

# Karakterizacija proupalnih i protupalnih citokina tijekom trudnoće

---

Ćehović, Asja

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:152:515878>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-15**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET U OSIJEKU  
SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
STUDIJ MEDICINA**

*Asja Čehović*

**KARAKTERIZACIJA PROUPALNIH I  
PROTUUPALNIH CITOKINA TIJEKOM  
TRUDNOĆE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2023.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET U OSIJEKU**  
**SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I**  
**DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINA**

*Asja Čehović*

**KARAKTERIZACIJA PROUPALNIH I**  
**PROTUUPALNIH CITOKINA TIJEKOM**  
**TRUDNOĆE**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2023.**

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet u Osijeku

Mentor rada: prof.dr.sc. Jasenka Wagner Kostadinović

Rad ima: 46 listova i 11 tablica

## Sadržaj rada

1. Uvod .....	1
1.1 Gestacijski dijabetes - definicija i klinička slika .....	2
1.2 Gestacijski dijabetes - postavljanje dijagnoze .....	5
1.3 Citokini.....	7
1.4 Gestacijski dijabetes - imunološki profil .....	8
2. Hipoteza.....	10
3. Ciljevi .....	11
4. Ispitanici i metode .....	12
4.1 Ustroj studije .....	12
4.2 Ispitanici.....	12
4.3 Metode .....	13
4.4 Statističke metode.....	14
5. Rezultati.....	14
6. Rasprava .....	28
7. Zaključak.....	33
8. Sažetak.....	34
9. Summary.....	35
10. Literatura.....	36
11. Životopis.....	40
12. Prilozi.....	41

## **Popis kratica**

**ADA** – Američko dijabetičko udruženje

**CRP** – C-reaktivni protein

**DIPSI** – Studijska grupa za dijabetes u trudnoći u Indiji (prema engl. *Diabetes In Pregnancy Study group India*)

**DM 1** – Dijabetes melitus tip 1

**DM 2** – Dijabetes melitus tip 2

**ECLIA** – Elektrokemiluminiscencijska metoda (prema engl. *Electrochemiluminiscence immunoassay*)

**ELISA** - Imunoenzimska metoda (prema engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

**FFA** – Slobodne masne kiseline (prema engl. *Free Fatty Acids*)

**GDM** – Gestacijski dijabetes melitus

**GUK** – Glukoza u krvi

**HAPO studija** - Hiperglikemija i nepovoljni ishodi trudnoće (prema engl. *The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes*)

**HbA1C** – Glikozilirani hemoglobin

**HRP** – peroksidaza iz hrena (prema engl. *Horseradish peroxidase*)

**Hs-CRP** – Ultravisokoosjetljivi C-reaktivni protein

**IADPSG** - Međunarodno udruženje studijskih grupa za dijabetes i trudnoću (prema engl. *International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups*)

**IgE** – Imunoglobulin E

**IL-6** - Interleukin 6

**IL-10** – Interleukin 10

**IR** – Inzulinska rezistencija

**ITM** – Indeks tjelesne mase

**OGTT** – Oralni glukoza tolerans test

**TINIA** - Turbidimetrijska inhibicijska imunokemijska metoda

**TNF-  $\alpha$**  – Faktor-nekroze tumora alfa

**WHO** – Svjetska zdravstvena organizacija (prema engl. *World Health Organisation*)

## 1. Uvod

### 1. Uvod

Dijabetes nastaje kao posljedica smanjenog lučenja inzulina uz perifernu rezistenciju na inzulin, što uzrokuje stanje hiperglikemije. Temeljne vrste dijabetesa su tip 1 i tip 2 (1), a razlikuju se po kombinaciji osobina. Tip 1 dijabetes (juvenilni ili ovisan o inzulinu) uzrokuje autoimuno razaranje beta-stanica, koje je subkliničko dok ne dođe do razaranja tolikog broja stanica da je količina inzulina nedovoljna za nadzor glikemije. To je tip dijabetesa koji se najčešće razvijao kod osoba ispod 30 godina, mada se zna javiti i kasnije. Čini oko 10% svih slučajeva dijabetesa (2).

Tip 2 (adultni ili dijabetes neovisan o inzulinu), pojavljuje se obično u odrasloj dobi, a uzrok mu je, osim genetske predispozicije, životni stil. Primarno nastaje periferna inzulinska rezistencija, uz povećanu glukoneogenezu u jetri, dok su razine inzulina u početku visoke. Kasnije dolazi i do smanjenja razina inzulina, što dodatno pogorša hiperglikemiju. Tip 2 je najčešći i incidencija mu sve više raste, uslijed epidemije pretilosti u svijetu (2).

Trudnoća je fiziološko stanje do kojeg dolazi nakon implantacije oplođene jajne stanice u endometrij maternice. Tijekom trudnoće, koja traje oko 40 tjedana, dolazi do velikih promjena u funkcioniranju organizma majke, a sve s ciljem omogućavanja rasta i razvoja ploda tijekom gestacijskog razdoblja. Promjene se odvijaju na različitim nivoima (3), primarno su to hormonske i fiziološke promjene usmjerene k opskrbi ploda dovoljnom količinom makronutrijenata; proteina, masti i ugljikohidrata. Prilagodbe uključuju kardiovaskularni, urinarni, hematološki, respiratorni i metabolički sustav. Jedna od važnijih adaptacija je svakako i promjena osjetljivosti na inzulin. Tijekom rane gestacije promjene su anaboličke (3) - dolazi do blagog povećanja osjetljivosti na inzulin, što promovira pohranu glukoze i stvaranja energetskih zaliha kao priprema za povećane potrebe za energijom tijekom nastavka trudnoće. Nakon toga, u nastavku trudnoće dolazi do kataboličkih promjena – razvija se blaga fiziološka inzulinska rezistencija, tako da se podižu razine glukoze u krvi (GUK) radi lakše opskrbe ploda. Inzulinska rezistencija također promovira endogenu glukoneogenezu, kao i cijepanje masnih zaliha i povišenje koncentracije slobodnih masnih kiselina (FFA). Da bi homeostaza glukoze bila održana, na životinjskom modelu je utvrđeno da se povećana potreba kompenzira hipertrofijom i hiperplazijom beta-stanica pankreasa (4), kao i povećanom, glukozom stimuliranom, sekrecijom inzulina. Lučenje hormona (prolaktina, estrogena i kortizola) uzrokuje postupni razvoj inzulinske rezistencije, koji je praćen povećanjem lučenja inzulina radi održavanja euglikemije. Lučenje inzulina povećava se dva puta, dok se osjetljivost na inzulin smanjuje 70% (5,6).



## 1. Uvod

Prijenos glukoze preko placente odvija se pomoću koncentracijskog gradijenta, odnosno ovisi o razlici koncentracije GUK majke i fetusa. U poodmakloj trudnoći (7), fetusu se povećava potreba za glukozom, što uzrokuje smanjenje koncentracije GUK kod majke. Da bi gradijent bio održan, povećava se inzulinska rezistencija kod majke, kao i proizvodnja glukoze u jetri. Da bi se održala ravnoteža i da ne bi prevelika količina glukoze prolazila do fetusa, dolazi do ranije pomenutog povećavanja lučenja inzulina.

### 1.1 Gestacijski dijabetes – definicija i klinička slika

Ako ranije opisani proces, a uslijed nekih predisponirajućih faktora, ne uspije održati glikemiju pod kontrolom, dolazi do razvoja gestacijskog dijabetesa. Gestacijski dijabetes melitus (GDM) je komplikacija trudnoće čija incidencija je kontinuirano u porastu (8), uslijed prelaska čovjeka na sjedilački način života. GDM podrazumijeva *de novo* razvoj povišenih razina GUK tijekom trudnoće, najčešće u drugom trimestru. Kod normalne trudnoće dolazi do hiperplazije beta stanica uslijed stimulacije humanim placentalnim laktogenom i prolaktinom, što rezultira višim razinama inzulina. Placentalno lučenje dijabetogenih hormona, kao što su hormon rasta, kortikotropin oslobađajući hormon, placentalni laktogen i progesteron, dovodi do povećane rezistencije na inzulin. Nemogućnost da se kompenzira rezistencija na inzulin nastala uslijed trudnoće (9), unatoč hiperplaziji beta stanica gušterače, dovodi do razvoja gestacijskog dijabetesa. Kod gestacijskog dijabetesa nedovoljno je povećanje lučenja inzulina da bi se kompenzirala nastala inzulinska rezistencija (6).

Gestacijski dijabetes dovodi do povećanih rizika, kako za majku, tako i za plod (10). Komplikacije koje mogu nastati uslijed GDM dijele se na kratkoročne i dugoročne. Kratkoročne komplikacije za majku su razvoj preeklampsije, povećana mogućnost poroda carskim rezom ili prijevremeni porod, a dugoročne su veća vjerojatnost razvoja GDM u idućoj trudnoći, kasniji razvoj dijabetesa tip 2 (DM-2) te rizik od kardiovaskularnih bolesti koje ga prate. Kratkoročne komplikacije za dijete uključuju makrosomiju, razvoj neonatalne hipoglikemije, poteškoće pri porodu, poput distocije ramena itd. Dugoročne posljedice po dijete podrazumijevaju slične bolesti kao i kod majke: DM-2, pretilost i druge.

Nepoznat je točan uzrok gestacijskog dijabetesa (2) te se smatra da je u pitanju kombinacija genetičkih, autoimunih te okolišnih faktora. Sama patofiziologija razvoja (1) podrazumijeva nedovoljnu količinu inzulina da bi se nadvladala rezistencija nastala djelovanjem fetalnih hormona, a koji uzrokuju perifernu rezistenciju na inzulin.

## 1. Uvod

Molekularna razina GDM-a uključuje složenu interakciju između genetičkih i okolišnih čimbenika koji utječu na funkciju inzulina i metabolizam glukoze. Jedan od glavnih faktora povezanih s razvojem GDM-a je inzulinska rezistencija (11). U normalnom metabolizmu, inzulin, hormon koji proizvodi gušterača, pomaže u regulaciji razine GUK poticanjem njenog unosa u stanice i smanjenjem proizvodnje glukoze u jetri. Međutim, tijekom trudnoće, hormoni poput estrogena, progesterona i humanog placentarnog laktogena (hPL) dovode do smanjene osjetljivosti tkiva na inzulin, što rezultira otpornošću na inzulin.

Na molekularnoj razini, oksidativni stres i upala također igraju važnu ulogu u razvoju GDM-a. Oksidativni stres nastaje kao posljedica neravnoteže između prooksidacijskih i antioksidacijskih mehanizama u tijelu, što dovodi do oštećenja stanica. Povišeni oksidativni stres (12) tijekom trudnoće može narušiti funkciju inzulina i povećati otpornost na inzulin. Slično tome, upalni procesi u tijelu (13) mogu inhibirati signalne puteve inzulina i oštetiti tkiva koja su odgovorna za normalnu regulaciju glukoze.

Uzrok nastanka GDM nije poznat (2), ali pretpostavke uključuju genetsku predispoziciju, disfunkciju beta-stanica pankreasa te kroničnu inzulinsku rezistenciju u podlozi. Po nekim pretpostavkama (14,15), uslijed povećane potrebe za inzulinom koja je uzrokovana inzulinskom rezistencijom te porastom potrošnje energije, dolazi do iscrpljivanja beta-stanica, što je u skladu s patofiziologijom nastanka DM-2 (16).

Molekularna analiza (14) gena povezanih s metabolizmom glukoze također je pokazala vezu između genskih varijacija i rizika od razvoja GDM-a. Određeni geni koji su uključeni u regulaciju inzulinske signalizacije, metabolizam glukoze i funkciju gušterače (15) mogu biti povezani s povećanim rizikom od GDM-a. Međutim, važno je napomenuti da genetička predispozicija nije jedini faktor koji utječe na razvoj GDM-a, već je interakcija između genetičkih faktora i okolišnih čimbenika ključna.

