 - 4,5)	<b>0,002<sup>†</sup></b>
hemoglobin	122 (115 - 129,8)	119,5 (113,25 - 128,3)	119,5 (111 - 125)	124,5 (118 - 132)	<b>0,02<sup>§</sup></b>
trombociti	204 (167,25 - 240,5)	237,5 (206,25 - 263,8)	232 (195 - 279,3)	238 (209 - 283,8)	<b>0,03<sup>‡</sup></b>
leukociti	9,45 (8,7 - 10,8)	9,6 (7,53 - 11,4)	8,6 (7,88 - 10,3)	9,8 (7,75 - 11,2)	0,60
neutrofili	68,5 (66 - 75)	71 (66 - 75,8)	72 (67 - 76)	73 (68,25 - 77)	0,21
limfociti	23 (18,5 - 26,8)	22 (19 - 26)	21,5 (18 - 26)	21 (16 - 26)	0,52
monociti	5,5 (5 - 6)	5,5 (4 - 6)	5 (5 - 6)	5 (4 - 6)	0,53
eozinofili	1 (1 - 2)	1 (1 - 2)	1 (0 - 2)	1 (1 - 1)	0,07
bazofili	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0,05
limfociti – protočna citometrija	17 (13,25 - 21)	16,5 (14 - 19,8)	16 (13,75 - 20)	16 (13 - 19,8)	0,70
T-limfociti (%)	78,3 (73,53 - 82,1)	77,8 (74,4 - 80,5)	77,55 (71,18 - 81,7)	78,9 (74,93 - 82,7)	0,52
pomagački T-limfociti	45,45 (42,4 - 50,8)	43,55 (40,4 - 48,4)	43,9 (40,28 - 50,4)	47,6 (44,5 - 54,1)	0,06
citotoksični T-limfociti	28,05 (26,13 - 32,7)	29,55 (24,25 - 34,2)	29,3 (25,73 - 33,9)	27,95 (22,58 - 30,2)	0,31
pomagački/citotoksični limfociti	1,65 (1,32 - 2)	1,48 (1,22 - 2)	1,46 (1,23 - 1,9)	1,78 (1,46 - 2,2)	0,10
NK-stanice	10,8 (8,25 - 14)	10,75 (7,95 - 14)	10,3 (7,33 - 15,1)	8,7 (6,9 - 12,1)	0,20
NKT-stanice	5,65 (3,13 - 8,2)	6,65 (4,53 - 11,2)	7,95 (4,38 - 11,7)	5,8 (3,6 - 10,4)	0,15
NKT/NK	0,461 (0,24 - 0,84)	0,689 (0,37 - 1,51)	0,72 (0,38 - 1,45)	0,65 (0,39 - 1,26)	0,10
B-limfociti	8,5 (6,45 - 10,8)	9,7 (7,48 - 12,5)	9 (6,85 - 12,7)	9,55 (7 - 13)	0,44
B1-limfociti (ograda svi limfociti)	1,65 (1 - 2,4)	1,85 (1,25 - 2,5)	1,4 (0,9 - 2)	2,15 (1,03 - 2,9)	0,12
B1-limfociti (ograda svi B-limfociti)	20,7 (12,1 - 28,6)	18,8 (12,98 - 28,3)	17,35 (11 - 22)	22,5 (13,83 - 32,8)	0,25
B2-limfociti	79,3 (71,43 - 87,9)	81,2 (71,75 - 87)	82,65 (78 - 89)	77,5 (67,2 - 86,2)	0,25
B1/B2 limfociti	0,26 (0,14 - 0,4)	0,23 (0,15 - 0,4)	0,21 (0,12 - 0,3)	0,29 (0,16 - 0,5)	0,25

GD-gestacijski dijabetes; NK-engl. *natural killer*; \*Kruskal-Wallisov test (post hoc Conover);

<sup>†</sup>na razini P < 0,05 značajne su razlike (4) vs. (2, 3); (3) vs. (4)

<sup>§</sup>na razini P < 0,05 značajne su razlike (4) vs. (2, 3)

<sup>‡</sup>na razini P < 0,05 značajne su razlike (1) vs. (2, 3, 4)

## 5. Rezultati

Tablica 28. Biokemijski pokazatelji prema skupinama

	Medijan (interkvartilni raspon)				P*
	zdrave	zdrave + komplikacije	GD	GD + komplikacije	
	(1)	(2)	(3)	(4)	
glukoza	4,45 (4,23 - 4,7)	4,5 (4,2 - 4,8)	4,5 (4,08 - 4,8)	4,5 (4,13 - 4,9)	0,95
inzulin	9,65 (6,85 - 13,1)	11,85 (9,18 - 17,3)	10,7 (7,8 - 17)	14,45 (9,48 - 21,2)	<b>0,005</b> <sup>§</sup>
C-peptid	0,73 (0,58 - 0,9)	0,86 (0,71 - 1,2)	0,9 (0,67 - 1,1)	1,02 (0,76 - 1,4)	<b>&lt;0,001</b> <sub>  </sub>
HOMA IR	2 (1 - 2,8)	2 (2 - 4)	2 (1 - 4)	3 (2 - 4)	<b>0,008</b> <sup>**</sup>
HbA1c	34 (31,5 - 37)	34,5 (32,25 - 36,8)	36 (33,75 - 38)	36,5 (34 - 38)	<b>0,02</b> <sup>††</sup>
CRP	2,7 (1,43 - 4,2)	4 (2,75 - 7,4)	4,35 (2,5 - 8)	6,35 (2,38 - 8,9)	<b>&lt;0,001</b> <sub>‡</sub>
imunoglobulin G	8,97 (7,15 - 10,3)	8,45 (7,69 - 9,7)	8,53 (7,34 - 9,9)	8,38 (7,62 - 10,1)	0,98
imunoglobulin M	1,11 (0,91 - 1,7)	0,98 (0,77 - 1,3)	1,02 (0,87 - 1,5)	1,05 (0,83 - 1,3)	0,32
imunoglobulin A	1,73 (1,31 - 2,2)	1,58 (1,29 - 2)	1,44 (1,16 - 1,8)	1,67 (1,27 - 2,2)	0,24
željezo	16 (9 - 21,8)	12,5 (9 - 18,3)	19 (13 - 25,3)	15 (11,5 - 21,3)	<b>0,02</b> <sup>§§</sup>
feritin	14 (10 - 22)	19 (11,25 - 30)	20,5 (9 - 32,5)	19 (15,25 - 30,8)	0,20
B12 vitamin	223,5 (181 - 282)	214 (155,25 - 297,3)	211,5 (164 - 244)	211,5 (162 - 287,8)	0,49
folna kiselina	36,35 (21,93 - 51,9)	35,15 (22,33 - 43,8)	32,2 (19,5 - 49,5)	37 (23,65 - 57,2)	0,61
kolesterol	6,9 (6,1 - 7,8)	6,75 (5,93 - 8)	6,9 (6,25 - 7,4)	6,45 (5,73 - 8)	0,79
HDL-kolesterol	1,9 (1,8 - 2,3)	2 (1,6 - 2,3)	1,75 (1,5 - 2)	1,8 (1,6 - 2,1)	<b>0,01</b> <sup>††</sup>
LDL-kolesterol	4,35 (3,73 - 5,2)	4,2 (3,63 - 5,5)	4,3 (3,6 - 4,9)	3,7 (2,73 - 4,8)	0,14
trigliceridi	2,35 (1,83 - 2,8)	2,4 (2,03 - 3,1)	2,8 (2,38 - 3,4)	3,2 (2,4 - 3,8)	<b>&lt;0,001</b> <sub>††</sub>
NT-proBNP	36 (18 - 61)	26,5 (19,75 - 44,8)	28 (18,75 - 39,5)	28 (19,25 - 48,5)	0,59
IL-6	2,4 (1,85 - 3,4)	2,6 (1,9 - 3,9)	2,3 (1,5 - 3,2)	3,25 (2,53 - 4,4)	<b>&lt;0,001</b> <sub>††</sub>
IL-10	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	0 (0 - 0)	>0,99
TNF- $\alpha$	4,29 (0 - 5,5)	0 (0 - 4,2)	4,2 (0 - 5,2)	4,47 (0 - 5,6)	<b>0,08</b>
adiponektin	16 (3,2 - 33,1)	7,65 (4,53 - 14,5)	17,6 (6,15 - 30,1)	17,2 (6,53 - 22,3)	<b>0,09</b>

GD-gestacijski dijabetes; HOMA-IR-engl. *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*, HbA1c-glikirani hemoglobin, CRP-C-reaktivni protein, IL-interleukin, TNF-engl. *tumor necrosis factor*; \*Kruskal-Wallisov test (post hoc Conover);

<sup>§</sup>na razini P < 0,05 značajne su razlike (4) vs. (2, 3)

<sup>‡</sup>na razini P < 0,05 značajne su razlike (1) vs. (2, 3, 4)

<sup>||</sup>na razini P < 0,05 značajne su razlike (1) vs. (2, 3, 4); (3) vs. (4)

<sup>\*\*</sup>na razini P < 0,05 značajne su razlike (1) vs. (2, 4)

<sup>††</sup>na razini P < 0,05 značajne su razlike (1) vs. (3, 4); (2) vs. (4)

<sup>§§</sup>na razini P < 0,05 značajne su razlike (2) vs. (3)

<sup>†††</sup>na razini P < 0,05 značajne su razlike (4) vs. (1, 2, 3); (2) vs. (3)

Spearmanovim koeficijentom korelacije ispitala se povezanost omjera proupalnih i protuupalnih faktora s omjerom NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita u svim skupinama ispitanica i uočava se da u skupini zdravih ispitanica nema značajnih povezanosti. Kod zdravih ispitanica, ali s imunološkim komplikacijama, što su više vrijednosti IL-6, to su više i vrijednosti omjera NKT/NK-stanica (Rho = 0,319) i niže vrijednosti omjera pomagačkih/citotoksičnih limfocita (Rho = -0,546). Kod ispitanica s GD-om omjer B1/B2-limfociti niži je kod viših vrijednosti IL-6 (Rho = -0,421). Ispitanice s GD-om i komplikacijama imaju značajnu negativnu vezu omjera B1/B2-limfocita s adiponektinom, odnosno uz viši adiponektin

## 5. Rezultati

niže su vrijednosti omjera B1/B2-limfocita i obratno ( $Rho = -0,388$ ) ( $Rho = -0,253$ ) (tablica 29).

Tablica 29. Povezanost proupalnih i protuupalnih faktora s omjerom NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita prema skupinama

	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P-vrijednost)		
	NKT/NK	pomagački/citotoksični limfociti	B1/B2-limfociti
<b>zdrave</b>			
IL-6	0,185 (0,25)	0,049 (0,77)	-0,053 (0,75)
IL-10	-	-	-
TNF- $\alpha$	0,105 (0,52)	0,105 (0,52)	0,106 (0,52)
adiponektin	-0,084 (0,61)	0,122 (0,45)	-0,025 (0,88)
<b>zdrave + komplikacije</b>			
IL-6	<b>0,319 (0,04)</b>	<b>-0,546 (&lt; 0,001)</b>	-0,019 (0,91)
IL-10	-	-	-
TNF- $\alpha$	0,201 (0,21)	-0,063 (0,70)	0,046 (0,78)
adiponektin	-0,058 (0,72)	0,079 (0,63)	0,153 (0,35)
<b>GD</b>			
IL-6	-0,014 (0,93)	0,121 (0,45)	<b>-0,421 (0,01)</b>
IL-10	-	-	-
TNF- $\alpha$	-0,112 (0,48)	0,121 (0,44)	0,028 (0,86)
adiponektin	-0,088 (0,58)	0,168 (0,29)	-0,125 (0,43)
<b>GD + komplikacije</b>			
IL-6	0,141 (0,39)	-0,136 (0,40)	0,128 (0,43)
IL-10	-	-	-
TNF- $\alpha$	-0,089 (0,59)	-0,093 (0,57)	-0,146 (0,37)
adiponektin	0,080 (0,63)	0,125 (0,44)	<b>-0,388 (0,01)</b>

IL-interleukin, GD-gestacijski dijabetes

Povezanost omjera proupalnih i protuupalnih faktora s omjerom NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita prema skupinama i biokemijskim pokazateljima prikazane su u tablicama od 30 do 33.

## 5. Rezultati

Tablica 30. Povezanost NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s hematološkim i biokemijskim pokazateljima kod zdravih ispitanica

Zdrave	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P vrijednost)		
	NK/NKT	pomagački/citotoksični	B1/B2
eritrociti	-0,081 (0,62)	0,055 (0,74)	0,128 (0,43)
hemoglobin	-0,029 (0,86)	-0,067 (0,68)	0,074 (0,65)
trombociti	-0,173 (0,29)	0,177 (0,27)	<b>-0,321 (0,04)</b>
leukociti	0,221 (0,17)	0,089 (0,59)	-0,108 (0,51)
neutrofili	0,155 (0,34)	-0,081 (0,62)	-0,066 (0,69)
limfociti	-0,187 (0,25)	0,101 (0,53)	0,057 (0,73)
monociti	0,130 (0,42)	-0,120 (0,46)	0,227 (0,16)
eozinofili	0,242 (0,13)	-0,130 (0,42)	-0,062 (0,70)
bazofili	-0,298 (0,06)	0,203 (0,21)	-0,142 (0,38)
limfociti (%) -protočni citometar	-0,060 (0,71)	-0,050 (0,76)	0,017 (0,92)
T-limfociti (%) CD3+	0,181 (0,26)	0,027 (0,87)	-0,112 (0,49)
pomagački T-limfociti (%) CD3+CD4+	-0,127 (0,43)	<b>0,843 (&lt; 0,001)</b>	-0,121 (0,46)
citotoksični T-limfociti (%) CD3+CD8+	<b>0,468 (&lt; 0,001)</b>	<b>-0,913 (&lt; 0,001)</b>	-0,020 (0,90)
NK-stanice (%) CD3-CD16+56+	<b>-0,376 (0,02)</b>	-0,082 (0,61)	<b>0,326 (0,04)</b>
NKT-stanice (%) CD3+CD16+56+	<b>0,881 (&lt; 0,001)</b>	<b>-0,358 (0,02)</b>	0,039 (0,81)
B-limfociti (%) CD19+20+	-0,033 (0,84)	-0,132 (0,42)	0,133 (0,41)
B1-limfociti (%) CD19+CD5+ (ograda svi limfociti)	0,006 (0,97)	-0,100 (0,54)	<b>0,800 (&lt; 0,001)</b>
glukoza	-0,113 (0,49)	0,215 (0,18)	-0,113 (0,49)
inzulin	0,049 (0,76)	-0,094 (0,56)	-0,145 (0,37)
C-peptid	0,161 (0,32)	-0,117 (0,47)	-0,203 (0,21)
HOMA-IR	-0,001 (> 0,99)	-0,067 (0,68)	-0,089 (0,59)
HbA1c	-0,115 (0,48)	0,241 (0,13)	-0,111 (0,50)
CRP	0,149 (0,36)	0,031 (0,85)	0,190 (0,24)
imunoglobulin G	0,059 (0,72)	0,078 (0,63)	0,085 (0,60)
imunoglobulin M	0,004 (0,98)	-0,030 (0,86)	0,168 (0,30)
imunoglobulin A	-0,014 (0,93)	0,072 (0,66)	-0,008 (0,96)
željezo	0,061 (0,71)	<b>-0,323 (0,04)</b>	-0,108 (0,51)
ferritin	0,254 (0,12)	-0,064 (0,70)	0,084 (0,61)
B12 vitamin	-0,237 (0,14)	0,136 (0,40)	-0,021 (0,90)
folna kiselina	-0,025 (0,88)	0,141 (0,39)	0,025 (0,88)
kolesterol	0,082 (0,62)	-0,027 (0,87)	0,165 (0,31)
HDL-kolesterol	0,065 (0,69)	-0,041 (0,80)	0,218 (0,18)
LDL-kolesterol	0,022 (0,89)	0,054 (0,74)	0,053 (0,74)
trigliceridi	0,121 (0,46)	-0,092 (0,57)	-0,066 (0,68)
NT-proBNP	-0,001 (> 0,99)	0,056 (0,74)	0,188 (0,25)

GD-gestacijski dijabetes; NK-engl.*natural killer*, HOMA-IR-engl.*Homeostatic Model Assesment for Insulin Resistance*, HbA1c-glikirani hemoglobin, CRP-C-reaktivni protein



## 5. Rezultati

Tablica 31. Povezanost NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s hematološkim i biokemijskim pokazateljima zdravih ispitanica s komplikacijama

