

Univerzitet u Beogradu

Farmaceutski fakultet

Marina Z. Pijanović

Longitudinalne promene parametara za
procenu insulinske rezistencije,
adipocitokina i markera formiranja kostiju
kod zdravih negojaznih trudnica

Doktorska disertacija

Beograd, 2017.

University of Belgrade

Faculty of Pharmacy

Marina Z. Pijanović

Longitudinal changes of insulin resistance
parameters, adipocytokines, and bone
formation markers in healthy non-obese
pregnant women

Doctoral dissertation

Belgrade, 2017.

Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:

1. Dr Slavica Spasić, profesor emeritus , mentor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet
-

2. Dr Aleksandra Stefanović, docent, mentor
Univerzitet u Beogradu , Farmaceutski fakultet
-

3. Dr Dušica Pavlović , redovni profesor
Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet
-

Datum odbrane _____

Izrazi zahvalnosti

Zahvaljujem se mentorima, prof. dr Slavici Spasić i doc. dr Aleksandri Stefanović na uspešnoj saradnji i pomoći oko izrade disertacije. Veliko hvala i prof. dr Dušici Pavlović na korisnim sugestijama.

Hvala kolegici Milici Miljković na nesebičnoj pomoći prilikom eksperimentane faze rada u laboratoriji Instituta za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu. Veliko hvala i osoblju Poliklinike Medilab i Instituta za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta, kao i dr sc. Snežani Marić-Krejović i kolegici Tanji Stefanović na pomoći prilikom sakupljanja i pripreme uzoraka.

Zahvaljujem se tati Zoranu, suprugu Nemanji i ćerki Sonji na podršci i razumevanju. Veliko hvala i sestri Jovani i zetu Andreasu na praktičnim savetima i pomoći.

Najveću zahvalnost dugujem majci, dr Biljani Mićović. Bez njene stalne pomoći i stručne, moralne, fizičke i svake druge podrške izrada ove doktorske disertacije ne bi bila moguća.

Longitudinalne promene parametara za procenu insulinske rezistencije, adipocitokina i markera formiranja kostiju kod zdravih negojaznih trudnica

Rezime

Tokom normalne, nekomplikovane trudnoće dolazi do prolaznog razvoja fiziološke insulinske rezistencije, intenziviranja oksidativnog stresa, kao i do promena u parametrima lipidnog statusa majke, ali još uvek nisu poznati svi mehanizmi koji utiču na ove promene. Poslednjih godina se sve veći značaj u ovom kontekstu pridaje i tkivima koja su se tradicionalno posmatrala kao depo energije (masno tkivo), ili kao deo potpornog i lokomotornog sistema (kost), a za koje je dokazano da produkuju niz metabolički aktivnih medijatora. U prva dva trimestra trudnoće majka skladišti najveći deo nutrijenata koje unosi. Poslednji trimestar trudnoće karakteriše ubrzan rast fetusa i pojačan transfer nutrijenata kroz placentu i zbog toga kod majke dolazi do intenziviranja kataboličkih procesa, kao i do razvoja fiziološke rezistencije tkiva na insulin. Tokom trudnoće razvija se lipidni profil koji se kod negravidnih žena smatra proaterogenim. Takođe dolazi i do porasta koncentracije HDL-holesterola, koji ima ateroprotektivna, antiinflamatorna i antioksidativna svojstva. Slobodni kiseonikovi radikali nastaju u aerobnom metabolizmu i igraju značajnu ulogu kao sekundarni glasnici. S druge strane, to su visoko reaktivna jedinjenja koja reaguju sa biološkim molekulima i dovode do njihovog oštećenja. Zato postoji niz mehanizama antioksidativne zaštite u organizmu. Poremećaj njihove ravnoteže, u kome dolazi do stvaranja viška reaktivnih radikala, dovodi do oksidativnog stresa. Trudnoća je stanje koje karakteriše povećana podložnost oksidativnom stresu, a praćena je i kompenzatornim povećanjem koncentracije parametara koji spadaju u sistem antioksidativne zaštite. U trudnoći dolazi do fiziološke regulacije urođenog imunskog odgovora radi prevencije odbacivanja fetusa. Masno tkivo produkuje biološki aktivne medijatore koji se nazivaju adipocitokini od kojih su najznačajniji leptin i adiponektin. Trudnoća se smatra stanjem centralne rezistencije na leptin, koja bi mogla imati uticaj na akumulaciju energetskih zaliha i biti povezana sa rastućom insulinskom rezistencijom. Moguće je i da je adiponektin jedan od medijatora koji utiče na regulaciju metabolizma glukoze u trudnoći. Trudnoća i laktacija su stanja u

kojima dolazi i do izraženih promena u apsorpciji i prometu kalcijuma, što se odražava u promenama u koncentraciji parametara koštanog prometa. Osteokalcin je proizvod osteoblasta koji nastaje u procesu formiranja kostiju, ali se smatra i da je uključen u metabolizam glukoze. Malobrojne studije su ispitivale povezanost osteokalcina sa metabolizmom glukoze u trudnoći, i one su se uglavnom bile fokusirane na trudnoće praćene gestacionim dijabetesom. N-terminalni propeptid prokolagena tipa 1 (PINP) nastaje iz novosintetisanog kolagena. To je specifičan marker formiranja kostiju i smatra se da je metabolički neaktivan. Glavna dejstva vitamina D podrazumevaju regulaciju koncentracije i prometa kalcijuma. Osim ovih dejstava, smatra se da ima ulogu i u karcinogenezi, prevenciji kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa, kao i u imunskom odgovoru. Veliki broj studija je ustanovio široku rasprostranjenost insuficijencije vitamina D kod trudnica u različitim populacijama, uključujući i našu. I pored rastućeg broja ispitivanja koja se bave povezanošću vitamina D i ishoda trudnoće, njegova dejstva u trudnoći još uvek nisu u potpunosti rasvetljena.

Ovo istraživanje je imalo za cilj ispitivanje longitudinalnih promena navedenih parametara tokom nekomplicovane trudnoće i posle porođaja, i njihovih korelacija, radi rasvetljavanja mehanizama razvoja i regulacije insulinske rezistencije u trudnoći. Takođe, cilj je bio i ispitivanje uticaja masnog tkiva i kosti, odnosno njihovih proizvoda- leptina, adiponektina i osteokalcina, na metabolizam glukoze, lipidni i redoks status kod zdravih, negojaznih trudnica.

U ovom longitudinalnom istraživanju je učestvovalo 38 zdravih negojaznih trudnica koje su izvele trudnoću do kraja i porodile se bez komplikacija, a sva novorođenčad su bila zdrava i dobila dobru ocenu na rođenju. Trudnice su tokom trudnoće bile na preporučenom adekvatnom režimu ishrane, sve su uzimale vitaminsku suplementaciju po savetu lekara i bile nepušači. Uzorkovanje je vršeno u pet poseta: u prvom trimestru, drugom trimestru, početkom trećeg trimestra, u kasnom trećem trimestru i najmanje četiri nedelje posle porođaja. Ispitanicama je zabeležena starost, gestaciona starost, izmerena visina, težina i krvni pritisak. Određivani su sledeći parametri: glukoza, ukupni proteini, mokraćna kiselina, aspartat aminotransferaza, alanin aminotransferaza, ukupni holesterol, trigliceridi, HDL-holesterol, LDL-holesterol, C-reaktivni protein, kompletna krvna slika; parametri insulinske rezistencije

– insulin, HOMA indeksi (HOMA-IR i HOMA-%B); adipocitokini - leptin i adiponektin; parametri koštanog prometa - osteokalcin i P1NP, 25-hidroksi-vitamin D i parametri redoks statusa - totalni oksidativni status (TOS), totalni antioksidativni status (TAS), prooksidativno-antioksidativni balans (PAB), tiobarbiturna kiselina reagujuće supstance (TBARS) i ukupni sadržaj sulfhidrilnih (SH) grupa.

Pokazano je da se u trudnoći razvija insulinska rezistencija tkiva majke, koja dovodi do kompenzatornog povećanja produkcije insulina, pa su najviše vrednosti insulina i HOMA-%B indeksa zabeležene u kasnom trećem trimestru. Posle porođaja je došlo do izraženog pada vrednosti svih parametra insulinske rezistencije, što znači da je ovaj proces u trudnoći reverzibilan. Sve vreme trajanja trudnoće i posle porođaja trudnice su bile normoglikemične, što znači da je insulinska rezistencija bila adekvatno kompenzovana dobro očuvanom funkcijom pankreasa. Koncentracija triglicerida je rasla tokom trudnoće, da bi posle porođaja došlo do izraženog pada u njihovoj koncentraciji. Najveće koncentracije ukupnog i LDL-holesterola su uočene u trećem trimestru. Specifičnost promene lipidnog statusa u trudnoći se ogleda u porastu koncentracije HDL-holesterola koji ima ateroprotektivna dejstva. Trudnoća, a posebno kasni treći trimestar, period je koji karakteriše pomeranje redoks balansa ka oksidativnom stresu, pa dolazi do povećanja koncentracije TOS-a, TBARS-a i PAB-a, da bi posle porođaja došlo do pada koncentracije navedenih parametara, kada su vrednosti parametara antioksidativne zaštite, TAS i ukupnih SH grupa, bile najveće. Trudnoća ima blagi proinflamatorni potencijal, koji se odražava na koncentraciju C-reaktivnog proteina, čija je koncentracija najviša u drugom trimestru. Zabeležen je postepeni porast koncentracije leptina do maksimalnih vrednosti početkom trećeg trimestra. Trudnoća se smatra stanjem centralne rezistencije na leptin, koja kao i insulinska rezistencija, verovatno ima za cilj neometano snabdevanje fetusa nutrijentima. U trećem trimestru, leptin je nezavisno povezan sa indeksom telesne mase, jer su izvori leptina u trudnoći masno tkivo majke i placenta čiji porast tokom trudnoće doprinosi porastu telesne težine majke. Pozitivna korelacija leptina i insulina može se, bar delom, objasniti stimulatornim dejstvom insulina na produkciju leptina, ali moguće je da leptin doprinosi razvoju rezistencije tkiva na insulin. Povezanost leptina i oksidativnog stresa ogleda se u činjenici da je koncentracija leptina bila u pozitivnoj korelaciji sa TOS-om u trećem trimestru. Leptin se smatra proinflamatornim

adipocitokinom, što potvrđuje njegova pozitivna korelacija sa koncentracijom CRP-a u trećem trimestru. U trudnoći su dominantna periferna, direktna dejstva leptina na kost. Na ovaj način on deluje stimulatorno na proces formiranja kostiju, što se ogleda u pozitivnoj korelaciji leptina sa osteokalcinom i P1NP-om. Primećena je tendencija smanjenja koncentracije adiponektina tokom trudnoće, mada ovo smanjenje nije bilo statistički značajno. Adiponektin verovatno povećava osetljivost tkiva na insulin, a u prilog tome ide činjenica da je njegova koncentracija u trećem trimestru bila u negativnoj korelaciji sa koncentracijom leptina i insulina, i vrednostima HOMA-IR i ITM, kao i sa koncentracijom glukoze. HDL-holesterol je bio nezavisno povezan sa adiponektinom u trećem trimestru, što ide u prilog tezi da su antiaterogena dejstva adiponektina povezana sa HDL-lipoproteinskim česticama. Koncentracija adiponektina je bila u negativnoj korelaciji sa TOS-om, što ukazuje na inverzan odnos adiponektina i oksidativnog stresa. Najveće koncentracije osteokalcina i P1NP su zabeležene u kasnom trećem trimestru i posle porođaja, što ukazuje na intenziviranje procesa formiranja kostiju u ovom periodu. Na ovaj proces verovatno utiču i insulin i leptin. Pozitivna korelacija osteokalcina i parametara za procenu insulinske rezistencije može biti i posledica endokrinog dejstva osteokalcina na metabolizam glukoze, tako da je porast koncentracije osteokalcina kompenzatorni mehanizam u stanju povećane insulinske rezistencije. Koncentracija osteokalcina je bila u pozitivnoj korelaciji i sa koncentracijom triglicerida u trećem trimestru. Ovi rezultati idu u prilog hipotezi da osteokalcin nije samo proizvod koji se oslobađa u cirkulaciju prilikom formiranja kostiju, već da svojim endokrinim dejstvom povezuje energetske metabolizam sa metabolizmom kosti, a preko adiponektina i sa masnim tkivom. Osteokalcin je bio nezavisno povezan samo sa koncentracijom TAS-a u trećem trimestru, što se može objasniti pozitivnim uticajem antioksidanasa na proces formiranja kostiju. Promene u koncentraciji 25(OH)D kao glavnog cirkulišućeg markera statusa vitamina D u organizmu su odražavale sezonske promene. Deficijencija vitamina D je uočena kod približno 76% ispitivanih trudnica. 25(OH)D nije bio u značajnoj korelaciji sa drugim parametrima, što je verovatno posledica njegovih kompleksnih dejstava prvenstveno na nivou genoma.

Ključne reči: trudnoća, insulinska rezistencija, leptin, adiponektin, osteokalcin, N-terminalni propeptid prokolagena tip 1, vitamin D, HDL-holesterol, oksidativni stres

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

UDK broj: 577.17:[618.2:616.379-008.04(043.3)]

Longitudinal changes of insulin resistance parameters, adipocytokines, and bone formation markers in healthy non-obese pregnant women

Abstract

Normal uncomplicated pregnancy is characterized by a transient development of physiological insulin resistance, intensifying of oxidative stress, as well as by changes in maternal lipid status, but the mechanisms of these changes are still incompletely understood. Tissues that are traditionally seen as energy storage (adipose tissue), or as a part of the locomotor system (bones), produce a number of metabolically active mediators. They are increasingly being recognized as a part of mechanisms of aforementioned changes. During the first and second trimester, a major part of nutrients is being stored. The third trimester is characterized by an accelerated fetal growth, so the maternal catabolic processes intensify and the physiological insulin resistance develops. The changes of maternal lipid status lead towards a more atherogenic state. The HDL-cholesterol also increases, and it has atheroprotective, anti-inflammatory, and antioxidative properties. Reactive oxidative species are products of oxidative metabolism and they have an important role as second messengers. On the other hand, they are highly reactive and can lead to a damage of biomolecules. They are normally counterbalanced by different anti-oxidative mechanisms. The oxidative stress occurs when the reactive species are produced in excess. Pregnancy is a state of increased susceptibility to oxidative stress, due to an increased basal oxygen consumption. At the same time, antioxidative mechanisms increase. The innate immune response is also regulated during pregnancy, so that fetus doesn't get rejected. Adipose tissue produces biologically active mediators- adipocytokines, among which the most important are leptin and adiponectin. Pregnancy is considered to be a state of central leptin resistance, that might influence the accumulation of energy storage and could be connected to the insulin resistance. Adiponectin is a possible mediator implicated in the regulation of the glucose metabolism in pregnancy. Pregnancy and lactation are also associated with the changes in calcium absorption and turnover. This is reflected in the changes of bone turnover parameters in blood. Osteocalcin is an osteoblast product which is released

during bone formation, but it is also implicated in the glucose metabolism. Only a few studies examined the interrelationships of osteocalcin and glucose metabolism in pregnancy, and they were mainly focused on gestational diabetes. Procollagen type 1 aminoterminal propeptide (P1NP) is released as the type 1 collagen is synthesized. It is a specific bone formation marker and is considered to be metabolically inactive. Vitamin D is mainly implicated in the regulation of calcium concentration and turnover. Apart from that, vitamin D is thought to have a role in carcinogenesis, cardiovascular disease, and diabetes prevention, as well as in the immune response. Vitamin D insufficiency in pregnant women is widely spread in different populations, including ours. Even though there is a growing number of studies on associations between vitamin D and pregnancy outcomes, its actions in pregnancy remain largely unknown.

The aim of this study was to explore the longitudinal changes of aforementioned parameters during uncomplicated pregnancy and after delivery, as well as their correlations, in order to elucidate mechanisms of insulin resistance development and regulation in pregnancy. The aim was also to explore the influence of adipose tissue and bone, i.e. their products – leptin, adiponectin, and osteocalcin, on glucose metabolism, lipid and oxidative state in healthy, non-obese pregnant women.

38 healthy non-obese pregnant women participated in this longitudinal study, and they all had a full-term pregnancy and delivery with no complications. All of the newborns were healthy and with a good score. The participants were on an adequate diet, they were non-smokers and took vitamin supplementation according to their doctors' advice. The sampling was performed on five occasions: in the first trimester, in the second trimester, at the beginning of the third trimester, at the end of the third trimester, and at least four weeks after delivery. Their age, gestational age, and height were recorded, and their blood pressure and weight were measured at each visit. The following blood parameters were measured: glucose, total proteins, uric acid, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, total cholesterol, triglycerides, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, C-reactive protein, complete blood count; insulin resistance parameters – fasting insulin, and HOMA indices (HOMA-IR i HOMA-%B); adipocytokines – leptin and adiponectin; bone turnover parameters – osteocalcin and P1NP, 25-hydroxi vitamin D and parameters of oxidative status – total oxidative status

(TOS), total antioxidative status (TAS), prooxidative-antioxidative balance (PAB), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and total sulfhydryl groups (SH).

It was shown that maternal insulin resistance develops during pregnancy and that it leads to a compensatory increase in insulin production so that the highest values of insulin and HOMA-%B were found in the late third trimester. There was a pronounced decrease in all insulin resistance parameters after delivery, which proved that this process is reversible under normal conditions. The participants remained normoglycemic, which was a proof that the insulin resistance was adequately compensated by a well preserved pancreatic function. Triglyceride concentrations increased during pregnancy. After delivery, there was a pronounced decrease in their concentration. The highest concentrations of total and LDL- cholesterol were noted in the third trimester. The specificity of lipid status of pregnancy was that it showed an increase in HDL-cholesterol concentrations, which has atheroprotective properties. Pregnancy, especially its third trimester, is a period characterized by a shift in oxidative balance towards oxidative stress, so an increase in TOS, TBARS, and PAB levels was noted. After delivery, the aforementioned parameters decreased, and at that time, the antioxidative parameters, TAS and SH groups, had their highest levels. Pregnancy has a mild proinflammatory potential, which was reflected on the concentrations of C-reactive protein, that were highest in the second trimester. Pregnancy is a state accompanied by a gradual increase in leptin concentrations, which had the peak at the beginning of the third trimester. It is considered to be a state of central leptin resistance, which probably aims to enable undisturbed fetal nutrient acquisition. In the third trimester, leptin is independently correlated to body mass index, because the adipose tissue and placenta are its main sources, and they contribute substantially to the weight increase. The positive correlation of leptin with insulin can be, at least partly, explained by a stimulatory effect of leptin on insulin production, but it is also possible that leptin contributes to the development of insulin resistance. The interrelationship between leptin and oxidative stress is reflected in the fact that leptin showed a significant positive correlation with TOS in the third trimester. Leptin is considered to be a proinflammatory adipocytokine, which is in line with its positive correlation with C-reactive protein levels in the third trimester. Direct peripheral actions of leptin on the bone metabolism predominate during pregnancy. This way leptin stimulates the bone

formation process, hence its positive correlations with both osteocalcin and P1NP levels. Adiponectin levels had a tendency to decrease during pregnancy, but this decrease was not statistically significant. Adiponectin probably increases tissue insulin sensitivity. This is supported by the fact that it was inversely correlated with leptin, insulin, and glucose levels, as well as HOMA indices, in the third trimester. HDL-cholesterol was independently correlated with adiponectin in the third trimester, which supports the notion that antiatherogenic properties of adiponectin are attributable to its effects on HDL-cholesterol. Adiponectin levels were inversely correlated with TOS levels, which corroborates the inverse relationship between adiponectin levels and oxidative stress. The highest concentrations of osteocalcin and P1NP were observed in the late third trimester and after delivery, which indicates that the bone formation process intensifies in this period. Both insulin and leptin probably influence this process. The observed positive correlation between osteocalcin levels and insulin resistance parameters can also be a consequence of endocrine actions of osteocalcin on glucose metabolism so that the increase in the osteocalcin concentrations can be viewed as a compensatory mechanism in the state of insulin resistance. Additionally, osteocalcin concentrations were positively correlated with triglycerides concentrations in the third trimester. These results are in line with the hypothesis that osteocalcin is not only a product released in the circulation during bone formation, but that it connects, through its endocrine actions, energy metabolism with bone, and also with adipose tissue, through adiponectin. Osteocalcin was independently associated with TAS levels in the third trimester, which can be due to the positive influence of antioxidants on the bone formation process. The changes in the 25-hydroxy vitamin D levels reflect its seasonal variation. Around 76% of the participants had the vitamin D levels in the deficiency range. Vitamin D was not significantly correlated to any other parameter, which is probably a consequence of its complex actions, mainly at the genome level.

Keywords: pregnancy, insulin resistance, leptin, adiponectin, osteocalcin, aminoterminal propeptide type 1 procollagen, vitamin D, HDL-cholesterol, oxidative stress

Scientific field: Pharmacy

Special topic: Medical biochemistry

UDC number: 577.17:[618.2:616.379-008.04(043.3)]

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Biohemijske i metaboličke promene u trudnoći.....	2
1.2. Oksidativni stres i inflamacija u trudnoći.....	8
1.3. Adipocitokini u trudnoći.....	12
1.3.1. Leptin.....	12
1.3.2. Adiponektin.....	15
1.4. Parametri koštanog prometa u trudnoći.....	18
1.4.1. Osteokalcin.....	19
1.4.2. Propeptidi prokolagena tipa I (P1NP).....	22
1.4.3. Vitamin D.....	24
2. Ciljevi.....	27
3. Materijal i metode.....	28
3.1. Ispitanice.....	28
3.2. Metode.....	30
Antropometrijski podaci.....	30
Biohemijski i hematološki parametri.....	30
Parametri insulinske rezistencije.....	30
Adipocitokini.....	31
Parametri koštanog prometa.....	32
Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.....	32
Određivanje totalnog oksidativnog statusa (TOS).....	32

Određivanje totalnog antioksidativnog statusa (TAS).....	33
Određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB).....	33
Određivanje koncentracije tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBARS).....	34
Određivanje ukupnog sadržaja sulfhidrilnih (SH) grupa.....	35
3.3. Statistička obrada podataka.....	36
4. Rezultati istraživanja.....	37
4.1. Demografske karakteristike ispitanica.....	37
4.2. Biohemijski i hematološki parametri tokom trudnoće i posle porođaja.....	39
4.3. Longitudinalne promene u parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite.....	44
4.4. Longitudinalne promene u adipocitokinima i parametrima za procenu insulinske rezistencije.....	46
4.5. Longitudinalne promene u parametrima koštanog prometa.....	48
4.6. Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza za utvrđivanje postojanja korelacije između leptina i biohemijskih parametara u trećem trimestru.....	52
4.7. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na koncentraciju leptina u trećem trimestru.....	54
4.8. Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza za utvrđivanje postojanja korelacije između adiponektina i biohemijskih parametara u trećem trimestru.....	55
4.9. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na koncentraciju adiponektina u trećem trimestru.....	57
4.10. Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza za utvrđivanje postojanja korelacije između osteokalcina i biohemijskih parametara u trećem trimestru.....	59
4.11. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na koncentraciju osteokalcina u trećem trimestru.....	61

4.12. Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza za utvrđivanje postojanja korelacije između P1NP i biohemijskih parametara u trećem trimestru.....	63
4.13. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na koncentraciju P1NP u trećem trimestru.....	65
5. Diskusija.....	67
5.1. Longitudinalne promene parametara lipidnog statusa, inflamacije i oksidativno-stresnog statusa.....	67
5.2. Longitudinalne promene parametara za procenu insulinske rezistencije.....	73
5.3. Adipocitokini u trudnoći.....	74
5.4. Parametri koštanog prometa.....	81
6. Zaključci.....	87
7. Literatura.....	90

1. Uvod

Normalnu fiziološku trudnoću karakterišu brojne anatomske, hormonske, metaboličke i biohemijske promene. Poznavanje ovih promena, njihovih mehanizama i manifestacija, osnovni je preduslov je za rano prepoznavanje eventualnih komplikacija trudnoće i adekvatnu prenatalnu negu majke i ploda. Adaptacije majčinog organizma u trudnoći omogućavaju adekvatan rast i razvoj fetusa, stvaranje zaliha kod novorođenčeta za period neposredno po rođenju, ali i pripremu majke za porođaj i period laktacije, uz istovremeno održanje homeostaze u organizmu majke. Ove kontinuirane adaptacije nastaju kao posledica koordinisanog dejstva niza placentalnih i neplacentalnih hormona i drugih medijatora, kao što su adipocitokini, citokini itd.

Dobro je poznato da u trudnoći dolazi do prolaznog razvoja fiziološke insulinske rezistencije [1], intenziviranja oksidativnog stresa [2], kao i do promena u parametrima lipidnog statusa majke [3], ali još uvek nisu poznati svi mehanizmi koji utiču na ove promene. Poslednjih godina se sve veći značaj u ovom kontekstu pridaje i tkivima koja su se tradicionalno posmatrala kao depo energije (masno tkivo), ili kao deo potpornog i lokomotornog sistema (kost), a za koje je dokazano da produkuju niz metabolički aktivnih medijatora koji imaju ulogu kako u fiziološkim, tako i u patološkim procesima tokom trudnoće [4,5].

Kako su saznanja o navedenim parametrima u trudnoći, čak i u odsustvu patoloških procesa, nepotpuna i nekonzistentna, ispitivanje cirkulišućih markera u krvi majke predstavlja neinvazivan način za ispitivanje adaptivnih promena tokom trudnoće i posle porođaja i povezanosti ovih procesa sa promenama u tkivima kao što su masno tkivo i kost.

1.1. Biohemijske i metaboličke promene u trudnoći

U prvoj fazi trudnoće, koju čine prva dva trimestra, fetalni rast je ograničen i majka skladišti najveći deo nutrijenata koje unosi, što zajedno sa hiperfagijom dovodi do akumulacije masnih naslaga. U poslednjem trimestru trudnoće, rast fetusa je ubrzan i održava ga pojačan transfer nutrijenata kroz placentu i zbog toga kod majke dolazi do intenziviranja kataboličkih procesa, kao i do razvoja fiziološke rezistencije tkiva na insulin. Ova adaptacija omogućava preusmeravanje nutrijenata ka fetusu [3]. Ključnu ulogu u trudnoći ima placenta. Ona razdvaja cirkulaciju majke i fetusa, hrani fetus, uklanja otpadne proizvode metabolizma fetusa i produkuje značajne proteinske i steroidne hormone [6].