Istraživanja su također identificirala specifične molekule koje mogu biti povezane s razvojem GDM-a. Na primjer, adipokini (17), hormoni koji se izlučuju iz masnog tkiva, kao što su adiponektin i leptin, mogu imati ulogu u regulaciji metabolizma glukoze tijekom trudnoće. Promjene u koncentracijama tih molekula mogu utjecati na inzulinsku osjetljivost i metabolizam glukoze.

Uzimajući u obzir sve navedene molekularne mehanizme, jasno je da GDM ima složeno podrijetlo na molekularnoj razini. Genetička predispozicija, oksidativni stres, upala i

## 1. Uvod

hormonalne promjene tijekom trudnoće svi su važni faktori koji utječu na regulaciju metabolizma glukoze i razvoj GDM-a.

Sama trudnoća je i proupalno stanje te je trudnica podložnija različitim infektivnim agensima (9). Hiperglikemija u GDM može djelovati kao okidač oksidativnog stresa u stanicama, koji potiče upalni odgovor lučenjem različitih proupalnih citokina i aktivacijom proupalnih stanica te se i tako povećava rezistencija na inzulin. U ovom radu istražena je korelacija ranog porasta različitih parametara, između ostalih, i proupalnih i protuupalnih citokina, i predikcije razvoja GDM te primjene u profilaksi komplikacija koje eventualni razvoj GDM nosi.

Uobičajeni mehanizam nastanka GDM je smanjena osjetljivost perifernih tkiva na inzulin, što rezultira relativnom inzulinskom rezistencijom (18). Kada endogeno izlučivanje inzulina ne može nadoknaditi tu rezistenciju, rezultat je gestacijski dijabetes.

Klinička slika gestacijskog dijabetesa može uključivati sljedeće simptome: glavobolje, zamućen vid, polidipsija, poliurija, umor te učestale urinarne infekcije. Važno je napomenuti da mnoge trudnice ne ispoljavaju kliničke simptome, stoga je redovito praćenje glikemije ključno za rano otkrivanje gestacijskog dijabetesa (19). Ako su rezultati testa izvan referentnih raspona, daljnje dijagnostičke mjere mogu biti potrebne radi potvrde gestacijskog dijabetesa. Liječenje gestacijskog dijabetesa ključno je za održavanje zdravlja majke i fetusa. Prva linija terapije obično obuhvaća prilagođenu prehranu i tjelesnu aktivnost (20). Trudnicama se preporučuje pridržavanje individualiziranog plana prehrane koji podrazumijeva ravnomjerno raspoređene obroke s kontroliranim unosom ugljikohidrata (21,22). U određenim slučajevima, terapija inzulinom može biti potrebna kako bi se postigla euglikemija.

Neadekvatno liječen gestacijski dijabetes može povećati rizik od komplikacija tijekom trudnoće, kao što su preeklampsija, gestacijska hipertenzija i prijevremeni porod. Također, prisutnost gestacijskog dijabetesa povećava rizik od razvoja DM-2 kod majke i djeteta kasnije u životu (23). Stoga je važno pratiti glikemiju nakon poroda i redovito obavljati testiranja radi identifikacije mogućih dugoročnih ishoda.

GDM je važno stanje koje zahtijeva pažljiv nadzor tijekom trudnoće kako bi se očuvalo zdravlje majke i fetusa. Rana dijagnoza, individualizirana prehrana, tjelesna aktivnost i, prema potrebi, farmakoterapija inzulinom (20,21,22) ključni su čimbenici u terapijskom pristupu gestacijskom dijabetesu. Redovito praćenje i testiranje nakon poroda također su važni kako bi se identificirali mogući dugoročni ishodi za zdravlje majke i fetusa.

### 1.2 Gestacijski dijabetes – postavljanje dijagnoze

Laboratorijski parametri igraju važnu ulogu u dijagnostici i praćenju gestacijskog dijabetesa (24). Njihova analiza omogućuje procjenu metabolizma glukoze, inzulina, lipidnog profila i bilježenje upalnih procesa. Također, mjerenje specifičnih biomarkera (25), kao što su imunoglobulini i citokini, pruža uvid u imunološke i upalne procese povezane s GDM-om.

**Glukoza:** Glukoza je osnovni parametar za dijagnostiku GDM-a. Uobičajeni test opterećenja glukozom (OGTT) mjeri razinu glukoze u krvi prije, tijekom i nakon unosa određene količine glukoze. Povišene razine glukoze upućuju na gestacijski dijabetes.

**Inzulin i C-peptid:** Mjerenje razine inzulina i C-peptida korisno je za procjenu inzulinske rezistencije i funkcioniranja gušterače. Povišene razine inzulina i C-peptida mogu ukazivati na nedovoljan odgovor tkiva na inzulin i povećanu proizvodnju inzulina.

**Lipidni profil:** Određivanje razine triglicerida, HDL (lipoproteina visoke gustoće) i LDL (lipoproteina niske gustoće) kolesterola važno je za procjenu metaboličkog statusa trudnica s GDM-om. Povišene razine triglicerida i LDL kolesterola, te smanjene razine HDL kolesterola mogu biti prisutne kod ovih trudnica.

**Ultravisoko osjetljivi C-reaktivni protein (Hs-CRP)** je marker upale koji se često mjeri u kliničkoj praksi. Povišene razine hs-CRP-a mogu ukazivati na prisutnost upalnih procesa kod trudnica s GDM-om.

**HbA1C:** HbA1C (glikozilirani hemoglobin) odražava prosječnu razinu glukoze u krvi u posljednja tri mjeseca. Mjerenje HbA1C-a korisno je za procjenu dugoročne kontrole glukoze (6) kod trudnica s GDM-om.

Laboratorijski parametri poput glukoze, inzulina, C-peptida, lipidnog profila, hs-CRP, HbA1C, imunoglobulina i citokina igraju važnu ulogu u dijagnostici i praćenju gestacijskog dijabetesa. Njihovo redovito praćenje omogućuje pravovremenu intervenciju i adekvatno zbrinjavanje ovog stanjem.

Prvi dijagnostički kriteriji za GDM bili su objavljeni prije skoro 60 godina (26), ali do danas nije postignut konsenzus na međunarodnoj razini. Dijagnostika GDM od vitalne je važnosti kako bi se rano prepoznalo ovo metaboličko stanje tijekom trudnoće. Pravovremeno testiranje i postavljanje dijagnoze ključni su za kontrolu GDM-a i smanjenje rizika od komplikacija za majku i dijete.

## 1. Uvod

Ne postoji međunarodni konsenzus (27) koji bi odredio vrijeme ili metodu probira, kao ni optimalne razine za dijagnozu ili terapiju GDM-a.

Rano testiranje (28): DIPSI (prema engl. *Diabetes In Pregnancy Study group India*) preporučuje rutinsko testiranje na GDM između 24. i 28. tjedna trudnoće kod svih trudnica koje nemaju prethodnu dijagnozu dijabetesa. Međutim, trudnice s visokim rizikom od razvoja GDM-a, poput onih s prethodnim poviješću GDM-a, prekomjernom tjelesnom masom ili drugim faktorima rizika, mogu biti podvrgnute testiranju već ranije tijekom trudnoće.

Kao odgovor na porast broja trudnica kod kojih dolazi do razvoja GDM, provedena je petogodišnja prospektivna HAPO studija (prema engl. *The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome*) (29) kojom je dokazana linearna povezanost između povećanih razina GUK nakon primjene 75g glukoze u OGTT i nepovoljnih ishoda trudnoće, poput makrosomije, kliničke neonatalne hipoglikemije, prijevremenog porođaja, distocije ramena, hiperbilirubinemije i preeklampsije. Na osnovu te studije preporučeno je provođenje OGTT testa između 24. i 28. gestacijskog tjedna kao dijagnostičkog kriterija za GDM. Razine GUK koje ukazuju na GDM prema HAPO studiji su: 5,1 mmol/L pri mjerenju natašte; 10 mmol/L pri mjerenju nakon 1h od uzimanja 75 glukoze i 8,5 mmol/L 2h nakon uzimanja glukoze. Iste mjere prihvatili su i Hrvatsko društvo za ginekologiju i opstetriciju (HDGO) i Hrvatska komora medicinskih biokemičara (HKMB).

Najčešći dijagnostički test za GDM je OGTT. Ovaj test uključuje davanje glukoze trudnici nakon posta, a zatim se prati razina glukoze u krvi nakon određenog vremenskog perioda. Uobičajeni protokol uključuje mjerenje razine glukoze u krvi nakon jednog i dva sata.

Kriteriji dijagnoze: Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (*World Health Organisation*, WHO) i Američkom udruženju za dijabetes (ADA), postoji nekoliko kriterija za dijagnozu GDM-a. Uobičajeni kriteriji uključuju:

1. Prilikom prvog prenatalnog pregleda izmjeriti GUK natašte, HbA1c ili slučajnu (engl. *random*) glikemiju kod žena koje su visokog rizika za obolijevanje od GDM. Ako su navedene vrijednosti veće od 7,0 mmol/L, 6,5 % i 11,1 mmol/L to znači da je postojao preegzistirajući dijabetes koji treba liječiti po smjernicama za liječenje dijabetesa. Ako je izmjereni GUK natašte bio između 5,1 i 7,0 mmol/L dijagnosticira se GDM.

2. Ako je prilikom prvog prenatalnog pregleda GUK natašte manji od 5,1 mmol/L preporučeno je učiniti OGTT između 24. i 28. tjedna gestacije za sve trudnice. OGTT se provodi ingestijom

## 1. Uvod

75 g glukoze i mjerenjem GUK-a prije testa te nakon 1 i 2 sata. Ako je GUK natašte veći od 5,1 mmol/L, nakon 1 sat veći od 10,0 mmol/L ili nakon 2 sata veći od 8,5 mmol/L dijagnosticira se GDM. Dovoljno je da samo jedna od ove tri vrijednosti bude povišena da bi se potvrdila dijagnoza.

Prema nekim autorima (27), upravo primjena različitih protokola dovela je do velikog skoka u broju dijagnosticiranih GDM, koji je po nekim kriterijima i 18%.

### 1.3 Citokini

Stanice koje sudjeluju u imunosnim reakcijama, upali, sustavnom odgovoru na oštećenje i hematopoezi odgovorne su za stvaranje malih molekula, po građi proteina, koji su jedan od načina komuniciranja između stanica – citokine. Vežu se na specifične receptore, obično djeluju putem drugog glasnika, dok odgovor na njih podrazumijeva promjenu u ekspresiji proteina.

Temelj su komunikacije unutar imunološkog sustava, a njihove odlike, poput kratkog poluvijeka, pleiotropije, redundancije te niska koncentracija u plazmi otežavaju detekciju i karakterizaciju. Citokini koji su tema ovog rada su primarno citokini koji sudjeluju u prirodnoj imunosti, IL-6, IL-10, TNF-alfa te adiponektin.

IL-6 (30) stvaraju monociti, makrofagi, Th2 te stromalne stanice, ciljne stanice su mu aktivirane stanice B, plazma stanice i stem stanice, a funkcija mu je diferencijacija u plazma stanice, sekrecija At, diferencijacija i odgovor akutne faze. IL-6 je proinflamatorni citokin koji ima važnu ulogu u regulaciji upalnih procesa, imunosnom odgovoru i metabolizmu glukoze.

Kod gestacijskog dijabetesa, često se primjećuje povišena razina IL-6 (30). To može ukazivati na povećanu upalnu aktivnost, inzulinsku rezistenciju i oštećenje funkcije beta stanica gušterače. IL-10 (31) stvaraju Th2 stanice, ciljne stanice su mu makrofagi i stanice B, a funkcija mu je aktivacija i stvaranje citokina. IL-10 je protuupalni citokin koji se smatra regulatorom upalnog odgovora s imunosupresivnim i antiinflamatornim učincima.

Kod trudnica s gestacijskim dijabetesom, može se primijetiti snižena razina IL-10, što može ukazivati na poremećenu ravnotežu upalnog odgovora i povećanu upalnu aktivnost.