Zdrave + komplikacije	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P vrijednost)		
	NKT/NK	pomagački/citotoksični	B1/B2
eritrociti	0,103 (0,53)	-0,187 (0,25)	-0,034 (0,84)
hemoglobin	-0,062 (0,70)	-0,011 (0,95)	0,057 (0,73)
trombociti	0,184 (0,25)	0,066 (0,69)	0,144 (0,38)
leukociti	-0,059 (0,72)	-0,121 (0,46)	-0,001 (>0,99)
neutrofili	0,072 (0,66)	<b>-0,462 (&lt; 0,001)</b>	-0,090 (0,58)
limfociti	-0,004 (0,98)	<b>0,344 (0,03)</b>	0,061 (0,71)
monociti	-0,087 (0,59)	0,257 (0,11)	0,163 (0,31)
eozinofili	0,008 (0,96)	0,257 (0,11)	0,132 (0,42)
bazofili	0,025 (0,88)	0,091 (0,58)	-0,265 (0,10)
limfociti (%) -protočni citometar	-0,037 (0,82)	0,141 (0,38)	0,153 (0,35)
T-limfociti (%) CD3+	<b>0,559 (&lt; 0,001)</b>	-0,038 (0,82)	-0,093 (0,57)
pomagački T-limfociti (%) CD3+CD4+	-0,094 (0,56)	<b>0,841 (&lt; 0,001)</b>	0,089 (0,58)
citotoksični T-limfociti (%) CD3+CD8+	<b>0,560 (&lt; 0,001)</b>	<b>-0,936 (&lt; 0,001)</b>	-0,081 (0,62)
NK-stanice (%) CD3-CD16+56+	<b>-0,621 (&lt; 0,001)</b>	-0,024 (0,88)	-0,126 (0,44)
NKT-stanice (%) CD3+CD16+56+	<b>0,767 (&lt; 0,001)</b>	<b>-0,574 (&lt; 0,001)</b>	0,033 (0,84)
B-limfociti (%) CD19+20+	-0,030 (0,85)	0,127 (0,43)	0,161 (0,32)
B1-limfociti (%) CD19+CD5+ (ograda svi ly)	0,101 (0,53)	0,021 (0,90)	<b>0,820 (&lt; 0,001)</b>
glukoza	-0,137 (0,40)	0,001 (> 0,99)	0,198 (0,22)
inzulin	-0,125 (0,44)	-0,248 (0,12)	0,038 (0,81)
C-peptid	0,070 (0,67)	-0,197 (0,22)	0,066 (0,69)
HOMA-IR	-0,136 (0,40)	-0,239 (0,14)	0,093 (0,57)
HbA1c	-0,050 (0,76)	-0,163 (0,31)	0,122 (0,45)
CRP	0,262 (0,10)	<b>-0,383 (0,01)</b>	-0,076 (0,64)
imunoglobulin G	-0,033 (0,84)	-0,195 (0,23)	-0,007 (0,97)
imunoglobulin M	-0,252 (0,12)	0,175 (0,28)	-0,169 (0,30)
imunoglobulin A	0,055 (0,73)	-0,063 (0,70)	-0,011 (0,95)
željezo	-0,005 (0,98)	-0,156 (0,34)	-0,136 (0,40)
feritin	0,092 (0,57)	-0,145 (0,37)	<b>-0,350 (0,03)</b>
B12 vitamin	0,080 (0,63)	-0,243 (0,13)	-0,271 (0,09)
folna kiselina	-0,153 (0,35)	-0,213 (0,19)	-0,167 (0,30)
kolesterol	-0,107 (0,51)	-0,020 (0,90)	0,091 (0,58)
HDL-kolesterol	<b>-0,468 (&lt; 0,001)</b>	0,241 (0,13)	-0,028 (0,87)
LDL-kolesterol	-0,092 (0,57)	0,001 (> 0,99)	0,101 (0,54)
trigliceridi	0,243 (0,13)	<b>-0,329 (0,04)</b>	-0,032 (0,84)
NT-proBNP	-0,098 (0,56)	0,323 (0,05)	-0,131 (0,43)

GD-gestacijski dijabetes; NK-engl. *natural killer*, HOMA-IR-engl. *Homeostatic Model Assesment for Insulin Resistance*, HbA1c-glikirani hemoglobin, CRP-C-reaktivni protein

## 5. Rezultati

Tablica 32. Povezanost NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s hematološkim i biokemijskim pokazateljima kod ispitanica s gestacijskim dijabetesom

GD	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P vrijednost)		
	NKT/NK	pomagački/citotoksični	B1/B2
eritrociti	-0,188 (0,23)	0,112 (0,48)	0,279 (0,07)
hemoglobin	-0,212 (0,18)	0,143 (0,37)	0,245 (0,12)
trombociti	-0,266 (0,09)	0,148 (0,35)	-0,027 (0,87)
leukociti	-0,150 (0,34)	0,061 (0,70)	-0,216 (0,17)
neutrofili	<b>-0,388 (0,01)</b>	0,056 (0,73)	0,209 (0,18)
limfociti	<b>0,328 (0,03)</b>	0,007 (0,97)	-0,186 (0,24)
monociti	0,057 (0,72)	-0,211 (0,18)	-0,159 (0,31)
eozinofili	0,171 (0,28)	0,040 (0,80)	0,019 (0,90)
bazofili	0,181 (0,25)	-0,207 (0,19)	-0,147 (0,35)
limfociti (%) -protočni citometar	0,240 (0,13)	0,088 (0,58)	-0,118 (0,46)
T-limfociti (%) CD3+	<b>0,335 (0,03)</b>	0,032 (0,84)	-0,194 (0,22)
pomagački T-limfociti (%) CD3+CD4+	-0,041 (0,80)	<b>0,799 (&lt; 0,001)</b>	-0,170 (0,28)
citotoksični T-limfociti (%) CD3+CD8+	<b>0,497 (&lt; 0,001)</b>	<b>-0,827 (&lt; 0,001)</b>	-0,077 (0,63)
NK-stanice (%) CD3-CD16+56+	<b>-0,701 (&lt; 0,001)</b>	0,129 (0,42)	0,215 (0,17)
NKT-stanice (%) CD3+CD16+56+	<b>0,841 (&lt; 0,001)</b>	<b>-0,433 (&lt; 0,001)</b>	-0,221 (0,16)
B-limfociti (%) CD19+20+	-0,029 (0,86)	-0,032 (0,84)	<b>0,338 (0,03)</b>
B1-limfociti (%) CD19+CD5+ (ograda svi limfociti)	-0,228 (0,15)	0,054 (0,74)	<b>0,875 (&lt; 0,001)</b>
glukoza	0,050 (0,75)	-0,087 (0,58)	-0,213 (0,18)
inzulin	0,073 (0,65)	<b>-0,353 (0,02)</b>	0,030 (0,85)
C-peptid	0,256 (0,10)	<b>-0,340 (0,03)</b>	-0,140 (0,38)
HOMA-IR	0,090 (0,57)	-0,301 (0,05)	-0,043 (0,78)
HbA1c	0,275 (0,08)	-0,127 (0,42)	-0,271 (0,08)
CRP	-0,019 (0,91)	0,009 (0,95)	-0,076 (0,63)
imunoglobulin G	0,106 (0,50)	-0,016 (0,92)	-0,141 (0,37)
imunoglobulin M	-0,087 (0,58)	-0,211 (0,18)	0,047 (0,77)
imunoglobulin A	-0,104 (0,51)	0,173 (0,27)	0,009 (0,96)
željezo	-0,072 (0,65)	-0,035 (0,83)	-0,036 (0,82)
feritin	-0,092 (0,56)	0,077 (0,63)	-0,063 (0,69)
B12 vitamin	-0,304 (0,05)	0,085 (0,59)	0,142 (0,37)
folna kiselina	-0,101 (0,53)	0,064 (0,69)	0,298 (0,06)
kolesterol	-0,064 (0,69)	-0,153 (0,33)	0,079 (0,62)
HDL-kolesterol	-0,244 (0,12)	0,130 (0,41)	-0,159 (0,32)
LDL-kolesterol	-0,076 (0,63)	-0,195 (0,22)	0,147 (0,35)
trigliceridi	0,148 (0,35)	-0,109 (0,49)	-0,202 (0,20)
NT-proBNP	-0,026 (0,87)	-0,043 (0,79)	-0,094 (0,55)

GD-gestacijski dijabetes; NK-engl. *natural killer*, HOMA-IR-engl. *Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*, HbA1c-glikirani hemoglobin, CRP-C-reaktivni protein

## 5. Rezultati

Tablica 33. Povezanost NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s hematološkim i biokemijskim pokazateljima ispitanica s gestacijskim dijabetesom i komplikacijama

GD + komplikacije	Spearmanov koeficijent korelacije Rho (P vrijednost)		
	NKT/NK	pomagački/citotoksični	B1/B2
eritrociti	0,080 (0,63)	-0,264 (0,10)	0,037 (0,82)
hemoglobin	0,074 (0,65)	-0,171 (0,29)	0,081 (0,62)
trombociti	-0,160 (0,33)	0,199 (0,22)	-0,290 (0,07)
leukociti	-0,047 (0,78)	0,181 (0,26)	-0,136 (0,40)
neutrofili	-0,084 (0,61)	-0,057 (0,72)	0,020 (0,90)
limfociti	0,147 (0,37)	0,006 (0,97)	-0,052 (0,75)
monociti	-0,149 (0,37)	0,091 (0,57)	0,133 (0,41)
eozinofili	-0,117 (0,48)	0,203 (0,21)	-0,231 (0,15)
bazofili	0,165 (0,31)	-0,050 (0,76)	-0,040 (0,81)
limfociti (%) -protočni citometar	0,066 (0,69)	0,004 (0,98)	-0,164 (0,31)
T-limfociti (%) CD3+	0,307 (0,06)	0,127 (0,44)	<b>-0,328 (0,04)</b>
pomagački T-limfociti (%) CD3+CD4+	-0,269 (0,10)	<b>0,847 (&lt; 0,001)</b>	<b>-0,337 (0,03)</b>
citotoksični T-limfociti (%) CD3+CD8+	<b>0,518 (&lt; 0,001)</b>	<b>-0,916 (&lt; 0,001)</b>	0,201 (0,21)
NK-stanice (%) CD3-CD16+56+	<b>-0,330 (0,04)</b>	-0,130 (0,43)	0,203 (0,22)
NKT-stanice (%) CD3+CD16+56+	<b>0,797 (&lt; 0,001)</b>	<b>-0,419 (0,01)</b>	0,240 (0,14)
B-limfociti (%) CD19+20+	0,058 (0,73)	-0,236 (0,14)	<b>0,507 (&lt; 0,001)</b>
B1-limfociti (%) CD19+CD5+ (ograda svi limfociti)	0,086 (0,60)	-0,291 (0,07)	<b>0,926 (&lt; 0,001)</b>
glukoza	0,189 (0,25)	-0,062 (0,70)	0,185 (0,25)
inzulin	<b>0,412 (0,01)</b>	-0,317 (0,05)	0,273 (0,09)
C-peptid	0,194 (0,24)	-0,181 (0,26)	0,182 (0,26)
HOMA-IR	<b>0,370 (0,02)</b>	-0,260 (0,11)	0,288 (0,07)
HbA1c	-0,088 (0,59)	-0,023 (0,89)	0,198 (0,22)
CRP	-0,051 (0,76)	-0,070 (0,67)	0,080 (0,62)
imunoglobulin G	0,023 (0,89)	<b>-0,450 (&lt; 0,001)</b>	0,062 (0,71)
imunoglobulin M	0,093 (0,57)	-0,069 (0,67)	-0,091 (0,58)
imunoglobulin A	0,243 (0,14)	<b>-0,338 (0,03)</b>	-0,095 (0,56)
željezo	<b>-0,355 (0,03)</b>	0,183 (0,26)	-0,085 (0,60)
feritin	-0,031 (0,85)	0,178 (0,27)	-0,058 (0,72)
B12 vitamin	-0,081 (0,62)	-0,210 (0,19)	0,157 (0,33)
folna kiselina	<b>-0,345 (0,03)</b>	<b>0,374 (0,02)</b>	-0,056 (0,73)
kolesterol	0,127 (0,44)	0,193 (0,23)	-0,124 (0,45)
HDL-kolesterol	-0,089 (0,59)	0,018 (0,91)	0,105 (0,52)
LDL-kolesterol	0,200 (0,22)	0,165 (0,31)	-0,238 (0,14)
trigliceridi	0,156 (0,34)	0,152 (0,35)	0,112 (0,49)
NT-proBNP	-0,204 (0,21)	0,156 (0,34)	-0,225 (0,16)

GD-gestacijski dijabetes; NK-engl.*natural killer*, HOMA-IR-engl.*Homeostatic Model Assesment for Insulin Resistance*, HbA1c-glikirani hemoglobin, CRP-C-reaktivni protein

## 5. Rezultati

Značajno su više vrijednosti omjera pomagačkih/citotoksičnih limfocita kod ispitanica s GD-om i komplikacijama u odnosu na zdrave i na zdrave ispitanice s komplikacijama (Kruskal-Wallisov test,  $P = 0,04$ ), kod GG s obzirom na *rs1800796* (*IL – 6*) (tablica 34).

Tablica 34. Razlike u omjerima NKT/NK-stanica, pomagačkih/citotoksičnih limfocita i B1/B2-limfocita s obzirom na *rs1800796* (*IL-6*)

<i>IL-6</i>	Medijan (interkvartilni raspon)			<i>P</i> *
	CC	CG	GG	
<b>zdrave (Z)</b>				
NKT/NK	-	0,52 (0,43 – 1,02)	0,42 (0,23 – 0,81)	0,26
pomagački/citotoksični limfociti	-	1,86 (1,34 - 2)	1,54 (1,31 - 1,9)	0,35
B1/B2	-	0,3 (0,14 - 0,6)	0,26 (0,14 - 0,4)	0,50
<b>zdrave + komplikacije (Z+K)</b>				
NKT/NK	-	3,31 (n = 1)	0,69 (0,39 – 1,56)	-
pomagački/citotoksični limfociti	-	1,78 (n = 1)	1,47 (1,22 - 2)	-
B1/B2	-	0,04 (n = 1)	0,23 (0,16 - 0,4)	-
<b>gestacijski dijabetes (GD)</b>				
NKT/NK	-	0,54 (0,25 – 1,69)	0,77 (0,40 – 1,45)	0,86
pomagački/citotoksični limfociti	-	1,65 (1,21 - 2,5)	1,46 (1,21 - 1,9)	0,54
B1/B2	-	0,2 (0,14 - 0,5)	0,21 (0,12 - 0,3)	0,67
<b>GD + komplikacije (GD+K)</b>				
NKT/NK	3,44 (n =1)	1,12 (0,75 - 1,56)	0,57 (0,34 – 1,14)	0,10
pomagački/citotoksični limfociti	1,28 (n =1)	2,08 (1,15 - 2,3)	1,78 (1,5 - 2,3)	0,83
B1/B2	0,321 (n =1)	0,23 (0,13 - 0,6)	0,30 (0,17 - 0,5)	0,87
<b>†<i>P</i> vrijednost (između skupina)</b>				
NKT/NK	-	0,50	0,06	
pomagački/citotoksični limfociti	-	0,98	<b>0,04<sup>‡</sup></b>	
B1/B2	-	0,42	0,26	

\*Mann-Whitney U-test; †Kruskal-Wallisov test (post hoc Conover)

‡na razini  $P < 0,05$  značajne su razlike (GD+K) vs. (Z+K, GD)

## 5. Rezultati

Nema značajnih razlika u vrijednostima omjera s obzirom na genotip rs1800796 (*IL-10*) (tablica 35).