Volumen cirkulišuće krvi raste u toku trudnoće u proseku 45%. Volumen plazme raste brže nego masa eritrocita. Zbog toga, uprkos povećanoj eritropoezi, koncentracija hemoglobina, broj eritrocita i hematokrit opadaju u toku trudnoće, ali se zapremina eritrocita (MCV) i prosečna koncentracija hemoglobina po eritrocitu (MCHC) ne menjaju značajno. Broj leukocita može značajno da varira, a u toku porođaja i u puerperijumu mogu biti i značajno povećani [7]. Broj trombocita ima tendenciju pada, iako najčešće ostanu u opsegu referentnih vrednosti. Kod 5-10% žena, broj trombocita se smanji na $100-150 \times 10^9/L$ do termina porođaja, bez ikakvih patoloških posledica [8]. U trudnoći dolazi do dvostrukog ili trostrukog povećanja potreba za gvožđem, ne samo za sintezu hemoglobina, već i za potrebe fetusa i za proizvodnju enzima koji u svom sastavu imaju gvožđe. Potrebe za folatima rastu 10-20 puta, a potreba za vitaminom B12 dva puta [9]. Promene u sistemu za koagulaciju vode stvaranju fiziološkog hiperkoagulabilnog stanja u trudnoći. Npr. fibrinogen raste približno 65%, što dovodi do porasta u brzini sedimentacije eritrocita, a fibrinolitička aktivnost se smanjuje. Raste i koncentracija faktora VII, VIII, IX, X i Von Willebrandovog faktora. Protrombin i faktor V se ne menjaju, a faktori XI i XII blago opadaju, kao i antitrombin i protein S [10]. Testovi protrombinskog vremena i aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena su samo malo skraćeni, ali trudnoća povećava rizik od tromboembolije do pet puta u odnosu na negravidno stanje [7].

Glavni proteinski hormoni placente su horionski gonadotropin (hCG, humani horionski gonadotropin), placentalni laktogen (PL, humani placentalni laktogen, humani horionski somatomotropin) i placentalni hormon rasta. Najznačajniji steroidi su progesteron, estradiol, estriol i estron. Placenta sekretuje svoje produkte najvećim delom u cirkulaciju majke, a samo mali deo dospeva u fetalnu cirkulaciju. Koncentracija hormona kakav je PL raste u majčinoj cirkulaciji sa napredovanjem trudnoće, srazmerno porastu placente. Izuzetak je hCG, koji ima pik na kraju prvog trimestra [6].

U prvim nedeljama gestacije, hCG stimuliše žuto telo da produkuje progesteron, koji zajedno sa estrogenom inhibira lučenje folikulostimulirajućeg hormona iz hipotalamusa i aktivaciju novih folikula jajnika čime se obustavljaju menstrualni ciklusi kod majke i tako štiti trudnoću [11]. Zajedno sa alfa-feto proteinom i slobodnim estriolom, koristi se za biohemijski prenatalni skrining na Daunov sindrom u drugom trimestru, dok se slobodni β -hCG zajedno sa PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein A) koristi sa biohemijski prenatalni skrining u prvom trimestru [12].

PL je polipeptidni lanac čija je struktura homologna sa hormonom rasta (96%) i prolaktinom (67%). On ima laktogeno, metaboličko, somatotropno, luteotropno, eritropoetsko i aldosteron-stimulišuće dejstvo. Direktno, ili u sinergiji sa prolaktinom, ima značajnu ulogu u pripremi mlečne žlezde za laktaciju. Najvažnija metabolička dejstva obuhvataju inhibiciju preuzimanja glukoze i povećanu lipolizu koja vodi povećanoj mobilizaciji slobodnih masnih kiselina [13]. Placentalni hormon rasta, koji je proizvod GH-V gena, i koji se eksprimira isključivo u sinciotrofoblastu, razlikuje se od hipofiznog hormona rasta u 13 amino kiselina. On u cirkulaciji majke postepeno zamenjuje hipofizni hormon rasta, koji postaje nedetektabilan tokom drugog trimestra trudnoće. Smatra se da kontroliše sintezu IGF-1 (Insulinu sličan faktor rasta-1) [6].

Estrogeni i progesteron u trudnoći omogućavaju odgovarajući razvoj endometrijuma, rast uterusu, adekvatno snabdevanje uterusu krvlju i pripremu uterusu za porođaj [14]. Merenje estriola u drugom trimestru se koristi za procenu rizika od trizomije 21 i 18. U ranoj trudnoći, progesteron proizvodi žuto telo jajnika kao odgovor na hCG. Kasnije, placenta proizvodi dovoljno progesterona za održanje trudnoće. Povišena koncentracija estrogena stimuliše hepatičnu produkciju kortizol-vezujućeg

globulina. Uklanjanje kortizola putem jetre se smanjuje, pa su apsolutne koncentracije i ukupnog i slobodnog kortizola nekoliko puta povećane u trudnoći, ali sa očuvanim cirkadijalnim ritmom [15]. Izraženo povećanje koncentracije kortizola u kasnoj trudnoći je takođe i rezultat produkcije kortikotropin-rilizing hormona od strane placente, što se smatra jednim od okidača porođaja [8]. Takođe su povećani i aldosteron i deoksikortikosteron [11].

Rastuća koncentracija estrogena povećava sekreciju prolaktina i do deset puta, i stoga dolazi i do uvećanja hipofize. Nasuprot tome, sekrecija luteinizirajućeg (LH) i folikulostimulišućeg hormona (FSH) je suprimirana negativnom povratnom spregom, zbog rastućih koncentracija estrogena, progesterona, i inhibina, pa su koncentracije ovih hormona niže od detekcionog limita [11]. Zadnji režanj hipofize sekretuje oksitocin i antidiuretski hormon. Koncentracija oksitocina raste tokom trudnoće i ima pik u terminu porođaja. Nivo antidiuretskog hormona ostaje nepromenjen, ali može doći do promena u osetljivosti osmoreceptora [16].

Tokom trudnoće dolazi do porasta koncentracije tiroksin-vezujućeg globulina, što povećava koncentraciju ukupnog tiroksina (T4) i trijodtironina (T3), što nema kliničkog značaja. Tokom drugog i trećeg trimestra dolazi do blagog sniženja koncentracije slobodnog T3 i T4. Tireoglobulin je značajno povećan, posebno u trećem trimestru. Koncentracija serumskog TSH tokom prvog trimestra je blago snižena, kao posledica tireotropnog dejstva hCG, a u drugom delu trudnoće dolazi do njegovog porasta, pa je i gornja referentna granica viša nego za negravidno stanje [8]. Adekvatna fetalna produkcija tiroksina se postiže tek sredinom trudnoće, a do tog perioda razvoj ploda zavisi od koncentracije majčinog tiroksina koja pređe placentu [17]. Radi adekvatne funkcije štitne žlezde, Svetska zdravstvena organizacija preporučuje povećanje unosa joda u trudnoći sa 100 na 150-200 mg/dan [18].

Trudnoća je dijabetogeno stanje, a adaptacije u metabolizmu glukoze omogućavaju preusmeravanje glukoze ka fetusu, kako bi se omogućio njegov nesmetan razvoj [1]. Dolazi do hiperplazije β -ćelija pankreasa, što rezultuje povećanom produkcijom insulina i povećanom osetljivošću perifernih tkiva na insulin u ranoj trudnoći, a zatim postepenim razvojem insulinske rezistencije [3]. Tokom trudnoće,

nivo insulina je povećan i našte i postprandijalno, a dolazi do blagog smanjenja koncentracije glukoze našte, zbog povećanog deponovanja tkivnog glikogena, povećanog korišćenja glukoze, smanjene produkcije glukoze u jetri i zbog preuzimanja glukoze od strane fetusa [19]. Insulinska rezistencija je uključena u patofiziologiju dijabetes melitusa tipa 2 (DM2) i gestacionog dijabetes melitusa (GDM), a takođe je povezana i sa metaboličkom sindromom i povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti [20].

Jedan od ključnih hormona u razvoju insulinske rezistencije u trudnoći je PL. On ima dvojnju ulogu- ima i antiinsulinska i insulinska dejstva. Povećava perifernu rezistenciju na insulin, lipolizu i koncentraciju slobodnih masnih kiselina u adipocitima, ali takođe stimuliše rast pankreasnih ostrvaca u trudnoći i stimuliše sekreciju insulina. Takođe, na izolovanim adipocitima pacova je pokazano da povećava oksidaciju glukoze i sintezu glikogena [13]. Placentalni hormon rasta ima slična dejstva kao hipofizni hormon rasta. On dovodi do hiperinsulinemije, smanjenog preuzimanja glukoze pod dejstvom insulina, smanjene glikogeneze i smanjenja sposobnosti insulina da suprimira glukoneogenezu u jetri [21]. Do smanjenja osetljivosti tkiva na insulin dovode i androgeni (posebno izraženo kod žena koje su pre trudnoće imale sindrom policističnih jajnika), kao i glukokortikoidi [22]. Gestageni, od kojih je najznačajniji progesteron, takođe utiču na razvoj insulinske rezistencije u trudnoći. Zabeležena je povećana incidenca GDM kod žena koje su primale terapijski progesteron [23], a eksperimentalno je pokazano da progesteron modulira proliferaciju β -ćelija pankreasa [24]. Epidemiološki podaci upućuju na to da i vitamin D ima ulogu u osetljivosti tkiva na insulin u trudnoći. Aktivni metabolit, 1,25-dihidroksi vitamin D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) reguliše ekstracelularni kalcijum i njegov prolaz kroz membrane, i tako održava ćelijski pul kalcijuma koji je neophodan za sva tkiva koja su osetljiva na insulin, a takođe može da utiče na insulinsku osetljivost promocijom ekspresije i aktivnosti insulinskih receptora, i ushodnom regulacijom gena za transport glukoze. Zabeležena je pozitivna korelacija koncentracije 25-hidroksi vitamina D ($25(\text{OH})\text{D}$) i indeksa insulinske osetljivosti i negativan efekat hipovitaminoze D na funkciju β -ćelija pankreasa u negravidnom stanju [25]. Razvoj insulinske rezistencije kod majke je objašnjen i dejstvom slobodnih masnih kiselina čija se koncentracija u krvi drastično povećava tokom trudnoće [26], putem intracelularne akumulacije diacil-glicerola, koji aktivira protein-kinazu C

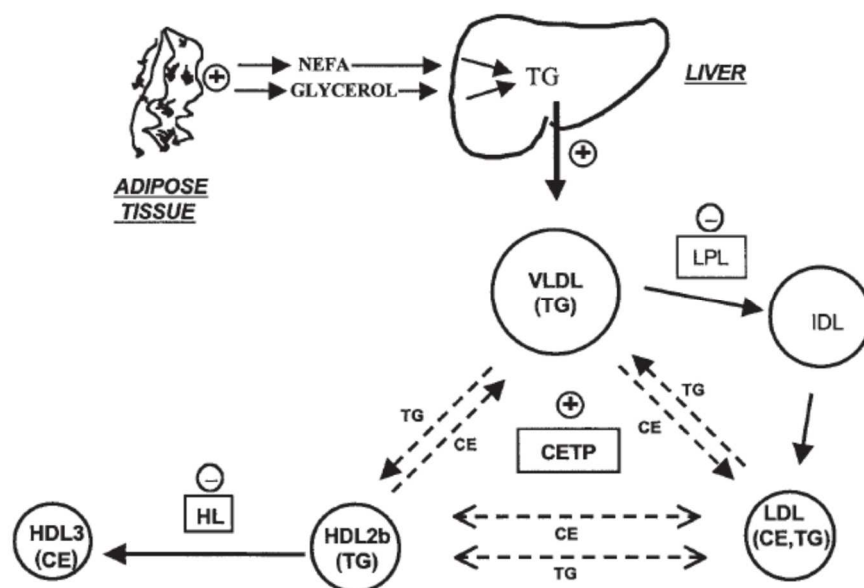
(izoforme β II i δ). Ovo dovodi do smanjenja fosforilacije tirozina supstrata za insulinski receptor (IRS-1) i inhibira aktivaciju fosfoinozitol-3-kinaze, odnosno utiče na intracelularni put prenosa signala insulina. Placenta je takođe izvor adipocitokina kao što je leptin, i proinflamatornih citokina (TNF- α , interleukini i td). Faktor nekroze tumora α (eng. tumor necrosis factor-alpha, TNF- α) utiče na signalizaciju tako što smanjuje tirozin-kinaznu aktivnost receptora, povećava fosforilaciju serina IRS-1, i suprimira dejstva adiponektina [27]. Leptin ostvaruje višestruka dejstva, a najznačajnija su povećanje β -oksidacije i smanjenje esterifikacije i de novo sinteze masnih kiselina [28], dok su neka od glavnih dejstava adiponektina povećana oksidacija masnih kiselina, preuzimanje glukoze od strane miocita i smanjenje aktivnosti enzima glukoneogeneze u jetri [29].

Zbog insulinske rezistencije i sklonosti ka hipoglikemiji, tokom trudnoće dolazi do pojačane lipolize, tako da organizam majke koristi više lipide kao izvor energije, dok glukozu i amino kiseline čuva za fetus, i minimizira katabolizam proteina. Placenta dozvoljava transport glukoze, aminokiselina i ketonskih tela u fetus, ali ne i lipida, osim slobodnih masnih kiselina. Ako pankreasna funkcija nije adekvatna u trudnoći, i ne dođe do produkcije adekvatne količine insulina, dolazi do razvoja GDM [8].

Metaboličke promene u jetri i masnom tkivu tokom trudnoće vode promenama u koncentraciji triglicerida, masnih kiselina, holesterola i fosfolipida. Posle inicijalnog smanjenja tokom prvih 8 nedelja trudnoće, u daljem toku trudnoće dolazi do porasta svih parametara lipidnog profila [3]. Rastuća koncentracija placentalnih hormona koji imaju lipolitičko dejstvo, insulinska rezistencija, humana placentalna lipaza, kao i kateholamini čija koncentracija raste kao odgovor na hipoglikemiju majke, smatraju se faktorima koji dovode do izražene hipertrigliceridemije, a u manjoj meri i hiperholesterolemije koje su karakteristične za kasnu trudnoću [30]. Ovi faktori dovode do povećane lipolize i pojačanog priliva slobodnih masnih kiselina u jetru. U jetri dolazi do sinteze triglicerida i njihove sekrecije u cirkulaciju u vidu lipoproteinskih čestica vrlo male gustine (VLDL). Osim toga, aktivnost lipoproteinske lipaze je smanjena, pa VLDL čestice ostaju duže u cirkulaciji i dolazi do povećane produkcije lipoproteinskih čestica male gustine (LDL) [31,32]. Osim što dolazi do povećanja nivoa VLDL

lipoproteina, dolazi i do povećanja aktivnosti holesterol estar transfernog proteina (CETP) koji povećava sadržaj triglicerida u HDL i LDL česticama [33]. Takođe, dolazi i do smanjenja aktivnosti hepatične lipaze, što za posledicu ima akumulaciju frakcije HDL_{2b} čestica u odnosu na HDL_{2a} i HDL₃ čestice [34]. Takođe, tokom trudnoće, dolazi do promene distribucije LDL lipoproteinskih frakcija i ona je usmerena ka povećanom stvaranju malih, gustih LDL čestica [31].

Promene u metabolizmu lipida odražavaju akumulaciju energetskih depoa u organizmu majke u prvom delu trudnoće, a zatim njihovu mobilizaciju kasnije tokom trudnoće. Placenta koristi holesterol za sintezu steroidnih hormona, a trigliceridi su izvor masnih kiselina za plod, uključujući i esencijelne masne kiseline. Tokom trudnoće se razvija lipidni profil koji se kod negravidnih žena smatra proaterogenim, ali takođe dolazi i do porasta koncentracije HDL holesterola, koji ima ateroprotektivna, antiinflamatorna i antioksidativna svojstva [35].



Slika 1: Shematski prikaz metabolizma lipoproteina u kasnoj trudnoći. Preuzeto iz Herrera 2002, [34].

1.2. Oksidativni stres i inflamacija u trudnoći

Slobodni kiseonikovi radikali (ROS) nastaju u aerobnom metabolizmu, prevashodno u mitohondrijama, endoplazmatskom retikulumu i dejstvom enzima kao što je NADPH oksidaza. Najznačajniji ROS su superoksidni anjon (O_2^-), vodonik-peroksid (H_2O_2), i hidroksil radikal ($OH\cdot$), a reakcijom superoksidnog anjona sa azot-monoksidom (NO) nastaje peroksinitrit, koji je takođe moćan oksidans. ROS igraju značajnu ulogu kao sekundarni glasnici, učestvuju u aktivaciji redoks-osetljivih transkripcionih faktora i protein kinaza [2]. S druge strane, to su visoko reaktivna jedinjenja koja reaguju sa lipidima, proteinima i nukleinskim kiselinama, i dovode do njihovog oštećenja. Zato postoji niz enzima antioksidativne zaštite u organizmu, u koje spadaju enzimi superoksid dizmutaza (SOD), katalaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza, glutation-S-transferaza i humana serumska paraoksonaza. U neenzimske sisteme antioksidativne zaštite spadaju vitamin C, α -tokoferol, tioli, kao što je tioredoksin; ceruloplazmin, transferin, mokraćna kiselina, bilirubin, i td. [2]. Poremećaj ravnoteže prooksidanata i antioksidanata, u kome dolazi do stvaranja viška reaktivnih radikala, dovodi do oksidativnog stresa.

Procena oksidativnog stresa u biološkim sistemima podrazumeva merenje porasta ili smanjenja redoks-senzitivnog molekula. Idealno, marker za procenu oksidativnog stresa ima sledeće osobine: hemijski je jedinstven i može se detektovati, njegova koncentracija se menja (povećava ili smanjuje) u periodima oksidativnog stresa, ima relativno dug poluživot i na njega ne utiču drugi ćelijski procesi (ćelijski ciklus, energetske metabolizam, i sl) [36]. Oksidativni stres karakteriše povećano stvaranje ROS i drugih oksidanata, smanjenje sadržaja antioksidanata, poremećaj ćelijskog redoks balansa i oksidativno oštećenje ćelijskih komponenata (lipida, proteina i DNK). Parametri oksidativno-stresnog statusa koji se određuju u cilju procene intenziteta oksidativnog stresa su:

-oksidanti i proizvodi oksidacije- O_2^- , H_2O_2 , totalni oksidativni status (TOS), tiobarbituratna kiselina-reagujuće supstance (TBARS), malondialdehid (MDA), lipidni hidroperoksidi, finalni proizvodi oksidacije proteina, proizvodi oksidacije dezoksiribonukleinske kiseline kao što je 8-hidroksideoksi-guanozin

-parametri antioksidativne zaštite - glutation, totalni antioksidativni status (TAS), ukupne sulfhidrilne grupe, α -tokoferol, enzimi kao što je superoksid-dizmutaza (SOD) i paraoksonaza itd.

-prooksidativno-antioksidativni balans (PAB), odnos redukovanog i oksidovanog glutationa, odnos tiola i disulfida [36].

Trudnoća je stanje koje karakteriše povećana podložnost oksidativnom stresu, zbog povećane bazalne potrošnje kiseonika. Placenta je bogata mitohondrijama, bogato vaskularizovana i izložena visokom parcijalnom pritisku kiseonika, a takođe je i izvor NO što može doprineti stvaranju reaktivnih radikala [37]. ROS imaju značajnu ulogu u signalnim putevima folikulogeneze, embriogeneze, funkciji žutog tela i uterusa, i u fetoplacentalnom razvoju [2,38]. Oksidativni procesi su uključeni u promene ekstracelularnog matriksa tokom implantacije i trofoblastne invazije uterinih arterija, verovatno preko modulacije aktivnosti matriks metaloproteinaza. Takođe su značajni i u regulaciji vaskularnog tonusa, što je značajno za održanje utero-placentalnog protoka krvi, ali i u održanju tonusa uterusa i cerviksa [39]. Smatra se i da ROS učestvuju u epigenetskoj regulaciji i fetalnom programiranju, tako što utiču na procese metilacije i acetilacije fetalne DNK i modifikaciju histona, što je posebno izraženo u stanjima kao što su intrauterina hipoksija, nutritivne deficijencije ili suficit, izlaganje glukokortikoidima i sl. [40].

Povećan oksidativni stres u trudnoći je povezan sa komplikacijama u trudnoći, kao što su spontani pobačaji, preeklampsija, intrauterini zastoje rasta fetusa [41]. Polimorfizmi antioksidativnih enzima, manjak mikronutrijenata kao što je selen u ishrani, pušenje, fizička neaktivnost, gojaznost, izloženost zagađenju okoline i sl, predstavljaju predisponirajuće faktore u razvoju oksidativnog stresa u trudnoći.

Većina dosadašnjih ispitivanja je upravo bila fokusirana na patološka stanja, a podaci koji se tiču normalne trudnoće nisu sasvim konzistentni. Razlog nekonzistentnih rezultata verovatno leži u činjenicama da su se u različitim studijama koristile različite metodologije i različiti parametri procene oksidativno-stresnog statusa.

Generalno, dosadašnja ispitivanja su našla porast nivoa prooksidanata u kasnoj trudnoći [31,42,43]. Toescu i saradnici [31] su opisali porast koncentracije lipidnih peroksida u drugom i trećem trimestru, kao i inicijalno sniženje TAS u prvom trimestru, a zatim porast ovog parametra; Hung i saradnici [42] su opisali porast 8-hidroksideoksiguanozina u urinu i 8-izoprostana u plazmi u trećem trimestru normalne trudnoće, ali i porast parametara antioksidativne zaštite- TAS, eritrocitne glutathion-peroksidaze i SOD posle 30. nedelje gestacije. TBARS je parametar koji obuhvata MDA i srodne aldehide koji su konačni proizvodi lipidne peroksidacije, i opisan je porast ovog parametra u kasnoj trudnoći [43,44]. Nasuprot navednim ispitivanjima koja su opisala povećanje antioksidativnih sistema u kasnoj trudnoći, Patil i saradnici [44] su našli da su aktivnosti SOD, glutathion-peroksidaze i glutathion-reduktaze najniže u trećem trimestru. Generalno, smatra da je fiziološka, nekomplikovana trudnoća praćena povećanom produkcijom slobodnih radikala i kompenzatornim povećanjem koncentracije parametara koji spadaju u sistem antioksidativne zaštite.

U trudnoći dolazi do fiziološke regulacije urođenog imunskog odgovora radi prevencije odbacivanja fetusa, a ključnu ulogu u ovom procesu imaju promene u produkciji citokina. Th1 limfociti proizvode interleukine kao što su IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- γ , TNF- α , i stimulišu ćelijski imunitet, a Th2 limfociti su izvor IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 i uključeni su u regulaciju humoralnog odgovora. Bitno mesto produkcije Th2 citokina u trudnoći je trofoblast, i u normalnoj trudnoći ravnoteža Th1 i Th2 aktivnosti je pomerena ka povećanju Th2 aktivnosti. Inflamatorni i infektivni procesi u trudnoći pomeraju ovu ravnotežu ka Th1 odgovoru, što započinje kaskadu proizvodnje proinflamatornih citokina koji su uključeni u spontani pobačaj, prevremeni porođaj i preeklampsiju [45]. Novija saznanja ističu i uticaj Th17 i regulatornog Treg imunskog odgovora. Th17 ćelije proizvode proinflamatorni citokin IL-17 i imaju značajnu ulogu u indukciji inflamacije, a Treg ćelije imaju centralnu ulogu u razvoju tolerancije i imunoregulaciji [46]. Nekoliko hormonskih faktora utiče na modulaciju imunskog odgovora u trudnoći: progesteron, estrogeni, aktivin A, oksitocin, kortikotropin rilizing faktor i neurohormon urokortin [45].

Trudnoća se smatra stanjem sa pojačanom inflamacijom, a ta pretpostavka se zasniva na činjenici da dolazi do promena u inflamatornim površinskim markerima i u

cirkulišućim markerima inflamacije, kao što su proteini akutne faze i citokini, što se pripisuje trofoblastu, ali i rastućem sadržaju masnog tkiva koje proizvodi proinflamatorne medijatore, od kojih su najznačajniji leptin i TNF- α [47].

Oksidativni stres i inflamacija su međusobno povezani. Reaktivni radikali mogu da aktiviraju niz transkripcionih faktora, kao što su nuklearni faktor kappa B (NF- κ B), aktivator protein-1 (AP-1), p53, γ izoforma receptora koji aktivira proliferaciju peroksizoma (eng. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $-\gamma$, PPAR- γ) itd. i na taj način dovode do ekspresije preko 500 različitih gena uključujući i gene za inflamatorne citokine, hemokine, molekule koji regulišu ćelijski ciklus, ali i antiinflamatorne molekule [48]. Metabolizam arahidonske kiseline takođe generiše ROS, posebno tokom sinteze leukotrijena [39]. Ova povezanost je dokumentovana i u trudnoći, a posebno je izražena u trudnoćama praćenim komplikacijama kao što je preeklampsija [49].

1.3. Adipocitokini u trudnoći

Masno tkivo proizvodi čitav niz biološki aktivnih medijatora koji se nazivaju adipokini ili adipocitokini, i učestvuje u regulaciji apetita, potrošnje energije, osetljivosti na insulin, endokrinog i reproduktivnog sistema, koštanog metabolizma, imuniteta i inflamacije [4]. U biološki aktivne proizvode masnog tkiva spadaju adipocitokini leptin, adiponektin, visfatin, omentin, hemerin, kao i citokini kao što su TNF- α , makrofag i monocit hemoatraktant protein 1 (MCP-1) itd. Oni imaju lokalna (autokrini i parakrini) i sistemska (endokrini) dejstva [50].

1.3.1. Leptin

Leptin je proizvod ob gena ili lep gena, koji se kod čoveka nalazi na hromozomu 7. Ima molekulsku masu od 16 kDa, i strukturu sličnu citokinima [51]. Naziv je dobio po grčkoj reči „leptos“, koja znači tanak. Proizvode ga diferencirani adipociti, ali je dokazana produkcija i u drugim tkivima, kao što je fundus želuca, skeletni mišići, jetra i placenta [52]. Receptor za leptin pripada klasi I familije receptora za citokine i rasprostranjen je u organizmu, što ukazuje na široke uloge leptina koje nisu do kraja razjašnjene. Identifikovano je nekoliko izoformi receptora za leptin (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, i Ob-Re) [53]. Ob-Rb je kompletna, dugačka forma receptora, koja ima intracelularne regione koji aktiviraju Jak-STAT put prenosa signala [54]. Vezivanje leptina za receptor takođe može dovesti i do aktivacije nekih drugih puteva intracelularnog prenosa signala, kao što su ERK/MAPK put, put aktivacije fosfatidilinozitol 3 fosfataze (PI3K) i put aktivacije 5'-AMP aktivirane proteine kinaze (AMPK) [55]. U plazmi se nalazi u slobodnoj formi ili vezan za vezujućii protein, koji se smatra solubilnom formom receptora za leptin [56].

Sinteza i sekrecija leptina zavisi od nekoliko hormonskih i nehormonskih faktora, gde su stimuli prekomerni unos hrane, insulin i glukokortikoidi, a supresori gladovanje, ciklični adenzin-monofosfat (cAMP) i kateholamini epinefrin i norepinefrin, preko β_3 -receptora [57]. TNF- α deluje kao parakrini faktor koji povećava sekreciju leptina [58]. Gojazne osobe imaju povećanu koncentraciju leptina. Ovo je verovatno rezultat desenzitizacije leptinskog signala, fenomena koji se označava kao

leptinska rezistencija. Ona se potencijalno razvija na dva nivoa- zasićenjem transporta leptina preko krvno-moždane barijere ili abnormalnostima u aktivaciji receptora za leptin i u signalnoj transdukciji [59]. Kod negojaznih osoba, leptin je u najvećoj meri u cirkulaciji vezan za vezujući protein, a kod gojaznih je u slobodnoj formi. Kada se uporede koncentracije slobodnog leptina kod gojaznih i negojaznih osoba, hiperleptinemija kod gojaznih je još izraženija [60].