TNF-alfa (31) proizvode makrofagi, mastociti i NK-stanice, ciljne stanice su mu makrofagi i tumorske stanice, a funkcija mu je citokinska ekspresija i stanična smrt. Kod gestacijskog dijabetesa, primjećuje se povišena razina TNF-alfa. To može pridonijeti upalnom stanju, inzulinskoj rezistenciji i oštećenju funkcije beta-stanica gušterače.

## 1. Uvod

Adiponektin (17,32) je proizvod primarno masnog tkiva koji je uključen u razgradnju masnih kiselina i regulaciju glukoze, što ostvaruje utječući na hormonsku i citokinsku aktivnost, vezanje sijalinske kiseline i signalnih receptora.

Kod GDM se često primjećuje snižena razina adiponektina (32). To može biti povezano s povećanom inzulinskom rezistencijom, upalnim procesima i metaboličkim disbalansom.

Poznato je da abnormalnosti u izražaju citokina mogu uzrokovati različite bolesti (33), ali kvantificiranje citokina može imati značaja i drugdje, budući da su izravno uključeni u etiologiju različitih patoloških stanja; mogu biti pokazatelji težine određenih, često infektivnih stanja.

### **Lučenje citokina u trudnoći**

Placenta je privremeni feto-maternalni organ koji postoji u trudnoći i neophodan je za razvoj ploda. Budući da je trudnoća proupalno stanje, lučenje citokina je povišeno u trudnoći. Majčin inzulin može potaknuti placentu (34) na lučenje više citokina. Ukoliko nije kontrolirano, povišeni citokini mogu imati utjecaj ne samo na majku, nego mogu i kompromitirati normalan razvoj fetusa. Osim toga, placenta i reagira na citokinske stimuluse koje luče majka i plod. Upalna reakcija je kaskadni proces koji se sastoji od nekoliko različitih procesa koordiniranih citokinima. Ovisno o poticaju, citokinska produkcija može biti stimulirana autonomno od strane majke, fetusa ili placentе. Pierce i sur. (35) utvrdili su placentalnu proizvodnju IL-6 i TNF-alfa koristeći *ex vivo* perfuzijski model placentе. Razina IL-6 bila je povišena kod majke, čime je indirektno potvrđen prolazak kroz utero-placentalnu barijeru. Vrsta i lokacija citokinskih receptora na površini placentе određuje odakle potiču poticaji za lučenje citokina – od same placentе, majke ili ploda.

### **1.4 Gestacijski dijabetes – imunološki profil**

GDM odlikuje i disregulacija (36) imunskog sustava koju uzrokuje neravnoteža između T pomoćničkih stanica Th1 i Th2, što pogoduje pokretanju proupalnog odgovora. T-stanice čine integralni dio adaptivnog imunskog odgovora i povezane su s epigenetičkim utjecajima, pa i s komplikacijama trudnoće (36-39). Th17 stanice, koje proizvode IL-17 imaju ključnu ulogu (38) u razvoju kronične upale i autoimunskih odgovora. Regulatorne T stanice (T reg), koje proizvode IL-10, moduliraju Th1 i Th2 imunski odgovor, kao i stanice Th17.

Budući da je GDM karakteriziran i blagom sustavnom upalom s proinflatornim imunskim odgovorom, imunološki sustav također ima važnu ulogu u razvoju GDM. Provedeno je istraživanje (36) perifernog odgovora Th1, Th2, Th17 i Treg kod trudnica s GDM u usporedbi

## 1. Uvod

s normalnom trudnoćom. Skupina s GDM je imala viši udio Th2, Th17 i Treg u trećem trimestru, ali su postpartalno imale jednake vrijednosti kao i kontrolna skupina. Također, skupina s GDM je imala više vrijednosti IgE i CRP.



## 2. Hipoteza

### **2. Hipoteza**

Osnovna pretpostavka ovog istraživanja jeste da se proupalni i protuupalni citokini iz krvi trudnica mogu koristiti kao prediktori ili dijagnostički marker gestacijskog dijabetesa.

### 3. Ciljevi

#### 3. Ciljevi

Cilj ovog istraživanja je potvrditi ili opovrgnuti hipotezu, odnosno, utvrditi:

- postoji li povezanost između promjena razina proupalnih i protuupalnih citokina s razvojem GDM te
- usporediti skupine trudnica niskog i visokog rizika za razvoj GDM u kontekstu proupalnih i protuupalnih citokina.

## 4. Ispitanici i metode

### 4. Ispitanici i metode

#### 4.1 Ustroj studije

Studija je ustrojena kao opažajna prospektivna kohortna studija. U istraživanju je sudjelovalo 30 trudnica, a uzorkovanje je provedeno u ambulanti Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek i Odjelu za laboratorijsku i transfuzijsku medicinu NMB „Dr. Juraj Njavro“ u Vukovaru. Uzorci su analizirani u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek, Odjelu za laboratorijsku i transfuzijsku medicinu NMB „Dr. Juraj Njavro“ u Vukovaru i Laboratoriju za medicinsku genetiku Medicinskog fakulteta u Osijeku.

#### 4.2 Ispitanici

Istraživanje je provedeno na uzorcima krvi trudnica koje su prethodno pročitale i potpisale informirani pristanak koji se nalazi u priložima, a koji je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Osijeku i Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra u Osijeku. Osnovni kriterij prema kojem su odabirane trudnice je da su u trenutku uključivanja u istraživanje bile dobrog općeg stanja i bez poznatih imunoloških bolesti.

Trudnice su razvrstane u dvije skupine, niskog i visokog rizika. Trudnice koje imaju normalne vrijednosti glukoze i HbA1C, normalnu tjelesnu masu (ITM<25), nemaju gestacijski dijabetes ili drugu patologiju trudnoće u prethodnoj trudnoći/ trudnoćama, nemaju dijabetes u obiteljskoj anamnezi ni malformaciju ploda svrstane su u skupinu niskog rizika za razvoj GDM. Trudnice s povišenim vrijednostima glukoze i HbA1C (vrijednost glukoze u prvom trimestru >5,1 mmol/L ili OGTT s patološkim vrijednostima u 24.-28. tjednu trudnoće), povećanom tjelesnom masom (ITM>25), gestacijskim dijabetesom u prethodnim trudnoćama ili šećernom bolesti te trudnice starije životne dobi (>35 godina) svrstane su u skupinu visokog rizika za razvoj GDM. U skupinu visokog rizika uključene su i trudnice koje su u ranijim trudnoćama imale malformacije ploda te one koje u obiteljskoj anamnezi imaju dijabetes.

Isključni kriteriji bili su nepotpisivanje informiranog pristanka te razvoj neke druge bolesti u trudnoći (preeklampsija i dr.).

Uzorkovanje krvi i klinički pregled učinjeni su tijekom prvog i trećeg trimestra na uzorku od 30 trudnica. Analizirani su laboratorijski parametri vezani uz gestacijski dijabetes (GUK, inzulin, C-peptid, trigliceridi, HDL i LDL kolesterolom, hs-CRP, HbA1C), kvantificirani su imunoglobulini te određene vrijednosti IL-10, IL-6, adiponektina i TNF-  $\alpha$ .

## 4. Ispitanici i metode

Istraživanje je učinjeno kao dio internog istraživačkog projekta IP16 (2020): Specifičnosti imunološkog profila u gestacijskom dijabetesu, voditeljica kojeg je prof. dr. sc. Jasenka Wagner Kostadinović.

### 4.3 Metode

Svakoj trudnici krv je uzorkovana u 1. i 3. trimestru. Analiza je učinjena u uzorcima svježe pune krvi, seruma i plazme.

Analizirani su laboratorijski parametri vezani za gestacijski dijabetes. Glukoza je određena enzimskom metodom s heksokinazom, inzulin i C-peptid elektrokemiluminiscencijskom metodom (ECLIA-om), trigliceridi enzimskom kolorimetrijskom metodom s lipoprotein lipazom, HDL i LDL kolesterolom homogenom enzimatskom kolorimetrijskom metodom, hs-CRP i kvantifikacija imunoglobulina klase IgG, IgM, IgA imunoturbidimetrijom, HbA1C turbidimetrijskom inhibicijskom imunokemijskom metodom (TINIA). Kao analizator korišten je Cobas Pro (Roche, Basel, Švicarska).

IL-6 je određen ECLIA metodom, IL-10 imunoenzimskom (ELISA) metodom (40) (Abcam, Boston, SAD), adiponektin ELISA metodom (ELK Biotechnology, Wuchan, Kina), TNF-alfa također ELISA metodom (Sigma-Aldrich, Burlington, Massachusetts, SAD).

Za TNF-alfa korišten je visokoosjetljivi ELISA set za kvantitativnu detekciju. Humano antitijelo na TNF-alfa dodano je na jažice, uzorak humanog TNF-alfa dodan je na antitijela. Biotinom konjugirano anti-humano TNF alfa antitijelo je dodano i vezano na TNF-alfa vezan na prvo antitijelo. Ispiranjem je uklonjen ostatak nevezanog biotinom konjugiranog antihumanog TNF-alfa protutijela. Dodan je streptavidin-HRP i vezan na biotinom konjugirano TNF-alfa protutijelo. Nakon inkubacije je ispiranjem uklonjen nevezani Streptavidin-HRP i dodan je amplifikacijski reagens 1 (Biotinyl-Tiramid) u jažice. Nakon sljedeće inkubacije, ispiranjem je uklonjen nevezani amplifikacijski reagens 1 i dodan je amplifikacijski reagens 2 (Streptavidin-HRP). Nakon inkubacije, ispran je i reagens 2 i dodana je HRP-reaktivna otopina supstrata.

Količina nastalog obojanog produkta je proporcionalna količini humanog TNF-alfa prisutnog u uzorku ili kontroli. Reakcija je završena dodavanjem kiseline, apsorbancija je mjerena pri 450 nm. Kontrola je izrađena od 7 humanih TNF-alfa razrjeđenja i određena je koncentracija uzorka.

## 4. Ispitanici i metode

Za određivanje adiponektina, korišten je set koji se sastoji od pločice na koju je ranije nanoseno adiponektin antitijelo. Uzorak ili kontrole dodani su na odgovarajuće jažice s biotinom konjugiranim antitijelima specifičnim za adiponektin, pa je pločica inkubirana s HRP-konjugiranim Avidinom. Nakon dodavanja otopine TMB supstrata, samo jažice koje sadrže adiponektin su promijenile boju. Enzim supstrat reakcija dovršena je dodavanjem otopine sumporne kiseline, a promjena boje mjerena je spektrofotometrijski na valnoj duljini od 450 nm. Nakon toga, koncentracija adiponektina u uzorcima određena je usporedbom uzorka sa standardnom krivuljom.

Koncentracija IL-10 određena je tako što su, pri sobnoj temperaturi, prvo u odgovarajuće jažice dodane kontrole i uzorci te su tako inkubirani 2,5 sata. Nakon toga je preostali sadržaj izliven i jažice su isprane otopinom za ispiranje, koja je zatim uklonjena dekantiranjem, a pločica je osušena staničevinom. Nakon toga, u jažice je dodano detekcijsko antitijelo koje je isprano nakon inkubacije. Nakon toga je dodana otopina Streptavidina u količini od 100  $\mu$ l u svaku jažicu, te je pločica ponovno inkubirana i nakon toga isprana. Nakon toga dodan je, inkubiran i ispran TMB supstratni reagens. Nakon kratke inkubacije (30 min), dodana je Stop otopina i učinjena je spektrofotometrija. Apsorbancija je očitana pri 450 nm.

### 4.4 Statističke metode

Učinjena je deskriptivna statistička obrada, a kategorički podaci su predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro - Wilkovim testom, a zbog razdiobe koja ne slijedi normalnu, podaci su opisani medijanom i granicama interkvartilnog raspona.