Tablica 35. Razlike u omjerima NKT/NK-stanica, pomagačkih/citotoksičnih limfocita i B1/B2-limfocita s obzirom na rs1800796 (*IL – 10*)

<i>IL-10</i>	Medijan (interkvartilni raspon)			<i>P</i> *
	CC	TC	TT	
<b>zdrave</b>				
NKT/NK	0,27 (0,23 – 0,42)	0,42 (0,21 – 0,73)	0,71 (0,42 – 1,08)	0,05
pomagački/citotoksični limfociti	1,87 (1,36 - 2,6)	1,76 (1,36 - 2)	1,36 (1,28 - 1,7)	0,13
B1/B2	0,31 (0,17 - 0,8)	0,26 (0,14 - 0,4)	0,2 (0,13 - 0,3)	0,55
<b>zdrave + komplikacije</b>				
NKT/NK	0,60 (0,31 – 1,71)	0,95 (0,39 – 1,53)	0,63 (0,40 – 0,94)	0,49
pomagački/citotoksični limfociti	1,47 (1,05 - 1,9)	1,53 (1,22 - 2,1)	1,42 (1,23 - 1,9)	0,81
B1/B2	0,23 (0,15 - 0,3)	0,38 (0,15 - 0,5)	0,21 (0,15 - 0,3)	0,21
<b>gestacijski dijabetes (GD)</b>				
NKT/NK	0,62 (0,23 – 1,43)	0,64 (0,45 – 1,25)	1,10 (0,40 – 1,68)	0,61
pomagački/citotoksični limfociti	1,61 (1,15 - 2,4)	1,4 (1,32 - 1,9)	1,46 (1,1 - 1,9)	0,64
B1/B2	0,28 (0,11 - 0,5)	0,22 (0,12 - 0,3)	0,16 (0,13 - 0,3)	0,55
<b>GD + komplikacije</b>				
NKT/NK	0,56 (0,43 – 0,87)	0,68 (0,34 – 1,39)	0,66 (0,45 – 1,11)	0,94
pomagački/citotoksični limfociti	1,66 (1,52 - 2,1)	1,7 (1,28 - 2,3)	1,8 (1,48 - 2,3)	0,82
B1/B2	0,36 (0,1 - 0,7)	0,24 (0,18 - 0,5)	0,28 (0,14 - 0,5)	0,85
<b>*P vrijednost (između skupina)</b>				
NKT/NK	0,23	0,10	0,73	
pomagački/citotoksični limfociti	0,65	0,56	0,11	
B1/B2	0,73	0,24	0,64	

\*Kruskal-Wallisov test

## 5. Rezultati

Omjer pomagačkih/citotoksičnih limfocita značajno je veći kod genotipa AG u skupini zdravih ispitanica (Mann-Whitney U-test,  $P = 0,03$ ) s obzirom na rs1800629 (*TNF- $\alpha$* ). Također, omjer pomagačkih/citotoksičnih limfocita u skupini s genotipom GG značajno je veći kod ispitanica s GD-om i komplikacijama u odnosu na zdrave ispitanice s komplikacijama i na ispitanice s GD-om (Kruskal-Wallisov test,  $P = 0,02$ ) (tablica 36).

Tablica 36. Razlike u omjerima NKT/NK-stanica, pomagačkih/citotoksičnih limfocita i B1/B2-limfocita s obzirom na rs1800629 (*TNF- $\alpha$* )

<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	Medijan (interkvartilni raspon)			<i>P</i>
	AA	AG	GG	
<b>zdrave (Z)</b>				
NKT/NK	-	0,43 (0,25 – 1,10)	0,49 (0,24 – 0,78)	0,93 <sup>†</sup>
pomagački/citotoksični limfociti	-	2,03 (1,4 - 2,3)	1,5 (1,3 - 1,8)	<b>0,03<sup>†</sup></b>
B1/B2	-	0,18 (0,13 - 0,3)	0,29 (0,14 - 0,4)	0,20 <sup>†</sup>
<b>zdrave + komplikacije (Z+K)</b>				
NKT/NK	0,63 (0,22 – 0,97)	0,55 (0,29 – 1,02)	0,77 (0,39 – 1,65)	0,33 <sup>*</sup>
pomagački/citotoksični limfociti	1,93 (1,23 - 2,4)	1,83 (1,37 - 2,4)	1,46 (1,18 - 1,7)	0,16 <sup>*</sup>
B1/B2	0,18 (0,14 - 0,4)	0,24 (0,13 - 0,3)	0,23 (0,18 - 0,4)	0,67 <sup>*</sup>
<b>gestacijski dijabetes (GD)</b>				
NKT/NK	0,91 (0,23 – 1,59)	0,77 (0,51 – 1,69)	0,72 (0,38 – 1,45)	0,89 <sup>*</sup>
pomagački/citotoksični limfociti	1,74 (0,82 - 1,8)	1,69 (1,35 - 2,4)	1,43 (1,17 - 1,8)	0,35 <sup>*</sup>
B1/B2	0,19 (0,09 - 0,2)	0,21 (0,12 - 0,4)	0,21 (0,13 - 0,3)	0,81 <sup>*</sup>
<b>GD + komplikacije (GD+K)</b>				
NKT/NK	1,11 (n = 1)	0,72 (0,55 – 0,88)	0,64 (0,34 – 1,48)	0,77 <sup>*</sup>
pomagački/citotoksični limfociti	2,36 (n = 1)	1,97 (1,15 - 2,5)	1,7 (1,48 - 2,2)	0,49 <sup>*</sup>
B1/B2	0,38 (n = 1)	0,38 (0,19 - 0,5)	0,24 (0,15 - 0,5)	0,84 <sup>*</sup>
<b>*P vrijednost (između skupina)</b>				
NKT/NK	0,50	0,50	0,11	
pomagački/citotoksični limfociti	0,89	0,96	<b>0,02</b>	
B1/B2	0,54	0,60	0,34	

\*Kruskal-Wallisov test; <sup>†</sup>Mann-Whitney U-test

<sup>‡</sup>na razini  $P < 0,05$  značajne su razlike (GD+K) vs. (Z+K, GD)

## 5. Rezultati

U slučaju rs266729 (*AdipoQ*) kod CC značajno su niže vrijednosti omjera NKT/NK-stanica kod zdravih ispitanica u odnosu na sve ostale skupine (Kruskal-Wallisov test,  $P = 0,02$ ) (tablica 37).

Tablica 37. Razlike u omjerima NKT/NK-stanica, pomagačkih/citotoksičnih limfocita i B1/B2-limfocita s obzirom na rs266729 (*AdipoQ*)

<i>AdipoQ</i>	Medijan (interkvartilni raspon)			<i>P</i> *
	CC	CG	GG	
<b>zdrave (Z)</b>				
NKT/NK	0,31 (0,17 – 0,71)	0,54 (0,34 – 0,91)	0,68 (0,42 – 0,94)	0,25
pomagački/citotoksični limfociti	1,7 (1,33 - 2)	1,44 (1,25 - 1,8)	1,93 (1,35 - 1,6)	0,41
B1/B2	0,32 (0,17 - 0,5)	0,18 (0,12 - 0,3)	0,29 (0,21 - 0,3)	0,12
<b>zdrave + komplikacije</b>				
NKT/NK	0,74 (0,63 – 1,62)	0,48 (0,30 – 1,44)	0,77 (0,53 – 1,42)	0,20
pomagački/citotoksični limfociti	1,64 (1,23 - 2)	1,47 (1,19 - 2,1)	1,49 (0,61 - 1,7)	0,76
B1/B2	0,26 (0,19 - 0,4)	0,22 (0,14 - 0,4)	0,23 (0,19 - 0,5)	0,50
<b>gestacijski dijabetes (GD)</b>				
NKT/NK	0,77 (0,37 – 1,50)	0,91 (0,38 – 1,59)	0,68 (0,35 – 1,15)	0,81
pomagački/citotoksični limfociti	1,49 (1,17 - 1,9)	1,4 (1,18 - 1,7)	1,96 (1,32 - 3,5)	0,26
B1/B2	0,23 (0,12 - 0,4)	0,22 (0,13 - 0,3)	0,2 (0,14 - 0,2)	0,76
<b>GD + komplikacije</b>				
NKT/NK	0,61 (0,45 – 1,25)	0,69 (0,28 – 1,32)	0,43 (0,26 – 1,91)	0,91
pomagački/citotoksični limfociti	1,7 (1,47 - 2,1)	1,82 (1,57 - 2,4)	1,32 (1,04 - 3,9)	0,58
B1/B2	0,34 (0,12 - 0,5)	0,34 (0,19 - 0,6)	0,24 (0,11 - 0,3)	0,39
<b>*P vrijednost (između skupina)</b>				
NKT/NK	<b>0,02<sup>†</sup></b>	0,73	0,85	
pomagački/citotoksični limfociti	0,39	0,16	0,61	
B1/B2	0,59	0,10	0,15	

\*Kruskal-Wallisov test

<sup>†</sup>na razini  $P < 0,05$  značajne su razlike (Z) vs. sve ostale skupine

## 5. Rezultati

Nema značajnih razlika u vrijednostima IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i adiponektina s obzirom na genotipove analiziranih SNP-ova u pojedinoj skupini ispitanica (tablica 38).

Tablica 38. Razlike u vrijednostima IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i adiponektina s obzirom na genotipove analiziranih SNP-ova u pojedinoj skupini ispitanica

		Medijan (interkvartilni raspon)			<i>P</i> *
<b>rs1800796 (IL-6)</b>		<b>CC</b>	<b>CG</b>	<b>GG</b>	
IL-6	zdrave	-	2,4 (2,1 – 3,8)	2,4 (1,8 – 3,4)	0,80
	zdrave + komplikacije	-	1,5 (n = 1)	2,6 (1,9 – 3,9)	0,13
	GD	-	2,0 (1,5 – 4,2)	2,3 (1,6 – 3,3)	0,60
	GD + komplikacije	6,5 (n = 1)	4,1 (2,9 – 5,7)	3,1 (2,5 – 4,2)	0,25
<b>rs1800896 (IL-10)</b>		<b>CC</b>	<b>TC</b>	<b>TT</b>	
IL-10	zdrave	-	-	-	-
	zdrave + komplikacije	-	-	-	-
	GD	-	-	-	-
	GD + komplikacije	-	-	-	-
<b>rs1800629 (TNF-<math>\alpha</math>)</b>		<b>AA</b>	<b>AG</b>	<b>GG</b>	
TNF- $\alpha$	zdrave	-	4,3 (0 – 6,2)	2,2 (0 – 4,9)	0,62
	zdrave + komplikacije	0 (0 – 9,7)	0 (0 – 1,0)	0 (0 – 4,6)	0,79
	GD	2,1 (0 – 5,5)	0 (0 – 5)	4,5 (0 – 5,4)	0,49
	GD + komplikacije	0 (n = 1)	0 (0 – 5,2)	4,8 (0 – 5,8)	0,19
<b>rs266729 (AdipoQ)</b>		<b>CC</b>	<b>CG</b>	<b>GG</b>	
adiponektin	zdrave	12,8 (3,8 – 27,7)	19,4 (2,3 – 44,6)	21,9 (15,2 – 18,7)	0,82
	zdrave + komplikacije	7,6 (4,7 – 21,3)	8,4 (4,6 – 14,5)	4,6 (3,2 – 25,0)	0,88
	GD	18,0 (5,4 – 21,3)	15,1 (8,3 – 30,4)	13,8 (3,9 – 50,5)	0,99
	GD + komplikacije	17,2 (5,3 – 29,6)	15,4 (7,9 – 21,8)	21,4 (19,1 – 24,7)	0,54

\*Kruskal-Wallisov test; GD-gestacijski dijabetes, IL-interleukin, TNF-*engl.tumor necrosis factor*



## 6. RASPRAVA

Cilj ovog presječnog istraživanja bio je vidjeti postoje li razlike u omjerima NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita između trudnica s GD-om i zdravih trudnica te koreliraju li navedeni omjeri u GD-u s povišenim vrijednostima proupalnih faktora (IL-6 i TNF- $\alpha$ ) i sniženim vrijednostima protuupalnih faktora (IL-10 i adiponektin) te razinu povezanosti sa specifičnim varijantama gena za navedene proupalne i protuupalne faktore. Dobiveni su rezultati uspoređeni između trudnica koje nisu razvile GD i trudnica s GD-om te u manjim grupama među četirima skupinama trudnica: zdravih trudnica (kojima nije dijagnosticirana šećerna bolest) bez komplikacija i s komplikacijama i trudnica s GD-om bez drugih komplikacija i s drugim komplikacijama. Iako nije bilo statistički značajne razlike u omjerima NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita između trudnica s GD-om i zdravih trudnica, istraživanje je pokazalo da su genotip CG u rs1800769 u genu za IL-6 i genotip CC u rs266729 u genu za adiponektin povezani s rizikom za razvoj GD-a, a omjer B1/B2-limfocita u značajnoj je vezi s vrijednostima adiponektina kod trudnica s GD-om. GD je najčešći metabolički poremećaj u trudnoći, a povećana učestalost pretilosti, starija životna dob trudnica i promjene u načinu života koje uključuju nezdravu prehranu i slabiju fizičku aktivnost doveli su do trenda porasta učestalosti i GD-a (104, 106). Iako je poznato da inzulinska rezistencija postupno raste od 12. tjedna gestacije, a da kod GD-a dolazi do izrazitog porasta glukoze u krvi zbog smanjene funkcije gušterače i visoke inzulinske rezistencije, i dalje nije poznato koji čimbenici dovode do ovog stanja te tako patofiziologija GD-a ostaje nerazjašnjena. Pretpostavlja se da bi imunološki sustav trudnice i njegova disfunkcija mogli igrati glavnu ulogu u razvoju inzulinske rezistencije i oštećenja  $\beta$ -stanica gušterače. Posljednjih godina sve je veći broj istraživanja ove teme, no već je pregled studija o toj temi prije nekoliko godina pokazao da ne postoji nijedno istraživanje koje uključuje profil B-limfocita, pomagačkih i citotoksičnih T-limfocita, NK i NKT stanica te njihovu povezanost s lučenjem proupalnih i protuupalnih čimbenika u trudnica s GD-om te da je njihova patofiziološka uloga u razvoju GD-a nepoznata (110). Stoga je izvorni znanstveni doprinos ovog istraživanja omjer B1- i B2-limfocita kod trudnica s GD-om i zdravih kontrolnih trudnica te korelacija vrijednosti IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i adiponektina s varijantama gena za IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i adiponektin jer, iako je dosad provedeno

## 6. Rasprava

nekoliko sličnih istraživanja, nijedno do sada nije obuhvatilo B-limfocite ni korelaciju citokina s alelnim varijantama u njihovim SNP-ovima kao ni ovu širinu određivanih parametara.

### 6.1. Opća i klinička obilježja trudnica

Iz prikupljenih općih podataka o trudnicama vidljivo je da su trudnice s GD-om starije od trudnica kojima nije dijagnosticiran GD u trudnoći, što je u skladu s očekivanjima i dosadašnjim znanjima o GD-u. Velika je metaanaliza, koja je uključila preko 120 milijuna ispitanica i objavljena 2022. godine, pokazala snažnu povezanost između rizika od razvoja GD-a i dobi majke, s linearnim povećanjem te predložila graničnu dob trudnica od 25 godina za probir na GD (111). Laine i suradnici u svojem su kohortnom istraživanju dokazali da prvorotkinje starije od 35 godina imaju tri puta veći rizik za razvoj GD-a od prvorotkinja mlađih od 25 godina (112). Iako se dob trudnice uvijek ubraja u rizične čimbenike za razvoj GD-a, točan razlog zašto se incidencija GD-a povećava s dobi trudnice nije do sada posve razjašnjena.  $\beta$ -stanice gušterače kod mladih su visoko proliferativne i brzo se povećava njihov broj od prenatalne faze do tridesete godine života. Izlučivanje inzulina u odrasloj dobi smanjuje se za 0,7 % godišnje, no smanjuje se i funkcija inzulina sa životnom dobi, odnosno raste inzulinska rezistencija (113, 114). Iako se proliferacija  $\beta$ -stanica gušterače može povećati tijekom trudnoće, patogeneza GD-a kod starijih majki može biti posljedica inzulinske rezistencije povezane sa starenjem i disfunkcijom  $\beta$ -stanica gušterače.

U ovom su istraživanju trudnice s GD-om bile niže obrazovane u odnosu na zdrave trudnice kod kojih je statistički značajno više bilo trudnica visoke stručne spreme. Godine 2019. objavljena je metaanaliza koja je dokazala da ne postoji statistički značajna razlika u stupnju obrazovanja trudnica koje su razvile GD i onih koje ga nisu (115). Moguće je da je veći postotak visoko obrazovanih trudnica u kontrolnoj skupini s obzirom na to da je riječ o manjem istraživanju te da na većoj populaciji ne bi postojala statistički značajna razlika u razini obrazovanja.

ITM se smatra rizičnim čimbenikom za razvoj GD-a te je ovaj podatak zastupljen u gotovo svakom istraživanju. Ono što se pokazalo i u ovom istraživanju jest da trudnice s GD-om imaju veći ITM od zdravih trudnica. Statistički je značajna razlika bila kod trudnica s GD-om i komplikacijama u odnosu na preostale skupine. Mirabelli i suradnici u svojoj su studiji dokazali da ITM majke prije trudnoće igra ključnu ulogu u razvoju

## 6. Rasprava

GD-a. ITM je pokazatelj visceralne pretilosti i sustavne inzulinske rezistencije te je modifikacijski čimbenik rizika za GD, stoga ga autori te studije predlažu kao prikladnu metu za podizanje svijesti javnosti o GD-u (116).