Regulatorni mehanizmi su povezani i sa polom, pa žene u reproduktivnom periodu imaju veće koncentracije leptina u odnosu na muškarce istih godina. Takođe, ženski fetusi i novorođenčad imaju viši nivo leptina u odnosu na muške, a nivo premenopauze je viši nego u postmenopauzi [61]. Nivo leptina u cirkulaciji ima pik noću, suprotno od kortizola, a koncentracija mu se smanjuje sa starenjem. Ovo smanjenje je izraženije kod žena nego kod muškaraca [56].

Leptin deluje na hipotalamus, tako što suprimira unos hrane i stimuliše potrošnju energije. On daje informaciju o zalihama masti u organizmu. Pretpostavka je da kad dođe do porasta broja i veličine adipocita, ob gen produkuje leptin, koji se sekretuje u cirkulaciju i dolazi do hipotalamusa, i smanjuje apetit i pojačava energetske metabolizam. Ventromedijalni nukleus hipotalamusa ima centralnu ulogu u regulaciji ishrane [62]. Značajna je i uloga leptina u regulaciji reproduktivnog sistema, inicijaciji puberteta i trudnoći. Smatra se da leptin ima permisivnu ulogu- neophodno je da dostigne odgovarajući nivo da bi došlo do započinjanja puberteta i održavanja reproduktivne funkcije kod žena, dok kod muškaraca uticaj leptina na reproduktivnu funkciju nije jasan [63]. Ova dejstva leptin ostvaruje kako direktno na hipotalamus, tako i na gonade. Smatra se da je dejstvo leptina na produkciju gonadotropin-rilizing hormona od strane hipotalamusa kompleksno i najverovatnije posredovano Kiss1 neuronima, peptidima kisleptinima i neuropeptidom Y1 [64,65]. Leptin utiče i na steroidogenezu u ovarijumu, ovulaciju i spermatogenezu [64]. Smanjenje koncentracije leptina kod gladovanja je odgovorno za supresiju hipotalamo-hipofizno-gonadalne ose, kao i poremećaje u funkcionisanju i drugih neuroendokrinih osa [60], tako da je leptin moguća ključna veza između masnog tkiva i centara u hipotalamusu koji regulišu energetske homeostazu, služeći kao indikator da li su prisutne energetske rezerve adekvatne za normalnu reproduktivnu funkciju.

Osim uloge koju ostvaruje preko centralnog nervnog sistema, leptin ima i direktne efekte na periferna tkiva [52]. Metabolički efekti ovog adipocitokina su verovatno posredovani aktivacijom AMPK, čija aktivacija povećava β -oksidaciju a smanjuje esterifikaciju masnih kiselina, i na taj način smanjuje akumulaciju lipida u skeletnim mišićima, masnom tkivu i drugim tkivima. AMPK je odgovorna i za inhibiciju acetil-koenzim A karboksilaze, koja učestvuje u de novo sintezi masnih kiselina [28].

Hiperinsulinemija je povezana sa povećanom koncentracijom leptina i povećanom ekspresijom gena za leptin; takođe, kod osoba sa insulinomom povećana je koncentracija leptina. S druge strane, visok nivo leptina je povezan sa insulinskom rezistencijom nezavisno od indeksa telesne mase, ali mehanizam dejstva leptina na sekreciju insulina od strane β -ćelija pankreasa kod ljudi nije razjašnjen [66]. Postoje indicije da leptin smanjuje ekspresiju gena za insulin i sekreciju insulina [55]. Neka od dokazanih dejstava leptina su sinergistička sa dejstvima insulina, npr. povećano preuzimanje slobodnih masnih kiselina od strane mišićnih ćelija, ali neka su antagonistička, npr. intenziviranje β -oksidacije masnih kiselina [66].

Smatra se da leptin ima ulogu i u hematopoezi – u proliferaciji i diferencijaciji prekursora hematopoeze, agregaciji trombocita, a da dovodi i do stimulacije rasta endotelnih ćelija i angiogeneze [66]. Leptin se smatra proinflamatornim adipocitokinom jer može da poveća produkciju nekolicine proinflamatornih citokina (IL-6, IL-12, IL-18, TNF α , itd) u monocitima, da indukuje stvaranje ROS u makrofagama, neutrofilima i endotelnim ćelijama, i da pojača interakciju leukocita i endotelnih ćelija [67].

Značajan izvor leptina u trudnoći je placenta [68]. Prema dosadašnjim saznanjima, do porasta koncentracije leptina dolazi i pre značajnog povećanja masnog tkiva majke, već u prvih 8 nedelja trudnoće, najviše koncentracije dostiže krajem drugog ili početkom trećeg trimestra, a posle porođaja dolazi do pada koncentracije [69,70]. Fiziološki značaj porasta koncentracije leptina nije u potpunosti razjašnjen, i trudnoća se smatra stanjem centralne rezistencije na leptin, koja bi mogla imati uticaj na akumulaciju energetske zaliha tokom trudnoće, tj. kao kompenzatorni mehanizam koji omogućava rast placente, obezbeđivanje energetske potrebe fetusa, i pripremu

organizma majke za laktaciju. Pokazano je da hCG povećava placentalnu sintezu i sekreciju leptina [71], kao i estradiol [72], a da prolaktin i PL utiču na proces prenosa signala putem receptora za leptin i tako utiču na razvoj rezistencije [73]. Postoje eksperimentalni dokazi da leptin učestvuje u ranom embriogenom razvoju - oslobađanju proinflamatornih citokina i prostaglandina, u implantaciji, nishodnoj regulaciji apoptoze blastocista, invaziji trofoblasta i angiogenezi. Osim toga, bitan je i za regulaciju fetalnog rasta, razvoj kostiju i sazrevanje pluća [61].

Dosadašnje studije o povezanosti leptina i insulinske rezistencije u normalnoj trudnoći su opisale negativnu korelaciju nivoa leptina i parametra SI (osetljivost na insulin) dobijenog metodom FSIVGTT (intravenski test tolerancije na glukozu sa čestim uzorkovanjem) [74] i pozitivnu korelaciju sa HOMA-IR [70,75]. Ovi nalazi idu u prilog tvrdnji da je leptin povezan sa rastućom insulinskom rezistencijom u trudnoći. Osim toga, eksperimentalno je pokazano da leptin povećava produkciju NO u placenti i da na taj način povećava katabolizam lipida [76]. Zabeleženo je i postojanje pozitivne korelacije nivoa leptina i TBARS kod gojaznih negravidnih žena [77], ali nema detaljnih podataka o povezanosti leptina i parametara oksidativnog stresa u normalnoj trudnoći.

1.3.2. Adiponektin

Adiponektin je protein od 30 kDa čija se primarna struktura sastoji iz signalnog peptida, varijabilnog regiona, domena sličnog kolagenu i globularnog domena, a koji je strukturno sličan komponenti komplementa C1q, TNF- α i kolagenu VIII i X [78]. Produkuju ga adipociti, i u cirkulaciji se nalazi u relativno visokoj koncentraciji (0,5-30 mg/L), najvišoj od svih adipocitokina. Formira multimere, od trimera i heksamera do multimera visoke molekulske mase, a takođe je u cirkulaciji prisutan u obliku manjeg globularnog domena nastalog proteolizom [79]. Poznata su dva receptora za adiponektin, AdipoR1 i AdipoR2. AdipoR1 se nalazi primarno u mišićima, a AdipoR2 u jetri [80].

Za razliku od drugih adipocitokina, njegova koncentracija je manja kod gojaznih nego kod negojaznih osoba, odnosno obrnuto je srazmerna sadržaju masnog

tkiva u organizmu. Hipertrofija adipocita, do koje dolazi kod prekomerne ishrane, dovodi do sekrecije hormona koji vode insulinskoj rezistenciji, kao što je TNF- α , a do smanjenja sinteze i sekrecije adiponektina [81]. S druge strane, muškarci imaju manju koncentraciju adiponektina od žena, iako žene imaju veći procenat masnog tkiva, pa se smatra da na koncentraciju adiponektina utiče i distribucija masnog tkiva koja je pod uticajem polnih hormona [82].

Poznato je da adiponektin povećava osetljivost tkiva na insulin, deluje antiinflamatorno i antiaterogeno [83]. On ostvaruje svoja dejstva na energetske homeostazu, metabolizam glukoze i lipida prvenstveno fosforilacijom i aktivacijom AMPK. Aktivacija AMPK dovodi do fosforilacije acetil-koenzim A karboksilaze, oksidacije masnih kiselina i preuzimanja glukoze od strane miocita. Takođe, smanjuje aktivnost enzima glukoneogeneze u jetri, i na taj način smanjuje nivo glukoze. Osim toga, povećava ekspresiju α izoforme receptora koji aktivira proliferaciju peroksizoma (PPAR- α , eng. peroxisome proliferator-activated receptor α), i time povećava sagorevanje masnih kiselina, što vodi smanjenju sadržaja triglicerida u jetri i mišićima i povećanju osetljivosti na insulin [29]. Adiponektin aktivira p38 mitogenom aktiviranu protein kinazu (p38 MAPK) u humanim osteoblastima, što dovodi do njihove diferencijacije, kao i c-jun N-terminalnu kinazu, što dovodi do njihove proliferacije [84]. Antiinflamatorna i antiaterogena svojstva ostvaruje blokadom nuklearnog faktora NF- κ B i smanjenjem koncentracije citokina kao što su TNF α , IL-6 i IL-18 [67].

U prethodnih 20 godina ispitivana su različita dejstva adiponektina u regulaciji energetskeg metabolizma i inflamacije, kao i njegova uloga u patološkim stanjima kao što je dijabetes i metabolički sindrom. Prospektivne studije su pokazale da je nizak nivo adiponektina povezan sa većom incidencom DM i insulinske rezistencije [85,86], kao i sa metaboličkim sindromom [87] i kardiovaskularnim bolestima [88]. Sa gubitkom telesne mase, dolazi do porasta nivoa adiponektina, a visok nivo adiponektina je povezan sa manjim rizikom od razvoja DM2 i ima protektivnu ulogu u eksperimentalnim modelima vaskularnog oštećenja i u ranoj aterosklerozi [60].

Uloga adiponektina u trudnoći nije razjašnjena. Rezultati prethodnih studija koje su se bavile ispitivanjem koncentracije adiponektina tokom nekomplikovane

trudnoće, nisu konzistentni - opisano je sniženje koncentracije adiponektina tokom trudnoće [20,89], inicijalni porast, a zatim sniženje [90], ili pak odsustvo značajnih promena [91]. Analiza abdominalnog masnog tkiva zdravih trudnica dobijenog prilikom carskog reza pokazala je smanjenu ekspresiju gena za adiponektin u terminu porođaja, odnosno u periodu kada je rezistencija perifernih tkiva majke na insulin najizraženija [92]. Placenta eksprimira receptore za adiponektin, ali nema dokaza da produkuje sam adiponektin [93]. Smatra se da u placenti adiponektin deluje tako što zapravo povećava insulinsku rezistenciju, utiče na fetalni rast i predstavlja molekularni medijator kojim majčino masno tkivo utiče na fetalni razvoj [93]. Studija Castro i saradnika je pokazala da je koncentracija adiponektina u krvi majke u pozitivnoj korelaciji sa procentom masnog tkiva novorođenčeta muškog pola [94].

Studije koje su ispitivale povezanost adiponektina i parametara za procenu insulinske rezistencije u trudnoći takođe su nekonzistentne [90,91,95–97]. U nekim istraživanjima korelacije adiponektina i parametara insulinske rezistencije nisu bile značajne [90,91,96], ali je u drugim istraživanjima opisano postojanje negativnih korelacija koncentracije adiponektina i parametara insulinske rezistencije [95,97]. Niži nivo adiponektina je primećen kod trudnica sa GDM u odnosu na zdrave trudnice [98,99]. Ako se uzmu u obzir svi ovi podaci, postoje indicije da je adiponektin jedan od medijatora koji utiče na regulaciju metabolizma glukoze u trudnoći, ali su mehanizmi, kao i veza adiponektina sa drugim medijatorima, nedovoljno ispitani.

U negravidnom stanju, adiponektin je u inverznoj korelaciji sa markerima sistemskog oksidativnog stresa [100,101], i oksidativni stres suprimira ekspresiju informacione RNK za adiponektin i njegovu sekreciju [101]. Studije koje su se bavile proučavanjem veze nivoa oksidativnog stresa i koncentracije adiponektina u fiziološkoj, nekomplikovanoj trudnoći, pokazale su da je adiponektin u negativnoj korelaciji sa markerom oksidativnog stresa TBARS [102]. Potrebna su dodatna ispitivanja kako bi se ova povezanost bolje definisala i kako bi se procenio njen značaj najpre u fiziološkoj trudnoći, a potom i u trudnoćama koje su praćene komplikacijama.

1.4. Parametri koštanog prometa u trudnoći

Kost je metabolički aktivno tkivo koje neprestano podleže procesu remodelovanja, odnosno procesima formiranja i resorpcije. Ova dva procesa su u normalnim uslovima kuplovana, tj. u ravnoteži. Osteoklasti vrše resorpciju, osteoblasti formiranje, a osteociti održavanje kosti. Koštani promet se odvija pod uticajem hormona (paratireoidni hormon (PTH), vitamin D i drugi steroidni hormoni) i lokalnih medijatora (citokini, faktori rasta). Fiziološka stanja kao što su rast i starenje, i patološka stanja, kao što su metabolička bolest kostiju, stanja sa povećanom ili smanjenom pokretljivošću, dovode do manje ili više izraženih poremećaja balansa formiranja i resorpcije kostiju, što rezultira u promenama njihove strukture, jačine i mase [103]. Trudnoća i laktacija su stanja u kojima dolazi do izraženih promena u apsorpciji i prometu kalcijuma, prvenstveno kako bi se podmirile potrebe fetusa i novorođenčeta. Smatra se da fetus do termina porođaja u proseku dobije 30g kalcijuma, od čega 80% u trećem trimestru [104]. Promene u koštanom prometu tokom trudnoće mogu dovesti do prolaznog smanjenja mineralnog sadržaja kosti majke, ali najverovatnije ne dovode do trajnih posledica po koštani sistem [105].

Donedavno se smatralo da PTH tokom trudnoće raste približno 40%, međutim ispitivanja sa novijim generacijama imunoeseja za PTH su pokazala da je PTH normalan ili čak suprimiran kod trudnica sa adekvatnim unosom kalcijuma [105]. Mnoga tkiva fetusa i majke proizvode PTHrP (eng. parathyroid hormone-related protein, parat-hormonu sličan protein), i njegova koncentracija u krvi majke raste značajno u trećem trimestru, da bi najviše vrednosti imala u periodu laktacije. On simulira dejstvo PTH, stimuliše apsorpciju kalcijuma i fosfata u bubrezima i crevima, a takođe reguliše i transfer kalcijuma kroz placentu ka fetusu [106]. Takođe, nivo $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ raste u trudnoći [106], i smatra se da povećava intestinalnu apsorpciju kalcijuma. Međutim, zanimljivo je da su ispitivanja na životinjama pokazala da intestinalna apsorpcija kalcijuma raste čak i u prisustvu teške deficijencije vitamina D i u odsustvu receptora za vitamin D [107], pa su neki istraživači ukazali na potencijalnu ulogu prolaktina i humanog PL na apsorpciju kalcijuma u trudnoći [108]. Tokom trudnoće dolazi do smanjenja koncentracije ukupnog kalcijuma u serumu, kao posledica dilucione hipoalbuminemije, ali koncentracija slobodnog kalcijuma ostaje

nepromenjena. Povećana apsorpcija kalcijuma je povezana i sa povećanim izlučivanjem kalcijuma putem urina, pa je u trudnoći povećan rizik od stvaranja bubrežnog kamena [8].

Struktura i jačina kostiju se teško mere in vivo, ali se koštana masa procenjuje denzitometrijom. Za procenu promena u metabolizmu kostiju koriste se i cirkulišući biomarkeri [103]. Marker formiranja kostiju su proizvodi aktivnih osteoblasta, i nastaju u različitim fazama osteoplastnog razvoja. To su koštana alkalna fosfataza, osteokalcin i propeptidi prokolagena tipa I (C- i N-terminalni). Kao markeri resorpcije se koriste proizvodi osteoklasta, kao što su tartarat rezistentna kisela fosfataza, produkti razgradnje koštanog kolagena (hidroksiprolin, kros-link telopeptidi kolagena tipa I itd) i nekolageni proteini, kao što su koštani sijalo-protein, i katepsini K i L [103].

Iako bi povećana intestinalna apsorpcija trebalo da podmiri povećane potrebe za kalcijumom u trudnoći i laktaciji, primećeno je da dolazi do promena u koštanom prometu i gustini. Malobrojni podaci o promeni koštane gustine koji su dobijeni metodom koštane denzitometrije govore da tokom trudnoće i laktacije dolazi do reverzibilnog gubitka koštane gustine, a da se ona vraća na nivo od pre trudnoće posle perioda od oko 19 meseci, bez obzira na dužinu laktacije [109]. Na osnovu rezultata cirkulišućih markera koštanog prometa, zaključeno je da dolazi do povećane resorpcije kostiju majke sve do sredine trudnoće, a da zatim dolazi do pojačanog formiranja kostiju [110,111]. Laktacija je praćena značajno povećanom resorpcijom kostiju, verovatno pod uticajem smanjenja koncentracije estradiola do koje dolazi posle porođaja [112].

1.4.1. Osteokalcin

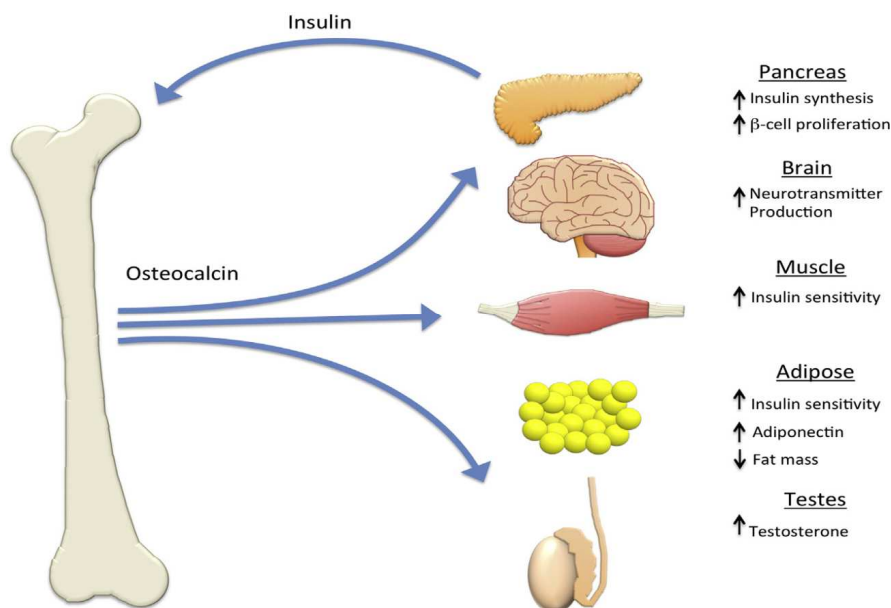
Osteoblasti su specijalizovane ćelije kosti koje sintetišu koštani matriks, koji je mineralizovan i bogat kolagenom. Osteokalcin, koji se još naziva i koštani Gla-protein, je proizvod osteoblasta, u manjoj meri odontoblasta i hondrocita [113], ali takođe eksprimira i u masnom tkivu [114]. Gen za osteokalcin, nazvan BGLAP, lociran je na hromozomu 1, i regulisan je dejstvom $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, koji povećava sintezu osteokalcina [115]. Osteokalcin ima tri glutamil rezidue, na pozicijama 17, 21, i 24, koje mogu biti

konvertovane u karboksiglutamil (Gla-) rezidue, vitamin K zavisnom enzimskom karboksilacijom. I kod miševa i kod ljudi osteokalcin u krvi može biti prisutan u karboksilovanoj i nekarboksilovanoj formi. Nekarboksilovana ili manje karboksilovana forma čini 16-21% ukupnog osteokalcina [116]. Nakon oslobađanja osteokalcina u ekstracelularni prostor, dolazi do njegovih konformacionih promena, tako da se kalcijum iz hidroksi-apatita vezuje za Gla-rezidue, što sugerise njegovu ulogu u mineralizaciji kostiju, mada postoje i dokazi da inhibira mineralizaciju kostiju [113]. Osteokalcin se smatra specifičnim markerom osteoblastne funkcije. Procenjuje se da se posle oslobađanja iz osteoblasta najveći deo novosintetisanog proteina inkorporira u ekstracelularni koštani matriks gde čini približno 15% nekolagene proteinske frakcije. Manji deo se oslobađa u cirkulaciju, i on se može detektovati pomoću imunoeseja. Serumski nivo imunoreaktivnog osteokalcina korelira sa brzinom formiranja kostiju, što je pokazano histomorfometrijom [103].

Neočekivano, knock-out miševi, kojima je isključen gen za osteokalcin, imali su povećan stepen formiranja kostiju u odnosu na wild-type miševе [117]. Takođe je zapaženo da su imali manju produkciju insulina i adiponektina, veću insulinsku rezistenciju, veći nivo glukoze i veći sadržaj masnog tkiva [118], što je uvelo pretpostavku da je osteokalcin hormon koga sekretuju osteoblasti, i koji može biti uključen u molekularne mehanizme nastanka insulinske rezistencije. Studije na ćelijskom kulturama su pokazale da povećava sintezu insulina i proliferaciju β -ćelija pankreasa [113].

Mnoge studije su ispitivale povezanost serumskog osteokalcina, kako ukupnog, tako i nekarboksilovanog, sa parametrima metabolizma glukoze u različitim fiziološkim i patološkim stanjima. Negativna korelacija osteokalcina sa nivoom glukoze ili glikohemoglobina je opisana kod pacijenata sa DM2 [119–122], žena u menopauzi [123], mladih gojaznih žena [124] i starijih muškaraca [125,126], ali neke studije nisu potvrdile ove povezanosti [127,128]. Meta-analiza [129] je pokazala slaganje sa studijama na miševima, tj. potvrdila pozitivan uticaj osteokalcina na metabolizam glukoze, i postojanje negativne korelacije osteokalcina i glukoze i glikohemoglobina kod ljudi. Takođe, zabeležena je i negativna korelacija sa HOMA-IR [122,130,131], serumskim trigliceridima [120,130] i parametrima inflamacije CRP i IL-6 [125,132].

Iako se nekarboksilovani osteokalcin smatra metabolički aktivnom formom kod miševa, smatra se da je ukupni osteokalcin dobar indikator koncentracije nekarboksilovane forme, pri normalnim uslovima (suficijencija vitamina K), i da su kod ljudi i ukupni i nekarboksilovani osteokalcin u istoj korelaciji sa parametrima metabolizma glukoze [129]. U prilog ovoj tvrdnji idu i dokazi dobijeni na adipocitima in vitro [133].



Slika 2: Dejstva osteokalcina, preuzeto iz Zoch i sar., 2015 [113]

Osteokalcin u trudnoći je ispitivan uglavnom u cilju evaluacije koštanog prometa. Ispitivanja koja su koristila novije generacije imunoeseja opisale su smanjenje koncentracije osteokalcina majke u drugom trimestru, a zatim porast do kraja trudnoće i dalji porast posle porođaja [110,134]. Malobrojne studije su ispitivale povezanost osteokalcina sa metabolizmom glukoze u trudnoći, i one su se uglavnom bile fokusirane na trudnoće praćene GDM. Pokazano je da je osteokalcin viši kod trudnica sa GDM u odnosu na trudnice sa normalnom tolerancijom na glukozu [135–137]. Podaci o korelacijama osteokalcina sa nivoom glukoze ili parametrima za procenu insulinske rezistencije su kontradiktorni – Winhofer i saradnici su pokazali da je osteokalcin u pozitivnoj korelaciji sa parametrima koji ukazuju na sintezu insulina [135], Srichmokwun i saradnici su pokazali da je osteokalcin u pozitivnoj korelaciji sa HOMA-IR i HOMA-%B [97], a Saucedo i saradnici nisu dokazali postojanje ovih

korelacija [138]. Osteoblasti na svojoj površini imaju receptore za adiponektin, i adiponektin utiče na njihovu proliferaciju, diferencijaciju i mineralizaciju [139]. Eksperimenti na miševima i ćelijskim kulturama su pokazali i da osteokalcin reguliše ekspresiju adiponektina [140], međutim u jedinoj studiji koja se ispitivala postojanje korelacija između osteokalcina i adiponektina u trudnoći, oni nisu bili u značajnoj korelaciji [97]. Leptin deluje na kost tako što smanjuje proces formiranja kostiju i produkciju osteokalcina centralnim dejstvom [141], dok direktnim perifernim dejstvom deluje stimulatorno na rast kostiju [142]. Podaci o povezanosti leptina i osteokalcina u trudnoći su takođe malobrojni- samo su Saucedo i saradnici pronašli da su leptin i osteokalcin u negativnoj korelaciji [138]. Ove malobrojne studije nisu dovoljne za izvođenje zaključka o međusobnoj povezanosti metabolizma glukoze, masnog tkiva i kosti tokom trudnoće.

U cirkulaciji osteokalcin podleže brzom degradaciji, pa su zato u krvi prisutni i intaktni peptid i fragmenti različitih veličina. Različiti eseji mere fragmente različite dužine, i često različitih epitopa i reaktivnosti prema antitelima. U praksi, različiti imunoeseji su davali različite, međusobno neuporedive rezultate. Samo jedna trećina cirkulišućeg pula predstavlja intaktni osteokalcin, i zbog nestabilnosti u serumu, dolazi do brzog gubitka imunoreaktivnosti u uzorcima koji stoje na sobnoj temperaturi duže od jednog sata. Da bi se izbegao ovaj problem, noviji eseji mere najzastupljeniji degradacioni fragment osteokalcina, 1-43 (N-terminalni/središnji, N-MID) fragment. Ovaj fragment nastaje kao rezultat proteolitičke degradacije intaktnog molekula i može delimično nastati u aktiviranim osteoblastima. Merenje N-MID fragmenta eliminiše problem preanalitičke nestabilnosti. Ipak, neophodna je brza obrada uzorka za većinu eseja, jer je primećen gubitak aktivnosti posle nekoliko sati na sobnoj temperaturi, a isto važi i za višestruko otapanje, ili produženo čuvanje na temperaturama višim od -25°C [143].

1.4.2. Propeptidi prokolagena tipa I (P1NP)

Propeptidi prokolagena tipa I nastaju iz kolagena tipa I, koji je glavna forma kolagena u kostima. Ovaj tip kolagena prisutan je i u drugim tkivima, kao što su koža, dentin, kornea, hrskavica, i tetive. U kostima, sintetišu ga osteoblasti, u formi pre-

prokolagena. Ovaj molekul prekursor ima kratke terminalne peptide- amino (N-) terminalni propeptid (P1NP) i karboksi (C-) terminalni propeptid (P1CP) [144].

