



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта : АНАЛИЗА ПАРАМЕТАРА ГЛИКОРЕГУЛАЦИЈЕ, ЛИПОРЕГУЛАЦИЈЕ, ПАРАМЕТАРА ФУНКЦИЈЕ ШТИТАСТЕ ЖЛЕЗДЕ И ЦИТОКИНСКОГ ПРОФИЛА ТОКОМ ТРУДНОЋЕ

Кључне речи : трудноћа, гликорегулација, липорегулација, параметри функције штитасте жлезде, цитокини, оксидативни стрес

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

Основне карактеристике метаболизма у трудноћи су лака измена из анаболичког у катаболичко стање и инсулинска резистенција која може довести до поремећаја метаболизма угљених хидрата, промене хормонског миљеа и физиолошког пораста липида у серуму (1, 2).

У трудноћи, половина антигена фетуса потиче од оца и разликује се од мајчиних антигена, па ипак изостаје снажна имунска реакција „одбацивања“ фетуса. Иmunски одговор мајке, током трудноће, заснива на дискретној равнотежи између про-инфламаторног Th1 одговора и Th2 одговора, и директно је укључен у фетални раст и развој. Про-инфламаторни цитокини (Th1 имунског одговора) TNF- α , IL-1 β и IL-6 су значајни у раној трудноћи. Како трудноћа напредује, повећана концентрација ових цитокина је повезана са развојем прееклампсије и ГДМ, смањује се ниво антиинфламаторног IL-10 и јављају се превремени порођаји (3, 4). Нормалну трудноћу карактерише гравидна имуносупресија. Активност слободних радикала се повећава током трудноће, а значајно се повећава у патолошким стањима, као што је еклампсија (5, 6).

У овој клиничкој, опсервационој, аналитичкој, проспективној, кохортној студији код пацијенткиња ће се испитати квалитет гликорегулације (путем *OGTT*-а), липорегулације, параметри оксидативног стреса (*MDA*, липидни пероксиди, *TAS*), системске вредности про- и анти- инфламаторних цитокина (*TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-10*, *IL-17*, *IL-33*), и параметри функције штитасте жлезде у трудноћи у 4 термина: у 1. , 2. , 3. триместру, као и 4 недеље после порођаја. Анализом кретања параметара гликорегулације у *OGTT*-у све испитанице ћемо поделити на гестацијски дијабетес мелитус (*GDM*) и нормалну толеранцију гликозе. Према клиничком исходу направићемо поделу на патолошку и нормалну трудноћу. Анализом кретања параметара липорегулације утврдићемо квалитет липорегулације, као и корелацију ових параметара са параметрима функције штитасте жлезде и гликорегулацијом.



Циљ истраживања:

1. Одредити квалитет гликорегулације у трудноћи у 4 термина (у 1. , 2. , 3. триместру, као и 4 недеље после порођаја)
2. Одредити квалитет липорегулације у трудноћи у 4 термина
3. Одредити параметре функције штитасте жлезде у трудноћи у 4 термина
4. Одредити параметре оксидативног стреса у трудноћи у 4 термина
5. Одредити цитокински профил у трудноћи у 4 термина (одредити концентрације и повезаност између IL-1, IL-6, IL-10, IL-17, IL-33, TNF- α у 4 термина, описати промене у концентрацијама током трудноће и проценити повезаност нивоа цитокина са индексом телесне масе (БМИ), доби, паритетом и ранијим превременим порођајем испитаница.

Актуелност истраживања: Последице поремећаја метаболизма угљених хидрата у трудноћи се могу посматрати кроз последице по плод (функционални поремећаји и морфолошке абнормалности) и последице по мајку (спонтани побачаји, хипертензија у трудноћи, полихидрамнион, абнормалности плаценте, инфекције, метаболичке компликације и повећан ризик од тромбоемболизма, повреда меких и чврстих порођајних ткива (1, 2). Гестацијски дијабетес мелитус (ГДМ) представља хетерогени синдром смањене толеранције глукозе различитог степена, који се развија или се први пут дијагностикује током трудноће, и обично престаје по порођају. Обично је благ и не угрожава живот труднице, али хипергликемија повећава фетални морбидитет, тако да у случајевима недијагностикованог и нелеченог ГДМ-а су могуће последице: макрозимија фетуса, антенатална и интрапартална асфиксија, оперативни начин завршетка порођаја и порођајне трауме, настанак неуролошких, интелектуалних или психомоторних поремећаја плода и касније одрасле јединке Жене са претходним ГДМ се одликују хроничном субклиничком инфламацијом која је удружена са ИР и абнормалним глукозним метаболизмом (1, 2). Познато је да 5 - 20 % жена у репродуктивном периоду болује од аутоимунске тироидне болести (АИТБ). Постоје различити аспекти њихове клиничке манифестације, и њихове реперкусије на матернално, фетално и неонатално благостање, као и потенцијално дугорочни ефекти на потомство (7, 8).