Kava je uobičajeno piće u cijelom svijetu, a sastoji se od kombinacije antioksidansa i mikronutrijenata koji povoljno djeluju na kardiovaskularne bolesti. Dosadašnja su istraživanja pokazala da ne postoji povezanost između konzumacije kave i rizika za razvoj GD-a u trudnoći (117, 118) ili da umjerena konzumacija kave s kofeinom prije trudnoće može imati zaštitnu ulogu u razvoju GD (119). Za razliku od prijašnjih istraživanja ovo je istraživanje pokazalo da značajnije više trudnica s GD-om konzumira kavu, a razlika je vidljiva među skupinama trudnica koje su uz GD imale dodatne komplikacije u odnosu na skupinu zdravih trudnica i skupinu zdravih trudnica s komplikacijama koje mogu utjecati na imunološki profil.

Prethodno je istraživanje pokazalo da je unos crvenog i prerađenog mesa prije trudnoće značajno i pozitivno povezan s rizikom od nastanka GD-a te žene koje su konzumirale više od šest porcija crvenog mesa tjedno imale su više od 1,7 puta veći rizik za razvoj GD-a u usporedbi s onim ženama koje su konzumirale manje od 1,5 porcije crvenog mesa tjedno. Pozitivna veza pronađena je i između rizika za razvoj GD-a i glikemijskog indeksa te unosa zaslađene Coca-Cole, dok nije bilo značajne veze s ostalim zašećerenim napitcima i dijetalnim pićima. Žene koje su konzumirale više od pet porcija Coca-Cole tjedno imale su 22 % veći rizik za razvoj GD-a. Nasuprot tome, konzumacija dijetalnih vlakana prije trudnoće (žitarica i voća) bila je značajno i obrnuto povezana s rizikom za GD (120). U ovom su se istraživanju trudnice s GD-om i komplikacijama izjasnile da imaju najmanje raznoliku prehranu u odnosu na preostale skupine trudnica, bogatu crvenim mesom, zaslađenim napitcima, zašećerenim obrocima i grickalicama što ide u prilog rezultatima prijašnjeg istraživanja. Iz toga se može zaključiti da je prehrana bitan čimbenik za razvoj GD-a te postoji mogućnost da je raznolikom prehranom moguće prevenirati razvoj GD-a i sličnih metaboličkih komplikacija u trudnoći.

U skupini ispitanica s GD-om i komplikacijama učestalija je i šećerna bolest u obitelji, endokrine bolesti i povišen krvni tlak prije trudnoće ili u prethodnoj trudnoći i problemi sa zanošenjem. Dokazano je da žene s hipertenzijom, bilo tijekom pet godina prije trudnoće ili tijekom prvog tromjesečja trudnoće, imaju dvostruko veći rizik od razvoja GD-a tijekom trudnoće te je ta povezanost neovisna o ITM-u žene. Međutim,

## 6. Rasprava

povezanost između krvnog tlaka i GD-a bila je jača među ženama s prekomjernom težinom (121).

Osim što je hipertenzija potvrđena kao čimbenik rizika za razvoj GD-a, ujedno je u ovom istraživanju i najčešća komplikacija uz GD. Hipertenzivni poremećaji u trudnoći, koji uključuju već postojeću hipertenziju, gestacijsku hipertenziju i preeklampsiju, dodatno kompliciraju visokorizične trudnoće. Najmanje 20 % trudnica s dijabetesom razvit će gestacijsku hipertenziju ili preeklampsiju, pri čemu su najrizičnije pacijentice s mikrovaskularnim komplikacijama, već postojećom hipertenzijom ili lošom kontrolom glikemije. Gestacijski dijabetes također povećava rizik žene za razvoj hipertenzivnih poremećaja u trudnoći te žene s GD-om imaju 1,5 puta veći rizik za razvoj gestacijske hipertenzije ili preeklampsije (122).

Najmanju razliku u kilogramima od početka trudnoće do trenutka uključivanja u ispitivanje imale su trudnice kojima je jedina komplikacija u aktualnoj trudnoći GD. U literaturnim podacima može se pronaći da razlika u kilogramima kod trudnica s GD-om varira te postoje posljedice i prevelike i premale razlike u dobivenim kilogramima. Prekomjerna razlika u tjelesnoj težini neovisno je povezana s makrosomijom, neonatalnom hipoglikemijom, prijevremenim porodom i porodom carskim rezom, dok je nedovoljna razlika povezana s prijevremenim porodom (123–125).

Istraživanje je pokazalo statistički značajnu razliku u svim točkama OGTT-a između ispitivanih skupina trudnica. Trudnice s GD-om imale su značajno više vrijednosti u svim trima točkama OGTT-a, što je fiziološki očekivano s obzirom na to da imaju narušenu inzulinsku rezistenciju i funkciju  $\beta$ -stanica gušterače te su zbog toga razvile dijabetes tijekom trudnoće. Jednako je i istraživanje provedeno na znatno većoj populaciji trudnica pokazalo slične rezultate gdje su glukoza natašte u plazmi i nakon opterećenja u OGTT-u (glukoza u plazmi nakon 1 i 2 sata od opterećenja) bile značajno više u skupini ispitanica s GD-om nego u skupini zdravih trudnica (126).

### 6.2. Hematološki i biokemijski parametri

Zhang i suradnici svojim su istraživanjem pokazali da se parametri krvne slike tijekom trudnoće s GD-om značajno mijenjaju. Prema njihovim rezultatima u prvom tromjesečju nema razlika u parametrima krvne slike između trudnica s GD-om i kontrolne skupine, u drugom tromjesečju skupina trudnica s GD-om pokazala je

## 6. Rasprava

značajno viši broj eritrocita i trombocita od kontrolne skupine, dok je u posljednjem tromjesečju skupina ispitanica s GD-om pokazala značajno više brojeve eritrocita, veću širinu distribucije crvenih krvnih stanica (RDW) i širinu distribucije trombocita (PDW) i niže vrijednosti hemoglobina od kontrolne skupine (127). Ovim istraživanjem nisu se potvrdili njihovi rezultati, s obzirom na to da statistički značajna razlika u parametrima krvne slike nisu pronađeni između trudnica s GD-om i zdravih trudnica ni među četirima skupinama ispitanica. Međutim, pokazalo se da su vrijednosti eozinofila i bazofila značajnije niže u skupini trudnica s GD-om. Eozinofili su zrnate bijele stanice s jezgrom koje predstavljaju do 6 % stanica koštane srži. Njihov razvoj i sazrijevanje događa se u nedovoljnoj izloženosti koštane srži mijeloidnim prekursorima IL-3, faktoru stimulacije kolonije granulocita i makrofaga i IL-5. IL-5 je osobito važan za završni stadij diferencijacije eozinofila i migracije u cirkulirajuću krv te je on ključni citokin u preživljavanju cirkulirajućih i tkivnih eozinofila jer sprječava apoptozu eozinofila i potiče aktivaciju stanica (128). Niži broj eozinofila pronađen je i kod trudnica s preeklampsijom u usporedbi sa zdravim trudnicama. Preeklampsija utječe na ekspresiju gena, proizvodnju i izlučivanje različitih molekula u organizmu koje su ključne za regulaciju eozinofila u perifernoj cirkulaciji. U preeklampsiji se povećavaju interferoni tipa 1 koji induciraju apoptozu eozinofilnih stanica, smanjuje se IL-5 koji je važan za diferencijaciju i preživljavanje cirkulirajućih eozinofila te preeklampsija može uzrokovati stres kod trudnica što sve može biti razlog sniženih eozinofila (129). Kako su preeklampsija i GD slične etiologije u trudnoći, sa sličnim patofiziološkim mehanizmom i rizičnim čimbenicima, nije neočekivano da je postotak eozinofila u oba slučaja niži u odnosu na zdrave trudnice. Početna hipoteza ovog rada bila je da će postojati razlika u postotcima pomagačkih T-limfocita među ispitivanim skupinama trudnica, što nije uspješno dokazano. Međutim, pomagački T-limfociti proizvode IL-5, o čijoj vrijednosti ovisi broj eozinofila, što može ukazati na oslabljenu funkciju pomagačkih T-limfocita u GD-u.

Značajno više vrijednosti kod ispitanica s GD-om u odnosu na kontrolnu skupinu pronađene su kod inzulina, C-peptida, HbA1c, CRP-a, HDL-kolesterola i triglicerida. To je potvrdilo dosadašnje spoznaje o povećanoj inzulinskoj rezistenciji i sniženoj osjetljivosti na inzulin kod trudnica s GD-om. Ovi podaci mogu ukazivati na pojačanu proizvodnju C-peptida i inzulina kako bi se održala homeostaza glukoze zbog snižene osjetljivosti perifernih tkiva na inzulin, ali pojačano lučenje inzulina i C-peptida može biti i uzrok povećane koncentracije glukoze u krvi. Slične rezultate dobili su i u

## 6. Rasprava

istraživanju provedenom na trudnicama između 16. i 33. gestacijskog tjedna, gdje su trudnice s GD-om imale izmjerene više vrijednosti glukoze, inzulina i C-peptida u odnosu na zdrave trudnice, a rezultati su pokazali značajnu povezanost između razvoja GD-a i izmjerenih koncentracija glukoze, inzulina i C-peptida natašte i 2 sata nakon jela (130). Kako C-peptid ima prednosti u odnosu na inzulin: dulji poluživot, zanemariva ekstrakcija prvog prolaska kroz jetru i stalniji klirens te posljedično stabilnija koncentracija u krvi, istraživanja su pretežno temeljena na njemu te su sva potvrdila njegovu povezanost s GD-om i ističu ga kao parametar vrijedan razmatranja za probir na GD (95,96,131–133).

HbA1c se nije pokazao kao dobar biljeg GD-a s obzirom na to da on ovisi i o koncentraciji hemoglobina u krvi, koja je fiziološki u trudnoći niža i ima visoku interindividualnu varijabilnost te su Rajput i suradnici naglasili da se može koristiti u dijagnostici GD-a samo uz OGTT (134). Prednost HbA1c manja je međulaboratorijska varijabilnost, manja intraindividualna varijabilnosti i što na njega ne utječu obroci, gladovanje, akutni stres ili lijekovi (135). Međutim, ne postoji prag za HbA1c u trudnoći; u četiri studije procijenjeni su različiti pragovi za dijagnozu GD-a (134, 136–138). Međutim, većina smjernica preporučuje HbA1c > 6,5 % za dijagnozu GD-a (139). Ovo je istraživanje pokazalo da trudnice s GD-om imaju više vrijednosti HbA1c, to jest da su one imale više koncentracije glukoze tijekom razvoja trudnoće u odnosu na zdrave trudnice. Vidljivo je da postoji razlika u HbA1c između zdravih trudnica i trudnica s GD-om neovisno o tome imaju li dodatne komplikacije, što ukazuje na to da su vrijednosti glukoze kod trudnica koje su razvile GD bile značajnije više u odnosu na trudnice koje nisu razvile GD. Rajput (134) i suradnici u svom su istraživanju istaknuli kako bi se vrijednost HbA1c kao biljega GD-a trebala ispitati za specifičnu populaciju, ovisno o geografskoj regiji, što su potvrdili i Saravanan i suradnici u nedavnom istraživanju, te su zaključili da bi HbA1c mogao biti parametar u probiru i dijagnostici GD-a u njihovoj populaciji (140), a ovo je istraživanje potvrdilo da bi isto tako mogao i našoj populaciji biti dobar biljeg, s obzirom na statistički značajnu razliku između trudnica s GD-om i zdravih trudnica.

Više vrijednosti CRP-a kod trudnica s GD-om potvrđuju da je GD upalno stanje organizma. Najniže vrijednost CRP-a pronađene su kod zdravih trudnica u usporedbi s trima preostalim skupinama što je očekivano. Budući da su različite studije koristile različite metode za procjenu CRP-a i različite kriterije za dijagnosticiranje GD-a, neke od njih nisu uspjele dokazati povišeni CRP u žena s GD-om (12). Treba naglasiti da

## 6. Rasprava

kada se uzme u obzir ITM, odnos između CRP-a i GD-a slabiji je ili nestaje (94, 141). Također, treba uzeti u obzir da CRP nije specifičan marker i može biti povišen kod upalnih procesa u različitim sustavima, zbog čega je i ovo istraživanje pokazalo najniže vrijednosti kod zdravih trudnica. No zbog gore navedenih kontradiktornih nalaza i njegove niske specifičnosti, malo je vjerojatno da će CRP imati primjenu kao nezavisni marker za GD.

Povećane vrijednosti triglicerida mogu biti povezane s inzulinskom rezistencijom jer je pod njezinim utjecajem povećana jetrena proizvodnja triglicerida, zbog čega se njihova koncentracija povećava i u krvi, a kako su tkiva manje osjetljiva na inzulin i ona manje iskorištavaju trigliceride. Međutim, neočekivan je rezultat ovog istraživanja da su trudnice s GD-om imale više vrijednosti HDL-kolesterola u odnosu na zdrave trudnice. HDL-kolesterol poznat je kao „dobar“ kolesterol i ima protektivnu ulogu te pomaže uklanjanju kolesterola iz krvi. Kod inzulinske rezistencije vrijednosti HDL-kolesterola uobičajeno su snižene, dok su vrijednosti LDL-kolesterola povišene. Istraživanje je pokazalo da trudnice s GD-om neovisno o komplikacijama imaju više vrijednosti HDL-kolesterola i triglicerida u usporedbi sa zdravim trudnicama bez komplikacija. Clark i suradnici u svom su istraživanju uočili da trudnice s GD-om imaju više vrijednosti triglicerida, ali niže vrijednosti HDL-kolesterola od zdravih trudnica te da su ti parametri dobar prediktor GD-a ako se mjere dva sata nakon jela (130).

Više vrijednosti inzulina i C-peptida imaju trudnice s GD-om i komplikacijama u odnosu na trudnice koje nemaju druge komplikacije uz GD. To je potvrda da se inzulinska rezistencija pojačava u trudnoći koja uz GD ima i dodatne komplikacije poput hipertenzije ili poremećaja rada štitnjače. Dodatne komplikacije pojačavaju upalni proces, a upala dovodi do oštećenja stanica i dodatnog smanjenja njihove osjetljivosti na inzulin. Stoga je očekivano da je istraživanje pokazalo kako zdrave trudnice bez komplikacija imaju najniže koncentracije C-peptida u odnosu na sve trudnice, dok najviše vrijednosti imaju trudnice koje imaju GD i neki drugi komorbiditet.

Najviše vrijednosti IL-6 izmjerene su u skupini trudnica s GD-om i komplikacijama te su se rezultati statistički razlikovali od preostalih triju skupina ispitanica. IL-6 ukazuje na prisutnost upale u organizmu. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je trudnoća komplicirana GD-om i nekom od dodatnih komplikacija veće upalno stanje organizma od trudnoće koja za komplikaciju ima samo GD ili neki drugi komorbiditet, kao što je hipertenzija ili poremećaj rada štitnjače. Amirian i suradnici u svom su preglednom članku analizirali dvadeset i četiri istraživanja željene kvalitete koji su

## 6. Rasprava

zadovoljili kriterije, od kojih je šesnaest studija pokazalo statistički značajnu povezanost između IL-6 i GD-a, dok u osam studija nije uočena nikakva veza između razine IL-6 i GD-a (142). S obzirom na to da je u ovom istraživanju najviše vrijednosti IL-6 imala skupina trudnica s GD-om i dodatnim komplikacijama, ne može se potvrditi da je IL-6 isključivo vezan za GD.

### 6.3. Povezanost NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita s hematološkim i biokemijskim pokazateljima

Ovim istraživanjem ispitana je povezanost omjera proupalnih i protuupalnih faktora s omjerom NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita kod svih ispitanica. Uočljivo je da u skupini zdravih ispitanica nema značajnih povezanosti između navedenih omjera i mjerenih proupalnih i protuupalnih citokina.