Posle sekrecije van ćelije, globularni trimerni propeptidi se enzimski odvajaju i oslobađaju u cirkulaciju. P1CP ima molekulsku masu od 115 kDa i stabilizovan je disulfidnim vezama. Eliminiše se preko endotelnih ćelija jetre preko manoznih receptora i zato ima kratak serumski poluživot od 6-8 min. P1NP ima molekulsku masu samo 70 kDa, bogat je prolinom i hidrokisprolinom i eliminiše se iz cirkulacije preko receptora čistača na endotelnim ćelijama jetre. Kako i P1CP i P1NP nastaju iz novosintetisanog kolagena, oni se smatraju kvantitativnom merom novoformiranog kolagena tipa I. Iako ovaj tip kolagena može poticati i iz drugih izvora, veći deo ovih neskeletnih tkiva ima sporiji promet nego kosti, i vrlo malo doprinosi cirkulišućem pulu ovih propeptida, pa se oni smatraju specifičnim markerima formiranja kostiju. P1NP se u cirkulaciju oslobađa u obliku trimera, ali se brzo razlaže do monomera pod dejstvom termalne degradacije [145]. Novije generacije imunoeseja detektuju obe frakcije, tj. ukupni P1NP.

Oba propeptida se trenutno mogu meriti korišćenjem specifičnih imunoeseja (radioimunoesej, enzimimunoesej). Različite studije su pokazale dobre korelacije između serumskog P1CP i P1NP i brzine formiranja kostiju. Smatra se da P1NP ima veću dijagnostičku vrednost u metaboličkoj bolesti kostiju. Praktično, termostabilnost ovih propeptida je njihova prednost, pa tako da čuvanje i transport uzoraka ne utiču značajno na gubitak signala [143].

Malobrojne studije su ispitivale longitudinalne promene P1NP tokom trudnoće- zabeleženo je smanjenje koncentracije P1NP na početku trudnoće, i porast P1NP u kasnoj trudnoći [146,147], što se može objasniti promenama u koštanom metabolizmu, tj. porastom formiranja kostiju u kasnoj trudnoći. P1NP se smatra metabolički neaktivnim i ne postoje literaturni podaci o aktivnosti ovog fragmenta. Međutim, zbog njegove stabilnosti u serumu, i pošto je specifičan marker osteoblastne aktivnosti, postojanje eventualnih korelacija sa drugim biohemijskim parametrima, kao što su insulin, leptin, adiponektin i vitamin D, može dati odgovor na pitanje koji faktori utiču na proces formiranja kostiju u nekomplikovanoj trudnoći, kao i odgovor na pitanje da li

su potencijalni mehanizmi, kojima je kost povezana sa drugim organima kao što je pankreas i masno tkivo, specifični za osteokalcin, koji se smatra aktivnim medijatorom iz kostiju.

1.4.3. Vitamin D

Vitamin D je preprohormon, koji se sintetiše u koži iz prekursora 7-dehidroholesterol, a 10% potiče iz hrane. Postoji u dva oblika- vitamin D₂ (ergosterol) i D₃ (holekalciferol). Ljudski organizam može da metaboliše oba oblika, ali de novo sintetiše samo D₃. Pod dejstvom ultravioletnog B zračenja, 7-dehidroholesterol u koži postaje previtamin D₃, koji zatim termalnom reakcijom izomerizuje u vitamin D₃. Bez ove reakcije, npr. u nedostatku svetlosti određene talasne dužine, povećavaju se potrebe organizma za dijetarnim izvorom vitamina D [148]. On je u cirkulaciji najvećim delom vezan za vitamin D vezujući protein (VDBP). U jetri dolazi do konverzije u 25-hidroksi vitamin D (25(OH)D) pod dejstvom enzima 25-hidroksilaze, a konačna aktivacija se odvija u bubregu dejstvom enzima 1 α -hidroksilaze, i nastaje aktivni metabolit 1,25-dihidroksi vitamin D (1,25(OH)₂D). Takođe može doći i do ekstrarenalne hidroksilacije 25(OH)D, npr. u placenti [149]. Svoja dejstva ostvaruje vezivanjem za intracelularni receptor (VDR). Njegova glavna dejstva su povećanje apsorpcije kalcijuma u crevima, povećanje reapsorpcije kalcijuma u bubrezima i regulacija sekrecije PTH negativnom povratnom spregom, što su sve komponente homeostaze kalcijuma u organizmu [148]. Osim ovih dejstava, smatra se da ima ulogu i u karcinogenezi, prevenciji kardiovaskularnih bolesti i DM, kao i u imunskom odgovoru [150].

Iako je 1,25(OH)₂D aktivni metabolit, ipak se smatra da je koncentracija 25(OH)D u serumu najbolji pokazatelj statusa vitamina D u organizmu, s obzirom da je to glavna cirkulišuća forma vitamina D i da najbolje korelira sa kliničkim ishodima nevezanim za regulaciju kalcijuma [151].

Veliki broj studija je ustanovio široku rasprostranjenost insuficijencije vitamina D kod trudnica u različitim populacijama [152–154], a u jednom istraživanju u Srbiji zabeleženo je da 77% normotenzivnih trudnica ima deficijenciju vitamina D [155].

Kao što je već napomenuto, nivo $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ raste u trudnoći [106], i smatra se da povećava intestinalnu apsorpciju kalcijuma, ali ipak neki autori smatraju da da u procesu povećane intestinalne apsorpcije kalcijuma ključnu ulogu ne igra vitamin D već hormoni sa laktogenim dejstvom [107]. Postoji i hipoteza da lokalno sintetisani $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ delujući imunomodulatorno, omogućava uspešnu implantaciju i rast fetoplacentalne jedinice [156]. Pokazano da deluje na adaptivni imunitet, tako što potencira Th2 odgovor, a suprimira Th1 odgovor [157], indukuje imunosupresivne regulatorne T ćelije [158], i deluje antiinflamatorno [149], što sve doprinosi uspešnoj implantaciji i održavanju fetoplacentalne jedinice.

Epidemiološki podaci su pokazali da trudnice sa GDM imaju niži nivo $25(\text{OH})\text{D}$ u odnosu na trudnice sa normalnim metabolizmom glukoze [159]. Pokazano je i da je deficijencija vitamina D u ranoj trudnoći značajno povezana sa povećanim rizikom od razvoja GDM [160,161]. Nizak nivo vitamina D u trudnoći je povezan i sa preeklampsijom [162–164]. Molekularni mehanizmi ekstraskelernih dejstava vitamina D su kompleksni i nedovoljno ispitani. Rezultati eksperimenata idu u prilog tvrdnji da vitamin D utiče na sekreciju i efekte insulina na ciljna tkiva. On dovodi do povećanja sekrecije insulina, verovatno tako što utiče na intracelularnu koncentraciju kalcijuma [165], a takođe promoter gena za insulin u svom sastavu ima vitamin D responsivne elemente, pa se smatra da utiče na ekspresiju ovog gena [166]. Nasuprot tome, pokazano je da deluje direktno na adipocite pacova tako što smanjuje preuzimanje glukoze posredovano insulinom [167].

Smatra se da vitamin D ima i antiinflamatorna svojstva, pa se i time objašnjava njegov protektivni efekat u razvoju dijabetesa [165]. Ova antiinflamatorna dejstva se ogledaju u činjenici da on inhibira oslobađanje $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1, IL-8, ciklooksigenaze-2 itd. iz monocita pacijenata sa DM2 [168]. Takođe, inhibira sintezu prostaglandina, a utiče i na druge intracelularne puteve koji su uključeni u inflamaciju [165].

U okviru promotera BGLAP gena koji kodira osteokalcin kod ljudi postoje vitamin D responsivni elementi, i vitamin D stimuliše produkciju osteokalcina [169]. Kako bi ispitali dejstva osteokalcina na metabolizam glukoze u trudnoći, s

pretpostavkom da je u ovaj proces istovremeno uključen i vitamin D, Tabatabei i saradnici [136] su ispitivali povezanost vitamina D, osteokalcina i pojave GDM. U njihovom istraživanju, osteokalcin i vitamin D nisu bili u značajnoj korelaciji. Treba napomenuti da, za razliku od rezultata drugih istraživanja, trudnice sa GDM nisu imale statistički značajno niže koncentracije vitamina D.

I pored rastućeg broja ispitivanja koja se bave povezanošću vitamina D i ishoda trudnoće, njegova dejstva još uvek nisu u potpunosti rasvetljena. Tumačenje rezultata je dodatno otežano činjenicom da na njegovu koncentraciju utiču godišnje doba i geografski region ispitanika, ishrana i upotreba suplemenata.

2. Ciljevi

1. Ispitati longitudinalne promene u parametrima za procenu insulinske rezistencije - koncentraciji insulina i vrednostima HOMA-IR i HOMA-%B indeksa, tokom trudnoće i posle porođaja.

2 Ispitati longitudinalne promene u koncentraciji adipocitokina- leptina i adiponektina tokom trudnoće i posle porođaja.

3. Ispitati longitudinalne promene u koncentraciji osteokalcina i P1NP tokom trudnoće i posle porođaja.

4. Ispitati longitudinalne promene 25(OH)D kao markera za procenu statusa vitamina D u organizmu, tokom trudnoće i posle porođaja.

5. Ispitati longitudinalne promene parametara lipidnog i redoks statusa tokom trudnoće i posle porođaja.

6. Ispitati povezanost adipocitokina leptina i adiponektina sa parametrima insulinske rezistencije, sa ciljem da se rasvetli molekularni mehanizam nastanka fiziološke insulinske rezistencije tokom trudnoće. Takođe ispitati povezanost ovih adipocitokina sa parametrima lipidnog statusa, redoks statusa i parametrima formiranja kostiju, kako bi se ispitaio uticaj masnog tkiva na energetski metabolizam, oksidativni stres i koštani promet u nekomplikovanoj trudnoći.

7. Ispitati povezanost osteokalcina i P1NP sa parametrima insulinske rezistencije, adiponektinom i leptinom, kao i sa parametrima lipidnog statusa i redoks statusa, kako bi se utvrdilo da su eventualna dejstva na metabolizam glukoze i druga dejstva specifična za osteokalcin, ali ne i za druge proizvode koji se oslobađaju u procesu formiranja kostiju, kao što je P1NP.

3. Materijal i metode

3.1. Ispitanice

Ovo istraživanje je dizajnirano kao longitudinalna studija. Trudnice su uključene u studiju tokom prve prenatalne posete biohemijskoj laboratoriji Poliklinike Medilab u Čačku radi prenatalnog laboratorijskog screeninga.

Sve ispitanice su dale pismeni pristanak za učešće u studiji, a istraživanje je izvršeno uz dozvolu Etičkog odbora Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od svake učesnice je uzeta kompletna medicinska istorija, uključujući postojeća oboljenja, pušački status i navike u ishrani. Gestaciona starost je utvrđivana na osnovu datuma poslednje menstruacije ili ultrazvučnim pregledom.

U studiju je inicijalno bilo uključeno 68 trudnica. Kriterijumi za isključivanje su bili prisustvo hroničnih bolesti pre trudnoće, redovno uzimanje lekova, blizanačka trudnoća ili pojava neke komplikacije ili poremećaja u trudnoći. Od ukupnog broja iz studije je isključeno 30 trudnica: 22 trudnice su svojevolumeno odustale od studije u različitim etapama, dve su razvile GDM, četiri su se prevremeno porodile i dve su imale spontani pobačaj. U studiji je ukupno preostalo 38 trudnica koje su trudnoću iznele do kraja i došle na kontrolu posle porođaja. Među njima je bilo 21 nulipara, 11 primipara i 6 multipara. Sve su se porodile vaginalnim putem ili elektivnim carskim rezom. Sva novorođenčad su bila zdrava i normalne veličine.

Trudnice su tokom trudnoće bile na preporučenom adekvatnom režimu ishrane i sve su uzimale vitaminsku suplementaciju po savetu lekara, koja je u proseku sadržala 200-300 mg kalcijuma, 15 mg cinka, 17 mg gvožđa, 400 µg folne kiseline, 400 IU vitamina D, 70 mg vitamina C, 3 mg tiamina, 2 mg riboflavina, 20 mg niacina, 6 µg vitamina B12 i 10 mg vitamina E. Sve ispitanice su bile nepušači.

Uzorkovanje je bilo planirano u pet poseta (tačaka): u prvom trimestru (T1, medijana 13. nedelja trudnoće), drugom trimestru (T2, medijana 24. nedelja trudnoće), početkom trećeg trimestra (T3, medijana 29. nedelja trudnoće), u kasnom trećem

trimestru (T4, medijana 36. nedelja trudnoće) i najmanje četiri nedelje posle porođaja (T4, medijana 5 nedelja posle porođaja).

Uzorkovanje je vršeno posle noćnog gladovanja (>10h), u serumsku epruvetu i epruvetu sa antikoagulansom EDTA. Zatim su uzorci centrifugirani na 1500g 10 min, podeljeni u alikvote od 200 μ L, zamrznuti na -80°C i čuvani do analiziranja, osim za merenja koja su vršena odmah (glukoza, ukupni proteini, mokraćna kiselina, CRP, aspartat aminotransferaza, alanin aminotransferaza, lipidni status i kompletna krvna slika).

3.2. Metode

1. Antropometrijski podaci:

Kod prve posete ispitanicama je zabeležena starost, gestaciona starost, izmerena visina i težina, za izračunavanje indeksa telesne mase (ITM, telesna masa,kg/visina,m²) i izmeren krvni pritisak. Kod svake sledeće posete zabeležena je gestaciona starost i izmerena težina i krvni pritisak.

2. Biohemijski i hematološki parametri

Glukoza, ukupni proteini, mokraćna kiselina, aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT), ukupni holesterol, trigliceridi, HDL-holesterol su mereni odmah, korišćenjem komercijalnih reagenasa na biohemijskom analizatoru Roche Cobas c311 (Roche Diagnostics, Manhajm, Nemačka). CRP je takođe meren odmah, korišćenjem komercijalnog reagensa na biohemijskom analizatoru Roche Cobas c311 (Roche Diagnostics, Manhajm, Nemačka) metodom imunoturbidimetrije.

LDL holesterol je izračunat korišćenjem Friedewaldove formule:

LDL holesterol (mmol/L) = ukupni holesterol (mmol/L) – HDL holesterol (mmol/L) – trigliceridi (mmol/L)/2.22 (136)

Kompletna krvna slika- broj leukocita, eritrocita, trombocita, hemoglobin, zapremina eritrocita (MCV), prosečna količina hemoglobina u eritrocitima (MCH), prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC) je određena na hematološkom brojaču ABX Pentra 80 (Horiba Medical, Monpelje, Francuska).

3. Parametri insulinske rezistencije

Insulin je određivan „sendvič“ metodom elektrohemiluminiscencije (ECLIA), korišćenjem komercijalnih reagenasa na imunoanalizatoru Cobas e411 (Roche Diagnostics, Manhajm, Nemačka). Prvi korak je inkubacija u toku koje insulin iz uzorka formira „sendvič“ kompleks sa specifičnim monoklonskim insulin-antitelom za koje je vezan biotin i drugim specifičnim monoklonskim insulin-antitelom koje je obeleženo rutenijumom. Posle dodatka mikročestica obloženih streptavidinom, „sendvič“

kompleks se vezuje za čvrstu fazu posredstvom veze streptavidin-biotin. Reakciona smeša se aspirira u mernu ćeliju gde se mikročestice vezuju magnetnim silama na površinu elektrode, a nevezane supstance se isperu. Protok struje kroz elektrodu indukuje hemiluminiscenciju koja se meri i koja je direktno srazmerna koncentraciji insulina u uzorku.

Za procenu insulinske rezistencije korišćeni su HOMA indeksi izračunati po sledećim formulama:

$$\text{HOMA-IR} = (\text{glukoza} \times \text{insulin}) / 22.5$$

$\text{HOMA-\%B} = (20 \times \text{insulin}) / (\text{glukoza} - 3.5)$, gde je glukoza izražena u mmol/L, a insulin u mU/L (134).

4. Adipocitokini

Leptin je određivan pomoću komercijalnog ELISA kita proizvođača DRG Instruments, Marburg, Nemačka. U ovom „sendvič“ ELISA imunoeseju, monoklonsko antitelo specifično za jedinstveni domen na molekulu leptina je imobilisano na mikroploču. Uzorak sa endogenim leptinom se inkubira zajedno sa specifičnim monoklonskim antitelom na leptin za koje je vezan biotin. Na taj način se formira sendvič. Nakon inkubacije, nevezane supstance se uklanjaju ispiranjem, i dodaje se kompleks streptavidin-peroksidaza-enzim. Po dodatku supstrata, dolazi do razvoja boje čiji intenzitet je srazmeran koncentraciji leptina u uzorku.

Adiponektin je određivan pomoću Human Adiponectin/Acrp30 Immunoassay, Quantikine, R&D systems, Mineapolis, Minesota, SAD. U ovom kvanitativnom „sendvič“ imunoeseju, monoklonsko antitelo specifično za globularni domen humanog adiponektina je imobilisano na ELISA mikroploču. Dodatkom standarda i uzoraka, dolazi do vezivanja prisutnog adiponektina za imobilisano antitelo. Nakon ispiranja nevezanih supstanci, dodaje se monoklonsko antitelo specifično za globularni domen adiponektina koje je obeleženo enzimom. Nakon ispiranja kojim se uklanja nevezani reagens, dodaje se supstrat. Dolazi do razvoja boje, čiji je intenzitet srazmeran

koncentraciji adiponektina. Nakon dodatka reagensa za zaustavljanje reakcije, intenzitet boje se meri spektrofotometrijski.

5. Parametri koštanog prometa

Osteokalcin i ukupni prokolagen tip 1 N-terminalni propeptid (P1NP) su određivani „sendvič“ metodom elektrohemiluminiscencije (ECLIA), korišćenjem komercijalnih reagenasa na imunoanalizatoru Cobas e411 (Roche Diagnostics, Manhajm, Nemačka).

25-hidroksi-vitamin D (25(OH)D) je određivan kompetitivnom metodom elektrohemiluminiscencije (ECLIA), korišćenjem komercijalnih reagenasa na imunoanalizatoru Cobas e411 (Roche Diagnostics, Manhajm, Nemačka). Metoda koristi vitamin D-vezujući protein (VDBP) kao protein-hvatač koji vezuje i 25(OH)D₃ i 25(OH)D₂. U prvom koraku se uzorak inkubira sa ditiotreitolum i natrijum-hidroksidom kako bi se raskinule veza 25(OH)D sa VDBP. Sledeći korak je inkubacija sa VDBP koji je obeležen rutenijumom pri čemu 25(OH)D stvara kompleks sa obeleženim VDBP. Sledeći korak je dodavanje mikročestica obloženih streptavidinom i 25(OH)D vezanog za biotin. 25(OH)D obeležen biotinom vezuje se za slobodna mesta na VDBP koji je obeležen rutenijumom i nastali kompleks se vezuje za čvrstu fazu. Reakciona smeša se aspirira u mernu ćeliju gde se mikročestice vezuju magnetnim silama na površinu elektrode, a nevezane supstance se isperu. Protok struje kroz elektrodu indukuje hemiluminiscenciju koja se meri i koja je obrnuto srazmerna koncentraciji 25(OH)D u uzorku.

6. Parametri oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Određivanje totalnog oksidativnog statusa (TOS)

Glavne komponente TOS sistema u serumu su prisutni H₂O₂ i lipidni hidroperoksidi. Ukupni oksidansi prisutni u uzorku oksiduju fero jon–orto-dianizidni kompleks u feri jon. Glicerol koji je prisutan u reakcionom medijumu olakšava reakciju oksidacije. Nastali feri jon gradi obojeni kompleks sa ksilenol-oranžom u kiseloj sredini. Intenzitet boje se meri spektrofotometrijski ($\lambda = 560$ nm) i proporcionalan je

ukupnom sadržaju oksidacionih molekula u uzorku. Kao standard koristi se vodeni rastvor vodonik-peroksida opsega koncentracije 10-200 $\mu\text{mol/L}$, što odgovara linearnosti metode i očekivanim koncentracijama u biološkom materijalu [170].

Određivanje totalnog antioksidativnog statusa (TAS)

Totalni antioksidativni status određen je kolorimetrijskim testom uz upotrebu stabilnog hromogena, 2,2'- azinobis- (3-etilbenzotiazolin)-6- sulfonska kiselina (ABTS⁺) katjona, metodom koju je formulisao Erel [171], uz određene modifikacije. Sam rastvor ABTS-a je bezbojan. Oksidacijom do ABTS⁺ katjona, pomoću vodonik-peroksida u kiseloj sredini (acetatni pufer; pH=3,6) rastvor dobija smaragdu boju. Kada se obojeni ABTS⁺ jon pomeša sa nekom supstancom koja može da se oksiduje (antioksidans), redukuje se do bezbojnog ABTS-a, što se manifestuje obezbojavanjem ispitivanog rastvora. Smanjenje intenziteta boje srazmeran je koncentraciji prisutnih ukupnih antioksidanasa u uzorku. Apsorbancije ispitivanih rastvora merene su pomoću ELISA čitača (Pharmacia LKB, Beč, Austrija) na talasnoj dužini od 660 nm nakon inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi (ili 5 minuta na 37°C). Reakcije se izvode na ELISA ploči (koja ima 96 mesta) čime je postupak izvođenja u značajnoj meri olakšan. Modifikacija metode izvršena je prilagođavanjem preporučenih zapremina standardnim zapreminama ELISA ploče.

Koncentracija prisutnih antioksidanasa u uzorku određuje se upotrebom standardne krive. Najčešće upotrebljavani standard je Trolox, hidrosolubilni ekvivalent vitamina E. Kako se on teško rastvara u vodi, za pripremu rastvora korišćen je 30 mmol/L fosfatni pufer, pH=7,4. Dobijeni rezultati izražavaju se u mmol Trolox ekvivalenta/L.

Određivanje prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB)

PAB testom se određuje koncentracija vodonik-peroksida (H_2O_2) u antioksidativnom okruženju, modifikovanom metodom po Alamdariju [172]. Hromogen 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) reaguje i sa vodonik-peroksidom i sa antioksidansima (mokraćnom kiselinom) u isto vreme, s obzirom da se nalaze u uzorku istovremeno. Reakcija H_2O_2 i hromogena je enzimski katalizovana enzimom

peroksidazom, pri čemu oksidovanjem TMB-a nastaje intenzivno plavo obojeni proizvod. Za razliku od toga reakcija mokraćne kiseline i hromogena je nekatalizovana, hemijska reakcija u kojoj se TMB katjon redukuje do bezbojnog proizvoda. Intenziteti boje standardnih rastvora su srazmerni odnosu dodatih količina H_2O_2 i mokraćne kiseline. Kapacitet prisutnih antioksidanasa se kalibriše prema mokraćnoj kiselini i izražava u $\mu\text{mol/L}$ mokraćne kiseline, a kapacitet prooksidanasa se kalibriše prema H_2O_2 i izražava u $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 . Za pravljenje standardne krive se koriste rastvori H_2O_2 i mokraćne kiseline u različitim odnosima, tako da na početku dominira mokraćna kiselina, a na kraju H_2O_2 . Ove dve komponente su izabrane za predstavnike prooksidanasa i antioksidanasa jer ne reaguju jedna sa drugom i ne ometaju aktivnost jedna drugoj prema hromogenu.

Metoda je spektrofotometrijska, a za merenje apsorbancija korišćen je ELISA čitač (Pharmacia LKB, Beč, Austrija). Reakcija se izvodi na ELISA ploči. Na osnovu apsorbancija koje se dobijaju u standardnim rastvorima konstruiše se kalibraciona kriva iz koje se očitavaju koncentracije uzoraka.

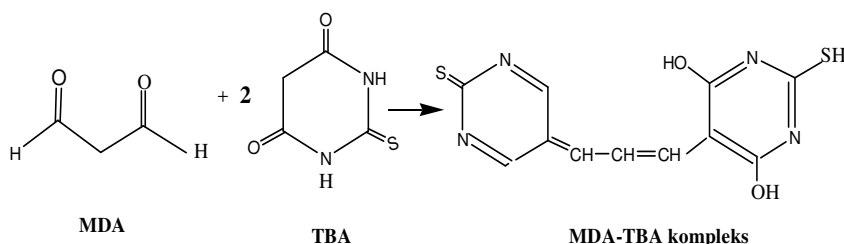
Vrednosti PAB-a se izražavaju u arbitrarnim jedinicama-HKU (hidrogen-peroksid komplementarne jedinice), koje predstavljaju procenat H_2O_2 u standardnim rastvorima pomnožen sa 6.

Modifikacija metode je izvršena prilagođavanjem zapremine uzorka, standardnih rastvora, slepe probe i reagenasa standardnim zapreminama bazena ELISA ploče i povećanjem količine enzima peroksidaze u radnom rastvoru. Time je omogućeno dobijanje linearne zavisnosti između koncentracije i apsorbancije prilikom izrade kalibracione krive.

Određivanje koncentracije tiobarbiturna kiselina reagujućih supstanci (TBARS)

Koncentracija tiobarbiturna kiselina-reagujuće supstance (TBARS) se određuje spektrofotometrijskim testom koji se zasniva na apsorpcionom maksimumu kompleksa malondialdehida i ostalih TBARS sa tiobarbiturnom kiselinom na 535 nm, čiji je

molarni apsorpcioni koeficijent $1,56 \times 10^5$ L/mol/cm. Princip ove metode se zasniva na sledećoj reakciji:



Izračunavanje koncentracije TBARS se vrši upotrebom molarnog apsorpcionog koeficijenta $1,56 \times 10^5$ L \times mol⁻¹ \times cm⁻¹ nastalog kompleksa između TBARS i tiobarbiturne kiseline [173].

Određivanje ukupnog sadržaja sulfhidrilnih (SH) grupa

Ukupni sadržaj sulfhidrilnih grupa u plazmi se određuje Ellman-ovom metodom [174]. Ova metoda se zasniva na reakciji 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzoeve kiseline (DTNB) sa alifatičnim tiolnim jedinjenjima u baznoj sredini (pH 9,0), pri čemu se stvara jedan mol p-nitrofenol anjona po jednom molu tiola, a intenzitet reakcije se meri spektrofotometrijski na 412 nm. Ukupan sadržaj SH grupa određivan je na automatskom analizatoru Ilab 300+ (Instrumentation Laboratory, Milano, Italija).

Koncentracija ukupnog sadržaja SH grupa u plazmi izračunava se preko molarnog apsorpcionog koeficijenta p-nitrofenola na 412 nm, koji za date uslove ima vrednost od 13600 L \times mol⁻¹ \times cm⁻¹.

$$\text{SH grupe, mmol/L} = \frac{A_A}{\epsilon} \times \frac{V_{uk}}{V_{uz}} \times 1000$$

gde su

$$\epsilon = 13\,600 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$$

V_{uk} - ukupna zapremina (0,97 mL)

V_{uz} - zapremina uzorka (0,05 mL)

3.3. Statistička obrada podataka

Podaci su prikazani kao srednja vrednost i SD (standardna devijacija) za normalno distribuirane varijable, i kao geometrijska sredina i 95-ti intervali pouzdanosti, ukoliko vrednosti nisu bile normalno distribuirane, ali su nakon logaritmovanja sledile normalnu raspodelu [175]. Provera tipa raspodele kontinuiranih podataka rađena je upotrebom Kolmogorov-Smirnov testa.

Poređenje kontinuiranih varijabli je izvršeno analizom varijanse (ANOVA) sa ponovljenim merenjima sa post hoc Bonferroni korekcijom.

Provera postojanja značajnih korelacionih odnosa između ispitivanih varijabli vršena je Spearman-ovom neparametarskom korelacionom analizom. Multipla regresiona analiza je korišćena za identifikaciju nezavisnih faktora uticaja na pojedine promenljive.