Za testiranje razlika kontinuiranih varijabli između dvije nezavisne skupine korišten je Mann Whitneyev U test. Sve  $P$  vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na  $\text{Alpha} = 0,05$ . Za analizu podataka korišten je statistički program MedCalc® Statistical Software version 20.218 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2023) i SPSS ver. 23 (IBM Corp. Released 2015. IBM SPSS, Ver. 23.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

## 5. Rezultati

### 5. Rezultati

Istraživanje je provedeno na 30 ispitanica s medijanom dobi od 29 godina (interkvartilnog raspona od 26 do 32 godine) u rasponu od najmanje 22 do najviše 37 godina. S obzirom na stručnu spremu ispitanice su većinom više ili visoke stručne spreme, njih 17 (56,6 %). Medijan tjedna gestacije je 9, u rasponu od najmanje 6 do najviše 12 tjedana. Prije trudnoće, indeks tjelesne mase je za 18 (60 %) ispitanica normalan, u rasponu od  $19 \text{ kg/m}^2$  –  $24,9 \text{ kg/m}^2$ , a razlika do sada u kilogramima se kreće od -4 do 5 kilograma, s medijanom 0. Omjer struk bokovi 12 (40 %) ispitanica ima  $\geq 0,86$  (Tablica 1).

Tablica 1. Osnovna obilježja ispitanica

	Broj (%) ispitanica
<b>Razina obrazovanja</b>	
Srednja stručna sprema	13 (43,3)
Viša stručna sprema	8 (26,7)
Visoka stručna sprema	9 (30)
<b>Gestacijski tjedan</b> [Medijan (interkvartilni raspon)]	
	9 (8 – 10)
<b>ITM prije trudnoće</b>	
ispod $19 \text{ kg/m}^2$	2 (6,7)
$19 \text{ kg/m}^2$ – $24,9 \text{ kg/m}^2$	18 (60)
$25 \text{ kg/m}^2$ – $29,9 \text{ kg/m}^2$	8 (26,7)
$\geq 30 \text{ kg/m}^2$	2 (6,7)
<b>Razlika kilograma (do sada) (kg)</b> [Medijan (interkvartilni raspon)]	
	0 (0 – 2)
<b>Omjer struk/bokovi</b>	
< 0,8	9 (30)
0,81 – 0,85	8 (26,7)
$\geq 0,86$	13 (44)

## 5. Rezultati

Puši cigarete 14 (47 %) ispitanica, a medijan broja šalica kava na dan je jedna u rasponu od niti jedne do 3 šalice kave. Rijetko se bave fizičkom aktivnosti 13 (44 %) ispitanica, a dnevnu aktivnost manju od 30 minuta ima ih 18 (60 %). Raznoliku prehranu ima 27 (90 %) ispitanica (Tablica 2).

Tablica 2. Raspodjela ispitanica prema životnom stilu

	Broj (%) ispitanica
Pušenje	14 (47)
Alkohol	0
Kava (broj šalica) [Medijan (interkvartilni raspon)]	1 (0 – 3)
Fizička aktivnost	
Nikada	4 (13)
Rijetko	13 (44)
Povremeno	9 (30)
Redovito	4 (13)
Dnevna aktivnost	
< 30 minuta	18 (60)
≥ 30 minuta	12 (40)
Raznolika prehrana	27 (90)

Šećernu bolest u obitelji ima 11 (37 %) ispitanica, a lijekove u trudnoći koriste 4 (13 %) ispitanice. Po jedna (3 %) ispitanica navodi anemiju, šum na srcu, te poremećaj koagulacije i tromboembolijski poremećaj (Tablica 3).

## 5. Rezultati

Tablica 3. Ispitanice prema povijesti bolesti

	Broj (%) ispitanica
Šećerna bolest u obitelji	11 (37)
Lijekovi izvan trudnoće	3 (10)
Lijekovi u trudnoći	4 (13)
Anemija	1 (3)
Poremećaji koagulacije i tromboembolijski poremećaji	1 (3)
Endokrine bolesti	3 (10)
Gastrointestinalne bolesti	3 (10)
Migrene	3 (10)
Šum na srcu	1 (3)

Dob kod prve mjesečnice je bila medijana 13 godina, u rasponu od najmanje 11 do najviše 16 godina. Ciklusi su kod većine, 17 (57 %), bili uredni. Spotting između ciklusa bilježi se kod 3 (10 %) ispitanice, dok je problem sa zanošenjem imalo njih 5 (17 %). Medijan dosadašnjih poroda je jedan, u rasponu od niti jednog do 4 poroda, a raspon pobačaja je bio do 2. Pobačaj je bio od 6. do najviše 11. tjedna trudnoće. Poremećaj štitnjače imale su 2 (7 %) ispitanice, a gestacijski dijabetes u prethodnoj trudnoći njih 4 (13 %). (Tablica 4).



## 5. Rezultati

Tablica 4. Ginekološka i opstetrička anamneza

	Broj (%) ispitanica
Dob prilikom prve mjesečnice	13 (12 – 14)
[Medijan (interkvartilni raspon)]	
Ciklusi	
Uredni	17 (57)
Obilni	9 (30)
Oskudni	1 (3)
Neredoviti	3 (10)
Spotting između ciklusa	3 (10)
Problemi sa zanošenjem	3 (10)
Broj poroda do sada	1 (0 – 1)
[Medijan (interkvartilni raspon)]	
Broj pobačaja	0 (0 – 1)
[Medijan (interkvartilni raspon)]	
Tjedan pobačaja	7 (6 – 9)
Medijan (interkvartilni raspon)]	
Poremećaji štitnjače u prethodnoj trudnoći	2 (7)
GDM u prethodnoj trudnoći	4 (13)
Novorođenče teže od 4000 g u prethodnoj trudnoći	3 (10)

U 1. trimestru aktualne trudnoće, po 4 (13 %) ispitanice imaju upale mokraćnog sustava ili vaginalno krvarenje, a terapiju u trudnoći uzima 10 (33 %) ispitanica. Visok rizik za GDM ima 20 (67 %) ispitanica (Tablica 5).

## 5. Rezultati

Tablica 5. Ispitanice prema obilježjima aktualne trudnoće u 1. trimestru

	Broj (%) ispitanica
Poremećaj štitnjače	3 (10)
Upale mokraćnog sustava	4 (13)
Anemija	1 (3)
Vaginalno krvarenje	4 (13)
Terapija u trudnoći	10 (33)
Visok rizik za GDM	20 (67)

Vrijednosti OGTT-a kretale su se od medijana 4,6 do 6,5 u aktualnoj trudnoći (Tablica 6).

Tablica 6. Vrijednosti OGTT-a aktualne trudnoće

	Medijan (interkvartilni raspon)	Raspon od najniže do najviše vrijednosti
OGTT 0	4,6 (4,3 – 4,9)	4,10 – 5,4
OGTT 1	7,7 (6,7 – 9,25)	6,0 – 11,4
OGTT 2	6,5 (5,3 – 7,3)	4,1 – 9,30

Razlika u kilogramima u 3. trimestru je medijana 10 kg, u rasponu od 2 do 25 kilograma. Tri (10 %) ispitanice razvile su gestacijski dijabetes i primjenjuju prilagođenu prehranu. Druge se komplikacije i poremećaji štitnjače bilježe kod 4 (13 %) ispitanice, i terapiju prima ukupno u trudnoći 6 (20 %) ispitanica (Tablica 7).

## 5. Rezultati

Tablica 7. Obilježja aktualne trudnoće (3. trimestar)

	Broj (%) ispitanica
Razlika u kilogramima [Medijan (interkvartilni raspon)]	10 (8 – 12)
GDM	3 (10)
Dijeta	1 (3)
Druge komplikacije	4 (13)
Poremećaji štitnjače	4 (13)
Terapija u trudnoći	6 (20)

U 1. trimestru, kod ispitanica s povećanim rizikom za GDM značajno su niže vrijednosti eozinofila (Mann Whitney U test,  $P = 0,02$ ) i značajno niže vrijednosti IgM (Mann Whitney U test,  $P = 0,02$ ) i feritina (Mann Whitney U test,  $P = 0,02$ ) u odnosu na one koje imaju nizak rizik (Tablica 8, Tablica 9).

## 5. Rezultati

Tablica 8. Vrijednosti biokemijskih pokazatelja u 1. trimestru prema riziku za GDM

	Medijan (interkvartilni raspon)		<i>P</i> *
	Nizak rizik	Visok rizik	
Eritrociti	4,27 (3,95 - 4,59)	4,4 (4,2 - 4,6)	0,18
Hemoglobin	133,2 (122 - 142)	136,5 (128 - 141,5)	0,45
Trombociti	249,9 (158 - 391)	253,5 (208,8 - 288,8)	0,72
Leukociti	8,03 (5,0 - 11,4)	8,8 (7,3 - 10,1)	0,40
Neutrofili	68,1 (55 - 81)	72 (69,3 - 78)	0,15
Limfociti	23,7 (15 - 33)	22 (20 - 24)	0,48
Monociti	5,4 (2 - 14)	4 (2 - 5)	0,18
Eozinofili	2,3 (1 - 4)	1 (0 - 2)	<b>0,009</b>
Bazofili	0,5 (0 - 1)	0 (0 - 0,8)	0,18
Glukoza	4,7 (4,1 - 5,1)	4,55 (4,4 - 5,1)	0,54
Inzulin	8,7 (4,2 - 19,9)	9,4 (6,6 - 13,5)	0,11
C-PEPTID	0,6 (0,4 - 0,9)	0,7 (0,5 - 0,8)	0,08
HOMA IR	1,8 (1 - 4)	2 (1 - 3)	0,19
HbA1c	33,3 (31,0 - 37,0)	34 (32,3 - 35)	0,21
CRP	2,8 (0,5 - 8,4)	3,7 (2,8 - 8,2)	0,65

\*Mann Whitney U test

## 5. Rezultati

Tablica 9. Vrijednosti biokemijskih pokazatelja u 1. trimestru prema riziku za GDM (2/2)

	Medijan (interkvartilni raspon)		<i>P</i> *
	Nizak rizik	Visok rizik	
IgG	10,6 (7,5 – 14,1)	11,4 (10,3 - 12,2)	0,18
IgM	1,6 (0,7 – 3,43)	0,9 (0,8 - 1,2)	<b>0,02</b>
IgA	1,5 (0,8 – 2,5)	2,1 (1,5 - 2,4)	<b>0,03</b>
Željezo	31,4 (15,0 – 30,0)	23 (18,5 - 26)	0,62
Feritin	74,7 (24,0 – 179,0)	38,5 (22,3 - 59,3)	<b>0,04</b>
B12	388,8 (220,0 – 701,0)	331 (269,8 - 385)	0,17
Folna kiselina	36,4 (16,5 – 64,6)	43,8 (33,4 - 61,7)	0,21
Kolesterol	4,3 (3,3 - 5,6)	4,6 (3,9 - 4,9)	0,18
HDL-kolesterol	1,8 (1,5 – 3,0)	1,7 (1,5 - 2,1)	0,06
LDL-kolesterol	2,2 (1,3 – 3,8)	2,3 (1,9 - 3)	0,07
Trigliceridi	1 (0,7 - 1,3)	1 (0,7 - 1,4)	0,61
IL-6	3,0 (1,6 – 4,8)	3,5 (2,8 - 4,3)	0,12
IL-10	62,4 (0 – 284,0)	9,1 (0,2 - 37,2)	0,32
TNF-A	0,76 (0 – 3,2)	1 (0 - 2)	0,24
Adiponektin	38,1 (5,57 – 90,9)	57 (11,9 - 65,4)	0,97

\*Mann Whitney U test

U 3. trimestru, kod ispitanica s visokim rizikom za GDM značajno su više vrijednosti CRP-a (Mann Whitney U test,  $P = 0,01$ ) i IgA (Mann Whitney U test,  $P = 0,009$ ), a značajno niže vrijednosti IgM (Mann Whitney U test,  $P = 0,001$ ) u odnosu na one koje imaju nizak rizik, dok u ostalim biokemijskim pokazateljima 3. trimestra nema značajnih razlika s obzirom na rizik GDM (Tablica 10, Tablica 11).