U skupini zdravih ispitanica s komplikacijama uočljivo je da što je veći omjer NKT/NK-stanica, to su više vrijednosti IL-6. Utvrđeno je da su IL-6 i IL-8 pleiotropni citokini uključeni u upalne procese, kao što su proupalna stanična kemotaksa, angiogeneza, mitozna i indukcija proliferacije. Pretvornik signala JAK i STAT važni su putevi koji pokreću IL-6. Proteini obitelji STAT uključuju šest članova koji imaju različite funkcije. Protočnom citometrijom ili Western blotom Wu i suradnici potvrdili su da se razina p-STAT3 u NK-stanicama povećala nakon stimulacije IL-6 te da se dodavanjem antitijela na IL-6 reverzibilno vraća razina p-STAT3 na početnu vrijednost (143). Ti podatci upućuju na to da IL-6 potiče fosforilaciju STAT3 kako bi oslabio funkciju NK-stanica. U tumorskim je stanicama dokazano da IL-6 ima pleiotropne učinke na efektorske stanice u antitumorskom odgovoru potičući diferencijaciju T-limfocita i inhibirajući citotoksičnost NK-stanica (144). Kod T2DM dokazano je da su veći postotci NKT- i NK-stanica što upućuje na aktivirani status prirodnog imunološkog sustava (55). Iz svega navedenog, može se zaključiti da je povezanost omjera NKT/NK-stanica s vrijednostima IL-6 u skladu s postojećim znanstvenim spoznajama. GD je stanje kronične upale te je bila očekivana povećana aktivnost NKT-stanica u regulaciji upalnog procesa. Aktivirane NKT-stanice mogu pojačano lučiti upalne citokine, pa tako i IL-6, ali i IL-6 može djelovati na NKT-stanice potičući njihovu aktivaciju i proliferaciju, čime se stvara pozitivna povratna sprega. S obzirom na to da povezanosti nije bilo kod trudnica s GD-om i kod zdravih trudnica bez imunoloških komplikacija, može se



## 6. Rasprava

zaključiti da je ova povezanost isključivo vezana za upalnu patologiju i imunološki sustav, a ne za zdravu trudnoću i GD.

U skupini zdravih ispitanica s komplikacijama uz više vrijednosti omjera pomagačkih/citotoksičnih limfocita niže su vrijednosti IL-6. Viši omjer pomagačkih/citotoksičnih limfocita mogao bi ukazivati na stanje imunosupresije kod zdravih trudnica s komplikacijom koja ima utjecaja na imunološki odgovor i smanjenu sposobnost imunološkog sustava, a time može biti smanjena i proizvodnja protuupalnih citokina kao što je IL-6 kako bi se spriječila prekomjerna upala. S druge strane, viši omjeri pomagačkih/citotoksičnih limfocita mogli bi ukazivati i na prevladavanje podskupova pomagačkih limfocita koji su manje povezani s proizvodnjom IL-6 s obzirom na to da je dokazano da Th2-limfociti proizvode IL-6, dok ga Th1-limfociti ne proizvode (145). U tumorskim je stanicama dokazano da IL-6 potiče citotoksični T-odgovor potičući aktivaciju i proliferaciju citotoksičnih T-limfocita (146–148). Mehanizam djelovanja IL-6 na citotoksične limfocite mogao bi biti sličan i kod GD-a te bi se tako mogao objasniti obrnuti odnos omjera pomagačkih/citotoksičnih limfocita i IL-6 kod trudnica s komplikacijama u trudnoći.

Kod ispitanica s GD-om omjer B1/B2-limfociti niži je kod viših vrijednosti IL-6. IL-6 može utjecati na sazrijevanje i funkciju B-limfocita utječući tako na omjer B1/B2-limfocita. B1-limfociti imaju važnu ulogu u održavanju imunološke tolerancije te niži omjer B1/B2-limfocita ukazuje na smanjenje B1-limfocita što ukazuje na poremećaj imunološkog sustava i povećan rizik od upalnih procesa. B1-limfociti proizvode autoantitijela koja se vežu na vlastite i egzogene antigene. Povećani postotci cirkulirajućih B1-limfocita prethodno su dokazani u nekoliko autoimunih bolesti uključujući reumatoidni artritis, progresivnu sistemsku sklerozu, Gravesovu bolest i Sjögrenov sindrom(149). Povezanost B1-limfocita i IL-6 opisana je u sistemskom eritemskom lupusu (SLE, engl. *systemic lupus erythematosus*), gdje je opisano da IL-6 djeluje na smanjenje membranskih B1-limfocita, točnije da proizvodnja visokih razina IL-6 kod SLE poništava sposobnost B-limfocita da induciraju DNA metil transferazu te metiliraju deoksiribonukleinsku kiselinu, a učinak koji je obrnut u prisutnosti blokirajućeg antitijela na IL-6 receptor (150). Takav odnos uočen je i iz dobivenih rezultata te je ovo vrijedna spoznaja koja bi se mogla iskoristiti za daljnja istraživanja odnosa IL-6 i populacija B-limfocita u GD-u. B1- i B2-limfociti do sada nisu istraživani u GD-u, međutim Schatz i suradnici u svom su istraživanju mjerili postotke B1-limfocita kod 93 kontrolna ispitanika, 17 ispitanika s novodijagnosticiranim dijabetes mellitusom

## 6. Rasprava

ovisnim o inzulinu, 31 ispitanika bez dijabetesa s pozitivnim visokorizičnim antitijelima na stanice otočića (ICA, engl. *islet cell antibody*) i 13 ispitanika s više od pet godina poznatim dijabetesom mellitusom ovisnom o inzulinom te su dokazali da postotci B1-limfocita ovise o dobi u zdravih kontrolnih ispitanika, progresivno opadajući od razdoblja novorođenčadi do srednjih godina, dok je u ICA pozitivnih ispitanika bez dijabetesa i novootkrivenih dijabetičara mlađih od 29 godina starosti postotak cirkulirajućih B1-limfocita bio snižen (149). Kada se usporede dobiveni rezultati s njihovim zaključkom, oni se podudaraju i ukazuju da B1-limfociti imaju ulogu u GD-u. Isto tako, rezultati su pokazali da ispitanice s GD-om i komplikacijama imaju značajnu negativnu vezu omjera B1/B2 limfocita s adiponektinom, odnosno uz viši adiponektin niže su vrijednosti omjera B1/B2 limfocita i obratno. Adiponektin ima protuupalna svojstva te niže vrijednosti adiponektina kod žena s GD-om i komplikacijama mogu ukazivati na povećanu upalu. Do sada je odnos adiponektina i B-limfocita istraživan samo u patogenezi reumatoidnog artritisa te je otkriveno da adiponektin stimulira proliferaciju i diferencijaciju B-limfocita u staničnoj kulturi te da adiponektin pospješuje ekspanziju B-limfocita i dovodi do pojačanja bolesti (151). Odnos subpopulacija B-limfocita s adiponektinom do sada nije istraživan te bi dobiveni rezultati mogli biti i rezultat zajedničkog temeljnog uzroka, kao što je inzulinska rezistencija ili disfunkcija masnog tkiva.

Kod povezanosti hematoloških i biokemijskih pokazatelja i omjera, uočeno je da je u skupini svih ispitanica omjer NKT/NK-stanica u pozitivnoj i značajnoj vezi s postotcima T-limfocita, citotoksičnih T-limfocita te s koncentracijama C-peptida i triglicerida, dok je veza negativna s koncentracijom HDL-kolesterola. Povezanost NKT/NK-stanica i T-limfocita, posebice citotoksičnih T-limfocita ukazuje na pojačan T-stanični imunitet. Moguće je da NKT-stanice, koje imaju ulogu u modulaciji imunološkog odgovora, potiču aktivaciju T-limfocita, posebno citotoksičnih T-limfocita i obratno. Nepromjenjive NKT-stanice (iNKT) glavni su podskup NKT-stanica koje prepoznaju strane i endogene lipidne antigene predstavljene od CD1d. iNKT stanice mogu se aktivirati citotoksičnim T-limfocitima te se tako može povećati i njihova proliferacija i citotoksičnost. Dokazano je i da izravna interakcija iNKT-stanica i citotoksičnih limfocita pojačava antitumorske imunološke odgovore citotoksičnih limfocita (152). S obzirom na to da je fiziološki upalno stanje, ovo je moguće objašnjenje i za dobivene rezultate.

Pozitivna povezanost NKT/NK-stanica s koncentracijom C-peptida i triglicerida ukazuje na vezu metaboličkih procesa s imunološkim sustavom. Povišene vrijednosti C-peptida

## 6. Rasprava

i triglicerida mogu biti povezane s inzulinskom rezistencijom, koja je fiziološki povišena u trudnoći, te bi pozitivna veza omjera NKT/NK-stanica mogla ukazivati na povezanost imunološkog sustava s inzulinskom rezistencijom. S obzirom na protektivnu ulogu HDL-kolesterola i da je on u upalnim stanjima snižen očekivana je njegova negativna povezanost s omjerom NKT/NK-stanica. NKT-stanice reagiraju na lipidne antigene na adipocitima i moduliraju upalu ovisno o prehranbenim lipidima i ligandima koji potječu iz mikrobioma (153) što je ovom pozitivnom povezanošću s C-peptidom i HDL-kolesterolom i potvrđeno.

Kod trudnica s GD-om omjer NKT/NK-stanica u pozitivnoj je vezi s postotkom limfocita, dok je veza negativna s brojem trombocita i postotkom neutrofila. Pozitivna veza omjera NKT/NK-stanica s postotkom limfocita mogla bi biti povezana s pojačanom aktivnošću limfocita i ukazivati na aktiviraniji imunološki odgovor kod trudnica s GD-om u odnosu na trudnice koje nisu razvile dijabetes u trudnoći. Moguće je da NKT-stanice potiču proliferaciju limfocita na što ukazuje i negativna povezanost omjera NKT/NK-stanica s postotkom neutrofila, iz čega se može zaključiti da se imunološki odgovor kod GD-a usmjerava prema limfocitima. Negativna korelacija s brojem trombocita može biti rezultat upalnog procesa za koji je karakterističan pad broja trombocita. Pregledom literature nema podataka o povezanosti NKT- i NK-stanica s brojem trombocita te je jedina pronađena korelacija između postotka NKT-stanica i broja trombocita obrnuta dobivenoj u ovom istraživanju te je pretpostavljeno kako su NKT-stanice uključene u patogenezu idiopatske trombocitopenije (154).

U skupini trudnica s GD-om i komplikacijama omjer NKT/NK-stanica u pozitivnoj je vezi i s koncentracijom inzulina. NKT-stanice mogu utjecati na proizvodnju inzulina i glukoneogenezu u jetri putem proizvodnje različitih citokina te na funkciju adipoznog tkiva koja uključuje skladištenje masti i proizvodnju adipokina, ali mogu i modulirati aktivnost drugih imunoloških stanica uključenih u regulaciju metabolizma glukoze. Međutim, i povećana aktivnost NKT-stanica može pojačati upalne procese i time pojačati inzulinsku rezistenciju zbog čega gušterača proizvodi veće količine inzulina. Snižen postotak NK-stanica pronađen je kod trudnica s dijabetesom u odnosu na zdrave trudnice, što je u skladu s dobivenim rezultatima (155). Ta je povezanost i u skladu s pozitivnom povezanošću između omjera NKT/NK-stanica i C-peptida među svim ispitivanim skupinama s obzirom na istovjetnu ulogu C-peptida i inzulina.

Omjer pomagačkih/citotoksičnih limfocita u negativnoj je i značajnoj vezi s postotkom NKT-stanica te koncentracijama inzulina, C-peptida i s izračunatim HOMA-IR. Kod

## 6. Rasprava

trudnica s GD-om, neovisno o komplikacijama, taj je omjer u pozitivnoj vezi s folnom kiselinom. Pomagački i citotoksični T-limfociti imaju različite uloge u imunološkom odgovoru; pomagački T-limfociti koordiniraju imunološki odgovor, dok citotoksični T-limfociti uništavaju upalne stanice, a NKT-stanice imaju regulacijsku ulogu (156). Negativna korelacija sugerira da postoji određena ravnoteža između tih populacija imunoloških stanica. Povećanjem postotka NKT-stanica može doći do smanjenja omjera pomagačkih/citotoksičnih limfocita što može ukazivati na preusmjerenje imunološkog odgovora, to jest moguće je da NKT-stanice inhibiraju aktivaciju i proliferaciju T-limfocita, pa tako dovode do smanjenog postotka pomagačkih limfocita. Povećan broj citotoksičnih T-limfocita može biti povezan s pojačanom upalnom reakcijom koja dovodi do oštećenja tkiva i razvoja inzulinske rezistencije, dok smanjenje broja pomagačkih T-limfocita može dovesti do slabljenja antiupalne zaštite. Sve to doprinosi razvoju inzulinske rezistencije i povećanim koncentracijama inzulina, C-peptida i HOMA-IR.

Omjer B1/B2-limfocita u značajnoj je negativnoj vezi s postotkom T-limfocita, a u pozitivnoj i značajnoj vezi s postotkom B-limfocita. Taj se omjer nije pokazao važan u korelaciji s biokemijskim parametrima, gdje je jedino negativna povezanost pronađena u skupini zdravih trudnica s komplikacijama između omjera B1/B2-limfocita i feritina. Smanjenje omjera B1/B2-limfocita, odnosno povećanje udjela B2 limfocita, može biti povezano s povećanim potrebama za željezom, što bi moglo dovesti do smanjenja feritina. Dokazano je da nedostatak željeza ima očit učinak na podskupine limfocita. Promjene u podskupovima limfocita počinju uglavnom kao odgovor na smanjene koncentracije hemoglobina, a ne na nedostatak željeza ili feritina. Sinkronizirani pad hemoglobina i povećanje ukupnog kapaciteta vezanja željeza dovode do apsolutnog smanjenja ukupnih limfocita, uglavnom NK-stanica, i relativnog povećanja T-limfocita, pretežno pomagačkih T-limfocita (157). S druge strane, komplikacije u trudnoći često su povezane s upalnim procesima koji mogu utjecati na metabolizam željeza i dovesti do smanjenja razine feritina.

## 6. Rasprava

### 6.4. Učestalost genotipova i alela analiziranog SNP-a između skupine ispitanica s GD-om i zdravih ispitanica

Analizirana je učestalost genotipa GG, CG i CC rs1800769 između dvije grupe (kontrolna skupina trudnica i trudnice s GD-om) različitim modelima nasljeđivanja (kodominantni, dominantni, recesivni, superdominantni) kako bi se utvrdila povezanost između SNP *IL-6* i rizika od GD-a. U obje skupine ispitanica genotipske frekvencije *IL-6* odgovaraju Hardy-Weinbergovoj ravnoteži, što ukazuje na slučajno parenje i odsutnost značajnih odstupanja od očekivanih frekvencija. Omjer izgleda predstavlja relativni rizik razvoja GD-a kod nositelja određenog genotipa u odnosu na nositelje referentnog genotipa. Omjer izgleda za heterozigotnog genotipa (CG) u SNP-u rs1800769 je 1,41, što sugerira blago povećan rizik za GD kod nositelja tog genotipa. Kod dominantnog i superdominantnog modela omjer izgleda za kombinaciju CG i CC genotipova je 1,54 i 1,39, respektivno, što također ukazuje na blago povećan rizik za GD. Kod recesivnog modela omjer izgleda za CC genotip nije izračunat zbog male frekvencije tog genotipa. Ovi rezultati potvrđuju prethodne rezultate gdje je kod polimorfizma rs1800796 pronađena povezanost alela G s T2DM i GD-om (81, 84).

Bez obzira na analizirani model nasljeđivanja (kodominantni, dominantni, recesivni, superdominantni) nije pronađena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova i alela između zdravih trudnica i trudnica s GD-om za ispitivane SNP-ove rs1800629 (*TNF- $\alpha$* ) i rs1800896 (*IL-10*). Vrijednosti omjera izgleda blizu su 1, što ukazuje na odsutnost veće vjerojatnosti razvoja GD-a kod nositelja određenih genotipova. Mala odstupanja od Hardy-Weinberg ravnoteže u obje skupine ukazuju na slučajno parenje i odsutnost značajnih odstupanja od očekivanih frekvencija genotipova. Ovi rezultati nisu potvrdili dosadašnja saznanja o navedenim polimorfizmima. Kod rs1800796 ranije je pronađena povezanost alela G s T2DM i GD-om (81, 84) što nije potvrđeno u ovom istraživanju u slučaju GD-a, dok je polimorfizam rs1800896 u prijašnjem istraživanju bio povezan s povećanim rizikom za razvoj T2DM (5), a ovo je istraživanje pokazalo da nije povezan s rizikom za razvoj GD-a.

Analiza polimorfizma rs266729 u genu za *AdipoQ* sugerira da bi mogao postojati određeni utjecaj genotipa adiponektina na razvoj GD-a. Homozigotni genotip CC pokazao se povezan s povećanim rizikom od GD-a u odnosu na heterozigotni genotip CG. Ta je povezanost statistički značajna u dominantnom modelu ( $p = 0,08$ ). Omjer izgleda za homozigotni genotip CC veći je od 1 u odnosu na heterozigotni genotip CG,

## 6. Rasprava

što ukazuje na povećan rizik od GD-a kod nositelja genotipa CC. Ti su rezultati suprotni dosadašnjim rezultatima koji su pokazali kako G alel rs266729 u genu *AdipoQ* povećava rizik od razvoja GD-a (86–89). U obje grupe (kontrola i GD) genotipske frekvencije adiponektina odgovaraju Hardy-Weinbergovoj ravnoteži.