Minimalan uslov za postojanje statistički značajne razlike je bio kada je verovatnoća (p , nivo značajnosti) bio manji ili jednak 0,05.

Statistička obrada posataka vršena je korišćenjem programa MS Excel i MedCalc (MedCalc Statistical Software version 15.6, Ostende, Belgium).

4. Rezultati istraživanja

4.1. Demografske karakteristike ispitanica

U ispitivanju je učestvovalo 38 zdravih trudnica prosečne starosti $29,4 \pm 4,49$ godina. Prema klasifikaciji Svetske zdravstvene organizacije [176], sve su pre trudnoće bile negojazne, tj. imale su $ITM < 30$, od toga 28 trudnica (73,7%) je imalo ITM u granicama optimalnih vrednosti ($18,5 < ITM < 24,9$), 4 (10,5%) su bile pothranjene ($ITM < 18,5$), a 6 (15,8%) je imalo prekomernu težinu ($25,0 < ITM < 30,0$). Srednja vrednost ITM pre trudnoće je bila $21,8 \pm 3,20$.

Tabela 1. Promene ITM i dobijanje u težini tokom trudnoće i posle porođaja (srednja vrednost \pm SD)

Parametar	T1	T2	T3	T4	T5
ITM	$22,3 \pm 0,56$	$23,4 \pm 0,55$	$24,8 \pm 0,54$	$26,5 \pm 0,51$	$23,9 \pm 0,54$
Dobijanje u težini, kg	$1,4 \pm 0,99$	$4,5 \pm 2,17$	$8,4 \pm 3,09$	$13,2 \pm 2,82$	$5,8 \pm 3,87$
Dobijanje u težini, %	$2,1 \pm 1,41$	$7,5 \pm 3,87$	$13,9 \pm 6,00$	$21,9 \pm 6,51$	$9,6 \pm 6,41$

Kako je očekivano, tokom trudnoće dolazi do kontinuiranog porasta telesne težine. Posle porođaja dolazi do gubitka telesne težine, ali je ona još uvek viša nego pre trudnoće.

Vrednosti sistolnog i dijastolnog pritiska kod svih trudnica bile su optimalne tokom celog perioda trudnoće (tabela 2).

Tabela 2. Vrednosti sistolnog (SBP) i dijastolnog (DBP) pritiska tokom trudnoće i posle porođaja (srednja vrednost \pm SD)

Parametar	T1	T2	T3	T4	T5
SBP, mm Hg	109,1 \pm 9,6	110,2 \pm 9,5	112,4 \pm 8,6	112,0 \pm 9,6	115,8 \pm 9,4
DBP, mm Hg	70,8 \pm 9,5	71,3 \pm 7,8	71,0 \pm 8,6	70,1 \pm 7,5	74,3 \pm 8,3

Sve trudnice su izvele trudnoću do kraja, porodile se u terminu i rodile zdravu decu koja su dobila visoke ocene na rođenju, a čije su karakteristike prikazane u tabeli 3.

Tabela 3. Termin porođaja i karakteristike novorođenčadi (srednja vrednost \pm SD)

Nedelja trudnoće na porođaju	Pol (M/Ž)	Težina novorođenčadi (g)	Dužina novorođenčadi (cm)	Obim glave novorođenčadi (cm)	Apgar score
39,4 \pm 2,0	25/13	3372,1 \pm 534,4	50,6 \pm 2,13	34,6 \pm 1,24	8,6 \pm 0,81

4.2. Biohemijski i hematološki parametri tokom trudnoće i posle porođaja

Vrednosti osnovnih biohemijskih i hematoloških parametara tokom trudnoće i posle porođaja prikazani su u tabelama 4, 5 i 6. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD, a kod podataka koji ne slede normalnu raspodelu, rezultati su prikazani kao geometrijska sredina i 95-ti interval pouzdanosti.

Tokom trudnoće došlo je do blagog porasta ukupnog broja leukocita, i njihovog pada posle porođaja. Koncentracija hemoglobina, broj eritrocita i hematokrit su pokazali smanjenje što je posledica fiziološke dilucione anemije tokom trudnoće, a posle porođaja je došlo do porasta njihovih vrednosti. Kako tokom normalne trudnoće ne dolazi do značajnih promena morfologije eritrocita, nije bilo značajnih promena u eritrocitnim indeksima (tabela 4).

Kao što je i očekivano, tokom trudnoće je došlo do smanjenja koncentracije proteina usled hemodilucije, pa su koncentracije u drugom i trećem trimestru značajno niže u odnosu na koncentracije u prvom trimestru i posle porođaja. Aktivnosti enzima AST i ALT tokom trudnoće su bile niže u odnosu na vrednosti posle porođaja (tabela 5). Koncentracija CRP-a je značajno porasla u drugom trimestru, a promene kasnije u toku trudnoće nisu bile statistički značajne. Posle porođaja, vrednosti CRP-a su bile značajno niže u odnosu na T2 i T3. Koncentracija mokraćne kiseline je progresivno rasla tokom trudnoće, najveće vrednosti imala pred porođaj, i ostala na tako visokom nivou i posle porođaja (tabela 5).

Koncentracija ukupnog holesterola je bila statistički značajno viša u drugom trimestru u odnosu na prvi trimestar (tabela 6). Na početku trećeg trimestra došlo je do daljeg porasta njegove koncentracije. Vrednosti pred porođaj su i dalje bile značajno više od vrednosti iz prva dva trimestra. Nakon porođaja je uočen pad u koncentraciji holesterola, ali je ona ipak bila i dalje statistički značajno viša u poređenju sa prvim trimestrom. Sličan trend je pokazao i nivo triglicerida, s tim što su vrednosti pre porođaja bile značajno više i od vrednosti na početku trećeg trimestra. Posle porođaja je došlo do pada koncentracije triglicerida do vrednosti koje nisu bile značajno različite od

vrednosti dobijenih u prvom trimestru. Promene u koncentraciji LDL-holesterola su bile vrlo slične promenama u koncentraciji ukupnog holesterola, odnosno došlo je do značajnog porasta njegove koncentracije u drugom trimestru, a najviše vrednosti su zabeležene u trećem trimestru. Posle porođaja je došlo do smanjenja njegove koncentracije, ali je ona i dalje bila viša u odnosu na prva dva trimestra. Koncentracija HDL-holesterola u drugom trimestru i na početku trećeg trimestra bila je značajno viša u odnosu na prvi trimestar. Posle porođaja je došlo do značajnog pada u njegovoj koncentraciji, pa je vrednost bila značajno niža u odnosu na sve izmerene vrednosti tokom trudnoće (tabela 6).

Tabela 4: Vrednosti hematoloških parametara tokom trudnoće i posle porođaja

Parametar	T1	T2	T3	T4	T5
Leukociti, x 10 ⁹	7,9 ± 1,54	8,5 ± 1,74	9,0 ± 1,92	9,2 ± 1,92	6,1 ± 1,24
Eritrociti, x 10 ¹²	4,1 ± 0,29	3,8 ± 0,32	3,7 ± 0,30	3,8 ± 0,26	4,4 ± 0,31
Hemoglobin, g/L	122,0 ± 7,78	116,1 ± 8,38	110,9 ± 9,44	111,8 ± 10,25	126,4 ± 9,82
Hematokrit	0,37 ± 0,025	0,36 ± 0,025	0,34 ± 0,026	0,35 ± 0,028	0,39 ± 0,028
MCV, fL	91,2 ± 5,57	92,9 ± 5,33	93,8 ± 5,09	91,8 ± 6,55	89,1 ± 5,17
MCH, pg	29,8 ± 1,81	30,3 ± 1,53	30,1 ± 1,81	29,6 ± 2,45	28,9 ± 1,91
MCHC, g/L	326,3 ± 6,31	326,2 ± 7,82	321,4 ± 5,40	321,7 ± 6,97	324,3 ± 6,22
Trombociti, x 10 ⁹	230 ± 45,3	225 ± 37,3	227 ± 35,3	221 ± 48,1	254 ± 46,1
MPV, fL	8,4 ± 0,80	8,3 ± 0,71	8,4 ± 0,84	8,5 ± 0,79	8,4 ± 0,87

Tabela 5: Vrednosti biohemijskih parametara tokom trudnoće i posle porođaja

Parametar	T1	T2	T3	T4	T5	p
Ukupni proteini, g/L	68,8 ± 3,43	64,1 ± 3,57 ^{a*}	62,4 ± 3,12 ^{a*}	62,0 ± 3,19 ^{a*}	70,9 ± 3,89 ^{b*,c*,d*}	<0,001
AST, U/L	16 ± 4,1	16 ± 4,6	16 ± 4,2	18 ± 5,8	21 ± 5,7 ^{a*, b*, c*,d*}	<0,001
ALT, U/L	15 ± 9,4	15 ± 8,5	14 ± 5,8	14 ± 6,0	25 ± 11,6 ^{a*, b*, c*,d*}	<0,001
Glukoza, mmol/L	4,7 ± 0,07	4,5 ± 0,06	4,6 ± 0,10	4,8 ± 0,11	4,8 ± 0,07 ^{b*}	<0,05
CRP, mg/L	2,2 (1,6 – 3,1)	3,2 (2,5 – 4,2) ^{a*}	2,9 (2,1 – 3,8)	2,6 (2,0 – 3,5)	1,6 (1,0 – 2,3) ^{b*, c*}	<0,001
Mokraćna kiselina, μmol/L	174 ± 5,7	187 ± 6,3 ^{a*}	207 ± 5,8 ^{a*, b*}	239 ± 7,2 ^{a*, b*, c*}	262 ± 8,0 ^{a*, b*, c*}	<0,001

^asrednja vrednost značajno različita od prvog trimestra; ^b srednja vrednost značajno različita od drugog trimestra; ^c srednja vrednost značajno različita od trećeg trimestra; ^d srednja vrednost značajno različita od vrednosti pred porođaj

* P<0,05, & P<0,001

Tabela 6: Vrednosti parametara lipidnog statusa tokom trudnoće i posle porođaja

Parametar	T1	T2	T3	T4	T5	p
Ukupni holesterol, mmol/L	4,6 ± 0,10	5,3 ± 0,13 ^a	6,5 ± 0,16 ^{a, b}	6,6 ± 0,18 ^{a, b}	5,2 ± 0,17 ^{a*, c, d}	<0,001
Trigliceridi, mmol/L	0,99 (0,85-1,15)	1,37 (1,19-1,59) ^a	2,09 (1,79-2,43) ^{a, b}	2,74 (2,41-3,11) ^{a, b, c}	0,96 (0,80-1,17) ^{b*, c, d}	<0,001
LDL-holesterol, mmol/L	2,3 ± 0,09	2,7 ± 0,10 ^{a*}	3,5 ± 0,14 ^{a, b}	3,5 ± 0,15 ^{a, b}	3,1 ± 0,15 ^{a, b*, c*}	<0,001
HDL-holesterol, mmol/L	1,8 ± 0,06	1,9 ± 0,06 ^{a*}	2,0 ± 0,07 ^{a*}	1,8 ± 0,07	1,5 ± 0,06 ^{a, b, c, d}	<0,001

^asrednja vrednost značajno različita od prvog trimestra; ^b srednja vrednost značajno različita od drugog trimestra; ^c srednja vrednost značajno različita od trećeg trimestra; ^d srednja vrednost značajno različita od vrednosti pred porođaj

* P<0,05, & P<0,001

4.3. Longitudinalne promene u parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Parametri oksidativnog stresa su prikazani u tabeli 7. Kako ovi parametri nisu pratili normalnu raspodelu, rezultati su prikazani kao geometrijska sredina i 95-ti interval pouzdanosti.

Vrednosti TOS-a su rasle tokom trudnoće. Statistički je značajan porast u trećem trimestru. Vrednosti sa početka trećeg trimestra su bile značajno veće od vrednosti iz drugog trimestra, a visoke koncentracije su ostale i u kasnom trećem trimestru. Vrednosti posle porođaja su bile statistički značajno niže od vrednosti u kasnom trećem trimestru (tabela 7).

Vrednosti TBARS, koji je krajnji proizvod razgradnje lipidnih peroksida, pokazale su tendenciju rasta u trećem trimestru, ali je ovaj porast dostigao statističku značajnost tek u kasnom trećem trimestru. Posle porođaja je došlo do značajnog pada vrednosti TBARS u odnosu na najvišu vrednost s kraja trudnoće (tabela 7).

Tendenciju porasta tokom trudnoće su pokazale i vrednosti PAB-a, ali je samo vrednost u kasnom trećem trimestru bila statistički značajno veća od vrednosti u drugim tačkama. Posle porođaja, zabeleženo je značajno smanjenje koncentracije PAB u odnosu na sve vrednosti dobijene tokom trudnoće (tabela 7).

Vrednosti TAS-a kao markera sveukupne antioksidativne zaštite nisu pokazale statistički značajne promene tokom trudnoće, ali je posle porođaja došlo do porasta koncentracije ovog parametra. Ta vrednost je bila statistički značajno viša u odnosu na vrednosti iz prvog i drugog trimestra (tabela 7).

Koncentracija ukupnih SH grupa, kao deo neenzimskog sistema odbrane od oksidativnog stresa, takođe je pokazala značajnu promenu tokom trudnoće. Vrednost sa početka trećeg trimestra je bila značajno veća od vrednosti u drugom trimestru. Koncentracija SH grupa posle porođaja je takođe bila značajno viša u odnosu na drugi trimestar (tabela 7).

Tabela 7: Longitudinalne promene u parametrima oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite

Parametar	T1	T2	T3	T4	T5	p
TOS, $\mu\text{mol/L}$	10,3 (8,6 – 12,3)	10,6 (9,1 – 12,5)	14,1 (11,5 – 17,2) ^{b*}	16,5 (13,9 – 19,7) ^{a*,b}	10,6 (8,4 – 13,3) ^d	p<0,001
TBARS, $\mu\text{mol/L}$	2,0 (1,8 – 2,1)	2,0 (1,8 – 2,1)	2,2 (1,9 – 2,5)	2,3 (2,1 – 2,5) ^{a*,b*}	1,9 (1,7 – 2,1) ^{d*}	p<0,05
PAB, HK jedinice	29,6 (25,7 – 34,1)	32,8 (30,1 – 35,7)	35,1 (32,5 – 37,9)	38,8 (35,6 – 42,3) ^{*,b*,c*}	17,9 (16,0 – 20,1) ^{a,b,c,d}	p<0,001
TAS, mmol/L	0,67 (0,62 – 0,73)	0,66 (0,60 – 0,74)	0,72 (0,68 – 0,80)	0,73 (0,67 – 0,78)	0,76 (0,69 – 0,84) ^{a*,b*}	p<0,05
SH grupe, g/L	0,57 (0,51 – 0,63)	0,55 (0,50 – 0,61)	0,61 (0,54 – 0,69) ^{b*}	0,61 (0,55 – 0,69)	0,63 (0,56 – 0,71) ^{b*}	p<0,05

^asrednja vrednost značajno različita od prvog trimestra; ^b srednja vrednost značajno različita od drugog trimestra; ^c srednja vrednost značajno različita od trećeg trimestra; ^d srednja vrednost značajno različita od vrednosti pred porođaj

* P<0,05, & P<0,001

4.4. Longitudinalne promene u adipocitokinima i parametrima za procenu insulinske rezistencije

Vrednosti leptina i adiponektina, kao i parametara za procenu insulinske rezistencije tokom trudnoće i posle porođaja, prikazani su u tabeli 8. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD, a kod podataka koji ne slede normalnu raspodelu, rezultati su prikazani kao geometrijska sredina i 95-ti interval pouzdanosti.

Primećen je porast koncentracije leptina, koji je dostigao statističku značajnost tek u trećem trimestru, odnosno u T3 i T4. Posle porođaja je došlo do pada koncentracije leptina, pa su vrednosti bile statistički značajno niže u odnosu na vrednosti iz trećeg trimestra (tabela 8).

Iako su vrednosti koncentracije adiponektina tokom trudnoće pokazale tendenciju pada, ove promene nisu bile statistički značajne. Vrednosti posle porođaja su bile značajno niže u odnosu na vrednosti u prvom i drugom trimestru (tabela 8).

Koncentracija insulina je pokazala najvišu vrednost u kasnom trećem trimestru. Vrednosti posle porođaja su bile značajno niže od vrednosti iz prvog i kasnog trećeg trimestra. Uočljiv je rast vrednosti HOMA-IR indeksa tokom trudnoće, međutim on nije bio statistički značajan. Značajno je bilo smanjenje njegove vrednosti posle porođaja. Vrednosti HOMA-%B indeksa su statistički značajno porasle u trećem trimestru. Posle porođaja zabeležene su vrednosti koje su bile značajno niže od svih vrednosti dobijenih u trudnoći (tabela 8).

Tabela 8: Vrednosti adipocitokina i parametara za procenu insulinske rezistencije tokom trudnoće i posle porođaja

Parametar	T1	T2	T3	T4	T5	p
Leptin, ng/mL	17,3 ± 2,50	19,5 ± 1,88	28,6 ± 3,44 ^{a,b}	24,2 ± 2,15 ^b	15,0 ± 2,14 ^{c*, d}	<0,001
Adiponektin, mg/L	12,3 ± 1,03	11,9 ± 1,12	10,5 ± 1,09	10,9 ± 1,65	9,3 ± 0,66 ^{a, b}	<0,05
Insulin, μU/mL	10,3 ± 1,22	9,6 ± 0,93	15,5 ± 3,78	16,4 ± 2,44 ^{b*}	6,9 ± 0,64 ^{a*, d*}	<0,05
HOMA-IR	2,2 ± 0,29	2,0 ± 0,21	3,2 ± 0,69	3,7 ± 0,69	1,5 ± 0,16 ^{d*}	<0,001
HOMA-%B	149,6 (122,7-182,4)	170,7 (142,3-204,8)	220,8 (174,5-279,4) ^{a*}	222,8 (188,2-263,8) ^{a, b*}	97,9 (82,6-116,0) ^{a, b, c*, d*}	<0,001

^asrednja vrednost značajno različita od prvog trimestra; ^b srednja vrednost značajno različita od drugog trimestra; ^c srednja vrednost značajno različita od trećeg trimestra; ^d srednja vrednost značajno različita od vrednosti pred porođaj

* P<0,05, & P<0,001

4.5. Longitudinalne promene u parametrima koštanog prometa

Vrednosti osteokalcina, P1NP i 25(OH)D tokom trudnoće i posle porođaja prikazani su u tabeli 9. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SD, a kod podataka koji ne slede normalnu raspodelu, rezultati su prikazani kao geometrijska sredina i 95-ti interval pouzdanosti.

Koncentracija osteokalcina bila je statistički značajno niža u drugom trimestru u poređenju sa prvim trimestrom. Kasnije tokom trudnoće, uočen je porast u koncentraciji osteokalcina koji je dostigao statističku značajnost na kraju trećeg trimestra. Zanimljivo je da je nakon porođaja koncentracija osteokalcina bila statistički značajno viša u odnosu na sve tačke tokom trudnoće (tabela 9).

Koncentracija P1NP je pokazala značajan porast od početka trećeg trimestra, a zatim, u kasnom trećem trimestru, došlo je do daljeg porasta njegove koncentracije. Koncentracija posle porođaja je bila značajno viša od vrednosti u tačkama T1, T2 i T3 (tabela 9).

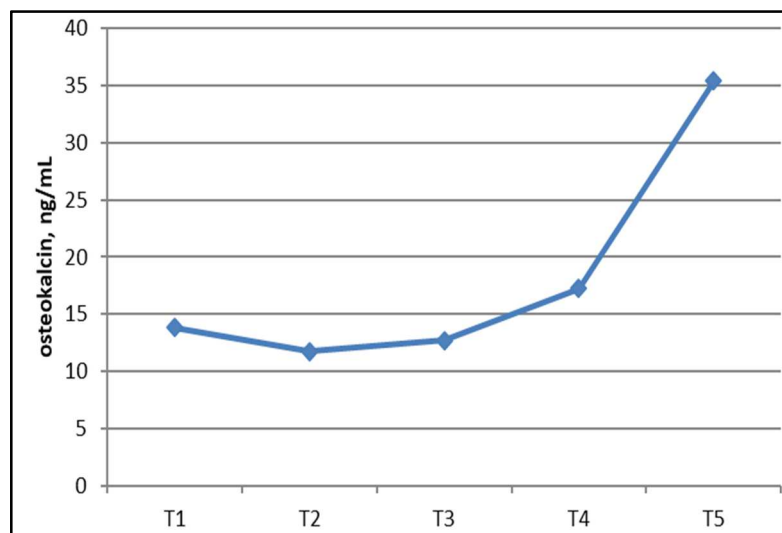
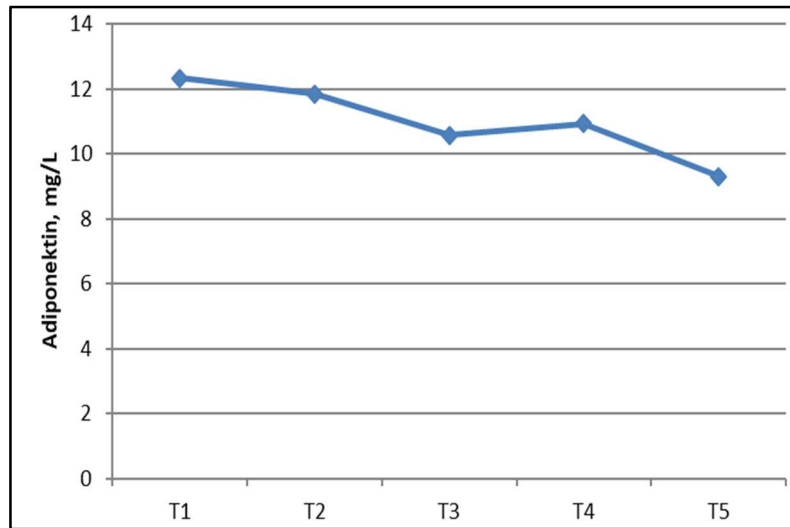
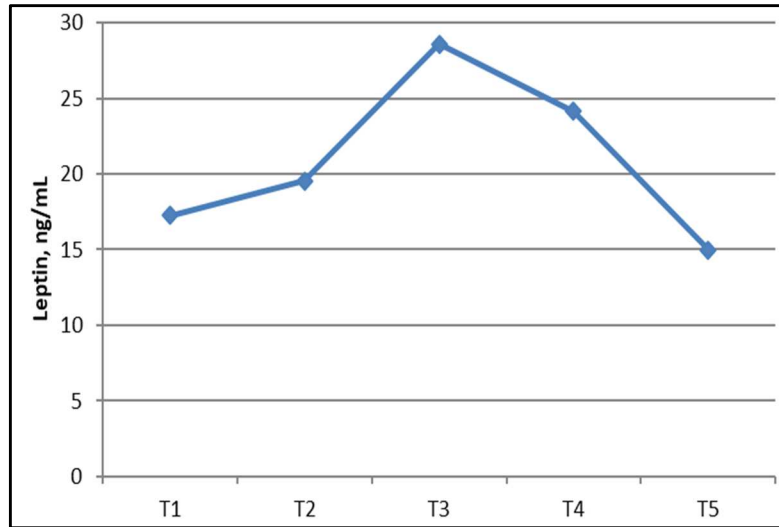
Koncentracija 25(OH)D je imala značajan porast u drugom trimestru, i održala sličan nivo na početku trećeg trimestra. U kasnom trećem trimestru došlo je do njenog značajnog pada. Vrednosti posle porođaja su bile najniže, značajno niže od vrednosti u drugom i trećem trimestru (tabela 9).

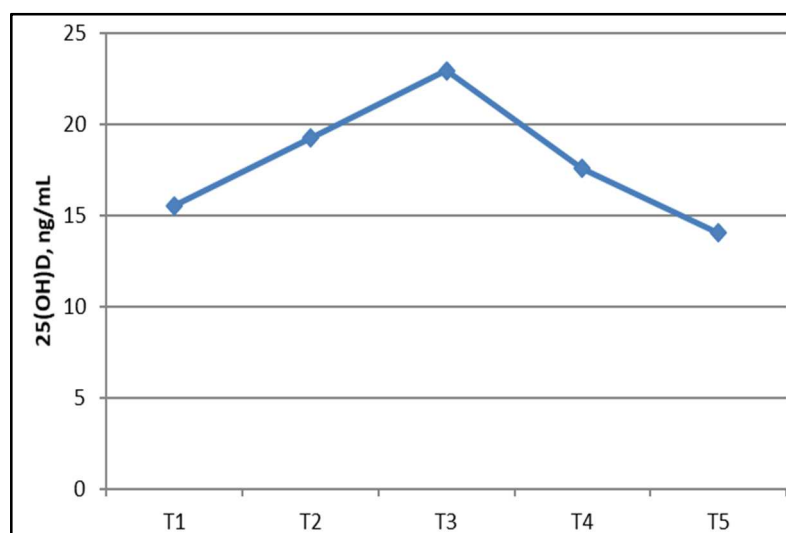
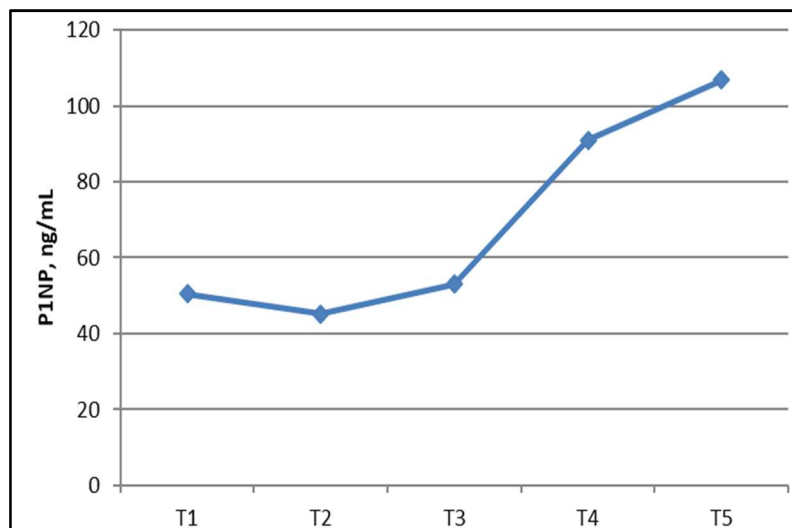
Tabela 9: Vrednosti parametara koštanog prometa tokom trudnoće i posle porođaja

Parametar	T1	T2	T3	T4	T5	p
Osteokalcin, ng/mL	13,9 ± 0,71	11,7 ± 0,49 ^a	12,7 ± 0,69	17,3 ± 0,92 ^{a,b*,c*}	35,4 ± 1,62 ^{a*,b*} c*,d*	<0.001
P1NP, ng/mL	50,5 ± 2,81	45,2 ± 2,85	53,0 ± 4,46 ^b	91,0 ± 8,23 ^{a,b*,c*}	106,8 ± 6,47 ^{a*,b*,c*}	<0.001
25(OH)D, ng/mL	15,3 (13,1 – 17,9)	19,0 (16,7 – 21,6) ^{a*}	20,4 (17,7 – 23,6) ^a	16,8 (14,4 – 19,6) ^c	12,9 (10,9 – 15,3) ^{b*,c*,d}	<0.001

^asrednja vrednost značajno različita od prvog trimestra; ^b srednja vrednost značajno različita od drugog trimestra; ^c srednja vrednost značajno različita od trećeg trimestra; ^d srednja vrednost značajno različita od vrednosti pred porođaj

* P<0,05, & P<0,001





Slika 3. Koncentracije leptina, adiponektina, osteokalcina, P1NP i 25(OH)D tokom trudnoće i posle porođaja

4.6. Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza za utvrđivanje postojanja korelacije između leptina i biohemijskih parametara u trećem trimestru

Rezultati statističke analize ANOVA sa ponovljenim merenjima su pokazali da u trećem trimestru dolazi do značajnog povećanja koncentracije leptina. Kako bi se ispitala povezanost leptina, kao produkta masnog tkiva i placente, i metabolizma glukoze i lipida, ali i inflamacije, oksidativnog stresa i procesa formiranja kostiju, primenjena je Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza.