## 5. Rezultati

Tablica 10. Vrijednosti biokemijskih pokazatelja u 3. trimestru prema riziku za GDM (1/2)

	Medijan (interkvartilni raspon)		P*
	Nizak rizik	Visok rizik	
Eritrociti	3,8 (3,7 – 4,4)	3,9 (3,8 - 4,1)	0,23
Hemoglobin	119 (108 – 129)	118,5 (112,8 - 129,3)	0,84
Trombociti	213 (121 - 303)	251,5 (218,5 - 264,3)	0,07
Leukociti	9,4 (5,9 – 12,2)	10,1 (8,7 - 12,3)	0,58
Neutrofili	69,5 (68 - 74,8)	72 (65,3 - 76,8)	0,64
Limfociti	22 (21,8 - 24,3)	20 (16,3 - 26)	0,34
Monociti	5 (4,5 - 6)	5,5 (4 - 6)	0,84
Eozinofili	1,5 (0,8 - 2,3)	1 (1 - 2)	0,82
Bazofili	0 (0 - 1)	0 (0 - 1)	0,88
Glukoza	4,5 (4,3 - 4,9)	4,7 (4,3 - 4,9)	0,57
Inzulin	10,9 (6,5 - 13,5)	13,1 (10,1 - 17,9)	0,09
C-PEPTID	0,8 (0,6 - 1)	1 (0,7 - 1,3)	0,20
HOMA IR	2,5 (1,75 - 3)	2,5 (2 - 4)	0,14
HbA1c	34,5 (32,7 - 37,7)	37 (34,3 - 38)	0,22
CRP	2,3 (1,6 - 3,6)	4,4 (2,8 - 7,4)	<b>0,01</b>

\*Mann Whitney U test

## 5. Rezultati

Tablica 11. Vrijednosti biokemijskih pokazatelja u 3. trimestru prema riziku za GDM (2/2)

	Medijan (interkvartilni raspon)		<i>P</i> *
	Nizak rizik	Visok rizik	
IgG	8 (7,4 - 9,3)	8,9 (7,5 - 10,1)	0,28
IgM	1,5 (1,2 - 2)	0,9 (0,7 - 1,2)	<b>0,001</b>
IgA	1,4 (1 - 1,7)	1,9 (1,4 - 2,3)	<b>0,009</b>
Željezo	14 (7 - 22)	12,5 (7,3 - 15,8)	0,18
Feritin	13,5 (11,8 - 19,3)	12 (8,3 - 18)	0,21
B12	229,5 (172,5 - 292,3)	217 (154,3 - 296)	0,58
Folna kiselina	21,9 (17,5 - 38,4)	25,9 (12,9 - 43,7)	0,91
Kolesterol	6,7 (5,9 - 7,9)	6,8 (6,1 - 7,9)	0,57
HDL-kolesterol	1,8 (1,7 - 2,5)	1,9 (1,6 - 2,2)	0,54
LDL-kolesterol	4,2 (2,7 - 4,9)	4 (3,6 - 5,2)	0,55
Trigliceridi	2,7 (1,9 - 3,1)	2,6 (2,2 - 3,4)	0,58
IL-6	2,9 (1,5 - 4)	3,3 (2 - 5,6)	0,12
IL-10	16,3 (4,3 - 55,7)	14,8 (1,7 - 35,8)	0,86
TNF-A	1,4 (0 - 6,2)	1,08 (0 - 5,2)	0,63
Adiponektin	38,1 (4,75 - 89,3)	30,1 (1,5 - 184,1)	0,25

\*Mann Whitney U test

U usporedbi biokemijskih pokazatelja u 1. trimestru nisu pronađene statistički značajne (Mann Whitney U test,  $P < 0,05$ ) razlike između skupine visokog rizika i skupine trudnica koje su razvile GDM.

## 5. Rezultati

Tablica 12. Vrijednosti biokemijskih pokazatelja u 1. trimestru prema razvoju GDM (1/2)

	Medijan (interkvartilni raspon)		<i>P</i> *
	Visoki rizik	Razvile GDM	
Eritrociti	4,27 (3,95 - 4,59)	4,29 (4,15 - 4,6)	0,40
Hemoglobin	137 (112 - 156)	135 (132,5 – 135,5)	0,70
Trombociti	253,5 (164 - 354)	239 (230,5 – 293,5)	0,35
Leukociti	8,75 (6 – 11,9)	8,7 (8,3 – 10,9)	0,70
Neutrofili	71,5 (63 - 82)	77 (75 – 77,5)	>0,99
Limfociti	22,5 (12 - 30)	20 (20 - 20)	>0,99
Monociti	4,0 (0 - 8)	2 (2 – 3,5)	0,76
Eozinofili	1 (0 - 1)	1,0 (0,5 – 1,5)	0,42
Bazofili	0,0 (0 - 1)	0 (0 - 0)	>0,99
Glukoza	4,65 (3,8 – 5,8)	4,5 (4,25 – 4,8)	0,50
Inzulin	9,75 (4,3 – 25,2)	9,1 (7,75 – 9,15)	>0,99
C-PEPTID	0,71 (0,2 - 6)	0,63 (0,55 - 0,64)	>0,99
HOMA IR	2 (1 - 5)	2 (1,5 - 2)	0,89
HbA1c	34 (31 – 39)	34 (33 – 36,5)	0,25
CRP	3,4 (3 – 15,6)	3,7 (2,8 - 8,2)	>0,99

Nastavak vrijednosti biokemijskih pokazatelja prikazan je u sljedećoj tablici (Tablica 13.). Ni u tim rezultatima nije bilo statistički značajnih ( $P>0,05$ ) razlika po Mann Whitney U testu.



## 5. Rezultati

Tablica 13. Vrijednosti biokemijskih pokazatelja u 1. trimestru prema razvoju GDM (2/2)

	Medijan (interkvartilni raspon)		<i>P</i> *
	Visok rizik	Razvile GDM	
IgG	11,4 (8,7 – 14,8)	9,9 (6,65 – 11,5)	0,60
IgM	0,9 (0,7 – 2,1)	11 (10,48 – 11,4)	0,45
IgA	2 (0,8 – 2,8)	1,33 (1 – 1,43)	0,70
Željezo	23,5 (14 – 33)	22 (19 - 34)	0,25
Feritin	74,7 (24,0 – 179,0)	47 (38 - 82)	0,40
Kolesterol	4,6 (2,9 – 6,4)	4,6 (3,9 - 4,9)	0,50
HDL-kolesterol	1,8 (1,3 – 2,5)	1,7 (1,5 - 2,1)	>0,99
LDL-kolesterol	2,4 (1,3 – 3,8)	2,3 (1,9 - 3)	0,50
Trigliceridi	1 (0,6 – 2,1)	1 (0,7 - 1,4)	>0,99
IL-6	3,3 (1,9 – 5,2)	4,8 (3,8 – 5,2)	>0,99
IL-10	9,1 (0 – 44,6)	10,88 (0 – 73,3)	0,56
TNF-A	0,6 (0 – 3,8)	0,8 (0 – 1,8)	0,15
Adiponektin	23,22 (0,35 – 90,9)	28,51 (25 - 37)	0,40

\*Mann Whitney U test

Pri usporedbi biokemijskih pokazatelja u 3. trimestru nisu pronađeni statistički značajni (Mann Whittney U test,  $P > 0,05$ ) rezultati. Trudnice koje su razvile GDM imaju nešto niže vrijednosti medijana za adiponektin i TNF-alfa.

## 5. Rezultati

Tablica 14. Vrijednosti biokemijskih pokazatelja u 3. trimestru prema razvoju GDM (1/2)

	Medijan (interkvartilni raspon)		<i>P</i> *
	Visoki rizik	Razvile GDM	
Eritrociti	3,9 (3,8 – 4,1)	3,9 (3,7 - 4,45)	0,78
Hemoglobin	118,5 (112,8 – 129,3)	124 (124 - 133)	>0,99
Trombociti	251,5 (218,5 – 264,3)	233 (207 - 262)	0,35
Leukociti	10,1 (8,7 – 12,3)	11,6 (9,5 - 14)	>0,99
Neutrofili	72 (65,3 - 76,8)	73 (69 – 74,6)	0,66
Limfociti	20 (16,3 - 26)	24 (15 - 24)	0,20
Monociti	5,5 (4 - 6)	2 (2 - 5)	>0,99
Eozinofili	1 (1 - 2)	1 (0 - 2)	0,58
Bazofili	0 (0 - 1)	0 (0 - 1)	>0,99
Glukoza	4,7 (4,3 – 5,1)	4,6 (4,2 - 4,9)	0,66
Inzulin	13,1 (10,1 – 17,9)	12,7 (10,5 – 16,2)	0,40
C-PEPTID	1 (0,7 – 1,3)	1,04 (0,9 - 1,3)	0,50
HOMA IR	2,5 (2 - 4)	3 (2 - 4)	0,16
HbA1c	37 (31 - 40)	37 (33 - 41)	0,20
CRP	8,4 (2,8 – 12,4)	9,3 (9 - 12)	>0,99

1. \*Mann Whitney U test

U sljedećoj tablici prikazani su rezultati vrijednosti biokemijskih pokazatelja u 3. trimestru prema razvoju GDM. Nisu zapažene statistički značajne razlike.

## 5. Rezultati

Tablica 15. Vrijednosti biokemijskih pokazatelja u 3. trimestru prema razvoju GDM (2/2)

	Medijan (interkvartilni raspon)		<i>P</i> *
	Visoki rizik	Razvile GDM	
IgG	8,9 (7,5 – 11,4)	9,2 (8,4 – 10,7)	>0,99
IgM	0,9 (0,7 – 1,2)	1,1 (0,9 - 1,2)	>0,99
IgA	1,9 (1,4 – 2,3)	1,3 (1,4 – 1,9)	0,60
Željezo	12,5 (7,3 – 15,8)	12,5 (9 - 15)	0,96
Feritin	12 (8,3 - 18)	11 (6 - 18)	>0,99
Kolesterol	6,8 (6,1 - 7,9)	6,1 (5,8 – 6,8)	>0,99
HDL-kolesterol	1,9 (1,6 - 2,2)	1,8 (1,7 - 2,1)	0,45
LDL-kolesterol	4,2 (2,8 – 6,0)	4 (3,6 - 5,2)	>0,99
Trigliceridi	2,6 (1,7 – 4,5)	3,0 (3,0 - 3,9)	>0,99
IL-6	3,3 (1,5 – 8,2)	3,6 (2,2 – 4,2)	0,30
IL-10	14,5 (0 – 80,3)	14,7 (0 – 41,4)	0,25
TNF-A	0,9 (0 – 5,2)	0,2 (0 – 0,5)	0,97
Adiponektin	16,9 (1,5 – 184,1)	7,8 (3,6 – 77,9)	0,30

\*Mann Whitney U test

### 6. Rasprava

Istraživanje je provedeno na uzorcima krvi trudnica koje su prethodno pročitale i potpisale informirani pristanak. Trideset trudnica razvrstane su u dvije skupine, niskog i visokog rizika, pa je tako u skupini visokog rizika bilo 20, a u skupini niskog rizika 10 ispitanica. Isključni kriteriji bili su nepotpisivanje informiranog pristanka te razvoj neke druge bolesti u trudnoći (preeklampsija i dr.).

Uzorkovanje krvi i klinički pregled učinjeni su tijekom prvog i trećeg trimestra. Analizirani su laboratorijski parametri vezani uz gestacijski dijabetes (GUK, inzulin, C-peptid, trigliceridi, HDL i LDL kolesterol, hs-CRP, HbA1C), kvantificirani su imunoglobulini te određene vrijednosti IL-6, IL-10, adiponektina i TNF-alfa.

Prosječna dob sudionica je 29 godina, a kretala se između 22 i 37 godina. Većina sudionica (60%) imala je normalan indeks tjelesne mase (ITM) prije trudnoće. Što se navika tiče, poražavajući je podatak da je 14 sudionica (47%) pušilo cigarete tijekom trudnoće, ali 27 ispitanica (90%) imalo je raznoliku prehranu, što definitivno ima utjecaj na rezultate ispitivanja.

Medicinska anamneza ispitanica uključivala je pozitivnu obiteljsku anamnezu dijabetesa kod 11 sudionica (37%), 4 sudionice (13%) izjavile su da su konzumirale lijekove tijekom trudnoće, a od ostalih medicinskih stanja, prijavljene su anemija, šum na srcu, poremećaji koagulacije i tromboembolijski poremećaji.