### 6.5. Razlike u vrijednostima IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ i adiponektina s obzirom na genotipove analiziranih SNP-ova

Ovo je prvo istraživanje koje je ispitalo razlike u vrijednostima IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i adiponektina s obzirom na genske varijante rs1800629, rs1800796, rs1800896 i rs266729. Istraživanjem je dokazano da nema značajnih razlika u vrijednostima IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i adiponektina s obzirom na genotipove analiziranih SNP-ova kod kontrola i ispitanica s GD-om ni u pojedinim skupinama ispitanica. S obzirom na to da je utjecaj gena na složene osobine, kao što je razina upalnih markera, često poligeni, moguće je da su za varijacije u vrijednostima ovih proupalnih i protuupalnih čimbenika odgovorni drugi geni ili kombinacije gena. Osim genetičkih čimbenika na razinu upalnih i metaboličkih čimbenika utječu i okolišni čimbenici kao što su ITM, prehrana, tjelesna aktivnost i stres te su ovi čimbenici mogli maskirati ili modificirati genske učinke. No isto tako, u ovo istraživanje uključeno je 162 trudnice, što je relativno mali broj za otkrivanje manjih, ali statistički značajnih razlika između ispitivanih skupina. Stoga se ne može isključiti da bi postojala statistički značajna razlika kada bi se istraživanje provelo na većem broju ispitanica.

### 6.6. Razlike u omjerima s obzirom na genotipove analiziranih SNP-ova

Nema značajnih razlika u vrijednostima omjera NKT/NK-stanica, pomagačkih/citotoksičnih T-limfocita i B1/B2-limfocita s obzirom na genotipove analiziranih SNP-ova za IL-6, IL-10 i adiponektin kod kontrola i ispitanica s GD-om. Međutim, značajno su više vrijednosti omjera pomagačkih/citotoksičnih limfocita kod ispitanica s GD-om i komplikacijama u odnosu na zdrave i na zdrave ispitanice s komplikacijama kod GG, s obzirom na rs1800796 (*IL – 6*). To ukazuje da bi omjer pomagačkih/citotoksičnih T-limfocita u kombinaciji s genotipom GG (rs1800796)

## 6. Rasprava

mogao poslužiti kao potencijalni biomarker za rano otkrivanje trudnica s većim rizikom od razvoja komplikacija.

Omjer pomagačkih/citotoksičnih limfocita u slučaju rs1800629 (*TNF- $\alpha$* ) ima značajno niže vrijednosti u slučaju GG kod svih ispitanica i u slučaju ispitanica kontrolne skupine. Također, omjer pomagačkih/citotoksičnih limfocita u skupini s GG značajno je veći kod ispitanica s GD-om i komplikacijama u odnosu na zdrave ispitanice s komplikacijama i na ispitanice s GD-om. Taj omjer značajno je veći kod AG u skupini zdravih ispitanica. U slučaju rs266729 (*AdipoQ*) kod CC značajno su niže vrijednosti omjera NKT/NK kod zdravih ispitanica u odnosu na sve ostale skupine što može ukazivati na potencijalno drugačiji imunološki odgovor zdravih ispitanica s ovim genotipom.

### 6.7. Prednosti i ograničenja istraživanja

Rezultati ovog istraživanja pridonose boljem razumijevanju patofiziologije GD-a. Ovo je prvo istraživanje koje je uključilo četiri skupine ispitanica (zdrave trudnice, zdrave trudnice s imunološkim komplikacijama, trudnice s GD-om, trudnice s GD-om i imunološkim komplikacijama) sa strogim uključnim i isključnim kriterijima. Sve su skupine ispitanica dobro uparene s obzirom na dob, gestacijski tjedan te imunološki profil i na prethodnu povijest bolesti. Važno je naglasiti da su sve trudnice iz iste geografske regije te je broj ispitanica ujednačen u svim skupinama.

Isto tako, prednost istraživanja je opseg analiziranih parametara, a posebnost je i postotak B1- i B2-limfocita kod trudnica s GD-om i zdravih kontrolnih trudnica te korelacija vrijednosti IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i adiponektina s varijantama gena za IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i adiponektin.

Ograničenje istraživanja relativno je mali broj ispitanica i određivanje IL-10 imunokemijskom metodom. Svim ispitanicama izmjeren je IL-10 s vrijednošću < 5 pg/mL. Imunokemijske metode imaju ograničenu osjetljivost, posebno kada se mjere niske koncentracije poput IL-10. Dobiveni rezultati ograničili su statističku analizu. U istraživanju je korištena automatizirana metoda za određivanje IL-10, koja je od nedavno dostupna na tržištu, te je očekivano da se razvojem metode promijeni i granica osjetljivosti čime bi se možda mogle točno odrediti vrijednosti IL-10 u uzorku i ispitati korelaciju s varijantama gena za IL-10.

## 6. Rasprava

U potencijalnom nastavku istraživanja moglo bi se ispitati i druge genske varijante za ispitivane pro-upalne i protu-upalne čimbenike GD-a te povećati skupine ispitanica. Također bi se moglo razvrstati skupine trudnica s komplikacijama prema komplikaciji kako bi se vidjelo utječu li sve komplikacije jednako na imunološki profil trudnice.



## 7. ZAKLJUČAK

Iako početna hipoteza nije potvrđena, istraživanje je donijelo vrijedna saznanja o imunološkom profilu u GD-u. Rezultati istraživanja postavili su temelje za nove hipoteze i istraživanja.

Prema rezultatima dobivenim u ovom istraživanju mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Nema statistički značajne razlike u omjerima NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita i pomagačkih/citotoksičnih limfocita između trudnica s GD-om i zdravih trudnica, neovisno o imunološkim komplikacijama u trudnoći.
2. U skupini zdravih ispitanica nema značajnih povezanosti između omjera NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita te pomagačkih/citotoksičnih limfocita i izmjerenih vrijednosti IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i adiponektina, dok je u skupini zdravih ispitanica s komplikacijama uočeno da su više vrijednosti IL-6 što je veći omjer NKT/NK-stanica te da su uz više vrijednosti omjera pomagačkih/citotoksičnih limfocita niže vrijednosti IL-6.
3. Kod ispitanica s GD-om omjer B1/B2-limfocita niži je kod viših vrijednosti IL-6. Ispitanice s GD-om i komplikacijama imaju značajnu negativnu vezu omjera B1/B2-limfocita s adiponektinom.
4. U skupini svih ispitanica omjer NKT/NK-stanica u pozitivnoj je i značajnoj vezi s postotcima T-limfocita, citotoksičnih T-limfocita te s koncentracijama C-peptida i triglicerida, dok je veza negativna s koncentracijom HDL-kolesterola.
5. Kod trudnica s GD-om omjer NKT/NK-stanica u pozitivnoj je vezi s postotkom limfocita, dok je veza negativna s brojem trombocita i postotkom neutrofila. Kod trudnica s GD-om i komplikacijama omjer NKT/NK-stanica je u pozitivnoj vezi i s koncentracijom inzulina.
6. Omjer pomagačkih/citotoksičnih limfocita u negativnoj je i značajnoj vezi s postotkom NKT-stanica te koncentracijama inzulina, C-peptida i s izračunatim HOMA-IR. Kod trudnica s GD-om, neovisno o komplikacijama, ovaj je omjer u pozitivnoj vezi s izmjerenim vrijednostima folne kiseline.
7. Omjer B1/B2-limfocita nije se pokazao važan u korelaciji s biokemijskim parametrima gdje je negativna povezanost pronađena jedino u skupini zdravih trudnica s komplikacijama između omjera B1/B2-limfocita i feritina.

## 7. Zaključak

8. Omjer izgleda za heterozigotni genotip CG rs1800769 (*IL-6*) sugerira blago povećan rizik za GD kod nositelja tog genotipa. Kod dominantnog i superdominantnog modela omjer izgleda za kombinaciju CG i CC genotipova također ukazuje na blago povećan rizik za GD.
9. Bez obzira na analizirani model nasljeđivanja (kodominantni, dominantni, recesivni, superdominantni) nije pronađena statistički značajna razlika u distribuciji genotipova i alela između zdravih trudnica i trudnica s GD-om za ispitivane SNP-ove rs1800629 (*TNF- $\alpha$* ) i rs1800896 (*IL-10*).
10. Homozigotni genotip CC pokazao se povezan s povećanim rizikom od GD-a u odnosu na heterozigotni genotip CG u SNP-u rs266729 u genu za *AdipoQ*.
11. Nema značajnih razlika u vrijednostima IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  i adiponektina s obzirom na genotipove analiziranih SNP-ova (rs1800629, rs1800796, rs1800896 i rs266729) kod kontrola i ispitanica s GD-om ni u pojedinim skupinama ispitanica.

## 8. SAŽETAK

*Cilj:* Gestacijski dijabetes (GD) definiran je kao hiperglikemija koja se prepoznaje prvi puta tijekom trudnoće, a njegova je incidencija u porastu. Cilj istraživanja bio je ispitati razlike u omjerima imunoloških stanica (NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita, pomagačkih/citotoksičnih T-limfocita) između trudnica s GD-om i zdravih trudnica te odrediti razinu proupalnih i protuupalnih biljega (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, adiponektin) i njihove genske varijante povezane s imunološkim odgovorom te usporediti rezultate s rutinskim biokemijskim i hematološkim parametrima.

*Nacrt studije:* Istraživanje je ustrojeno kao presječno istraživanje te je u njemu sudjelovalo 162 trudnice u trećem trimestru trudnoće. Ispitanice su podijeljene u 4 skupine: trudnice s GD-om bez komplikacija, trudnice s GD-om i dodatnim komplikacijama, kontrolna skupina trudnica (koje nisu razvile GD) bez komplikacija i kontrolna skupina trudnica (trudnice koje nisu razvile GD) s komplikacijama.

*Ispitanici i metode:* Venska je krv uzorkovana trudnicama u trećem trimestru trudnoće te su učinjene analize koje su obuhvatile određivanje kompletne krvne slike i diferencijalne krvne slike, glukozu, lipide, C-reaktivni protein, imunoglobuline, hormone (inzulin, C-peptid), vitamine (B12, folna kiselina), NT-proBNP, željezo, feritin, HbA1c, interleukin (IL)-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , adiponektin, imunofenotipizaciju limfocita protočnom citometrijom i genotipizacija varijanti gena rs266729 (*AdipoQ*), rs1800629 (*TNF- $\alpha$* ), rs1800896 (*IL-10*) i rs1800796 (*IL-6*) metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu.

*Rezultati:* Nema statistički značajne razlike u omjerima NKT/NK-stanica, B1/B2-limfocita i pomagačkih/citotoksičnih limfocita između trudnica s GD-om i zdravih trudnica, međutim kod trudnica s GD-om omjer je B1/B2-limfocita bio niži kod visokih vrijednosti IL-6 te u značajnoj negativnoj vezi s adiponektinom. Različiti omjeri imunoloških stanica bili su povezani s drugim biokemijskim parametrima, poput lipida i hormona. Određene genske varijante (SNP) povezane su s povećanim rizikom od razvoja GD-a. Genotip CG u rs1800769 u genu za *IL-6* i genotip CC u rs266729 u genu *AdipoQ* pokazali su se čimbenicima rizika za razvoj GD-a. Nisu pronađene značajne povezanosti između ispitivanih genotipova i izmjerenih koncentracija adiponektina, IL-6, IL-10 i TNF- $\alpha$ .

*Zaključak:* Genotip CG u rs1800769 u genu za *IL-6* i genotip CC u rs266729 u genu *AdipoQ* povezani su s rizikom za razvoj GD-a, a omjer B1/B2-limfocita u značajnoj je vezi s vrijednostima adiponektina kod trudnica s GD-om.

*Ključne riječi:* gestacijski dijabetes, trudnoća, limfociti, upala, polimorfizam jednog nukleotida (SNP)

## 9. SUMMARY

*Objective:* Gestational diabetes (GD) is defined as hyperglycemia that is recognized for the first time during pregnancy, and its incidence is increasing. The aim of the research was to examine the differences in the ratios of immune cells (NKT/NK-cells, B1/B2-lymphocytes, helper/cytotoxic T-lymphocytes) between pregnant women with GD and healthy pregnant women, and to determine the level of pro-inflammatory and anti-inflammatory markers (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, adiponectin) and their genetic variants associated with the immune response, and also compare the results with routine biochemical and hematological parameters.

*Study draft:* The research was organized as a cross-sectional study, and 162 pregnant women in the third trimester participated in the research. The test subjects were divided into 4 groups: pregnant women with GD without complications, pregnant women with GD and additional complications, a control group of pregnant women (who did not develop GD) without complications and a control group of pregnant women (pregnant women who did not develop GD) with complications.

*Subjects and methods:* Venous blood was sampled from pregnant women in the third trimester of pregnancy and analyzes were performed that included determination of complete blood count and differential blood count, glucose, lipids, C-reactive protein, immunoglobulins, hormones (insulin, C-peptide), vitamins (B12, folic acid), NT-proBNP, iron, ferritin, HbA1c, interleukin (IL)-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , adiponectin, immunophenotyping of lymphocytes by flow cytometry and genotyping of polymorphisms rs266729 (*AdipoQ*), rs1800629 (*TNF- $\alpha$* ), rs1800896 (*IL-10*) and rs1800796 (*IL-6*) by the polymerase chain reaction method.

*Results:* There is no statistically significant difference in the ratios of NKT/NK-cells, B1/B2-lymphocytes and helper/cytotoxic lymphocytes between pregnant women with GD and healthy pregnant women, however, in pregnant women with GD, the ratio of B1/B2-lymphocytes was lower with high values of IL-6 and in a significantly negative relationship with adiponectin. Different ratios of immune cells were associated with other biochemical parameters, such as lipids and hormones. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are associated with an increased risk of developing GD. The CG genotype in rs1800769 in the *IL-6* gene and the CC genotype in rs266729 in the *AdipoQ* gene were shown to be risk factors for the development of GD. No significant associations were found between the genotypes for adiponectin, IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  and the measured concentrations of these cytokines.

*Conclusion:* The CG genotype in rs1800769 in the *IL-6* gene and the CC genotype in rs266729 in the *AdipoQ* gene are associated with the risk of developing GD, and the ratio of B1/B2-lymphocytes is significantly related to adiponectin values in pregnant women with GD.

*Key words:* gestational diabetes, pregnancy, lymphocytes, inflammation, single nucleotide polymorphism (SNP)

## 10. LITERATURA

1. Delmiš J, Ivanišević M, Metelko Ž, editors. *Dijabetes u žena*. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
2. Negrato CA, Gomes MB. Historical facts of screening and diagnosing diabetes in pregnancy. *Diabetol Metab Syndr*. 2013;5(1):22.
3. Mestman JH. Historical Notes on Diabetes and Pregnancy: The *Endocrinologist*. 2002;12(3):224–42.
4. The Clinical Significance of Glycosuria in Pregnant Women. *Hospital (Rio J)*. 1910;47(1231):658.
5. O'Sullivan JB, Mahan CM. Criteria for the oral glucose tolerance test in pregnancy. *Diabetes*. 1964;13:278–85.
6. Pedersen J, Pedersen LM. Prognosis of the outcome of pregnancies in diabetics. A new classification. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1965;50(1):70–8.
7. Luo JY, Chen LG, Yan M, Mei YJ, Cui YQ, Jiang M. Effect of individualized nutrition interventions on clinical outcomes of pregnant women with gestational diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2023;14(10):1524–31.
8. Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy: a World Health Organization Guideline. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;103(3):341–63.
9. McIntyre HD, Catalano P, Zhang C, Desoye G, Mathiesen ER, Damm P. Gestational diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primer*. 2019;5(1):47.
10. Sweeting A, Wong J, Murphy HR, Ross GP. A Clinical Update on Gestational Diabetes Mellitus. *Endocr Rev*. 2022;43(5):763–93.
11. Pons RS, Rockett FC, De Almeida Rubin B, Oppermann MLR, Bosa VL. Risk factors for gestational diabetes mellitus in a sample of pregnant women diagnosed with the disease. *Diabetol Metab Syndr*. 20157(S1):A80, 1758-5996-7-S1-A80.
12. Omazić J, Viljetić B, Ivić V, Kadivnik M, Zibar L, Müller A, et al. Early markers of gestational diabetes mellitus: what we know and which way forward? *Biochem Medica*. 2021;31(3):030502.
13. Mao L, Gao B, Chang H, Shen H. Interaction and Metabolic Pathways: Elucidating the Role of Gut Microbiota in Gestational Diabetes Mellitus Pathogenesis. *Metabolites*. 2024;14(1):43.