У трудноћи, половина антигена фетуса потиче од оца и разликује се од мајчаних антигена. Мајка носи фетус чији се МНС молекули разликују од сопствених, а обично не “одбацује” фетус. Данас се зна да су фетални антигени изложени имунском систему мајке јер су антитела против фетусних МНС молекула (пореклом од оца) лако детектабилна. Цитокини су интрацелуларни месенџери имунског система и значајно учествују у многим аспектима трудноће (9).

Некада се сматрало да је имунски систем мајке, током трудноће, усмерен од про-инфламаторног Th1 одговора (потенцијално штетног по фетус) који карактеришу про-инфламаторни цитокини, као што су TNF- α и IL-1 β ка анти-инфламаторном и Th2 одговору, ослобађањем цитокина из плаценте (као што су IL-6, IL-4 и IL-10) (3, 10). Данас знамо да утерусне NK ћелије и моноцити продукују Th1 цитокине, током нормалне трудноће. Ипак, код животиња са генетском склоношћу ка абортусу, Th1 цитокини у плаценти су појачано експримирани.

Од зачећа до термина порођаја, постоји интеракција између про- и анти-инфламаторних цитокина. Модулација имунског одговора кроз снижене вредности про-инфламаторних



citoкина, тј. смањену активност и урођене и стечене имуности и повећане вредности регулаторних citoкина, током трудноће, омогућава толеранцију фетусних антигена и одржавање трудноће.

Про-инфламаторни citoкини IL-1 и TNF- α могу егзацербирати инсулинску резистенцију, која је нормална појава у трудноћи, и тако фаворизују настанак ГДМ. Значајно повишена продукција TNF- α је нађена у плаценти жена са лоше контролисаним ГДМ у поређењу са добро контролисаним ГДМ. TNF- α је повишен и код мајки са прееклампсијом, тако да се може сматрати маркером степена тежине хипертензивног синдрома у трудноћи. TNF- α је повезан са гојазношћу, интолеранцијом гликозе, ДМ2, ГДМ и позитивно корелише са БМИ, и значајан је фактор у патогенези ИР и ГДМ. Изгледа да је TNF- α маркер „деметаболизма“ и мајчине контроле гликемије у трудноћама компликованим са ДМ2 и ГДМ (10,11, 14). Показано је да је продукција анти-инфламаторног IL-10 повећана у нормалној трудноћи у односу на ону високог ризика (11, 12). Cитокин IL-17 има проинфламаторну активност, и показано је да индукује инфламацију у аутоимунским болестима (13), док улога овог про-инфламаторног citoкина у трудноћи није испитана. IL-33 је скорије откривен citoкин. Ослобађа се после ћелијске некрозе, и припада групи молекула који се називају „алармини“. До данас је описана улога овог citoкина у многим инфективних, туморским и аутоимунским болестима. Постоје истраживања која повезују IL-33 и трудноћу. Десоу рецептор за IL-33 је повишен у трећем триместру нормалне трудноће и значајно повишен у прееклампсији (16, 17). Ипак, није пронађена директна веза овог citoкина са имунопатологијом трудноће.

Због повезаности квалитета и квантитета имунског одговора и исхода трудноће, рана идентификација типа имунског одговора, кроз дефинисање citoкиноског профила, током трудноће може бити бити важан податак у процени ризика трудноће.