Rezultati su prikazani u tabeli 10. Koncentracija leptina je bila u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa ITM, koncentracijom mokraćne kiseline, CRP, insulina, HOMA-IR i HOMA-%B indeksima, kao i sa koncentracijom osteokalcina, P1NP i TOS, a u negativnoj korelaciji sa koncentracijom adiponektina.

Tabela 10. Spearman-ove neparametarske korelacije između leptina i biohemijskih parametara u trećem trimestru

Parametar	ρ	p
ITM, kg/m ²	0,528	<0,05
Glukoza, mmol/L	0,289	0,079
holesterol, mmol/L	0,012	0,941
trigliceridi, mmol/L [#]	0,235	0,155
HDL-C, mmol/L	-0,146	0,382
LDL-C, mmol/L	-0,085	0,611
Mokraćna kiselina, μ mol/L	0,499	<0,05
CRP, mg/dL	0,575	<0,001
Insulin, μ IU/L	0,390	<0,05
HOMA-IR	0,443	<0,05
HOMA-%B	0,295	<0,05
Osteokalcin, ng/mL	0,393	<0,05
P1NP, ng/mL	0,506	<0,05
25(OH)D, ng/mL	0,173	0,300
TAS, mmol/L	-0,105	0,406
TOS, μ mol/L	0,302	<0,05
SH grupe, g/L	0,185	0,144
MDA, μ mol/L	0,052	0,684
PAB, HK jedinice	0,074	0,558
Adiponektin, mg/L	-0,321	<0,05

4.7. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na koncentraciju leptina u trećem trimestru

Kako je Spearmanovom neparametarskom korelacionom analizom pokazano da je veći broj parametara u značajnoj korelaciji sa koncentracijom leptina u trećem trimestru, u sledećem koraku smo ispitivali nezavisni uticaj ovih parametara na koncentraciju leptina.

Prilikom formiranja modela za multiplu regresionu analizu, leptin je označen kao zavisna promenljiva. Na osnovu Spearman-ovog koeficijenta korelacije ($p < 0,1$), kao nezavisne promenljive označeni su parametri ITM, mokraćna kiselina, CRP, HOMA-IR, osteokalcin, TOS i adiponektin. Insulin, HOMA-%B i P1NP nisu uključeni u model zbog multikolinearnosti.

Rezultati multiple regresione analize prikazani su u tabeli 11.

Tabela 11. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na koncentraciju leptina u trećem trimestru

Parametar	Leptin $R^2 = 0,247$; adjusted $R^2 = 0,165$, $p = 0,009$		
	β	SE (β)	p
ITM, kg/m^2	0,308	0,125	<0,05
Mokraćna kiselina, $\mu\text{mol/L}$	-0,017	0,136	0,899
CRP, mg/dL	0,121	0,131	0,361
HOMA-IR	-0,023	0,127	0,855
Osteokalcin, ng/mL	0,194	0,136	0,157
TOS, mmol/L	0,085	0,119	0,476
Adiponektin, mg/L	-0,121	0,119	0,313

Rezultati ove analize su pokazali da je jedino ITM nezavisno povezan sa koncentracijom leptina u trećem trimestru i da se 16,5% porasta leptina tokom trudnoće može objasniti povećanjem ITM (tj. telesne težine) trudnice tokom nekomplikovane trudnoće.

4.8. Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza za utvrđivanje postojanja korelacije između adiponektina i biohemijskih parametara u trećem trimestru

Posle ispitivanja longitudinalnih promena u koncentraciji adiponektina tokom trudnoće i posle porođaja, sledeći korak je bio Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza kako bi se ispitala povezanost adiponektina i drugih biohemijskih parametara u trećem trimestru. U trećem trimestru je koncentracija adiponektina bila najniža, iako nije bila statistički značajno niža od ostalih vrednosti, a ovaj period je odabran za korelacionu analizu i kako bi se napravilo poređenje sa korelacijama leptina u istom delu trudnoće.

Rezultati su prikazani u tabeli 12. Koncentracija adiponektina je bila u značajnoj pozitivnoj korelaciji koncentracijom HDL-holesterola, a u značajnoj negativnoj korelaciji sa ITM, koncentracijom glukoze, triglicerida, insulina, HOMA-IR indeksom, kao i sa koncentracijom osteokalcina, TOS i leptina.

Tabela 12. Spearman-ove neparametarske korelacije između adiponektina i biohemijskih parametara u trećem trimestru

Parametar	ρ	p
ITM, kg/m ²	-0,408	<0,05
Glukoza, mmol/L	-0,408	<0,05
Holesterol, mmol/L	-0,146	0,383
Trigliceridi, mmol/L	-0,557	<0,001
HDL-C, mmol/L	0,492	<0,05
LDL-C, mmol/L	-0,092	0,581
Mokraćna kiselina, μ mol/L	-0,286	0,082
CRP, mg/dL	-0,284	0,084
Insulin, μ IU/L	-0,543	<0,001
HOMA-IR	-0,390	<0,05
HOMA-B	-0,141	0,264
Osteokalcin, ng/mL	-0,387	<0,05
P1NP, ng/mL	-0,310	0,058
25(OH)D, ng/mL	0,105	0,538
TAS, mmol/L	-0,060	0,637
TOS, μ mol/L	-0,341	<0,05
SH grupe, g/L	-0,192	0,129
MDA, μ mol/L	-0,097	0,445
PAB, HK jedinice	-0,020	0,874
Leptin, ng/mL	-0,321	<0,05

4.9. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na koncentraciju adiponektina u trećem trimestru

Kako je Spearman-ovom neparametarskom korelacionom analizom pokazano da je veći broj parametara u značajnoj korelaciji sa koncentracijom adiponektina u trećem trimestru, u sledećem koraku smo ispitivali nezavisni uticaj ovih parametara na koncentraciju adiponektina.

Prilikom formiranja modela za multiplu regresionu analizu, adiponektin je označen kao zavisna promenljiva. Na osnovu Spearman-ovog koeficijenta korelacije ($p < 0,1$), kao nezavisne promenljive označeni su parametri ITM, trigliceridi, HDL-holesterol, mokraćna kiselina, CRP, HOMA-IR, osteokalcin, TOS i leptin. Glukoza, insulin i P1NP nisu uključeni u model zbog multikolinearnosti.

Rezultati multiple regresione analize prikazani su u tabeli 13.

Tabela 13: Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na koncentraciju adiponektina u trećem trimestru

Parametar	Adiponektin $R^2 = 0,285$; adjusted $R^2 = 0,186$, $p = 0,006$		
	β	SE (β)	p
ITM, kg/m^2	0,174	0,143	0,229
Trigliceridi, mmol/L	-0,298	0,196	0,133
HDL-holesterol, mmol/L	0,291	0,129	<0,05
Mokraćna kiselina, $\mu\text{mol/L}$	-0,042	0,138	0,765
CRP, mg/dL	-0,076	0,124	0,539
HOMA-IR	-0,044	0,120	0,715
Osteokalcin, ng/mL	-0,104	0,135	0,444
TOS, mmol/L	0,100	0,166	0,550
Leptin, ng/mL	-0,241	0,128	0,065

Rezultati ove analize su pokazali da je jedino HDL-holesterol nezavisno povezan sa koncentracijom adiponektina u trećem trimestru i da se 18,6% porasta adiponektina tokom trudnoće može objasniti povećanjem koncentracije HDL-holesterola tokom nekomplikovane trudnoće.

4.10. Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza za utvrđivanje postojanja korelacije između osteokalcina i biohemijskih parametara u trećem trimestru

Rezultati analize varijanse sa ponovljenim merenjima su pokazali da se koncentracija osteokalcina značajno menja tokom trudnoće i posle porođaja. Treći trimestar karakterišu izražene promene u koncentraciji osteokalcina i P1NP, kao i promene u parametrima insulinske rezistencije i drugih biohemijskih parametara. Za ispitivanje postojanja veze između osteokalcina i drugih parametara u trećem trimestru, primenjena je Spearmanova neparametarska korelaciona analiza. Rezultati su prikazani u tabeli 14.

Koncentracija osteokalcina je bila u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa ITM, koncentracijom triglicerida, mokraćne kiseline, insulina i leptina, kao i sa vrednostima HOMA-IR i HOMA-%B indeksa, P1NP i TAS-a, a u značajnoj negativnoj korelaciji sa koncentracijom adiponektina.

Tabela 14. Spearman-ova neparametarska korelacija između osteokalcina i biohemijskih parametara

Parametar	ρ	p
ITM, kg/m ²	0,293	<0,05
glukoza, mmol/L	0,161	0,164
holesterol, mmol/L	0,179	0,121
trigliceridi, mmol/L	0,314	<0,001
HDL-C, mmol/L	-0,103	0,377
LDL-C, mmol/L	0,104	0,370
Mokraćna kiselina, μ mol/L	0,382	<0,001
CRP, mg/dL	-0,005	0,969
Insulin, μ IU/L	0,323	<0,05
HOMA-IR	0,310	<0,05
HOMA-%B	0,374	<0,05
P1NP, ng/mL	0,863	< 0,001
25(OH)D, ng/mL	0,079	0,501
TAS, mmol/L	0,324	<0,05
TOS, μ mol/L	-0,039	0,742
SH grupe, g/L	-0,030	0,810
MDA, μ mol/L	-0,023	0,853
PAB, HK jedinice	0,149	0,238
Leptin, ng/mL	0,393	<0,05
Adiponektin, mg/L	-0,387	<0,05

4.11. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na koncentraciju osteokalcina u trećem trimestru

Spearman-ovom neparametarskom korelacionom analizom pokazano je da je veći broj parametara u značajnoj korelaciji sa koncentracijom osteokalcina u trećem trimestru, pa smo u sledećem koraku ispitivali nezavisni uticaj ovih parametara na koncentraciju osteokalcina.

Prilikom formiranja modela za multiplu regresionu analizu, osteokalcin je označen kao zavisna promenljiva, a ITM, trigliceridi, mokraćna kiselina, HOMA-IR, leptin i adiponektin kao nezavisne promenljive, na osnovu Spearmanovog koeficijenta korelacije ($p < 0,1$). Koncentracija insulina nije uključena u model zbog multikolinearnosti, kao ni HOMA-%B indeks. Koncentracije osteokalcina i P1NP su bile u jakoj pozitivnoj korelaciji, što je i bilo očekivano s obzirom da se oba proteina oslobađaju u procesu formiranja kostiju, međutim P1NP nije uključen u model jer je cilj ove analize bio utvrđivanje nezavisnog uticaja nekoštanih parametara na nivo osteokalcina.

Rezultati ove analize su prikazani u tabeli 15.

Tabela 15: Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na koncentraciju osteokalcina u trećem trimestru

Parametar	Osteokalcin $R^2 = 0,263$; adjusted $R^2 = 0,186$, $p=0,004$		
	β	SE (β)	p
ITM, kg/m^2	-0,049	0,136	0,719
trigliceridi, mmol/L	0,134	0,138	0,336
Mokraćna kiselina, $\mu\text{mol/L}$	0,211	0,120	0,085
HOMA-IR	0,096	0,114	0,401
TAS, mmol/L	0,222	0,107	<0,05
Leptin, ng/mL	0,195	0,121	0,111
Adiponektin, mg/L	-0,112	0,118	0,354

Rezultati ove analize su pokazali da je jedino TAS nezavisno povezan sa koncentracijom osteokalcina u trećem trimestru i da se 18,6% porasta koncentracije osteokalcina može objasniti povećanjem koncentracije TAS tokom nekomplikovane trudnoće.

4.12. Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza za utvrđivanje postojanja korelacije između P1NP i biohemijskih parametara u trećem trimestru

Kako bismo ispitali da li su korelacije osteokalcina i drugih parametara specifične samo za osteokalcin, koji se smatra aktivnim medijatorom iz kosti, a ne i za druge proizvode formiranja kostiju, kao što je P1NP, koji se smatra inertnim markerom formiranja kostiju, primenjena je Spearmanova neparametarska korelaciona analiza između P1NP i drugih ispitivanih parametara u trećem trimestru. Rezultati su prikazani u tabeli 16.

Koncentracija P1NP je bila u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa ITM, koncentracijom insulina, HOMA-IR i HOMA-%B indeksom, kao i koncentracijom osteokalcina i leptina.

Tabela 16. Spearman-ova neparametarska korelacija između P1NP i biohemijskih parametara

Parametar	ρ	p
ITM, kg/m ²	0,258	<0,05
glukoza, mmol/L	0,059	0,641
holesterol, mmol/L	0,037	0,770
trigliceridi, mmol/L	0,243	0,053
HDL-C, mmol/L	-0,048	0,705
LDL-C, mmol/L	-0,033	0,795
Mokraćna kiselina, μ mol/L	0,245	0,051
CRP, mg/dL	-0,002	0,987
Insulin, μ IU/L	0,410	<0,001
HOMA-IR	0,358	<0,05
HOMA-%B	0,526	< 0,001
osteokalcin, ng/mL	0,863	< 0,001
25(OH)D, ng/mL	-0,033	0,796
TAS, mmol/L	0,077	0,542
TOS, μ mol/L	-0,080	0,529
SH grupe, g/L	0,004	0,975
MDA, μ mol/L	-0,091	0,471
PAB, HK jedinice	-0,017	0,896
Leptin, ng/mL	0,506	<0,05
Adiponektin, mg/L	-0,310	0,058

4.13. Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na koncentraciju P1NP u trećem trimestru

Spearman-ovom neparametarskom korelacionom analizom pokazano je da je veći broj parametara u značajnoj korelaciji sa koncentracijom P1NP u trećem trimestru, pa smo u sledećem koraku ispitivali nezavisni uticaj ovih parametara na njegovu koncentraciju.

Prilikom formiranja modela za multiplu regresionu analizu, P1NP je označen kao zavisna promenljiva, a ITM, trigliceridi, mokraćna kiselina, HOMA-IR, leptin i adiponektin kao nezavisne promenljive (na osnovu Spearmanovog koeficijenta korelacije ($p < 0,1$)). Koncentracija insulina nije uključena u model zbog multikolinearnosti, kao ni HOMA-%B indeks. Analogno multiploj regresionoj analizi za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na koncentraciju osteokalcina, u ovom slučaju je iz modela isključen osteokalcin.

Rezultati su prikazani u tabeli 17. Nijedan od ispitivanih parametara nije bio nezavisno povezan sa koncentracijom P1NP.

Tabela 17: Multipla linearna regresiona analiza za ispitivanje nezavisnog uticaja ispitivanih parametara na koncentraciju PINP u trećem trimestru

Parametar	PINP $R^2 = 0,127$; adjusted $R^2 = 0,050$; $p=0,148$		
	β	SE (β)	p
ITM, kg/m^2	-0,061	0,146	0,678
trigliceridi, mmol/L	0,149	0,149	0,320
Mokraćna kiselina, $\mu\text{mol/L}$	0,093	0,130	0,476
HOMA-IR	-0,003	0,123	0,978
Leptin, ng/mL	0,178	0,130	0,176
Adiponektin, mg/L	-0,155	0,146	0,678

5. Diskusija

U ovom istraživanju učestvovalo je 38 zdravih trudnica koje su izvele trudnoću do kraja i porodile se bez komplikacija, sva novorođenčad su bila zdrava i dobila dobru ocenu na rođenju, pa se može smatrati da su dobijeni rezultati odraz normalnih, fizioloških procesa koji se dešavaju u trudnoći. Smanjenje koncentracije osnovnih bihemijskih i hematoloških parametara (AST, ALT, ukupni proteini, hemoglobin, hematokrit i broj eritrocita) je posledica fiziološke hemodilucije koja je karakteristična za trudnoću. Posle porođaja dolazi do porasta koncentracije navedenih parametara do vrednosti koje su karakteristične za negravidno stanje.

5.1. Longitudinalne promene parametara lipidnog statusa, inflamacije i oksidativno-stresnog statusa

Rezultati ove studije su pokazali kontinuirani porast koncentracije ukupnog holesterola od prvog do trećeg trimestra (tabela 5). Prosečno procentualno povećanje od prvog do trećeg trimestra bilo je 43%. Prethodne longitudinalne studije su opisale porast holesterola od 35-59% do trećeg trimestra, do prosečnih vrednosti 6,6-7,3 mmol/L u različitim populacijama trudnica [19,177–179], što je u skladu sa našim rezultatima. Literaturni podaci govore da je nivo holesterola u ranoj trudnoći, pre 12. nedelje gestacije, isti ili čak niži u odnosu na negravidno stanje [3,19,179]. Progresivno povećanje koncentracije holesterola, koje je značajno već od drugog trimestra, ima fiziološku ulogu jer je holesterol supstrat za sintezu steroidnih hormona čija koncentracija raste u trudnoći, a može biti značajan i za fetus u periodu dok je fetalna sinteza holesterola nedovoljna [180]. Gotovo isti trend porasta je pokazao i nivo LDL-holesterola i najviše vrednosti su zabeležene u trećem trimestru (tabela 6). Posle porođaja je došlo do značajnog smanjenja nivoa ukupnog i LDL-holesterola. Ipak, vrednosti posle porođaja su bile i dalje značajno više u odnosu na vrednosti iz prvog trimestra, što znači da je potreban period duži od 4 nedelje da bi došlo do vraćanja koncentracije holesterola na vrednosti koje su bile pre trudnoće, što je u skladu sa prethodnim studijama [181,182]. Zanimljivo je da su neka istraživanja pronašla da je niži nivo holesterola posle porođaja povezan sa anksioznošću i promenjenim

raspoložnjem kod porodilja [183], ali nema dovoljno podataka da bi se izveli sigurni zaključci o ovoj povezanosti.

Preporučeni nivo ukupnog holesterola kod odraslih negravidnih žena je <5,2 mmol/L [184], jer je povećana koncentracija holesterola povezana sa povećanim rizikom od razvoja ateroskleroze. U trudnoći dolazi do porasta nivoa holesterola preko ove vrednosti, i neki autori smatraju da trudnoća, a posebno višestruke trudnoće, nose veći rizik od razvoja ateroskleroze kasnije u životu [185,186]. S druge strane, rezultati nekih studija ističu povoljan uticaj laktacije u balansiranju proaterogenog profila koji se razvija u trudnoći i smanjenju rizika od ateroskleroze i kardiovaskularne bolesti [187,188].

Do porasta koncentracije holesterola u trudnoći dolazi kod svih trudnica, i kod trudnica sa familijarnom hiperholesterolemijom [189], što može sugerisati da je od fiziološkog značaja relativno povećanje koncentracije holesterola kao jedan od mehanizama održavanja normalne trudnoće. Snižene vrednosti holesterola u trudnoći povezane su sa intrauterinim zastojem rasta fetusa i sa smanjenom težinom na porođaju [33]. S druge strane, neki istraživači sugerišu da hiperholesterolemija majke dovodi do stvaranja masnih pruga kod fetusa i da utiče na razvoj ateroskleroze kasnije u životu, ali nepostojanje konsenzusa oko preporučenih vrednosti onemogućava rutinsku evaluaciju koncentracije holesterola u trudnoći i eventualnu terapiju [190].

Porast koncentracije triglicerida je još izraženiji (tabela 5), i koncentracija triglicerida je rasla progresivno od prvog trimestra pa do kraja trudnoće, i najveću vrednost dostigla pred porođaj. Posle porođaja je došlo do izraženog pada koncentracije triglicerida. Prosečno povećanje nivoa triglicerida je bilo 175%, što je u skladu sa rezultatima prethodnih studija [34,189,191,192]. Hipertrigliceridemija u trudnoći nastaje zbog povećane lipolize i smanjenog uklanjanja VLDL čestica iz cirkulacije [32].

Povećanje koncentracije triglicerida tokom trudnoće ima veliki fiziološki značaj. Trigliceridi su mobilni energetske depo, i u stanju kratkotrajnog gladovanja, iz njih se uspešno sintetišu ketonska tela u jetri majke. Oni su rezervoar masnih kiselina i izvor esencijelnih masnih kiselina za fetus. Neophodni su i za sintezu mleka u laktaciji. Posle porođaja, dolazi do povećane ekspresije i aktivnosti lipoproteinske lipaze u

mlečnoj žlezdi, što ubrzava uklanjanje triglicerida iz cirkulacije [34]. Međutim, prekomerno povećanje nivoa triglicerida povezano je sa GDM, preeklampsijom i povećanim rizikom od razvoja ateroskleroze kasnije u životu [193]. Prekomeran dijetarni unos masnih kiselina u trudnoći, povezan sa prekomernim povećanjem nivoa triglicerida, ima inhibitorni efekat na Δ -5 i Δ -6 desaturazu, što dovodi do značajnog sniženja nivoa arahidonske kiseline u fetusu, pojačava peroksidaciju i smanjuje antioksidativni kapacitet [194].

Rezultati ove studije su pokazali da je nivo HDL-holesterola bio najviši u drugom i na početku trećeg trimestra (Tabela 5). Posle porođaja, njegova vrednost bila je najniža, niža i od vrednosti u prvom trimestru, pa možemo pretpostaviti da do porasta njegove koncentracije u odnosu na negravidno stanje dolazi već u prvom trimestru, što je u skladu sa prethodnim studijama [19,178]. U drugim studijama HDL-holesterol u prvom trimestru nije bio značajno različit u odnosu na negravidno stanje [181,195]. Iako nije sasvim jasno u kom trenutku dolazi do porasta njegove koncentracije, jasno je da dostiže najviše koncentracije sredinom trudnoće, a zatim dolazi do postepenog pada [19,177–179,181,195]. Povećanje koncentracije HDL-holesterola u trudnoći ima fiziološki značaj, zbog njegove uloge u reverznom transportu holesterola, ali i zbog njegovih antiinflamatornih, antioksidativnih i antitrombotičkih dejstava tj. protektivnog dejstva na endotel [196]. Preeklampsija je stanje koje karakteriše endotelna disfunkcija, a za koju je karakterističan niži nivo HDL-holesterola [181]. Struktura HDL čestica je kompleksna, i u njen sastav ulazi preko 50 proteina. Antioksidativna svojstva HDL-čestica potiču od apolipoproteina apoA-I, apoE, apoJ, apoA-II, apoA-IV, zatim od enzima kao što su paraoksonaza-1, glutation peroksidaza i acetilhidrolaza faktora aktivacije trombocita (PAF-AH, eng. platelet activating factor acetylhydrolase), kao i od malih količina lipofilnih antioksidanata kao što su tokoferoli, što omogućava HDL česticama da inhibiraju oksidativnu modifikaciju LDL čestica [197]. Antiaterogene karakteristike HDL čestica ogledaju se i u njihovoj sposobnosti da inhibiraju ekspresiju adhezionih molekula na zidovima krvnih sudova i agregaciju trombocita, kao i u sprečavanju inhibicije NO sintaze [196].

Mokraćna kiselina nastaje katabolizmom purina i izlučuje se putem bubrega. U našem istraživanju zabeležen je porast koncentracije mokraćne kiseline od drugog

trimestra do kraja trudnoće i dalje posle porođaja (tabela 4). Prema dosadašnjim saznanjima, u prvim nedeljama trudnoće dolazi do inicijalnog smanjenja koncentracije mokraćne kiseline zbog povećanog renalnog izlučivanja, a zatim dolazi do porasta njene koncentracije usled povećanja katabolizma [198]. Mokraćna kiselina je antioksidans koji neutrališe superoksidni anjon i hidrosil radikal, a smanjuje i nitrozilaciju ostataka tirozina na proteinima, ali takođe može i da postane prooksidans (urat radikal) u stanjima gde je smanjena koncentracija antioksidanasa, posebno askorbinske kiseline. Takođe, ona je i medijator inflamacije koji stimuliše produkciju IL-1, IL-6 i TNF- α [199]. U negravidnoj populaciji visok nivo mokraćne kiseline je nezavisni prediktor kardiovaskularne i renalne bolesti [200], a u trudnoći je hiperurikemija povezana sa preeklampsijom jer dovodi do stimulacije proliferacije glatkomišićnih ćelija, inhibicije proliferacije i migracije endotelnih ćelija i do njihove disfunkcije [199]. Trudnoća se smatra stanjem sa povišenim nivoom subkliničke inflamacije [47]. Prethodne studije se pronašle povišen nivo CRP-a u trudnoći u odnosu na negravidno stanje [201–204]. Koncentracija CRP-a u našem istraživanju je bila najviša u drugom trimestru, a promene kasnije u toku trudnoće nisu bile statistički značajne, sve do posle porođaja kada su zabeležene najniže vrednosti (tabela 5).

Trudnoća se smatra stanjem u kome dolazi do povećanja intenziteta oksidativnog stresa, koji je u normalnim uslovima reverzibilan i praćen povećanim antioksidativnim odgovorom [39]. Patološka stanja kao što su npr. GDM, preeklampsija, spontani pobačaj i sl. praćena su narušavanjem ravnoteže oksidativnog stresa i antioksidativne zaštite [41]. U našem istraživanju, vrednosti TOS-a, čije su glavne komponente vodonik peroksid i lipidni peroksidi, bile su statistički značajno najveće u trećem trimestru, a posle porođaja je došlo do njihovog značajnog smanjenja (tabela 7), što je u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja [205]. Parametar TBARS, koji obuhvata malon-dialdehid (MDA) i srodne aldehide kao konačne proizvode lipidne peroksidacije, nije se značajno menjao do pred kraj trudnoće kada su vrednosti bile najveće, da bi posle porođaja došlo do značajnog pada njegove koncentracije (tabela 7). I Leal i saradnici su opisali porast TBARS u kasnoj trudnoći [43]. Patil i saradnici [44] su pronašli viši nivo MDA kod trudnica u odnosu na negravidne žene, kao i da je nivo MDA najviši u trećem trimestru. Takođe, D'Souza i

saradnici [206] su pronašli da je kod normotenzivnih trudnica MDA najviši u trećem trimestru.

Prooksidativno-antioksidativni balans (PAB) je pokazao statistički značajno najviše vrednosti u kasnom trećem trimestru u odnosu na sve druge tačke u trudnoći, a vrednosti posle porođaja su bile značajno niže u odnosu na sva prethodna merenja (tabela 7). Ovaj rezultat ide u prilog hipotezi da je trudnoća, a posebno kasni treći trimestar, period koga karakteriše pomeranje redoks balansa ka oksidativnom stresu, kao i da se u normalnim uslovima ravnoteža uspostavlja ubrzo posle porođaja, što smo dalje potvrdili ispitivanjem parametara antioksidativne zaštite.