## 10. Literatura

14. National Diabetes Data Group. Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Other Categories of Glucose Intolerance. *Diabetes*. 1979;28(12):1039–57.
15. Moon JH, Jang HC. Gestational Diabetes Mellitus: Diagnostic Approaches and Maternal-Offspring Complications. *Diabetes Metab J*. 2022;46(1):3–14.
16. Diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 1985;727:1–113.
17. Wendland EM, Torloni MR, Falavigna M, Trujillo J, Dode MA, Campos MA, et al. Gestational diabetes and pregnancy outcomes - a systematic review of the World Health Organization (WHO) and the International Association of Diabetes in Pregnancy Study Groups (IADPSG) diagnostic criteria. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2012;12(1):23.
18. Coustan DR, Lowe LP, Metzger BE, Dyer AR, International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups. The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study: paving the way for new diagnostic criteria for gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;202(6):654.e1-6.
19. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel, Metzger BE, Gabbe SG, Persson B, Buchanan TA, Catalano PA, et al. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care*. 2010;33(3):676–82.
20. Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy: a World Health Organization Guideline. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;103(3):341–63.
21. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2014. *Diabetes Care*. 2014;37 Suppl 1:S14-80.
22. ACOG Practice Bulletin No. 190: Gestational Diabetes Mellitus. *Obstet Gynecol*. 2018;131(2):e49–64.
23. 2018 surveillance of diabetes in pregnancy: management from preconception to the postnatal period (NICE guideline NG3) [Internet]. London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE); 2018. Dostupno na adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK550982/>. Datum pristupa: 11.06.2024.

## 10. Literatura

24. Khunti K, Gavin JR, Boulton AJM, Blickstead R, McGill M, Ceriello A, et al. The Berlin Declaration: A call to improve early actions related to type 2 diabetes. Why is primary care important? *Prim Care Diabetes*. 2018;12(5):383–92.
25. Novi kriteriji za gestacijski dijabetes povećavaju broj dijagnosticiranih. Portal Hrvatskog društva za ginekologiju i opstetriciju, 2012. Dostupno na adresi: <https://www.hdgo.hr/Default.aspx?sifraStranica=591#:~:text=Novi%20kriteriji,%20pre dlo%C5%BEeni%20od%20strane%20Me%C4%91unarodne%20skupine%20za>  
Datum pristupa: 11.06.2024.
26. Laboratorijska dijagnostika šećerne bolesti u trudnoći. Standardni laboratorijski postupak. Hrvatska komora medicinskih biokemičara, 2014. Dostupno na adresi: [http://www.hkmb.hr/obavijesti/2014/HKMB%20PPSP%203%20ispravak%20JM%2021\\_02\\_14.pdf](http://www.hkmb.hr/obavijesti/2014/HKMB%20PPSP%203%20ispravak%20JM%2021_02_14.pdf). Datum pristupa: 11.06.2024.
27. Moyce Gruber BL, Dolinsky VW. The Role of Adiponectin during Pregnancy and Gestational Diabetes. *Life*. 2023;13(2):301.
28. Catalano PM, Huston L, Amini SB, Kalhan SC. Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;180(4):903–16.
29. Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes*. 2001;50 Suppl 1:S154-159.
30. Lappas M. Effect of pre-existing maternal obesity, gestational diabetes and adipokines on the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue. *Metabolism*. 2014;63(2):250–62.
31. Talukdar S, Oh DY, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, McNelis J, et al. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. *Nat Med*. 2012;18(9):1407–12.
32. Ribatti D, Crivellato E, Vacca A. The contribution of Bruce Glick to the definition of the role played by the bursa of Fabricius in the development of the B cell lineage. *Clin Exp Immunol*. 2006;145(1):1–4.
33. Carsetti R, Terreri S, Conti MG, Fernandez Salinas A, Corrente F, Capponi C, et al. Comprehensive phenotyping of human peripheral blood B lymphocytes in healthy conditions. *Cytometry A*. 2022;101(2):131–9.

## 10. Literatura

34. Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, Paltser G, et al. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med*. 2011;17(5):610–7.
35. Winer DA, Winer S, Chng MHY, Shen L, Engleman EG. B Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2014;71(6):1033–43.
36. Nikolajczyk BS, Jagannathan-Bogdan M, Shin H, Gyrko R. State of the union between metabolism and the immune system in type 2 diabetes. *Genes Immun*. 2011;12(4):239–50.
37. Srikakulapu P, McNamara CA. B Lymphocytes and Adipose Tissue Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;40(5):1110–22.
38. Lin J, Tang W, Liu W, Yu F, Wu Y, Fang X, et al. Decreased B1 and B2 Lymphocytes Are Associated With Mortality in Elderly Patients With Chronic Kidney Diseases. *Front Med*. 2020;7:75.
39. Deng C, Xiang Y, Tan T, Ren Z, Cao C, Liu B, et al. The Imbalance of B-Lymphocyte Subsets in Subjects with Different Glucose Tolerance: Relationship with Metabolic Parameter and Disease Status. *J Diabetes Res*. 2017;2017:5052812.
40. Zhuang Y, Zhang J, Li Y, Gu H, Zhao J, Sun Y, et al. B Lymphocytes Are Predictors of Insulin Resistance in Women with Gestational Diabetes Mellitus. *Endocr Metab Immune Disord - Drug Targets*. 2019;19(3):358–66.
41. Luck H, Khan S, Kim JH, Copeland JK, Revelo XS, Tsai S, et al. Gut-associated IgA+ immune cells regulate obesity-related insulin resistance. *Nat Commun*. 2019;13;10(1):3650.
42. Kumar BV, Connors TJ, Farber DL. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*. 2018;48(2):202–13.
43. Abu-Raya B, Michalski C, Sadarangani M, Lavoie PM. Maternal Immunological Adaptation During Normal Pregnancy. *Front Immunol*. 2020;11:575197.
44. Abell SK, De Courten B, Boyle JA, Teede HJ. Inflammatory and Other Biomarkers: Role in Pathophysiology and Prediction of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2015;16(6):13442–73.
45. McElwain CJ, McCarthy FP, McCarthy CM. Gestational Diabetes Mellitus and Maternal Immune Dysregulation: What We Know So Far. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8):4261.



## 10. Literatura

46. Oldham RK. Natural killer cells: Artifact to reality: An odyssey in biology. *Cancer Metastasis Rev.* 1983;2(4):323–36.
47. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. „Natural” killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol.* 1975;5(2):117–21.
48. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. „Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol.* 1975;5(2):112–7.
49. Carrega P, Ferlazzo G. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Front Immunol.* 2012;3:347.
50. Oldham RK, Siwarski D, McCoy JL, Plata EJ, Herberman RB. Evaluation of a cell-mediated cytotoxicity assay utilizing <sup>125</sup>iododeoxyuridine-labeled tissue-culture target cells. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1973;37:49–58.
51. Pross HF, Jondal M. Cytotoxic lymphocytes from normal donors. A functional marker of human non-T lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 1975;21(2):226–35.
52. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol.* 2018;9:1869.
53. Kim JH, Park K, Lee SB, Kang S, Park JS, Ahn CW, et al. Relationship between natural killer cell activity and glucose control in patients with type 2 diabetes and prediabetes. *J Diabetes Investig.* 2019;10(5):1223–8.
54. Jafarpour R, Pashangzadeh S, Mehdizadeh S, Bayatipoor H, Shojaei Z, Motallebnezhad M. Functional significance of lymphocytes in pregnancy and lymphocyte immunotherapy in infertility: A comprehensive review and update. *Int Immunopharmacol.* 2020;87:106776.
55. Lv X, Gao Y, Dong T, Yang L. Role of Natural Killer T (NKT) Cells in Type II Diabetes-Induced Vascular Injuries. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2018;24:8322–32.
56. Tard C, Rouxel O, Lehuen A. Regulatory role of natural killer T cells in diabetes. *Biomed J.* 2015;38(6):484–95.
57. 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. *Antioxid Basel Switz.* 2022;11(1):129.

## 10. Literatura

58. Khambule L, George JA. The Role of Inflammation in the Development of GDM and the Use of Markers of Inflammation in GDM Screening. U: Reviews on Biomarker Studies of Metabolic and Metabolism-Related Disorders. Springer International Publishing; 2019:217–42.
59. Brogin Moreli J, Cirino Ruocco AM, Vernini JM, Rudge MVC, Calderon IMP. Interleukin 10 and Tumor Necrosis Factor-Alpha in Pregnancy: Aspects of Interest in Clinical Obstetrics. *ISRN Obstet Gynecol.* 2012;2012:1–5.
60. Effect of tumor necrosis factor-alpha on endometrial glucose transporter-4 expression in patients with polycystic ovary syndrome through nuclear factor-kappaB signaling pathway activation. *J Physiol Pharmacol.* 2022.
61. Briana DD, Malamitsi-Puchner A. Adipocytokines in Normal and Complicated Pregnancies. *Reprod Sci.* 2009;16(10):921–37.
62. 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 J Br Diabet Assoc.* 2001;18(11):921–7.
63. Kuźmicki M, Szamatowicz J, Kretowski A, Kuć P, Kretowski M, Wawrusiewicz N, et al. [Evaluation of adiponectin and TNFalpha genes expression in women with gestational diabetes. Preliminary results]. *Ginekol Pol.* 2006 Dec;77(12):930–6.
64. Markert UR, Morales-Prieto DM, Fitzgerald JS. Understanding the link between the IL-6 cytokine family and pregnancy: implications for future therapeutics. *Expert Rev Clin Immunol.* 2011;7(5):603–9.
65. Classen-Linke I, Müller-Newen G, Heinrich PC, Beier HM, von Rango U. The cytokine receptor gp130 and its soluble form are under hormonal control in human endometrium and decidua. *Mol Hum Reprod.* 2004;10(7):495–504.
66. Jones HN, Jansson T, Powell TL. IL-6 stimulates system A amino acid transporter activity in trophoblast cells through STAT3 and increased expression of SNAT2. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;297(5):C1228-1235.
67. Morisset AS, Dubé MC, Côté JA, Robitaille J, Weisnagel SJ, Tchernof A. Circulating interleukin-6 concentrations during and after gestational diabetes mellitus: Interleukin-6, gestational diabetes and obesity. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2011;90(5):524–30.
68. Brink HS, Van Der Lely AJ, Van Der Linden J. The potential role of biomarkers in predicting gestational diabetes. *Endocr Connect.* 2016;5(5):R26–34.

## 10. Literatura

69. Lacroix M, Battista MC, Doyon M, Ménard J, Ardilouze JL, Perron P, et al. Lower Adiponectin Levels at First Trimester of Pregnancy Are Associated With Increased Insulin Resistance and Higher Risk of Developing Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2013;36(6):1577–83.
70. Williams MA, Qiu C, Muy-Rivera M, Vadachkoria S, Song T, Luthy DA. Plasma Adiponectin Concentrations in Early Pregnancy and Subsequent Risk of Gestational Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(5):2306–11.
71. Hedderson MM, Darbinian J, Havel PJ, Quesenberry CP, Sridhar S, Ehrlich S, et al. Low Prepregnancy Adiponectin Concentrations Are Associated With a Marked Increase in Risk for Development of Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2013;36(12):3930–7.
72. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 1995;269(5223):543–6.
73. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(5):331–44.
74. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(1):23–63.
75. Mobini M, Mortazavi M, Nadi S, Zare-Bidaki M, Pourtalebi S, Arababadi MK. Significant roles played by interleukin-10 in outcome of pregnancy. *Iran J Basic Med Sci*. 2016;19(2):119–24.
76. Thaxton JE, Sharma S. REVIEW ARTICLE: Interleukin-10: A Multi-Faceted Agent of Pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):482–91.
77. Hanna N, Hanna I, Hleb M, Wagner E, Dougherty J, Balkundi D, et al. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000;164(11):5721–8.
78. Hart PMB, Stephenson NL, Scime NV, Tough SC, Slater DM, Chaput KH. Second trimester cytokine profiles associated with gestational diabetes and hypertensive disorders of pregnancy. *PloS One*. 2022;17(12):e0279072.
79. Majcher S, Ustianowski P, Tarnowski M, Dziedziejko V, Safranow K, Pawlik A. *IL-1 $\beta$*  and *IL-10* gene polymorphisms in women with gestational diabetes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2021;34(19):3169–74.

## 10. Literatura

80. Huang Q, Wang Y, Gu B, Xu Y. Whether the risk of gestational diabetes mellitus is affected by TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 or ADIPOQ polymorphisms: a meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr*. 2020;12(1):81.
81. Wei Q, Chen X, Chen H. Association of Single Nucleotide Polymorphisms of the IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  Genes with Susceptibility to Gestational Diabetes Mellitus. *Genet Test Mol Biomark*. 2020;24(7):390–8.
82. Liu J, Song G, Zhao G, Meng T. Association between TNF- $\alpha$  polymorphisms and gestational diabetes mellitus: a meta-analysis and trial sequential analysis. *Gynecol Endocrinol Off J Int Soc Gynecol Endocrinol*. 2021;37(6):506–10.
83. Cheng Z, Zhang C, Mi Y. IL-6 gene rs1800795 polymorphism and diabetes mellitus: a comprehensive analysis involving 42,150 participants from a meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr*. 2022;14(1):95.
84. Obirikorang C, Lokpo SY, Owiredu WKBA, Ahenkorah-Fondjo L, Osei-Yeboah J, Duedu KO, et al. Association between Interleukin-6 Gene Polymorphism (rs1800795 and rs1800796) and Type 2 Diabetes Mellitus in a Ghanaian Population: A Case-Control Study in the Ho Municipality. Aihara K ichi, editor. *BioMed Res Int*. 2024;2024:1–11.
85. da Silva Pereira BL, Polina ER, Crispim D, Sbruzzi RC, Canani LH, Dos Santos KG. Interleukin-10 -1082A > G (rs1800896) polymorphism is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;138:187–92.
86. Bai Y, Tang L, Li L, Li L. The roles of ADIPOQ rs266729 and MTNR1B rs10830963 polymorphisms in patients with gestational diabetes mellitus: A meta-analysis. *Gene*. 2020;730:144302.
87. Beltcheva O, Boyadzhieva M, Angelova O, Mitev V, Kaneva R, Atanasova I. The rs266729 single-nucleotide polymorphism in the adiponectin gene shows association with gestational diabetes. *Arch Gynecol Obstet*. 2014;289(4):743–8.
88. Kaftan AN, Hussain MK. Association of adiponectin gene polymorphism rs266729 with type two diabetes mellitus in Iraqi population. A pilot study. *Gene*. 2015;570(1):95–9.
89. Sun P, Liu L, Chen J, Chen Y, Shi L, Imam MU, et al. The polymorphism of rs266729 in adiponectin gene and type 2 diabetes mellitus: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(47):e8745.

## 10. Literatura

90. Riskin-Mashiah S, Damti A, Younes G, Auslender R. First trimester fasting hyperglycemia as a predictor for the development of gestational diabetes mellitus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010;152(2):163–7.
91. Donovan L, Hartling L, Muise M, Guthrie A, Vandermeer B, Dryden DM. Screening Tests for Gestational Diabetes: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2013;159(2):115.
92. Li P, Lin S, Li L, Cui J, Zhou S, Fan J. First-trimester fasting plasma glucose as a predictor of gestational diabetes mellitus and the association with adverse pregnancy outcomes: FPG predicting for GDM. *Pak J Med Sci.* 2019;35(1).
93. Falcone V, Kotzaeridi G, Breil MH, Rosicky I, Stopp T, Yerlikaya-Schatten G, et al. Early Assessment of the Risk for Gestational Diabetes Mellitus: Can Fasting Parameters of Glucose Metabolism Contribute to Risk Prediction? *Diabetes Metab J.* 2019;43(6):785.
94. Powe CE. Early Pregnancy Biochemical Predictors of Gestational Diabetes Mellitus. *Curr Diab Rep.* 2017;17(2):12.
95. Yang X, Ye Y, Wang Y, Wu P, Lu Q, Liu Y, et al. Association between early-pregnancy serum C-peptide and risk of gestational diabetes mellitus: a nested case–control study among Chinese women. *Nutr Metab.* 2022;19(1):56.
96. Yin P, Shao P, Liu H, Li W, Wang L, Wang J, et al. C-peptide levels and the risk of diabetes and pre-diabetes among Chinese women with gestational diabetes. *J Diabetes Complications.* 2017;31(12):1658–62.
97. Sibiak R, Jankowski M, Gutaj P, Mozdziak P, Kempisty B, Wender-Ożegowska E. Placental Lactogen as a Marker of Maternal Obesity, Diabetes, and Fetal Growth Abnormalities: Current Knowledge and Clinical Perspectives. *J Clin Med.* 2020;9(4):1142.
98. Berggren EK, Boggess KA, Mathew L, Culhane J. First Trimester Maternal Glycated Hemoglobin and Sex Hormone-Binding Globulin Do Not Predict Third Trimester Glucose Intolerance of Pregnancy. *Reprod Sci.* 2017;24(4):613–8.
99. Faal S, Abedi P, Jahanfar S, Ndeke JM, Mohaghegh Z, Sharifipour F, et al. Sex hormone binding globulin for prediction of gestational diabetes mellitus in pre-conception and pregnancy: A systematic review. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;152:39–52.
100. Kennelly MA, McAuliffe FM. Prediction and prevention of Gestational Diabetes: an update of recent literature. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016;202:92–8.