Предмет и опис истраживања: задаци, методологија, очекивани резултати: На основу структурисаног упитника који садржи све релевантне параметре биће узети анамнестички подаци, урађена антропометријска мерења, одредиће се биохемијски параметри, хормонске анализе (РИА) и параметри оксидативног стреса ЕЛИСА (*MDA*, липидни пероксиди, *TAS*), citoкински профил и извршити анализа по триместрима. Анализом кретања параметара гликорегулације (гликемије и инсулинемије) у *OGTT*-у на основу поделе према критеријумима Светске здравствене организације (СЗО), Америчке дијабетеске асоцијације (АДА) све испитанице ћемо поделити на гестацијски дијабетес мелитус (ГДМ) и нормалну толеранцију гликозе. Према клиничком исходу направићемо подела на патолошку трудноћу и нормалну трудноћу уз анализу свих параметара. Дефинисаћемо граничну вредност (*cut off*) за сваки параметар у односу на исход трудноће. Дефинисаћемо клинички циљну вредност (*end point*) за гестацијски дијабетес мелитус и на основу: телесне масе за гестацијску доб, термина порођаја, зрелости органа, калцијума, гликозе и билирубина детета, Апгар скорa, употреба антибиотика.

Мерење серумске концентрације IL-1, IL-6, IL-10, IL-17, IL-33, TNF- α :

Током трудноће у 4 термина (у 1. , 2. , 3. триместру, као и 4 недеље после порођаја) узима се крв из кубиталне вене, и центрифугира 10 минута на 300G. Затим се серум за сваку поједину испитаницу издваја аутоматском пипетом и оставља на -20°C до извођења анализе.



Концентрације цитокина (IL-1, IL-6, IL-10, IL-17, IL-33, TNF- α) у серуму одређиваће се комерцијалним ELISA китовима специфичним за мишје цитокине.

Стандарди ће се пре употребе растворити у PBS-у (pH 7.2), тако да почетне концентрације буду 2000pg/ml, односно 1000pg/ml, зависно од цитокина који се мери. Од оваквих штокова направиће се серијска растућа разблажења у 7 тачака у комерцијалном растварачу, према упутству произвођача.

100 μ l радне концентрације везујућег антитела (енгл. *Capture Antibody*) сипаће се у бунарчиће полистиренских микротитар плоча (енгл. *microtiter plate- MTP*) са 96 бунарчића са равним дном (*SARSTED*). Плоче ће се прелепити адхезивном фолијом (енгл. *ELISA Plate Sealers*) и оставити преко ноћи на собној температури, након чега се бунарчићи испирају пуфером за испирање (енгл. *Wash Buffer*) у аутоматској машини за испирање МТП-а. Затим се у све бунарчиће додаје блокирајући пуфер (*Block Buffer*, 1% BSA у PBS-у) финалног волумена 300 μ l и МТП се остављају минимум један сат на собној температури, а потом испирају пуфером за испирање. Сви узорци се претходно разблажују 4 пута у дејонизованој води. Разблажени узорци и припремљени стандарди насуће се у МТП, прекрити адхезивном фолијом и оставити два сата на собној температури. Након инкубације и испирања МТП, у све бунарчиће ће се додати 100 μ l радне концентрације детекционог антитела (енгл. *Detection Antibody*), плоче се обложу адхезивном фолијом и поново остављају два сата на собној температури. Плоче се потом испирају, а у бунарчиће сипа 100 μ l радне концентрације Streptavidin-HRP (енгл. *Streptavidin horseradish peroxidase*). Инкубација на собној температури и без директног излагања светлости прекинуће се након 20 минута, испирањем МТП-а. У бунарчиће ће се сипати 100 μ l раствора субстрата (енгл. *Substrate Solution: Color reagent A + Color reagent B, 1:1*). Двадесет минута касније, додаће се 50 μ l стоп раствора (енгл. *Stop Solution: 2N H₂SO₄*) и абсорбанца мерити одмах у сваком бунарчету, помоћу *Microplate reader-a (Zenyth, Anthos, UK)* подешеног на 450nm.

Све измерене вредности ће се умањити за вредности апсорбанце слепе пробе (дејонизована вода). На основу измерених вредности стандарда направиће се стандардна крива, а помоћу ње израчунати вредности за сваки појединачан узорак. Сви узорци ће се мерити у трипликату.