Dvije sudionice (7%) imale su poremećaje štitnjače, dok ih je 5 (17%) imalo poteškoće sa začećem. Od ovih 30 ispitanica, četiri (13%) su razvile GDM tijekom prethodnih trudnoća.

U istraživanju (41) provedenom na 612 trudnica (310 zdravih i 302 s GDM) utvrđeno je da su trudnice s GDM imale povišene neutrofile, limfocite, trombocite i eritrocite. Broj eritrocita je unutar referentnih vrijednosti u obje skupine, s tim da je nešto viši u prvom, nego u trećem trimestru (kod obje skupine) i nešto viši kod trudnica višeg rizika u odnosu na one niskog. Razlika trećeg trimestra u odnosu na prvi objašnjiva je hemodilucijom do koje dolazi fiziološki zbog rasta volumena plazme koji nije usklađen s rastom stanične komponente.

Razlike u koncentraciji hemoglobina između skupina visokog i niskog rizika nema, dok postoji određena razlika između prvog i trećeg trimestra, objašnjiva također fiziološkom hemodilucijom (nešto su niže vrijednosti u trećem trimestru), iako prema istraživanju (42) viši hemoglobin bi mogao biti korišten kao prediktivni faktor za razvoj GDM.

## 6. Rasprava

Povišen broj trombocita u nekoliko istraživanja pokazao se kao mogući prediktor razvoja GDM (41,43), no ispitanice su imale vrijednosti trombocita unutar referentnih vrijednosti, kako one niskog, tako i visokog rizika, iako su nešto niže vrijednosti bile kod trudnica niskog rizika, posebno u trećem trimestru ( $p=0,7$ ).

Leukociti su unutar referentnih vrijednosti pri svim mjerenjima, iako nešto niži u prvom, nego u trećem trimestru kod obje skupine, dok je u ranijem istraživanju (41) utvrđeno da su trudnice s razvijenim GDM imale više vrijednosti leukocita. Porast leukocita između prvog i trećeg trimestra objašnjiv je time da je trudnoća blago upalno stanje (44).

Prema istom istraživanju (41) neutrofili, kao još jedan znak upale, povišeni su kod trudnica s GDM, no ovdje to nije bio slučaj; ne postoji značajna razlika, kako između skupina visokog i niskog rizika, tako ni između mjerenja u prvom i trećem trimestru.

U istraživanju (45) provedenom na 1140 žena, koje su proveli Huang i sur., 214 ispitanica je razvilo GDM te je utvrđeno je da je sniženje koncentracije monocita u direktnoj korelaciji s razvojem GDM. U našem istraživanju, vrijednosti monocita su snižene kod visokorizične skupine u trećem trimestru, što odgovara tim rezultatima.

Broj limfocita je u ovom istraživanju unutar referentnih vrijednosti i bez razlika između prvog i trećeg trimestra, ali i između skupina niskog i visokog rizika, iako su prema ranijim studijama (39) očekivani povišeni limfociti.

Eozinofili su unutar referentnih vrijednosti, ali su značajno niži u prvom trimestru kod skupine visokog rizika ( $p=0,009$ ), mada nismo uspjeli pronaći istraživanja koja su se time bavila. Bazofili su unutar referentnih vrijednosti i bez razlika između skupina ili između mjerenja. Razine glukoze su unutar referentnih vrijednosti te bez značajnih razlika između skupina i između prvog i drugog mjerenja. Inzulin je viši kod skupine visokog rizika, značajnije pri drugom mjerenju, a kod obje skupine je viši u trećem nego u prvom trimestru, što je u skladu s reakcijom na fiziološku inzulinsku rezistenciju koja nastaje u trudnoći.

C-peptid je viši kod trudnica visokog rizika te je viši u trećem trimestru, nego u prvom, što je u skladu s napredovanjem trudnoće. HOMA-IR je unutar referentnih vrijednosti za obje skupine u prvom trimestru, dok je izvan referentnih vrijednosti (viši od 2) kod obje skupine u trećem trimestru, što je u skladu s razvojem fiziološke inzulinske rezistencije te ne pokazuje razlike između skupina visokog i niskog rizika. HbA1C ne pokazuje razlike između skupina, kao ni između mjerenja te se kreće u referentnim vrijednostima.

## 6. Rasprava

CRP je unutar referentnih vrijednosti kod obje skupine pri oba mjerenja, viši je u trećem, nego u prvom trimestru te je značajna ( $p=0,01$ ) razlika između skupine visokog i skupine niskog rizika. Istraživanja do sada nisu potvrdila korelaciju između razine CRP i razvoja GDM, dok je viši CRP prisutan u trudnoći zbog njenih proupalnih svojstava.

IgG ima više vrijednosti u prvom nego u trećem trimestru, dakle, pokazuje pad kod obje skupine, bez značajnih razlika među skupinama. IgM sa značajnoću od  $p=0,001$  pokazuje niže vrijednosti kod skupine višeg rizika u odnosu na skupinu nižeg rizika, dok razlike između prvog i drugog mjerenja nema. IgA pokazuje značajno više vrijednosti i pri prvom i drugom mjerenju ( $p=0,009$  i  $p=0,03$ ) kod skupine visokog rizika, dok u literaturi nisu pronađena istraživanja u tom smjeru, što svakako ostavlja prostor za nastavak istraživanja u tom smjeru.

Vitamin B12 i folna kiselina su unutar referentnih vrijednosti, ali imaju više vrijednosti u prvom, nego u trećem trimestru, što je u skladu s napredovanjem trudnoće. Ne postoje odstupanja između skupina niskog i visokog rizika.

Kolesterol je viši pri mjerenju u trećem trimestru, dok su vrijednosti HDL i LDL nepromijenjene, ali značajne razlike između skupina niskog i visokog rizika nema. Trigliceridi imaju blagi rastu kod obje skupine u trećem u odnosu na prvi trimestar, ali bez razlika između skupina.

Vrijednosti željeza su značajno niže u trećem nego u prvom trimestru, no razlika između skupina visokog i niskog rizika nije značajna. Feritin ima značajno ( $p=0,04$ ) nižu vrijednost kod skupine visokog rizika u prvom trimestru, ali se ta razlika u trećem trimestru gubi te su vrijednosti kod obje skupine značajno niže, na donjim granicama referentnih vrijednosti. Budući da je u trudnoći povećana potreba te povećan volumen krvi, takvo kretanje ne iznenađuje.

Vrijednosti OGTT (Oralni test tolerancije glukoze) u trenutnoj trudnoći:

Vrijednosti OGTT-a su se kretale od 4,1 do 5,4 za OGTT 1, od 6,0 do 11,4 za OGTT 2 i od 4,1 do 9,3 za OGTT 3. Medijan porasta tjelesne težine u trećem tromjesečju bio je 10 kg.

Vrijednost OGTT uzet je kao metoda probira za razvoj GDM prema zlatnom standardu za dijagnozu gestacijskog dijabetesa te su trudnice u ovom istraživanju imale rezultate u skladu s očekivanima.

## 6. Rasprava

Više studija je provedeno s ciljem utvrđivanja uloge određenih citokina i kemokina (46,47,48) u predviđanju razvoja GDM, ali u sklopu ovog istraživanja uzeti su u obzir odabrani, koji su se do sada pokazali kao najizvjesniji prediktori razvoja ove bolesti.

U ranije provedenim studijama slično kretanje pokazuje i IL-6 (30), koji je nizak tijekom trudnoća u kojima se razvije GDM. U ovom istraživanju, IL-6 nije pokazao značajno kretanje kod skupine visokog rizika u odnosu na skupinu niskog, a kod pacijentica koje su razvile GDM postoji određeno smanjenje koncentracije između prvog i trećeg trimestra. TNF-alfa pak je povišen (30) kod visokorizičnih trudnica te onih koje razvijaju GDM.

Wedekind i Belkacemi (33) utvrdile su da je citokinska mreža izmijenjena u GDM pa majke s GDM imaju povišene razine citokina (ali ne i TNF-alfa), što utječe na zdravstvene rizike za plod kasnije u životu.

U istraživanju u Kini (31) su zaključili da je adiponektin nizak, a TNF-alfa visok kod pacijentica koje su razvile GDM u usporedbi s kontrolnom skupinom. Također, nizak adiponektin bio je prisutan kod pacijentica koje bi i u kontekstu ovog rada pripadale u skupinu visokog rizika za razvoj GDM (godine >35, visok pregestacijski ITM, dijabetes u obitelji itd.).

Budući da je inzulinska rezistencija u podlozi GDM (49), mnoga su istraživanja usmjerena na temelje inzulinske rezistencije – pa se visok ITM uzima kao važan prediktivni faktor, kao i promjene koncentracije leptina, adiponektina, rezistina, visfatina, retinol-vežućeg proteina 1, vaspina i ometina, čije je lučenje izmijenjeno kod pretilih majki (2,30,31).

Immanuel i Simmons (50) utvrdili su u meta-analizi, koja je uzela u obzir više studija provedenih nad trudnicama koje su razvile GDM, da trudnice koje razvijaju GDM u prvom trimestru nemaju povišenu GUK, što je bio slučaj i u ovom istraživanju.

U ovom istraživanju, IL-6 pokazuje sniženje u trećem u odnosu na prvi trimestar u obje promatrane skupine, dok je pri oba mjerenja viši kod skupine visokog rizika.

IL-10 je nešto niži pri prvom nego pri drugom mjerenju kod skupine visokog rizika, dok je kod skupine niskog rizika značajno viši pri prvom, nego pri drugom mjerenju. Za sada nije utvrđena značajna korelacija između koncentracije IL-10 (31) i rizika razvoja GDM.

Prema meta-analizi koju su radili Fasshauer i sur. (17), adiponektin snižen prije trudnoće ukazuje na viši rizik od razvoja GDM, ali su zaključili da se ne može koristiti kao bolji prediktor od GUK. Druga studija (51), provedena kao prospektivna kohortna studija na 150 žena, od

## 6. Rasprava

kojih je 75 razvilo GDM, a 75 bilo kontrola, utvrdila je poveznicu između snižene koncentracije adiponektina i pojave GDM. U ovom istraživanju kod trudnica iz skupine visokog rizika došlo je do značajnog sniženja koncentracije adiponektina od prvog do trećeg trimestra, dok je kod trudnica niskog rizika koncentracija adiponektina ostala nepromijenjena, što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima.

Vrijednosti adiponektina su pri oba mjerenja niže kod skupine visokog rizika. Ne postoji značajna razlika u vrijednostima adiponektina između trudnica koje su razvile GDM i skupine visokog rizika.

Od trideset sudionica, tri su razvile GDM (10 %), što je u skladu s poznatom prevalencijom (49,50) te bolesti. Sudionice koje su razvile GDM primjenjivale su prilagođenu prehranu u svrhu smanjenja posljedica razvijenog GDM (52), ali bez primjene medikamentne terapije.

Bilo bi dobro da je broj ispitanica koje su sudjelovale u ispitivanju veći, da bi se donijeli relevantni zaključci. Budući da je sudjelovalo samo 30 ispitanica, od kojih su tri ispitanice razvile GDM, to predstavlja ograničenje ovog istraživanja.



### 7. Zaključak

Pravodobno testiranje i postavljanje dijagnoze gestacijskog dijabetesa od ključne su važnosti za pravilan nadzor nad ovim stanjem tijekom trudnoće. Oralni test opterećenja glukozom i dijagnostički kriteriji omogućuju identifikaciju trudnica koje su pogođene GDM-om i omogućuju pravovremenu intervenciju kako bi se smanjili rizici za majku i dijete.

Gestacijski dijabetes ima značajan utjecaj na zdravlje majke i djeteta tijekom trudnoće i dugoročno nakon nje. Pravovremena dijagnoza, praćenje i eventualne terapijske intervencije ključni su za smanjenje rizika od komplikacija i poboljšanje ishoda za majku i dijete. Zdravstveni stručnjaci trebaju educirati trudnice o važnosti praćenja glikemije i pridržavanju preporučenih terapijskih mjera. Kontinuirana skrb i podrška tijekom trudnoće igraju ključnu ulogu u postizanju pozitivnih ishoda za oba roditelja i novorođenče.