Vrednosti parametra sveukupne antioksidativne zaštite, TAS, nisu pokazale statistički značajne promene tokom trudnoće. Međutim, posle porođaja došlo do značajnog porasta koncentracije ovog parametra (tabela 7). Glavne komponente TAS-a su sulfhidrilne grupe proteina (52,9%), mokraćna kiselina (33,1%), vitamin C (4,7%) i vitamin E (10%) [171]. Nekoliko studija je opisalo porast nivoa TAS-a u kasnoj trudnoći [31,42,207], međutim u našem istraživanju porast nije bio statistički značajan (tabela 7). Ukupne SH grupe su važan konstituent antioksidativnog sistema organizma, i u njihov sastav ulaze SH grupe proteina plazme, u prvom redu albumina, kao i SH grupe glutaciona, homocisteina, cisteinilglicina i cisteina [208]. U ovom istraživanju, vrednosti ukupnih SH grupa na početku trećeg trimestra su bile značajno veće od vrednosti u drugom trimestru. U kasnom trećem trimestru nije bilo značajnih promena, a vrednosti posle porođaja su i dalje bile na visokom nivou (tabela 7). Kako je koncentracija ukupnih proteina najniža u trećem trimestru (tabela 5), moguće je da je u ovom periodu došlo do porasta neproteinskih SH grupa. Leal i saradnici [43] su međutim pronašli da je nivo ukupnih SH grupa niži kod trudnica u trećem trimestru u odnosu na negravidne žene.

Treba naglastiti da su sve ispitanice u ovoj studiji bile normotenzivne tokom cele trudnoće i posle porođaja, kao i da su bile nepušači, dobile savet o balansiranoj ishrani, kao i da su sve koristile prenatalne suplemente sa ujednačenim sadržajem vitamina i oligoelemenata, tako da su bile homogena grupa po pitanju faktora koji u značajnoj meri mogu da modifikuju oksido-stresni status. Iz naših rezultata možemo sa

sigurnošću da zaključimo da čak i u uslovima nekomplikovane trudnoće, bez dodatnih faktora rizika, dolazi do značajnog porasta parametara oksidativnog stresa, posebno u kasnoj trudnoći. Oksidativni procesi imaju veliki značaj, još u preimplantacionom periodu i pripremi žutog tela, zatim u promenama ekstracelularnog matriksa tokom implantacije, invaziji trofoblasta i regulaciji vaskularnog tonusa [39]. Povećan oksidativni stres u kasnoj trudnoći verovatno ima ulogu u sazrevanju cerviksa i inicijaciji porođaja, a jedan od mogućih mehanizama je aktivacija matriks metaloproteinaza od strane ROS [209].

Rezultati studija o dejstvu vitaminske suplementacije na oksidativni stres i ishode trudnoće su kontradiktorni. Nekoliko randomiziranih studija sa velikim brojem ispitanica je pokazalo da suplementacija vitaminom C i vitaminom E u trudnoći ne sprečava pojavu preeklampsije [210–212], iako je pokazano da popravlja antioksidantni status [210]. Kada su u pitanju kombinovani prenatalni suplementi koji pored gvožđa i folne kiseline sadrže i druge mikronutrijente, još uvek ne postoji jedinstven stav. U ovoj studiji su sve ispitanice koristile ovu vrstu suplementacije, pa nismo mogli da ispitamo njen uticaj na promene oksidativno-stresnog statusa. Velika analiza iz 2015, koja je uključila 17 prospektivnih randomiziranih studija sa oko 140.000 ispitanica, imala je za cilj poređenje ishoda trudnoće između trudnica koje su koristile ove kombinovane suplemente, i trudnica koje su uzimale samo gvožđe sa ili bez folne kiseline ili placebo. Rezultati ove studije su pokazali da je kod trudnica koje su koristile složenije suplemente koji pored gvožđa i folne kiseline sadrže i antioksidanse i druge mikronutrijente, manja incidenca negativnih ishoda trudnoće kao što su niska telesna težina na rođenju i broj mrtvo rođene dece, ali nije bilo razike u drugim ishodima (prevremeni porođaj, pobačaj, anemija majke, mortalitet majke i dr). Autori su preporučili zamenu suplementacije gvožđem i folnom kiselinom ovim kombinovanim preparatima u zemljama u razvoju gde postoji rizik od nutritivne deficijencije mikronutrijenata [213].

Suplementacija gvožđem u trudnoći je indikovana ako je nivo hemoglobina ispod 110 g/L u prvom trimestru ili ispod 105 g/L u trećem trimestru [214]. Gvožđe takođe može biti generator slobodnih radikala, učestvuje u Fenton reakciji i generisanju hidroksil radikala, pa neki autori smatraju da i to može biti izvor oksidativnog stresa u

trudnoći [43]. Suplementacija gvožđem je široko rasprostranjena kod trudnica u našoj zemlji i kao profilaksa, pa bi bilo značajno ispitati ovaj njen potencijalni neželjeni efekat, s obzirom da se o tome nedovoljno zna.

5.2. Longitudinalne promene parametara za procenu insulinske rezistencije

Prethodne studije koje su koristile metodu HIEG (hiperinsulinemijski euglikemijski klamp) za procenu insulinske rezistencije [215], kao i indekse dobijene iz OGTT (eng. Oral Glucose Tolerance Test, oralni test opterećenja glukozom) [91], pokazale su da u trudnoći dolazi do smanjenja osetljivosti tkiva majke na insulin. Kirwan i saradnici [216] su našli da HOMA-IR dobro korelira sa HIEG metodom kod trudnica. U ovom istraživanju su kao parametri za procenu insulinske rezistencije korišćeni insulin i HOMA indeksi- HOMA-IR za procenu insulinske rezistencije, a HOMA-%B za procenu bazalne sekrecije insulina. Vrednosti insulina su imale najvišu vrednost u tački pre porođaja, a vrednost posle porođaja je bila statistički najniža (tabela 8). Porast HOMA-IR u toku trudnoće u ovom istraživanju nije bio statistički značajan, a u tački posle porođaja vrednost je bila značajno niža u odnosu na vrednost pre porođaja (tabela 8). HOMA-%B je značajno rastao od početka trećeg trimestra, odražavajući kompenzatorno povećanje sekrecije insulina od strane β ćelija pankreasa (tabela 8). Vrednosti insulina i HOMA-%B posle porođaja su pokazale izražen pad, što potvrđuje hipotezu da je insulinska rezistencija i povećana produkcija insulina u trudnoći reverzibilan proces i da je u odsustvu patoloških procesa, potreban relativno kratak period da se produkcija insulina vrati na vrednost karakterističnu za negravidno stanje. Koncentracije glukoze nisu pokazale značajne promene u trudnoći, što je dokaz da je povećanje produkcije insulina bio adekvatno (tabela 5). Hemodilucija u trudnoći, kao i smanjena proizvodnja glukoze u jetri i preuzimanje glukoze od strane fetusa [19], faktori su koji doprinose nižoj koncentraciji glukoze koja je zapažena u drugom trimestru. Postoje dokazi da do povećanja produkcije insulina u trudnoći dolazi zbog adaptivnog povećanja broja Langerhansovih ostrvaca pankreasa i sniženja pankreasnog praga odnosno potrebnog nivoa glukoze koji dovodi do sekrecije insulina [217]. Glavni medijatori ovih promena su hormoni sa laktogenim dejstvom, hPL i prolaktin, ali se smatra da u prenosu signala određenu ulogu imaju i drugi medijatori, kao što je

serotonin [218]. Ukoliko povećanje produkcije insulina nije adekvatno, ili ukoliko postoji stanje smanjene osetljivosti insulinskih receptora na insulin i pre trudnoće, dolazi do nastanka GDM. Endo i saradnici [219] su našli više vrednosti HOMA-IR kod trudnica sa GDM, ali i kod gojaznih trudnica sa normoglikemijom, u odnosu na zdrave negojazne trudnice. Oni su ispitivali odvojene grupe trudnica u prvom, drugom i trećem trimestru, i nisu našli porast HOMA-IR sa napredovanjem gestacije, ali je porast HOMA-%B bio značajan, što je slično našim rezultatima. Ni Das i saradnici [220] nisu našli veće vrednosti HOMA-IR kod trudnica u 24-28 nedelji gestacije u odnosu na negravidne kontrole, ali su našli značajno viši HOMA-%B. Ozcimen i saradnici su našli da je vrednost HOMA-IR veća od 2,6 u prvom trimestru prediktor razvoja GDM u trudnoći [221].

Povećanje produkcije insulina u trudnoći, a zatim smanjenje produkcije insulina posle porođaja je bilo očekivano, a s obzirom da su ispitanice bile zdrave, negojazne i bez faktora rizika, bilo je očekivano i da tokom cele trudnoće ostanu normoglikemične i da novorođenčad budu normalne težine.

5.3. Adipocitokini u trudnoći

Leptin je produkt masnog tkiva koji povezuje energetska stanje organizma i reproduktivnu funkciju [64]. U našem istraživanju, koncentracija leptina je rasla tokom trudnoće do najviše vrednosti na početku trećeg trimestra, a zatim je došlo do njenog postepenog pada, do najniže vrednosti u tački posle porođaja (tabela 8). Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim studijama, u kojima je opisano da leptin raste od početka trudnoće, da maksimalne vrednosti u krvi majke dostiže krajem drugog ili početkom trećeg trimestra, a da zatim opada [69,70]. Spearman-ova neparametarska korelaciona analiza je pokazala da je leptin u pozitivnoj korelaciji sa ITM, koncentracijom mokraćne kiseline, CRP-a, insulina, HOMA indeksima, koncentracijom osteokalcina, P1NP i TOS-a u trećem trimestru (tabela 10). Ova pozitivna korelacija ITM i leptina je mogla biti očekivana, i u skladu je sa prethodnim studijama [222,223]. Multipla linearna regresiona analiza je pokazala da je jedino ITM nezavisno povezan sa koncentracijom leptina u trećem trimestru. Objašnjenje ovog rezultata leži u činjenici da porastu telesne mase tj. ITM trudnice doprinose porast masnog tkiva i placentе, a upravo su masno

tkivo i placenta izvori leptina u trudnoći. Trudnice sa GDM imaju veće koncentracije leptina u odnosu na trudnice sa normalnom tolerancijom glukoze [224–226]. Takođe, rezultati studija su pokazali da je koncentracija leptina kod gojaznih trudnica viša u odnosu na negojazne, međutim procentualno je značajno veće povećanje leptina u trudnoći kod negojaznih žena [223,227]. Neki autori smatraju se da je kod negojaznih žena procentualno veći porast sadržaja masnog tkiva u organizmu tokom trudnoće u odnosu na gojazne žene, pa da je zato i porast koncentracije leptina izraženiji [227]. Drugi autori međutim smatraju da je dominantan izvor leptina u trudnoći ipak placenta [228], zato što do značajnog povećanja koncentracije leptina dolazi i pre značajnog porasta masnog tkiva majke. U trudnoći dolazi i do porasta koncentracije cirkulišućeg receptora za leptin, što dovodi do stanja leptinske rezistencije jer se zbog toga smanjuje koncentracija slobodnog leptina, a takođe je i otežan njegov prolaz kroz krvno-moždanu barijeru [228]. Usled centralne rezistencije na leptin, tokom trudnoće ne dolazi do suprimiranja apetita uprkos rastućoj koncentraciji leptina.

Osim hormona kao što su hCG i estradiol, placentalnu ekspresiju leptina povećava i insulin [229]. U našem istraživanju, leptin je bio u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom insulina, što ide u prilog toj činjenici. Leptin je bio u pozitivnoj korelaciji i sa HOMA indeksima, pa možemo pretpostaviti da je on jedan od faktora koji utiče na razvoj insulinske rezistencije u trudnoći. To je u skladu sa prethodnim studijama u kojima je ispitivana korelacija leptina i ovih parametara kod trudnica [70,75,219,221]. Uticaj leptina na sekreciju i dejstva insulina je kompleksan i još uvek nedovoljno istražen. Neka od dejstava leptina su sinergistička sa dejstvima insulina – npr. on povećava preuzimanje masnih kiselina od strane mišićnih ćelija kao i preuzimanje glukoze od strane hepatocita, ali s druge strane povećava β -oksidaciju masnih kiselina u jetri, masnom tkivu i mišićima, kao i glukoneogenezu u jetri [55]. Neki autori smatraju da leptin može da suprimira sekreciju insulina, da suprimira anabolička dejstva insulina kao i da modulira perifernu osetljivost tkiva na insulin [230]. Leptin je proučavan i kao potencijani target molekula u terapiji gojaznosti i dijabetesa, međutim njegova pleotropna dejstva na centralnom i perifernom nivou, kao i činjenica da su ova stanja često praćena rezistencijom na leptin, onemogućavaju njegovu kliničku primenu [231]. Povećanje koncentracije leptina u trudnoći, ili pak

stanje rezistencije na leptin, mogu biti deo mehanizama koji omogućavaju mobilizaciju energetskih rezervi majke, što omogućava transfer nutrijenata ka fetusu [232].

Kako je trudnoća stanje centralne rezistencije na leptin, od velikog značaja su njegova periferna dejstva. Leptin proizveden u placenti deluje lokalno, tako što reguliše rast placente, stimuliše preuzimanje aminokiselina, deluje mitogeno i antiapoptotski [61]. Uticaj leptina na rast placente posebno je izražen u GDM, gde su vrednosti leptina značajno veće u odnosu na normalnu trudnoću, i gde dolazi do hipertrofije placente [233]. Značajan i za rast i razvoj fetusa, posebno za razvoj kostiju i pluća, ali nije jasno da li je za fetus značajniji fetalni leptin ili leptin poreklom iz placente [233].

Jedna od hipoteza je da je leptin je faktor koji deluje kao funkcionalna veza između adipocita i ćelija mlečne žlezde, delujući kao signal o energetskim zalihama u masnom tkivu [228]. Prolaktin i PL mogu da utiču na put prenosa signala putem vezivanja za leptinski receptor, i da na taj način doprinesu stanju centralne rezistencije na leptin [232].

Smatra se da leptin ne deluje značajno na de novo sintezu lipida, ali da povećava oslobađanje glicerola i hidrolizu lipidnih estara u placenti. Ova uloga leptina verovatno ima značaj u transportu nutrijenata u fetus [76]. U našem istraživanju leptin nije bio u značajnoj korelaciji sa parametrima lipidnog statusa. Leptin povećava produkciju NO u humanoj placenti [76]. Ovaj efekat leptina može biti potencijalni uzrok pozitivne korelacije leptina i TOS-a u našem istraživanju (tabela 10). Kao što je već napomenuto, leptin se smatra proinflamatornim adipocitokinom jer može da poveća produkciju nekolicine proinflamatornih citokina (IL-6, IL-12, IL-18, TNF α , itd) u monocitima, da pojača interakciju leukocita i endotelnih ćelija, ali i da indukuje stvaranje ROS u makrofagama, neutrofilima i endotelnim ćelijama i da potencira ekspresiju NO sintaze indukovanu interferonom γ [67]. Proinflamatorna dejstva leptina objašnjavaju pozitivnu korelaciju koncentracije leptina sa koncentracijom CRP-a u našem istraživanju (tabela 10).

Povezanost leptina i oksidativnog stresa može biti u osnovi opisane pozitivne korelacije leptina sa mokraćnom kiselinom (tabela 10), s obzirom da je mokraćna

kiselina deo antioksidativnog sistema organizma. Do sada je zabeleženo da je leptin u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom mokraćne kiseline kod trudnica sa hipertenzijom, a da kod normotenzivnih trudnica postoji negativna korelacija ovih parametara, ili uopšte ne postoji [234,235]. Naše istraživanje je imalo relativno mali broj ispitanica i moguće je da je to razlog različitih rezultata, pa su neophodna istraživanja na većem broju ispitanica kako bi se izveo siguran zaključak o ovoj povezanosti. Postojanje veze između koncentracije leptina i mokraćne kiseline kod muškaraca i negravidnih žena zabeležili su Bedir i saradnici [236], koji su sugerisali da je upravo leptin potencijalna veza između gojaznosti i povećanog nivoa mokraćne kiseline. Veza leptina i oksidativnog stresa je ispitivana kod negravidnih gojaznih žena kod kojih je leptin bio u pozitivnoj korelaciji sa TBARS [77].

Ova zapažanja idu u prilog hipotezi da leptin povezuje nutritivni status i metabolizam masnog tkiva majke sa funkcijom placente. Novija istraživanja su pokazala da ishrana majke, u prvom redu povećan unos masnih kiselina, kao i nebalansiran odnos različitih vrsta masnih kiselina u ishrani, dovode do subkliničke inflamacije u hipotalamusu i do epigenetskih promena kod potomstva, što može dovesti do povećanog rizika za razvoj gojaznosti kod potomaka [237]. S obzirom da leptin svoja dejstva ostvaruje u velikoj meri preko hipotalamusa, od značaja bi bila dalja istraživanja kako bi se utvrdilo koja je uloga leptina i drugih proizvoda masnog tkiva u epigenetskoj regulaciji gena fetusa.

Uticaj leptina na metabolizam kostiju je složen, i odvija se na centralnom i perifernom nivou. Svojim centralnim dejstvom preko hipotalamusa, leptin deluje inhibitorno na proces formiranja kostiju [238]. S druge strane, svojim direktnim dejstvom, on povećava proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta i deluje stimulatorno na mineralizaciju i rast kostiju. Njegova periferna dejstva su usmerena ka očuvanju skeleta, što je u skladu s činjenicom da veći sadržaj masnog tkiva zahteva i jači skelet kao potporu [142]. Smatra se da periferna dejstva leptina na kosti dominiraju, posebno u stanjima koja karakteriše centralna rezistencija na leptin [142]. Kako je trudnoća takvo stanje, očekivano je da povećanje koncentracije leptina bude povezano sa povećanim formiranjem kostiju. Koncentracija leptina u trećem trimestru bila je u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom osteokalcina i P1NP (tabela 10), što je u skladu

sa prethodno navedenim, ali je u suprotnosti sa rezultatima Saucedo i saradnika [138]. Naime, u njihovoj studiji leptin je bio u negativnoj korelaciji sa osteokalcinom u grupi zdravih trudnica, što su objasnili inhibitornim dejstvom leptina na proces formiranja kostiju putem njegovog centralnog dejstva. Kako su zdrave trudnice u istraživanju Saucedo i saradnika i našem istraživanju imale slične vrednosti ITM i koncentracije osteokalcina i leptina, neophodna su istraživanja sa većim brojem ispitanica kako bi se izveli čvrsti zaključci o međusobnoj povezanosti leptina i osteokalcina u trudnoći.

U našem istraživanju koncentracija adiponektina je pokazala tendenciju pada tokom trudnoće, ali to sniženje nije bilo statistički značajno. Tek su vrednosti posle porođaja bile statistički značajno niže od vrednosti u prvom i drugom trimestru (tabela 8). U studiji Mastorakosa i saradnika nije bilo značajne promene u koncentraciji adiponektina tokom trudnoće [91], dok su Fuglsang i saradnici opisali da inicijalno dolazi do porasta koncentracije adiponektina do najviših vrednosti sredinom gestacije, a da zatim dolazi do sniženja njegove koncentracije, ali na relativno malom broju ispitanica (11) [90]. Catalano i saradnici su pronašli da u trećem trimestru dolazi do značajnog smanjenja koncentracije adiponektina u odnosu na vrednosti pre trudnoće, kao i do smanjene ekspresije gena za adiponektin u masnom tkivu [20]. Smatra se da na ekspresiju gena za adiponektin inhibitorno deluju glukokortikoidi, TNF- α i IL-6 [239,240], kao i oksidativni stres [101]. Asai-Sato i saradnici su takođe opisali značajno smanjenje koncentracije adiponektina u trećem trimestru trudnoće i dalje smanjenje posle porođaja [89], a pokazali su da prolaktin deluje inhibitorno na sekreciju adiponektina in vitro. Razlike u rezultatima između navedenih studija možda se mogu objasniti različitim metodologijama merenja koncentracije adiponektina, kao i relativno malim brojem ispitanica, međutim zajedničko im je da su sve opisale tendenciju smanjenja koncentracije adiponektina u kasnoj trudnoći i posle porođaja. To je verovatno u prvom redu posledica inhibitornog dejstva rastuće koncentracije prolaktina na sekreciju adiponektina, ali moguće je da utiču i glukokortikoidi, proinflamatorni citokini i oksidativni stres.

Adiponektin povećava osetljivost perifernih tkiva na dejstva insulina [83]. U našem istraživanju, koncentracija adiponektina je bila u negativnoj korelaciji sa parametrima insulinske rezistencije- sa koncentracijom insulina i HOMA-IR indeksom,

ali i sa koncentracijom glukoze (tabela 11), što je u skladu sa nekim od prethodnih studija [20,95,97,241]. Međutim, rezultati prethodnih studija nisu sasvim konzistentni, i u nekim studijama koncentracija adiponektina nije bila u značajnoj korelaciji sa parametrima za procenu insulinske rezistencije [89,90,96]. Kako adiponektin povećava osetljivost tkiva majke na insulin, pad njegove koncentracije je mogao biti očekivan, posebno u kasnoj trudnoći kada je insulinska rezistencija tkiva majke najizraženija, kako bi se održala adekvatna snabdevenost fetusa glukozom. S druge strane, mora se uzeti u obzir da su dejstva adiponektina složena, i da postoje dokazi da u placenti deluje suprotno, tj. tako što povećava insulinsku rezistenciju [93].

Kao što je već rečeno, rezultati ove studije su pokazali da su koncentracije adiponektina i leptina su bile u negativnoj korelaciji. Kako je adiponektin jedini adipocitokin čija koncentracija se smanjuje sa povećanjem masnog tkiva [81], a nema dokaza da ga produkuje placenta [93], njegova koncentracija u trećem trimestru je bila u negativnoj korelaciji sa ITM (tabela 11), što je u skladu sa prethodnim studijama [242,243].

Smatra se da adiponektin ima i antiinflamatorna dejstva, putem blokade nuklearnog faktora NF- κ B i smanjenjem koncentracije citokina kao što su TNF α , IL-6 i IL-18 [67], međutim u našoj studiji nije bio u značajnoj korelaciji sa koncentracijom CRP-a, koji je jedini ispitivani marker inflamacije (tabela 11).

Koncentracija adiponektina je bila u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom HDL-holesterola, a u negativnoj sa koncentracijom triglicerida u trećem trimestru (tabela 11), što je u skladu sa rezultatima studije Ritteratha i saradnika [96]. Adiponektin utiče na nivo navedenih lipidnih frakcija prvenstveno tako što dovodi do aktivacije AMPK, što dovodi do smanjenja sinteze i povećanja oksidacije masnih kiselina [29]. Takođe utiče na aktivnost enzima kao što su lipoproteinska lipaza i hepatična lipaza [244], i povećava aktivnost PPAR α u skeletnim mišićima i jetri [29,245]. Ova dejstva adiponektina vode smanjenju sadržaja triglicerida u jetri i mišićima. Adiponektin utiče na nivo HDL-holesterola na više načina. Osim što povećava oksidaciju masnih kiselina u mitohondrijama i snižava nivo masnih kiselina u cirkulaciji, i što povećava aktivnost PPAR α u skeletnim mišićima i jetri, on povećava i

hepatičnu ekspresiju apolipoproteina apoA-I i apoA-II [246]. Smatra se i da adiponektin direktno deluje na HDL-čestice tako što smanjuje katabolizam apoA-I, ali precizan mehanizam nije poznat [247]. S druge strane, eksperimenti na miševima su pokazali da HDL čestice, putem apoA-I, dovode do povećane ekspresije adiponektina u adipocitima [248]. Rezultati naše studije su pokazali da je samo koncentracija HDL-holesterola nezavisno povezana sa nivoom adiponektina u trećem trimestru i da se blizu 20% promene u koncentraciji adiponektina koja je uočena u trećem trimestru može objasniti promenom u koncentraciji HDL-holesterola (tabela 12). Slična nezavisna pozitivna korelacija adiponektina i HDL-holesterola je zabeležena kod muškaraca i negravidnih žena [249–251], i ide u prilog hipotezi da adiponektin ima antiaterogena dejstva koja su posredovana HDL-holesterolom.

Koncentracija adiponektina je bila u negativnoj korelaciji sa TOS-om (tabela 12), što je u skladu sa saznanjima da oksidativni stres suprimira ekspresiju informacione RNK za adiponektin i njegovu sekreciju [101]. Iako je negativna korelacija koncentracije adiponektina i parametra TBARS-MDA zabeležena kod muškaraca i žena u negravidnom stanju [100,252,253], kao i kod zdravih, normotenzivnih trudnica [102], u našoj studiji ova dva parametra nisu bila u značajnoj korelaciji (tabela 12), verovatno zato što je broj ispitanica bio relativno mali. Takođe, adiponektin nije bio u značajnoj korelaciji ni sa parametrima antioksidativne zaštite (tabela 12), iako postoje podaci da je adiponektin u pozitivnoj korelaciji sa antioksidativnim statusom u opštoj populaciji [254]. Adiponektin ima antioksidativna dejstva in vitro, jer je pokazano da inhibira proliferaciju ćelija indukovanu oksidovanim LDL česticama, kao i stvaranje superoksidnog anjona [255]. Mada nije jasna njegova uloga u modulaciji oksidativnog stresa u trudnoći, rezultati naše studije idu u prilog inverznom odnosu adiponektina i oksidativnog stresa.

Uticaj adiponektina na metabolizam kostiju je kompleksan, kao i u slučaju leptina. Lokalno sintetisan adiponektin stimuliše formiranje kostiju svojim autokrinim/parakrinim dejstvom; cirkulišući adiponektin deluje inhibitorno na ovaj proces direktnim dejstvom, a stimulatorno indirektnim dejstvom, potenciranjem dejstva insulina [256]. Kako nije bilo značajne korelacije sa parametrom PINP, moguće je da je korelacija sa osteokalcinom posledica specifičnih dejstava osteokalcina koje nemaju

drugi produkti koji se u cirkulaciju oslobađaju u procesu formiranja kostiju. Eksperimenti na adipocitima su pokazali da osteokalcin povećava produkciju adiponektina [133], i prema jednoj hipotezi ovo je jedan od mehanizama kojima osteokalcin indirektno utiče na metabolizam glukoze [257]. Moguće je da povećanje koncentracije osteokalcina u trudnoći teži da kompenzuje smanjenje koncentracije adiponektina, što bi moglo da objasni negativnu korelaciju ova dva parametra u trećem trimestru (tabela 12). U istraživanju Srichomkwuna i saradnika adiponektin nije bio u značajnoj korelaciji sa osteokalcinom kod trudnica. Naše istraživanje je prvo koje je pronašlo ovakvu vezu kod trudnica, što može da ide u prilog hipotezi da su masno tkivo i kost ne samo međusobno povezani u trudnoći, nego da utiču i na metabolizam glukoze. Međutim, neophodna su opsežnija istraživanja na većem broju ispitanica kako bi se izveli pouzdani zaključci i kako bi se utvrdio eventualni značaj ove povezanosti u kliničkoj praksi.

5.4. Parametri koštanog prometa

Trudnoća je stanje koje karakterišu izražene promene koštanog prometa. U prvom delu trudnoće dolazi do povećanja resorpcije kostiju [110,111]. Zatim dolazi do postepenog intenziviranja procesa formiranja kostiju [110,111], što potvrđuju i naši rezultati.