Значај истраживања: Укупни резултати овог истраживања дали би реалну слику квалитета гликорегулације, липорегулације, параметара функције штитасте жлезде и оксидативног стреса током трудноће. На основу повезаности имуних параметара и исхода трудноћа, рана идентификација алтерација имунског одговора може помоћи у предикцији и/или утицају на исход трудноћа.

Временски оквир: Клиничка, опсервациона, аналитичка, проспективна, кохортна студија, са могућношћу „усађене студије случај - контрола у кохортну студију“, што зависи од добијених резултата истраживања планира се у оквиру две године.

Литература

1. Metzger BE, GabbeSG, PerssonB et al. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care* 2010;33:676–682.
2. Briyyi P, Tonolo G, Esposito F, Puddu L, Dessole S, Maioli M et al. Lipoprotein metabolism during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:430-4.
3. Denney JM, Nelson EL, Wadhwa PD, Waters TP, Mathew L, Chung EK et al. Longitudinal modulation of immune system cytokine profile during pregnancy. *Cytokine* 53 (2011) 170–177.



4. Curry AE, Vogel I, Skogstrand K, Drews C, Schendel DE, Flanders WD et al. Maternal plasma cytokines in early- and mid-gestation of normal human pregnancy and their association with maternal factors. *Journal of Reproductive Immunology* 77 (2008) 152–160.
5. Ilhan H, Ilhan H, Simsek M. The changes of trace elements, malondialdehyde levels and superoxide dismutase activities in pregnancy with or without preeclampsia. *Clinical Biochemistry* 35 (2002) 393–397.
6. Grissa O, Ategbo JM, Yessoufou A, Tabka Z, Miled A, Jerbi M et al. Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and macrosomia. *Translational Research* 2007;150:164–171.
7. Vaidya B, Anthony S, Bilous M, et al. Detection of thyroid dysfunction in early pregnancy: universal screening or targeted high-risk case finding? *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 203–7.
8. Negro R, Mestman JH. Thyroid disease in pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2011;25: 927–943.
9. Prins J, Gomez-Lopez N., Robertson S. Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. *Journal of Reproductive Immunology* 95 (2012) 1– 14.
10. Atčgbo JM, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, et al. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4137–43.
11. Moreli JB, Cirino Ruocco A, Vernini JM, Cunha Rudge MV, Paranhos Calderon IM. Interleukin 10 and Tumor Necrosis Factor-Alpha in Pregnancy: Aspects of Interest in Clinical Obstetrics. *ISRN Obstetrics and Gynecology Volume 2012, Article ID 230742, 5 pages doi:10.5402/2012/230742*
12. Thaxton J, Sharma C. Interleukin-10: A Multi-Faceted Agent of Pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 482–49.
13. Darmochwal-Kolarz D, Kludka-Sternik M, Tabarkiewicz J, Kolarz B, Rolinski J, Leszczynska-Gorzela B et al. The predominance of Th17 lymphocytes and decreased number and function of Treg cells in preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology* 93 (2012) 75– 81
14. Vrachnis N, Belitsos P, Sifakis s, Dafopoulos K, Siristatidis C, Pappa K, Iliodromiti Z. Role of Adipokines and Other Inflammatory Mediators in Gestational Diabetes Mellitus and Previous Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Endocrinology Volume 2012, Article ID 549748, 12 pages doi:10.1155/2012/549748*
15. López-Tinoco C, Roca M, Fernández-Deudero A, García-Valero A, Bugatto F, Aguilar-Diosdado M, Bartha J.L. Cytokine profile, metabolic syndrome and cardiovascular disease risk in women with late-onset gestational diabetes mellitus. *Cytokine* 58 (2012) 14–19.
16. Granne I, Southcombe JH, Snider JV, Tannetta DS, Child T, et al. (2011) ST2 and IL-33 in Pregnancy and Pre-Eclampsia. *PLoS ONE* 6(9): e24463. doi:10.1371/journal.pone.0024463
17. Kaitu'u-Lino TJ, Tuohey L, Tong S. Maternal serum interleukin-33 and soluble ST2 across early pregnancy, and their association with miscarriage. *Journal of Reproductive Immunology* 95 (2012) 46– 49