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Sve sudionice koje su razvile GDM bile su iz skupine visokog rizika, što potvrđuje ispravnost korištenih prediktivnih faktora
- Sudionice koje su bile visokog rizika za GDM imale su značajno niže vrijednosti eozinofila, IgM i feritina u usporedbi s onima niskog rizika, što bi mogao biti temelj smjera razvoja daljeg istraživanja na tu temu
- Vrijednosti IgA više su kod skupine visokog rizika pri oba mjerenja
- Vrijednosti monocita su niže kod skupine visokog rizika u 3. trimestru
- Vrijednosti inzulina više su kod skupine visokog rizika, nego kod skupine niskog rizika
- Skupina visokog rizika imala je nešto više vrijednosti CRP, što je u skladu sa stanjem blage upale koje karakterizira GDM
- Trudnice s GDM ne moraju u prvom trimestru imati povišene razine GUK
- Ne postoji značajna razlika između trudnica s visokim rizikom za razvoj GDM te onih koje su doista razvile GDM u analiziranim biokemijskim pokazateljima
- IL-6 je viši kod skupine visokog rizika, nego kod skupine niskog rizika
- Vrijednosti adiponektina pokazuju značajno sniženje između prvog i drugog mjerenja kod skupine visokog rizika

Kretanje promatranih pokazatelja nije jednoznačno, ali je i uzorak pacijentica koje su razvile GDM mali te bi valjalo učiniti istraživanje na većem uzorku kako bi bio veći broj promatranih pacijentica na osnovu kog bi se mogli donijeti relevantni zaključci.

## 8. Sažetak

### **Karakterizacija proupalnih i protuupalnih citokina tijekom trudnoće**

**Cilj istraživanja:** Cilj ovog istraživanja je utvrditi postoji li povezanost između promjena razina proupalnih i protuupalnih citokina s razvojem gestacijskog dijabetesa melitusa te usporediti skupine trudnica niskog i visokog rizika za razvoj GDM, kako generalno, tako i u kontekstu proupalnih i protuupalnih citokina.

**Nacrt studije:** Opažajna prospektivna kohortna studija

**Ispitanici i metode:** U istraživanju je sudjelovalo 30 ispitanica, koje su prethodno pročitale i potpisale informirani pristanak. Osnovni kriterij je bio da su trudnice u trenutku uključivanja u istraživanje dobrog općeg stanja i bez poznatih imunoloških bolesti. Razvrstane su u skupine visokog i niskog rizika, sukladno rizičnim faktorima za razvoj GDM. Uzorkovanje krvi učinjeno je tijekom prvog i trećeg trimestra te su analizirani laboratorijski parametri vezani uz GDM, kvantificirani su imunoglobulini te su određene vrijednosti IL-6, IL-10, adiponektina i TNF-alfa.

Nakon analize uzoraka, učinjena je deskriptivna statistička obrada, a kategorički podaci predstavljeni su apsolutnim i relativnim vrijednostima.

**Rezultati:** Istraživanjem je obuhvaćeno 30 sudionica prosječne prosječne dobi 29 godina. Njih 67% bilo je u skupini visokog rizika za razvoj GDM. GDM su razvile tri sudionice, dok je skupina visokog rizika imala niže vrijednosti eozinofila, IgM, feritina i monocita te više vrijednosti CRP, IgA i inzulina. Adiponektin je bio viši kod sudionica visokog rizika, kao i IL-6.

**Zaključak:** Nije utvrđena značajna razlika između skupine visokog rizika i trudnica koje su razvile gestacijski dijabetes. Ipak, bilo bi dobro provesti istraživanje na većem uzorku, budući da je prisutno sniženje koncentracije adiponektina kod skupine visokog rizika i povišenje razine IL-6.

**Ključne riječi:** adiponektin; gestacijski dijabetes; IL-6; IL-10; TNF-alfa; trudnoća.

## 9. Summary

### **Characterization of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during pregnancy**

**Research Objective:** The aim of this study is to determine whether there is a connection between changes in pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine levels and the development of gestational diabetes mellitus (GDM), and to compare groups of low and high-risk pregnant women for GDM development, both generally and in the context of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines.

**Study Design:** Observational prospective cohort study.

**Participants and Methods:** The study involved 30 participants who had read and signed an informed consent form. The basic criterion was that the pregnant women were in good general health at the time of inclusion in the study and had no known immune disorders. They were classified into low-risk and high-risk groups based on risk factors for GDM development. Blood sampling was conducted during the first and third trimesters, and laboratory parameters related to GDM were analysed. Immunoglobulins were quantified, and the levels of IL-6, IL-10, adiponectin and TNF-alpha were determined. After analysing the samples, descriptive statistical analysis was performed, and categorical data were presented in absolute and relative values.

**Results:** The study included 30 participants with an average age of 29 years. Of them, 67% were in the high-risk group for developing GDM (gestational diabetes mellitus). GDM was developed by three participants, while the high-risk group had lower levels of eosinophils, IgM, ferritin and monocytes, and higher levels of CRP, IgA and insulin. Adiponectin levels were higher in the high-risk group, as well as IL-6 levels.

**Conclusion:** No significant difference was found between the high-risk group and pregnant women who developed gestational diabetes. However, further research on a larger sample would be beneficial, considering the observed decrease in adiponectin levels in the high-risk group and the increase in IL-6 levels.

**Keywords:** adiponectine; gestational diabetes; IL-6; IL-10; pregnancy; TNF-alpha.

**10. Literatura**

1. Cloete L. An overview of types, symptoms, complications and management. *Nurs Stand.* 2022;37(1):61-66.
2. Piche ME, Tchernof A, Despres JE. Obesity Phenotypes, Diabetes and Cardiovascular Diseases. *Circ Res.* 2020;126(11):1477-1500.
3. Lain KY, Catalano PM. Metabolic changes in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol.* 2007;50(4):938-48.
4. Parsons JA, Brelje TC, Sorenson RL. Adaptation of Islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology.* 1992;130(3):1459-1466.
5. Kopylov AT, Papyshva O, Gribova I, Kotaysch G, Kharitonova L, Mayatskaya T i sur. Molecular pathophysiology of diabetes mellitus during pregnancy with antenatal complications. *Sci Rep.* 2020;10:19641.
6. Rodrigo N, Glastras S. The Emerging Role of Biomarkers in the Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus. *J Clin Med.* 2018;7:120.
7. Baeyens L, Hindi S, Sorenson RL, German MS. Beta-cell adaptation in pregnancy. *Diabetes Obes Metab.* 2016;1:63-70.
8. Plows J, Stanley J, Baker P, Reynolds C, Vickers M. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3342.
9. Kampmann U, Knorr S, Fuglsang J, Ovesen P. Determinants of Maternal Insulin Resistance during Pregnancy: An Updated Overview. *J Diabetes Res.* 2019;5(3):36-41.
10. Zehravi M, Maqbool M, Ara I. Correlation between obesity, gestational diabetes mellitus and pregnancy outcomes: an overview. *Int J Adolesc Med Health.* 2021;33(6):339-345.
11. Chen P, Wang S, Ji J, Ge A, Chen C, Zhu Y, et al. Risk Factors and Management of Gestational Diabetes. *Cell Biochem Biophys.* 2014;71(2):689–94.
12. Jamilian M, Mirhosseini N, Eslahi M, Bahmani F, Shokrpour M, Chamani M i sur. The effects of magnesium-zinc-calcium-vitamin D co-supplementation on biomarkers of inflammation, oxidative stress and pregnancy outcomes in gestational diabetes. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2019;19(1):107.
13. Lekva T, Norwitz ER, Aukrust P, Ueland T. Impact of Systemic Inflammation on the Progression of Gestational Diabetes Mellitus. *Current Diabetes Reports.* 2016;16(4):26.
14. Dias S, Pheiffer C, Abrahams Y, Rheeder P, Adam S. Molecular Biomarkers for Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2018;19(10):2926.

## 10. Literatura

15. Nguyen-Ngo C, Jayabalan N, Salomon C, Lappas M. Molecular pathways disrupted by gestational diabetes mellitus. *J Mol Endocrinol*. 2019;63(3):51–72.
16. Zajdenverg L, Negrato CA. Gestational diabetes mellitus and type 2 diabetes: same disease in different moment of life? Maybe not. *Arch Endocrinol Metab*. 2017;61(3):208-210.
17. Fasshauer M, Blüher M, Stumvoll M. Adipokines in gestational diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014;2(6):488–499.
18. National Institute for Health and Care Excellence. Diabetes in pregnancy: management from preconception to the postnatal period. Dostupno na adresi: <https://www.nice.org.uk/guidance/ng3>. Datum pristupa: 10.06.2023.
19. World Health Organisation. Diagnostic Criteria and Classification of Hyperglycaemia First Detected in Pregnancy. Dostupno na adresi: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85975/WHO\\_NMH\\_MND\\_13.2\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85975/WHO_NMH_MND_13.2_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Datum pristupa: 05.06.2023.
20. Ehrlich SF, Ferrara A, Hedderson MM, Feng J, Neugebauer R. Exercise During the First Trimester of Pregnancy and the Risks of Abnormal Screening and Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2020;44(2):425-432.
21. American Diabetes Association: Standards of Medical Care in Diabetes: Summary of Revisions. *Diabetes Care*. 2014;38:S4–4.
22. Lende M, Rijhsinghani A. Gestational Diabetes: Overview with Emphasis on Medical Management. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(24):9573.
23. Sweeting A, Wong J, Murphy HR, Ross GP. A Clinical Update on Gestational Diabetes Mellitus. *Endocr rev*, 2022;43(5):763-793.
24. França DCH, França EL, Sobrevia L, Barbosa AMP, Honorio-França AC, Rudge MVC, i sur. Integration of nutrigenomics, melatonin, serotonin and inflammatory cytokines in the pathophysiology of pregnancy-specific urinary incontinence in women with gestational diabetes mellitus. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2023;1869(6):166-173.
25. Lorenzo-Almorós A, Hang T, Peiró C, Soriano-Guillén L, Egido J, Tuñón J, i sur. Predictive and diagnostic biomarkers for gestational diabetes and its associated metabolic and cardiovascular diseases. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18(1):140-152.
26. Metzger BE. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care*. 2010;33(3):676–682.

## 10. Literatura

27. He Y, Ching Wan Ma R, McIntyre HD, Sacks DA, Lowe J, Catalano PM, et al. Comparing IADPSG and NICE Diagnostic Criteria for GDM in Predicting Adverse Pregnancy Outcomes. *Diabetes Care*. 2022;45(9):2046-2054.
28. Rani PR. Screening and Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus, Where Do We Stand. *J Clin Diagn Res*. 2016;10(4):11-14.
29. HAPO Study Cooperative Research Group. The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *Int J Gynaecol Obstet*. 2002;78(1):69-77.
30. Zhang J, Chi H, Xiao H, Tian X, Wang Y, Yun X, et al. Interleukin 6 (IL-6) and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), Inflammation and Metabolism in Gestational Diabetes Mellitus in Inner Mongolia. *Med Sci Monit*. 2017;23:149–157.
31. Ni J, Wang Y, Zhu J, Zheng T, Yu J, Xiong Y. Interleukin-10 levels and risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2022;35(25):7609-7616.
32. Wei W, Zhang X. Expression of ADP and TNF-alpha in patients with gestational diabetes mellitus and its relationship with pregnancy outcomes. *Exp Ther Med*. 2020;20(3):2184-2190.
33. Wedekind L, Belkacemi L. Altered cytokine network in gestational diabetes mellitus affects maternal insulin and placental-fetal development. *J Diabetes Complications*. 2016;30(7):1393-1400.
34. Badon SE, Zhu Y, Sridhar SB, Xu F, Lee C, Ehrlich SF, i sur. A Pre-Pregnancy Biomarker Risk Score Improves Prediction of Future Gestational Diabetes. *J Endocr Soc*. 2018;2(10):1158–1169.
35. Pierce BT, Napolitano PG, Pierce LM, Apodarca CC, Hume Jr RF, Calhoun BC. The effects of hypoxia on fetal-placental vascular tone and inflammatory cytokine production. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;185(5):1068-1072.
36. Sifnaios E, Mastorakos G, Psarra K, Panagopoulos ND, Panoulis K, Vitoratos N, i sur. Gestational Diabetes and T-cell (Th1/Th2/Th17/Treg) Immune Profile. *In Vivo*. 2018;33(1):31-40.
37. Polese B, Gridelet V, Araklioti E, Martens H, Perrier TM, Hauterive S, i sur. The Endocrine Milieu and CD4 T-Lymphocyte Polarization during Pregnancy. *Frontiers in Endocrinology*. 2014;7:5-13.
38. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/ Th2/ Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):601–610.