## 10. Literatura

101. Hill M, Pařízek A, Šimják P, Koucký M, Anderlová K, Krejčí H, et al. Steroids, steroid associated substances and gestational diabetes mellitus. *Physiol Res*. 2021;70(Suppl4):S617–34.
102. Hlača N, Klobučar Majanović S. Novosti u liječenju gestacijskog dijabetesa. *Med Flum*. 2019;55(4):330–6.
103. American Diabetes Association. 14. Management of Diabetes in Pregnancy: *Standards of Medical Care in Diabetes—2019*. *Diabetes Care*. 2019;42(Supplement\_1):S165–72.
104. Nakshine VS, Jogdand SD. A Comprehensive Review of Gestational Diabetes Mellitus: Impacts on Maternal Health, Fetal Development, Childhood Outcomes, and Long-Term Treatment Strategies. *Cureus*. 2023.
105. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 15. Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Care in Diabetes-2024. *Diabetes Care*. 2024;47(Suppl 1):S282–94.
106. Ye W, Luo C, Huang J, Li C, Liu Z, Liu F. Gestational diabetes mellitus and adverse pregnancy outcomes: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2022;377:e067946.
107. Semnani-Azad Z, Gaillard R, Hughes AE, Boyle KE, Tobias DK, ADA/EASD PMDI, et al. Precision stratification of prognostic risk factors associated with outcomes in gestational diabetes mellitus: a systematic review. *Commun Med*. 2024;4(1):9.
108. Carlson RV, Boyd KM, Webb DJ. The revision of the Declaration of Helsinki: past, present and future. *Br J Clin Pharmacol*. 2004;57(6):695–713.
109. Blondel B, Morin I, Platt RW, Kramer MS, Usher R, Bréart G. Algorithms for combining menstrual and ultrasound estimates of gestational age: consequences for rates of preterm and postterm birth. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2002;109(6):718–20.
110. De Luccia TPB, Pendeloski KPT, Ono E, Mattar R, Pares DBS, Yazaki Sun S, et al. Unveiling the pathophysiology of gestational diabetes: Studies on local and peripheral immune cells. *Scand J Immunol*. 2020;91(4):e12860.
111. Li Y, Ren X, He L, Li J, Zhang S, Chen W. Maternal age and the risk of gestational diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of over 120 million participants. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020;162:108044.

## 10. Literatura

112. Laine MK, Kautiainen H, Gissler M, Raina M, Aahos I, Järvinen K, et al. Gestational diabetes in primiparous women—impact of age and adiposity: a register-based cohort study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2018;97(2):187–94.
113. Han Y, Tong M, Jin L, Yu J, Meng W, Ren A, et al. Maternal age at pregnancy and risk for gestational diabetes mellitus among Chinese women with singleton pregnancies. *Int J Diabetes Dev Ctries*. 2021;41(1):114–20.
114. Møller N, Gormsen L, Fuglsang J, Gjedsted J. Effects of Ageing on Insulin Secretion and Action. *Horm Res Paediatr*. 2003;60(Suppl. 1):102–4.
115. Wang JW, Wang Q, Wang XQ, Wang M, Cao SS, Wang JN. Association between maternal education level and gestational diabetes mellitus: a meta-analysis. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet*. 2021;34(4):580–7.
116. Mirabelli M, Tocci V, Donnici A, Giuliano S, Sarnelli P, Salatino A, et al. Maternal Preconception Body Mass Index Overtakes Age as a Risk Factor for Gestational Diabetes Mellitus. *J Clin Med*. 2023;12(8):2830.
117. Kukkonen A, Hantunen S, Voutilainen A, Ruusunen A, Uusitalo L, Backman K, et al. Maternal caffeine, coffee and cola drink intake and the risk of gestational diabetes – Kuopio Birth Cohort. *Prim Care Diabetes*. 2024;18(3):362–7.
118. Ni J, Wang P, Zheng T, Lv L, Peng H. Consumption of Coffee and Risk of Gestational Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Front Nutr*. 2021;8:739359.
119. Adeney KL, Williams MA, Schiff MA, Qiu C, Sorensen TK. Coffee consumption and the risk of gestational diabetes mellitus. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2007;86(2):161–6.
120. Zhang C, Ning Y. Effect of dietary and lifestyle factors on the risk of gestational diabetes: review of epidemiologic evidence. *Am J Clin Nutr*. 2011 Dec;94:S1975–9.
121. Hedderon MM, Ferrara A. High blood pressure before and during early pregnancy is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2008;31(12):2362–7.
122. Sullivan SD, Umans JG, Ratner R. Hypertension complicating diabetic pregnancies: pathophysiology, management, and controversies. *J Clin Hypertens Greenwich Conn*. 2011;13(4):275–84.

## 10. Literatura

123. Gou BH, Guan HM, Bi YX, Ding BJ. Gestational diabetes: weight gain during pregnancy and its relationship to pregnancy outcomes. *Chin Med J (Engl)*. 2019;132(2):154–60.
124. He J, Hu K, Wang B, Wang H. Effects of women with gestational diabetes mellitus related weight gain on pregnancy outcomes and its experiences in weight management programs: a mixed-methods systematic review. *Front Endocrinol*. 2023.
125. Zheng W, Huang W, Liu C, Yan Q, Zhang L, Tian Z, et al. Weight gain after diagnosis of gestational diabetes mellitus and its association with adverse pregnancy outcomes: a cohort study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2021.
126. Levent Cirakli Z, Gulec N. Evaluation of White Blood-cell-based Inflammatory Markers in Gestational Diabetes Mellitus. *Bakirkoy Tip Derg Med J Bakirkoy*. 2022;18(2):157–63.
127. Zhang Y, Zhang Y, Zhao L, Shang Y, He D, Chen J. Distribution of complete blood count constituents in gestational diabetes mellitus. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(23):e26301.
128. Ramirez GA, Yacoub MR, Ripa M, Mannina D, Cariddi A, Saporiti N, et al. Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. *BioMed Res Int*. 2018;2018:9095275.
129. Gelaw Y, Asrie F, Walle M, Getaneh Z. The value of eosinophil count in the diagnosis of preeclampsia among pregnant women attending the University of Gondar Comprehensive Specialized Hospital, Northwest Ethiopia, 2021. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2022;22(1):557.
130. Clark CM, Qiu C, Amerman B, Porter B, Fineberg N, Aldasouqi S, et al. Gestational diabetes: should it be added to the syndrome of insulin resistance? *Diabetes Care*. 1997;20(5):867–71.
131. Andersson-Hall U, Carlsson NG, Sandberg AS, Holmäng A. Circulating Linoleic Acid is Associated with Improved Glucose Tolerance in Women after Gestational Diabetes. *Nutrients*. 2018;10(11):1629.
132. Zhao C, Liu H, Deng Y, Wu H, Wang S, Lyu X, et al. Maternal fasting serum C-peptide concentrations in the first and second trimesters and subsequent risk of gestational diabetes mellitus: A nested case-control study among Chinese women. *Diabetes Res Clin Pract*. 2024;208:111111.
133. Kun A, Tornoczky J. HbA1C and C-peptide levels in gestational diabetes mellitus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2019;234:e99.



## 10. Literatura

134. Rajput R, YogeshYadav, Rajput M, Nanda S. Utility of HbA1c for diagnosis of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2012;98(1):104–7.
135. Kopylov AT, Papyshva O, Gribova I, Kotaysch G, Kharitonova L, Mayatskaya T, et al. Molecular pathophysiology of diabetes mellitus during pregnancy with antenatal complications. *Sci Rep.* 2020;10(1):19641.
136. Agarwal MM, Hughes PF, Punnose J, Ezimokhai M, Thomas L. Gestational diabetes screening of a multiethnic, high-risk population using glycated proteins. *Diabetes Res Clin Pract.* 2001;51(1):67–73.
137. Agarwal MM, Dhatt GS, Punnose J, Koster G. Gestational diabetes: a reappraisal of HBA1c as a screening test. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005;84(12):1159–63.
138. Uncu G, Ozan H, Cengiz C. The comparison of 50 grams glucose challenge test, HbA1c and fructosamine levels in diagnosis of gestational diabetes mellitus. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 1995;22(3):230–4.
139. Lapolla A, Metzger BE. The post-HAPO situation with gestational diabetes: the bright and dark sides. *Acta Diabetol.* 2018;55(9):885–92.
140. Saravanan P, Deepa M, Ahmed Z, Ram U, Surapaneni T, Kallur SD, et al. Early pregnancy HbA1c as the first screening test for gestational diabetes: results from three prospective cohorts. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2024;12(8):535–44.
141. Amirian A, Rahnemaei FA, Abdi F. Role of C-reactive Protein(CRP) or high-sensitivity CRP in predicting gestational diabetes Mellitus: Systematic review. *Diabetes Metab Syndr.* 2020;14(3):229–36.
142. Amirian A, Mahani MB, Abdi F. Role of interleukin-6 (IL-6) in predicting gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol Sci.* 2020;63(4):407–16.
143. Wu J, Gao F xia, Wang C, Qin M, Han F, Xu T, et al. IL-6 and IL-8 secreted by tumour cells impair the function of NK cells via the STAT3 pathway in oesophageal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019.
144. Patel SA, Nilsson MB, Yang Y, Le X, Tran HT, Elamin YY, et al. IL6 Mediates Suppression of T- and NK-cell Function in EMT-associated TKI-resistant EGFR-mutant NSCLC. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2023;29(7):1292–304.
145. Zubiaga AM, Munoz E, Merrow M, Huber BT. Regulation of interleukin 6 production in T helper cells. *Int Immunol.* 1990;2(11):1047–54.
146. Korn T, Hiltensperger M. Role of IL-6 in the commitment of T cell subsets. *Cytokine.* 2021;146:155654.

## 10. Literatura

147. Huseni MA, Wang L, Klementowicz JE, Yuen K, Breart B, Orr C, et al. CD8+ T cell-intrinsic IL-6 signaling promotes resistance to anti-PD-L1 immunotherapy. *Cell Rep Med*. 2023;4(1):100878.
148. Tsukamoto H, Fujieda K, Senju S, Ikeda T, Oshiumi H, Nishimura Y. Immune-suppressive effects of interleukin-6 on T-cell-mediated anti-tumor immunity. *Cancer Sci*. 2018;109(3):523–30.
149. Schatz DA, Lang F, Cantor AB, Riley WJ, Maclaren NK, Sleasman JW, et al. CD5+ B Lymphocytes in High-Risk Islet Cell Antibody–Positive and Newly Diagnosed IDDM Subjects. *Diabetes*. 1991;40(10):1314–8.
150. Garaud S, Le Dantec C, Jousse-Joulin S, Hanrotel-Saliou C, Saraux A, Mageed RA, et al. IL-6 Modulates CD5 Expression in B Cells from Patients with Lupus by Regulating DNA Methylation. *J Immunol*. 2009;182(9):5623–32.
151. Che N, Sun X, Gu L, Wang X, Shi J, Sun Y, et al. Adiponectin Enhances B-Cell Proliferation and Differentiation via Activation of Akt1/STAT3 and Exacerbates Collagen-Induced Arthritis. *Front Immunol*. 2021;12:626310.
152. Qin Y, Oh S, Lim S, Shin JH, Yoon MS, Park SH. Invariant NKT cells facilitate cytotoxic T-cell activation via direct recognition of CD1d on T cells. *Exp Mol Med*. 2019;51(10):1–9.
153. Satoh M, Iwabuchi K. Role of Natural Killer T Cells in the Development of Obesity and Insulin Resistance: Insights From Recent Progress. *Front Immunol*. 2018;9:1314.
154. Xu R, Zheng Z, Ma Y, Hu Y, Zhuang S, Wei B, et al. Elevated NKT cell levels in adults with severe chronic immune thrombocytopenia. *Exp Ther Med*. 2014;7(1):149–54.
155. Lapolla A, Sanzari MC, Zancanaro F, Masin M, Guerriero A, Piva I, et al. A study on lymphocyte subpopulation in diabetic mothers at delivery and in their newborn. *Diabetes Nutr Metab*. 1999;12(6):394–9.
156. Yang J, Zhu X, Feng J. The Changes in the Quantity of Lymphocyte Subpopulations during the Process of Sepsis. *Int J Mol Sci*. 2024;25(3):1902.
157. AlRajeh L, Zaher A, Alghamdi A, Alsheikh R, AlSultan O. Effects of Iron Deficiency and Its Indicators on Lymphocyte Subsets: A Study at King Fahd Hospital of the University, Saudi Arabia. *J Blood Med*. 2022;13:61–7.

## 11. ŽIVOTOPIS

### OPĆI PODACI:

Ime i prezime: Jelena Omazić

Datum i mjesto rođenja: 25.04.1989., Osijek

Adresa: Psunjska 125, Osijek

e-mail: jelena.omazic@gmail.com

Telefon: 0981672764

### OBRAZOVANJE:

2017. – danas: Poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, Medicinski fakultet u Osijeku, Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku

2016. – 2020.: Poslijediplomski specijalistički studij Medicinska biokemija i laboratorijska medicina, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu

2008. – 2013.: Studij medicinske biokemije, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu

2004. – 2008.: Isusovačka klasična gimnazija s pravom javnosti u Osijeku

1996. – 2004.: Osnovna škola Ivana Filipovića, Osijek

### RADNO ISKUSTVO:

2024. – danas: voditelj Odjela za laboratorijsku i transfuzijsku medicinu, NMB Vukovar

2020. – 2024.: specijalistica medicinske biokemije i laboratorijske medicine, Odjel za laboratorijsku i transfuzijsku medicinu, NMB Vukovar

2016. – 2020.: specijalizantica medicinske biokemije i laboratorijske medicine, Odjel za laboratorijsku i transfuzijsku medicinu, NMB Vukovar

2015. – 2016.: magistra medicinske biokemije, Odjel za laboratorijsku i transfuzijsku medicinu, NMB Vukovar

2014. – 2015.: pripravnički staž, Zavod za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, KBC Osijek

### AKADEMSKO NAPREDOVANJE:

2018. – danas: naslovno suradničko zvanje asistenta, Medicinski fakultetu u Osijeku, Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

## 11. Životopis

### ČLANSTVA:

Hrvatska komora medicinskih biokemičara

Hrvatsko društvo za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu

European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

### PUBLIKACIJE:

Do sada objavljeno 6 znanstvenih radova te 19 kongresnih priopćenja, s jednim usmenim priopćenjem.

Popis znanstvenih radova:

1. **Omazić J**, Muller A, Dumančić B, Kadivnik M, Alardović J, Pađen L, Kralik K, Brkić N, Dobrošević B, Vuković B, Wagner J. Metabolic and immune parameteres in pregnancy with impaired glucose metabolism - a pilot study *Metabolites*. 2024
2. Brkić N, Švagelj D, **Omazić J**. Pathohistological Changes in the Gastric Mucosa in Correlation with the Immunohistochemically Detected Spiral and Coccoid Forms of *Helicobacter pylori*. *Microorganisms*. 2024;12(6):1060.
3. **Omazić J**, Viljetić B, Ivić V, Kadivnik M, Zibar L, Muller A, Wagner J. Early markers of gestational diabetes mellitus: what we know and which way forward? *Biochem Med*. 2021;31(3):030501.
4. Supak-Smolcic V, Mlinaric A, Antocic D, Horvat M, **Omazić J**, Simundic AM: ICMJE authorship criteria are not met in a substantial proportion of manuscripts submitted to *Biochemia Medica*. *Biochem Med*. 2015;25(3):324-34.
5. Horvat M, Mlinaric A, **Omazić J**, Supak-Smolcic V. An Analysis of Medical Laboratory Technology Journals' Instructions for Authors. *Sci Eng Ethics*. 2016 Aug;22(4):1095-1106.
6. Nikolac N, **Omazic J**, Simundic AM: The evidence based practice for optimal sample quality for ammonia measurement; *Clin Biochem*. 2014;47(12):991-5.

### POZVANO PREDAVANJE:

**Omazić J**: Sve boje elektroforeze / Making sense of electrophoresis bands, 10.kongres Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu s međunarodnim sudjelovanjem, Zagreb 28.9-.1.10.2022.