## 10. Literatura

39. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;7(1):485–517.
40. Tabatabaei MS, Ahmed M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Methods Mol Biol.* 2022;2508:115-134.
41. Yang H, Zhu C, Ma Q, Long Y, Cheng Z. Variations of blood cells in prediction of gestational diabetes mellitus. *J Perinat Med.* 2015;43(1):89-93.
42. Sissala N, Mustaniemi S, Kajantie E, Vaarasmaki M, Koivunen P. Higher hemoglobin levels are an independent risk factor for gestational diabetes. *Sci Rep.* 2022;12(1):1686.
43. Colak E, Ozcimen EE, Ceran MU, Tohma YA, Kulaksizoglu S. Role of mean platelet volume in pregnancy to predict gestational diabetes mellitus in the first trimester. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2020;33(21):3689-3694.
44. Pantham P, Aye ILMH, Powell TL. Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus. *Placenta.* 2016;36(7):709–715.
45. Huang X, Zha B, Zhang M, Li Y, Wu Y, Zhang R i sur. Decreased Monocyte Count Is Associated With Gestational Diabetes Mellitus Development, Macrosomia, and Inflammation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022;107(1):192-204.
46. Abell S, De Courten B, Boyle J, Teede H. Inflammatory and Other Biomarkers: Role in Pathophysiology and Prediction of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2015;16(12):142–173.
47. Świrska J, Zwolak A, Dudzińska M, Matyjaszek-Matuszek B, Paszkowski T. Gestational diabetes mellitus - literature review on selected cytokines and hormones of confirmed or possible role in its pathogenesis. *Ginekol Pol.* 2018;89(9):522–527.
48. Bhandari S, Rankawat G, Mathur S, Kumar A, Sahlot R, Jain A. Circulatory Cytokine Levels as a Predictor of Disease Severity in COVID-19: A Study from Western India. *The Journal of the Association of Physicians of India.* 2022;70(5):11–22.
49. Liu H, Liu A, Kaminga AC, McDonald J, Wen SW, Pan X. Chemokines in Gestational Diabetes Mellitus. *Front Immunol.* 2022;13:52-58.
50. Immanuel J, Simmons D. Screening and Treatment for Early-Onset Gestational Diabetes Mellitus: a Systematic Review and Meta-analysis. *Curr Diab Rep.* 2017;17(11):115.
51. Corcoran MS, Achamallah N, O’Loughlin J, Stafford P, Dicker P, Malone DF, i sur. First trimester serum biomarkers to predict gestational diabetes in a high-risk cohort: Striving for clinically useful thresholds. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2018; 222:7-12.

## 10. Literatura

52. Kim SY, Sappenfield W, Sharma AJ, Wilson HG, Bish CL, Salihu HM, i sur. Racial/ethnic differences in the prevalence of gestational diabetes mellitus and maternal overweight and obesity, by Nativity, Florida, 2004-2007. *Obesity*. 2013;(1):33–40.
53. Benhalima K, Lens K, Bosteels J, Chantal M. The Risk for Glucose Intolerance after Gestational Diabetes Mellitus since the Introduction of the IADPSG Criteria: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med*. 2019;8(9):1431.
54. Kattini R, Hummelen R, Kelly L. Early Gestational Diabetes Mellitus Screening With Glycated Hemoglobin: A Systematic Review. *J Obstet Gynaecol Can*. 2020;42(11):1379-1384.
55. Alesi S, Ghelani D, Rassie K, Mousa A. Metabolomic Biomarkers in Gestational Diabetes Mellitus: A Review of the Evidence. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):5512.
56. Powe CE. Early Pregnancy Biochemical Predictors of Gestational Diabetes Mellitus. *Curr Diab Rep*. 2017;17(2):12.



## 11. Životopis

### 11. Životopis

Asja Čehović, studentica 6. godine Medicinskog fakulteta u Osijeku na Sveučilišnom integriranom prijediplomskom i diplomskom studiju Medicina

Adresa: Boška Paradžika 6, 31226, Dalj

Telefon: +38591 1654 141

E-mail: [asja.cehovic@gmail.com](mailto:asja.cehovic@gmail.com)

Obrazovanje: Ekonomski fakultet u Osijeku, Financijski menadžment

Stečeno zvanje: mag.oec.

Predsjednica Sekcije za psihijatriju Medicinskog fakulteta u Osijeku

Demonstratura na kolegiju Temelji neuroznanosti 2021/2022, 2022/2023

## 12. Prilozi

### 12. Prilozi

#### Upitnik za trudnice (popunjavaju trudnice u 1. trimestru)

Osobni podaci

Identifikacijska oznaka (ostaviti prazno, popunjava istraživač): \_\_\_\_\_

Datumi mjesto istraživanja: \_\_\_\_\_

Ime i prezime: \_\_\_\_\_

Datum rođenja : \_\_\_\_\_

Zanimanje : \_\_\_\_\_

Stručna sprema : \_\_\_\_\_

Kontakt broj i e-mail adresa: \_\_\_\_\_

U kojem ste tjednu trudnoće? \_\_\_\_\_

Stil života/ rizični faktori

Koristite li cigarete?

a) Ne, nikada

b) Ne, niti sam izložen pasivnompušenju

c) Da; ako da, kada ste počeli pušiti? \_\_\_\_\_

d) Prestala sam pušiti; ako da, kada? \_\_\_\_\_

Ako pušite, koliko cigareta dnevno?

a) Manje od 5 dnevno

b) 5-10 dnevno

c) 10-20 dnevno

d) Više od 20 dnevno

Konзумirate li alkohol? DA NE

Ako da, koliko često konzumirate i koliko? \_\_\_\_\_

Koristite li narkotike ? DA NE

## 12. Prilozi

Pijete li kavu? DA NE

Ako da, koliko šalice dnevno? \_\_\_\_\_

Prehrambene navike te aktivnost

Bavite li se fizičkom aktivnošću, i ako da, koliko često?

Redovito Povremeno Rijetko Nikada

Kako procjenjujete svoju tjelesnu aktivnost?

aktivnost 30-40min

Imate li problema sa prekomjernom tjelesnom težinom? DA NE

Koliko kilograma trenutno imate? \_\_\_\_\_

Koliko ste imali kilograma prije trudnoće? \_\_\_\_\_

Koliko ste visoki? \_\_\_\_\_

BMI \_\_\_\_\_ (izračunat će ispitivač)

Omjer struk/bokovi u prvom trimestru: \_\_\_\_\_ (izračunat će ispitivač)

Mislite li da jedete raznoliku hranu? DA NE

Opišite svoju prehranu. Vrste namirnica koje pretežno konzumirate (zaokružiti):

o voće

o povrće

o bijelo meso

o crveno meso

o juhe

o žitarice neprerađene

o kruh

o tjestenina

o slatkiši i keksi

## 12. Prilozi

o čips i ostale slane grickalice

o zašećerani sokovi

o prirodni nešećerani sokovi

o voda

o žestoka alkoholna pića

o pivo

o vino

Trenutno uzimanje lijekova/ vitamina/ dodataka

Uzimate li ikakve lijekove izvan trudnoće? DA NE

Ako da, koje i zašto? \_\_\_\_\_

Povijest bolesti

Imate li išta od slijedećih bolesti? (vrijeme izvan trudnoće )

o Anemija

o Artritis

o Astma

o Karcinom (ako da, koji) \_\_\_\_\_

o Defekt koagulacije (zgrušavanja krvi)

o Depresiju

o Dijabetes

o Cerebrovaskularne bolesti

o Endokrine probleme (štitna žlijezda, policistični jajnici, drugo)

o Gastrointestinalne probleme (GERB, drugo)

o Probleme s mokraćnim mjehurom

o Migrenozne glavobolje

## 12. Prilozi

- o Šumove na srcu
- o Povišene vrijednosti kolesterola
- o Povišene vrijednosti krvnog tlaka
- o Iritabilni kolon
- o Bubrežne probleme
- o Tromboembolijske poremećaje
- o Upale mokraćnih puteva

### Ginekološka anamneza

S koliko godina ste dobili prvu menstruaciju? \_\_\_\_\_

Kakvi su vam menstrualni ciklusi?

Uredni Obilni Oskudni Neredoviti

Koliko često dolaze menstruacije?

Koliko dana traju? \_\_\_\_\_

Imate li krvarenja (spottinge) između ciklusa?

Imate li cistično promijenjene jajnike? DA NE

### Obsterička anamneza

Jeste li do sada rađali? DA NE

Ako da, koliko puta? \_\_\_\_\_

Jeste li imali problema sa zanošenjem? DA NE

Jeste li imali spontane ili namjerne pobačaje? DA NE

Ako da, koliko? \_\_\_\_\_

U slučaju spontanog pobačaja, u kojem tjednu/tjednima su isti bili? \_\_\_\_\_

Jeste li imali neki od navedenih problema u prethodnoj trudnoći/trudnoćama?

- o Povišene vrijednosti krvnog tlaka

## 12. Prilozi

o Problemi sa štitnjačom

o Šećerna bolest u trudnoći

Jeste li u prethodnoj trudnoći/ trudnoćama rodili dijete teže od 4000 g? DA NE

Imate li u obiteljskoj anamnezi šećernu bolest? DA NE

Ako da, koji član obitelji? \_\_\_\_\_

Aktualna trudnoća

Navedite datum zadnje menstruacije? \_\_\_\_\_

Jeste li tijekom ove trudnoće imali ikakve komplikacije? DA NE

Ako da, koje: dijabetes, bolesti vezane za poremećaje krvnog tlaka, bolesti vezane za štitnjaču, upale mokraćnog sustava, upale rodnice, anemija

Druge, koje? \_\_\_\_\_

Jeste li uzimali ikakvu terapiju za gore navedene bolesti? DA NE

Ako da, koju i koliko dugo? \_\_\_\_\_

Jeste li imali pozitivan nalaz urinokulture ili cervikalnih briseva? DA NE

Ako da, koji je u pitanju bio uzročnik? \_\_\_\_\_

U slučaju upale rodnice ili mokraćnog mjehura, dali je ista bila izliječena? DA NE

Jeste li vaginalno krvarili tijekom trudnoće? DA NE

Ako da, da li ste uzimali neki oblik terapije tijekom trudnoće ? DA NE

Ako da, koju terapiju i kako ? \_\_\_\_\_

## 12. Prilozi

### 2. Upitnik za trudnice u 3. trimestru

Koliko kilograma trenutno imate? \_\_\_\_\_

Vrijednost glukoze u OGTT-u (24.-28. tjedan): \_\_\_\_\_

Jeste li tijekom ove trudnoće imali gestacijski dijabetes? DA NE

Jeste li uzimali terapiju za gestacijski dijabetes? DA NE

Ako da, koju terapiju ? \_\_\_\_\_

Jeste li tijekom ove trudnoće imali druge komplikacije? DA NE

Ako da, koje: vaginalno krvarenje, bolesti vezane za poremećaje krvnog tlaka, bolesti vezane za štitnjaču, upale mokraćnog sustava, upale rodnicice, anemija.

Druge, koje? \_\_\_\_\_

Jeste li uzimali ikakvu terapiju za gore navedene bolesti? DA NE

Ako da, koju terapiju i kako ? \_\_\_\_\_