Koncentracija parametra P1NP je bila značajno veća na početku trećeg trimestra u odnosu na drugi trimestar, a zatim je u kasnom trećem trimestru došlo do daljeg porasta njegove koncentracije, da bi se i posle porođaja se održao visok nivo ovog parametra (tabela 9). Naši rezultati su u skladu sa prethodnim longitudinalnim studijama koje su ispitivale nivo P1NP u normalnoj nekomplikovanoj trudnoći [146,147,258]. Povećanje koncentracije P1NP specifično odražava intenziviranje procesa formiranja kostiju sa napredovanjem trudnoće, s obzirom da P1NP proizvod koji se oslobađa prilikom sinteze kolagena tipa 1 u kostima, a da je metabolički inertan [144].

Koncentracija osteokalcina bila je statistički značajno niža u drugom trimestru u poređenju sa prvim trimestrom. Ovo sniženje se može objasniti povećanim renalnim

izlučivanjem i hemodilucijom [106]. Kasnije tokom trudnoće, došlo je do porasta njegove koncentracije, pa su vrednosti u kasnom trećem trimestru bile više od vrednosti izmerenih u prvom trimestru. Posle porođaja, došlo je do daljeg rasta njegove koncentracije (tabela 9). Slične promene koncentracije osteokalcina tokom trudnoće opisale su i druge studije [110,134,259], mada su Naylor i saradnici opisali sniženje koncentracije osteokalcina tokom trudnoće [146]. Promene u koncentraciji osteokalcina su u najvećoj meri posledica promena u koštanom prometu.

Intenziviranje procesa formiranja kostiju u kasnoj trudnoći može biti inicirano porastom nivoa IGF-I. Izražen koštani promet u laktaciji je verovatno povezan sa visokim prolaktinom i PTH, padom estradiola i PTHrP [260]. Osim toga, povećana sekrecija insulina u trudnoći možda ima anabolički efekat na kosti, jer je insulinska rezistencija izražena prvenstveno u mišićima i masnom tkivu [261]. Insulin deluje direktno na osteoblaste [262], ali i sinergistički sa IGF-I i PTH [263]. U stanjima insulinopenije, i eksperimentalnim i kliničkim (kao što je DM tip 1) dolazi do smanjenog formiranja kostiju, poremećaja funkcije osteoblasta, i smanjene ekspresije osteokalcina. Do istih efekata dovodi i delecija receptora za insulin na osteoblastima [264]. U našoj studiji koncentracije osteokalcina i P1NP u trećem trimestru su bile u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa ITM, koncentracijom insulina, vrednostima HOMA-IR i HOMA-%B indeksa, kao i sa koncentracijom leptina (tabele 14 i 16). Ove korelacije se mogu objasniti stimulatornim dejstvom insulina, kao i ranije pomenutim perifernim efektima leptina, na proces formiranja kostiju. P1NP je metabolički neaktivan i pored navedenih parametara, bio je u značajnoj korelaciji samo još sa osteokalcinom (tabela 16), jer su oba proizvodi istog procesa. Multipla regresiona analiza je pokazala da nijedan od ispitivanih parametara nije bio nezavisno povezan sa koncentracijom P1NP (tabela 17).

Uprkos izraženim promenama u koštanom prometu, smatra se da trudnoća, ili višestruke trudnoće, pod normalnim uslovima ne dovode do povećanog rizika za razvoj osteoporoze tj. da ne postoji značajna razlika u koštanoj masi ili incidenci fraktura kod žena koje su imale više trudnoća u odnosu na žene koje nisu rađale [138,265]. Povećan koštani promet, zajedno sa povećanjem intestinalne apsorpcije kalcijuma, doprinosi nesmetanom snabdevanju fetusa kalcijumom, ali ne dolazi do trajnog gubitka koštane

mase majke [107]. S druge strane, kost je metabolički aktivno tkivo, čiji proizvod osteokalcin, koji se u najvećoj meri oslobađa u cirkulaciju u procesu formiranja kostiju, ima ulogu u regulaciji energetskeg metabolizma i metabolizma glukoze. Kod ljudi, ova uloga je kompleksna i mehanizmi njegovog dejstva verovatno nisu isti u fiziološkom stanju i patološkim stanjima.

Pozitivna korelacija osteokalcina i parametara za procenu insulinske rezistencije delom može biti i posledica endokrinog dejstva osteokalcina, odnosno dejstva na metabolizam glukoze, jer je sve više dokaza da osteokalcin povećava osetljivost tkiva na insulin, a i da utiče na povećanje sekrecije insulina [113]. Naši rezultati su u skladu sa rezultatima Winhofer i saradnika, kod kojih je osteokalcin bio u pozitivnoj korelaciji sa parametrima koji ukazuju na sintezu insulina izračunatim iz OGTT testa [135], kao i sa rezultatima Srichmokwuna i saradnika, koji su pokazali da je osteokalcin u pozitivnoj korelaciji sa HOMA-IR i HOMA-%B [97]. Ove rezultate možemo tumačiti potencijalnim kompenzatornim povećanjem koncentracije osteokalcina u stanju rastuće insulinske rezistencije. U prilog tome ide i činjenica da je kod trudnica sa GDM zabeležen viši nivo osteokalcina u odnosu na trudnice sa normalnom tolerancijom na glukozu [135–137]. Kao što je već pomenuto, porast koncentracije osteokalcina može biti povezan i sa smanjenjem koncentracije adiponektina u trudnoći, povezujući na taj način masno tkivo, kost i metabolizam glukoze. Neki autori su predložili mehanizam po kome pod normalnim uslovima insulin stimuliše diferencijaciju osteoblasta, koji produkuju više osteokalcina, koji zatim stimuliše dalju produkciju insulina od strane β -ćelija pankreasa i povećava osetljivost perifernih tkiva na insulin [266].

Negativna korelacija osteokalcina i triglicerida je opisana kod muškaraca i negravidnih žena [120,130,267]. Nasuprot ovim rezultatima, u našem istraživanju osteokalcin je bio u pozitivnoj korelaciji sa trigliceridima (tabela 14). Naše ispitanice su bile zdrave nekojane trudnice, dok su u pomenutim istraživanjima ispitanici bili stariji muškarci i žene u menopauzi, sa poremećajem u toleranciji glukoze i/ili metaboličkim sindromom, i možemo pretpostaviti da je to razlog različitih rezultata.

Rezultati multiple regresione analize za nezavisni uticaj na koncentraciju osteokalcina su pokazali da je samo koncentracija TAS-a nezavisno povezana sa koncentracijom osteokalcina u trećem trimestru. Postoji više dokaza da je oksidativni stres povezan sa promenama u koštanom prometu. Povećana osteoklastna aktivnost i smanjena osteoblastna aktivnost su povezane sa nižim nivoom antioksidanasa u plazmi osoba sa postmenopauzalnom osteoporozom [268], a estrogen pojačava antioksidativnu zaštitu u kostima [269]. Osim toga, eksperimentalno je dokazano da osteoblasti proizvode antioksidanse kao što je glutation-peroksidaza [270], kao i da su antioksidansi neophodni za preživljavanje osteoblasta i da pojačavaju efekat faktora rasta na osteoblaste [271].

Zanimljivo je napomenuti i da su eksperimenti na miševima pokazali da osteokalcin prolazi krvno-moždanu barijeru i utiče na sintezu neurotransmitera γ -aminobuterna kiselina, na razvoj anksioznosti i depresije, procese učenja i memorije nezavisno od njegovih metaboličkih funkcija, kao i da prolazi kroz placentu i utiče na razvoj mozga fetusa [272]. Potpuna je nepoznanica da li i u kojoj meri ovi procesi postoje i kod ljudi.

U drugom trimestru je došlo do porasta koncentracije 25(OH)D, i visok nivo je zabeležen i na početku trećeg trimestra. U kasnom trećem trimestru je došlo do pada njegove koncentracije, a posle porođaja je zabeležena najniža vrednost (tabela 9). Ovi rezultati se mogu objasniti sezonskim promenama koje su praćene promenama u koncentraciji vitamina D, jer je prvo uzorkovanje sprovedeno u periodu april-jun. Drugo uzorkovanje je sprovedeno u toku letnjih meseci, a treće u periodu septembar-oktobar, pa su i vrednosti 25(OH)D u uzorcima sakupljenim u ovom periodu najviše. Četvrto uzorkovanje je sprovedeno u kasnu jesen, a poslednje merenje u zimskom periodu, kada ima najmanje sunčanih sati, a i to je period posle porođaja u kome ispitanice nisu provodile značajno vreme napolju. Pošto su sve ispitanice koristile vitaminske suplemente sa ujednačenim sadržajem vitamina D, i dobile savet o balansiranoj ishrani, predstavljale su homogenu grupu po pitanju unosa vitamina D. Takođe sve su istog etničkog porekla i žive na istoj geografskoj širini, odnosno izložene su istom broju sunčanih sati. S druge strane, zabeleženo je da u trudnoći dolazi do kontinuiranog porasta u koncentraciji aktivnog metabolita vitamina D, 1,25(OH)₂D, do kraja trudnoće

[273,274]. Porast $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ se smatra činiocem koji dovodi do povećanja intestinalne apsorpcije kalcijuma kako bi se zadovoljile potrebe rastućeg fetusa, iako postoje indicije da nije neophodan u ovom procesu [106]. Osim toga, u trudnoći dolazi i do porasta koncentracije vitamin D vezujućeg proteina [134], pa je bilo očekivano i da $25(\text{OH})\text{D}$ raste do kraja trudnoće, ili da se kompenzuje smanjenje usled sezonskog uticaja. I druge studije koje su u obzir uzele sezonske varijacije koncentracije $25(\text{OH})\text{D}$ opisale su smanjenje njegove koncentracije od sredine trudnoće, sa najnižim vrednostima oko 36. nedelje gestacije [275,276].

Ovo istraživanje je pokazalo da je deficijencija vitamina D je rasprostranjena čak i kod zdravih trudnica sa adekvatnom ishranom koje su koristile vitaminsku suplementaciju. Koncentracija $25(\text{OH})\text{D}$ manja od 20 ng/mL se smatra indikativnom za postojanje deficijencije vitamina D u organizmu [277]. Ukoliko se primeni ovaj kriterijum, čak 29 trudnica koje su učestvovala u ovoj studiji (76,3%) je na početku trudnoće imalo insuficijenciju vitamina D. Veliki broj studija je ispitivao učestalost insuficijencije vitamina D kod trudnica, i dobijeni su rezultati od 7% do čak 100% kod određenih subpopulacija afričkog porekla [278]. U jednom istraživanju u Srbiji, koje je ispitivalo status vitamina D kod trudnica sa preeklampsijom i normotenzivnih trudnica, zabeleženo je da 77% zdravih trudnica ima koncentraciju $25(\text{OH})\text{D}$ manju od 20 ng/mL [155], što je vrlo slično rezultatima dobijenim u ovoj studiji. Opsežnija ispitivanja trudnica sa naših prostora su neophodna kako bi se preciznije utvrdila prevalenca insuficijencije u celokupnoj populaciji, kao i njene dalekosežne posledice. Hipovitaminoza D u trudnoći je češća kod trudnica sa GDM i preeklampsijom [274], ali nije jasno da li suplementacija i povećanje nivoa $25(\text{OH})\text{D}$ u cirkulaciji majke vode poboljšanju ishoda u ovim stanjima, za koja se zna da imaju multifaktorsku etiologiju [278].

Vitamin D stimuliše ekspresiju osteokalcina [115], ali rezultati ovog istraživanja nisu pokazali postojanje statistički značajne korelacije između ova dva parametra. Koncentracija $25(\text{OH})\text{D}$ nije bila u značajnoj korelaciji ni sa jednim izmerenim parametrom, iako se on dovodi u vezu kako sa metabolizmom kostiju, tako i sa insulinskom rezistencijom, metabolizmom masnog tkiva i inflamatornom i imunskom funkcijom. Zanimljivo je da je studija transkriptoma periferne krvi zdravih

trudnica, koji su sprovedi Al-Garawi i saradnici, pokazala da tokom nekomplikovane trudnoće dolazi do promene u transkripciji preko 5000 gena, a da je vitamin D povezan sa promenama u transkripciji nekolicine gena, kao što su geni uključeni u antimikrobnu odbranu, reorganizaciju ekscelularnog matriksa, regulaciju ćelijskog ciklusa, regulaciju nivoa glutaciona i transkripcionih faktora [279]. Dejstva vitamina D u trudnoći su očigledno veoma složena čak i u trudnoćama koje nisu praćene komplikacijama, ali još uvek postoje nedoumice o optimalnom nivou ovog vitamina-hormona u trudnoći, optimalnom unosu i suplementaciji, kao i njegovoj povezanosti sa ishodima trudnoće.

6. Zaključci

1. Tokom trudnoće je došlo do promene koncentracije svih parametara lipidnog profila. Koncentracija triglicerida je pokazala najveće povećanje tokom trudnoće, a najviše vrednosti su izmerene u trećem trimestru. Posle porođaja, dolazi do izraženog pada u koncentraciji triglicerida do vrednosti koje su slične vrednostima u prvom trimestru. Tokom trudnoće je došlo i do porasta koncentracije ukupnog i LDL-holesterola. Najveće koncentracije ukupnog i LDL-holesterola su uočene u trećem trimestru. Posle porođaja dolazi do pada njihove koncentracije. Ove promene koncentracije ukupnog holesterola, LDL-holesterola i triglicerida vode ka profilu koji se u negravidnom stanju smatra proaterogenim. Specifičnost promene lipidnog statusa u trudnoći se ogleda u porastu koncentracije HDL-holesterola koji ima ateroprotektivna dejstva. Vrednosti HDL-holesterola su bile najviše u drugom trimestru i na početku trećeg trimestra.

2. Trudnoća, a posebno kasni treći trimestar, je period koji karakteriše pomeranje redoks balansa ka oksidativnom stresu, pa dolazi do povećanja koncentracije TOS-a, TBARS-a i PAB-a koje je najizraženije u tački pre porođaja. Posle porođaja, dolazi do pada koncentracije navedenih parametara. U normalnim uslovima, redoks ravnoteža se uspostavlja ubrzo posle porođaja, kada su vrednosti parametara antioksidativne zaštite, TAS i ukupnih SH grupa, najveće.

3. Mokraćna kiselina je deo sistema antioksidativne zaštite, njena koncentracija značajno raste od drugog trimestra i najveća je posle porođaja. Trudnoća ima blagi proinflamatorni potencijal, koji se odražava na koncentraciju CRP-a, čija je koncentracija bila najviša u drugom trimestru, a najniža posle porođaja.

4. U trudnoći se razvija insulinska rezistencija tkiva majke, koja dovodi do kompenzatornog povećanja produkcije insulina, što se ogleda u promeni koncentracije insulina i vrednosti HOMA-IR i HOMA-%B indeksa. Najviše vrednosti insulina i HOMA-%B indeksa su zabeležene u kasnom trećem trimestru. Posle porođaja je došlo do izraženog pada vrednosti sva tri parametra, što znači da je fiziološka insulinska rezistencija u trudnoći reverzibilna. Sve vreme trajanja trudnoće i posle porođaja trudnice su bile normoglikemične, što znači da je insulinska rezistencija bila adekvatno kompenzovana dobro očuvanom funkcijom pankreasa.

5. Trudnoća je stanje koje je praćeno postepenim porastom koncentracije leptina do maksimalnih vrednosti početkom trećeg trimestra. Trudnoća se smatra stanjem centralne rezistencije na leptin, koja kao i insulinska rezistencija, verovatno ima za cilj neometano snabdevanje fetusa nutrijentima.

6. U trećem trimestru, leptin je nezavisno povezan sa ITM, jer su izvori leptina u trudnoći masno tkivo majke i placenta čiji porast tokom trudnoće doprinosi porastu telesne težine majke. Pozitivna korelacija leptina i insulina može se, bar delom, objasniti stimulatornim dejstvom insulina na produkciju leptina, ali moguće je da leptin doprinosi razvoju rezistencije tkiva na insulin jer je zabeležena pozitivna korelacija sa HOMA indeksima, i da na taj način doprinosi mobilizaciji energetske rezerve majke. Povezanost leptina i oksidativnog stresa ogleda se u činjenici da je koncentracija leptina bila u pozitivnoj korelaciji sa parametrom TOS-om u trećem trimestru, kada je oksidativni stres najizraženiji u trudnoći. Leptin se smatra proinflamatornim adipocitokinom, što potvrđuje njegova pozitivna korelacija sa koncentracijom CRP-a u trećem trimestru. U trudnoći su dominantna periferna, direktna dejstva leptina na kost. Na ovaj način on deluje stimulatorno na proces formiranja kostiju, što se ogleda u pozitivnoj korelaciji leptina sa osteokalcinom i P1NP-om.

7. Primećena je tendencija smanjenja koncentracije adiponektina tokom trudnoće, mada ovo smanjenje nije bilo statistički značajno. Adiponektin verovatno deluje antagonistički u odnosu na leptin, odnosno povećava osetljivost tkiva na insulin, a u prilog tome ide činjenica da je njegova koncentracija u trećem trimestru bila u negativnoj korelaciji sa koncentracijom leptina i insulina, i vrednostima HOMA-IR i ITM, kao i sa koncentracijom glukoze. Značajan je i uticaj adiponektina na lipidni status u trudnoći. Koncentracija adiponektina je bila u negativnoj korelaciji sa koncentracijom triglicerida u trećem trimestru, a pozitivnoj sa koncentracijom HDL-holesterola. Samo je HDL-holesterol bio nezavisno povezan sa adiponektinom u trećem trimestru, što ide u prilog tezi da su antiaterogena dejstva adiponektina povezana sa HDL-lipoproteinskim česticama. Nasuprot leptinu, koncentracija adiponektina je bila u negativnoj korelaciji sa TOS-om, što ukazuje na inverzan odnos adiponektina i oksidativnog stresa. S obzirom na odsustvo značajne korelacije adiponektina sa parametrom P1NP, negativna korelacija sa koncentracijom osteokalcina može biti posledica specifičnog kompenzatornog dejstva osteokalcina u stanju smanjene koncentracije adiponektina u

trećem trimestru, jer je jedan od potencijalnih mehanizama kojima osteokalcin indirektno utiče na metabolizam glukoze upravo preko povećanja koncentracije adiponektina.

8. Od sredine trudnoće dolazi do postepenog povećanja koncentracije osteokalcina i P1NP. Najveće koncentracije oba parametra su zabeležene u kasnom trećem trimestru i posle porođaja, što ukazuje na intenziviranje procesa formiranja kostiju što je karakteristično za ovaj period. Na povećanje procesa formiranja kostiju, do koga dolazi od sredine trudnoće, verovatno utiču i insulin i leptin, jer su zabeležene pozitivne korelacije koncentracije osteokalcina i P1NP sa koncentracijom insulina i leptina i vrednostima HOMA-IR i HOMA-%B indeksa u trećem trimestru.

9. Pozitivna korelacija osteokalcina i parametara za procenu insulinske rezistencije može biti i posledica endokrinog dejstva osteokalcina na metabolizam glukoze. Moguće je da je porast koncentracije osteokalcina kompenzatorni mehanizam u stanju povećane insulinske rezistencije i smanjene koncentracije adiponektina, kakvo je treći trimestar trudnoće. Takođe, koncentracija osteokalcina je bila u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom triglicerida u trećem trimestru. Ovi rezultati idu u prilog hipotezi da osteokalcin nije samo proizvod koji se oslobađa u cirkulaciju prilikom formiranja kostiju, već da svojim endokrinim dejstvom povezuje energetski metabolizam sa metabolizmom kosti, a preko adiponektina i sa masnim tkivom.

10. Osteokalcin je bio nezavisno povezan samo sa koncentracijom TAS-a u trećem trimestru, što se može objasniti pozitivnim uticajem antioksidanasa, među kojima je i mokraćna kiselina, na preživljavanje osteoblasta i proces formiranja kostiju.

11. Promene u koncentraciji 25(OH)D kao glavnog cirkulišućeg markera statusa vitamina D u organizmu su odražavale sezonske promene u različitim tačkama uzorkovanja. Najveće vrednosti su zabeležene u letnjim mesecima. Deficijencija vitamina D (<20 ng/mL) je uočena kod 76,3% ispitivanih trudnica. 25(OH)D nije bio u značajnoj korelaciji sa drugim parametrima, što je verovatno posledica njegovih kompleksnih dejstava prvenstveno na nivou genoma.

7. Literatura

1. Angueira AR, Ludvik AE, Reddy TE, Wicksteed B, Lowe WL, Layden BT. New insights into gestational glucose metabolism: lessons learned from 21st century approaches. *Diabetes*. 2015;64(2):327–34.
2. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011;25(3):287–99.
3. Butte NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(5):1256S–1261.
4. Kershaw EE, Flier JS. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J Clin Endocrinol Metab*. Endocrine Society; 2004;89(6):2548–56.
5. Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(5):230–6.
6. Guibourdenche J, Fournier T, MalassinÃŠ A, Evain-Brion D. Development and hormonal functions of the human placenta. *Folia Histochem Cytobiol*. 2010;47(5):35–40.
7. Costantine MM. Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy. *Front Pharmacol*. 2014;5:65.
8. Soma-Pillay P, Nelson-Piercy C, Tolppanen H, Mebazaa A. Physiological changes in pregnancy. *Cardiovasc J Afr*. 27(2):89–94.
9. Townsley DM. Hematologic complications of pregnancy. *Semin Hematol*. 2013;50(3):222–31.
10. Chandra S, Tripathi AK, Mishra S, Amzarul M, Vaish AK. Physiological changes in hematological parameters during pregnancy. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2012;28(3):144–6.
11. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and*

- Molecular Diagnostics. 5th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. Saunders, Elsevier; 2012.
12. Malone FD, Canick JA, Ball RH, Nyberg DA, Comstock CH, Bukowski R, et al. First-Trimester or Second-Trimester Screening, or Both, for Down's Syndrome. *N Engl J Med.* 2005;353(19):2001–11.
 13. Handwerger S. Clinical counterpoint: the physiology of placental lactogen in human pregnancy. *Endocr Rev.* 1991;12(4):329–36.
 14. Strauss JF, Martinez F, Kiriakidou M. Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions. *Biol Reprod.* 1996;54(2):303–11.
 15. Jung C, Ho JT, Torpy DJ, Rogers A, Doogue M, Lewis JG, et al. A longitudinal study of plasma and urinary cortisol in pregnancy and postpartum. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(5):1533–40.
 16. Ananthakrishnan S. Diabetes insipidus during pregnancy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2016;30(2):305–15.
 17. Lazarus JH. Thyroid function in pregnancy. *Br Med Bull.* 2011;97(1):137–48.
 18. Glinoe D. What happens to the normal thyroid during pregnancy? *Thyroid.* 1999;9(7):631–5.
 19. Brizzi P, Tonolo G, Esposito F, Puddu L, Dessole S, Maioli M, et al. Lipoprotein metabolism during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;181(2):430–4.
 20. Catalano PM, Hoegh M, Minium J, Huston-Presley L, Bernard S, Kalhan S, et al. Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetologia.* 2006;49(7):1677–85.
 21. Handwerger S, Freemark M. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000;13(4):343–56.

22. Vejrazkova D, Vcelak J, Vankova M, Lukasova P, Bradnova O, Halkova T, et al. Steroids and insulin resistance in pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;139:122–9.
23. Rebarber A, Istwan NB, Russo-Stieglitz K, Cleary-Goldman J, Rhea DJ, Stanziano GJ, et al. Increased incidence of gestational diabetes in women receiving prophylactic 17alpha-hydroxyprogesterone caproate for prevention of recurrent preterm delivery. *Diabetes Care.* 2007;30(9):2277–80.
24. Picard F, Wanatabe M, Schoonjans K, Lydon J, O'Malley BW, Auwerx J. Progesterone receptor knockout mice have an improved glucose homeostasis secondary to beta -cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(24):15644–8.
25. Chiu KC, Chu A, Go VLW, Saad MF. Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and {beta} cell dysfunction. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(5):820–5.
26. Sivan E, Boden G. Free fatty acids, insulin resistance, and pregnancy. *Curr Diab Rep.* 2003;3(4):319–22.
27. Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier J-C, Huston-Presley L, Friedman JE, et al. TNF- Is a Predictor of Insulin Resistance in Human Pregnancy. *Diabetes.* 2002;51(7):2207–13.
28. Vettor R, Milan G, Rossato M, Federspil G. Review article: adipocytokines and insulin resistance. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;22 Suppl 2:3–10.
29. Esteve E, Ricart W, Fernández-Real JM. Adipocytokines and insulin resistance: the possible role of lipocalin-2, retinol binding protein-4, and adiponectin. *Diabetes Care.* 2009;32 Suppl 2:S362-7.
30. Mshelia DS, Kullima A, Gali RM, Kawuwa MB, Mamza YP, Habu SA, et al. The use of plasma lipid and lipoprotein ratios in interpreting the hyperlipidaemia of pregnancy. *J Obstet Gynaecol (Lahore).* 2010;30(8):804–8.

31. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol*. 2002;57(5):609–13.
32. Herrera E, Ortega-Senovilla H. Disturbances in lipid metabolism in diabetic pregnancy - Are these the cause of the problem? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010;24(4):515–25.
33. Herrera E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr*. 2000;54 Suppl 1:S47-51.
34. Herrera E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine*. 2002 Oct;19(1):43–55.
35. Fisher E, Feig J, Shamir R. Atheroprotective Effects of HDL: Beyond Reverse Cholesterol Transport. *Curr Drug Targets*. 2008;9(3):196–203.
36. Halliwell B, MC Gutteridge J. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford, UK: Oxford University Press,; 2007.
37. Casanueva E, Viteri FE. Iron and oxidative stress in pregnancy. *J Nutr*. 2003;133(5 Suppl 2):1700S–1708S.
38. Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(10):1634–50.
39. Biondi C, Pavan B, Lunghi L, Fiorini S, Vesce F. The Role and Modulation of the Oxidative Balance in Pregnancy. *Curr Pharm Des*. 2005;11(16):2075–89.
40. Thompson LP, Al-Hasan Y. Impact of oxidative stress in fetal programming. *J Pregnancy*. 2012;2012:582748.
41. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005;3:28-21p.
42. Hung T-H, Lo L-M, Chiu T-H, Li M-J, Yeh Y-L, Chen S-F, et al. A longitudinal

- study of oxidative stress and antioxidant status in women with uncomplicated pregnancies throughout gestation. *Reprod Sci.* 2010;17(4):401–9.
43. Leal CAM, Schetinger MRC, Leal DBR, Morsch VM, da Silva AS, Rezer JFP, et al. Oxidative stress and antioxidant defenses in pregnant women. *Redox Rep.* 2011;16(6):230–6.
 44. Patil SB, Kodliwadmth M V, Kodliwadmth SM. Study of oxidative stress and enzymatic antioxidants in normal pregnancy. *Indian J Clin Biochem.* 2007;22(1):135–7.
 45. Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci.* 2009;16(2):206–15.
 46. 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):601–10.
 47. Friis CM, Paasche Roland MC, Godang K, Ueland T, Tanbo T, Bollerslev J, et al. Adiposity-related inflammation: Effects of pregnancy. *Obesity.* 2013;21(1):E124–30.
 48. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med.* 2010;49(11):1603–16.
 49. Bernardi F, Guolo F, Bortolin T, Petronilho F, Dal-Pizzol F. Oxidative stress and inflammatory markers in normal pregnancy and preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res.* 2008;34(6):948-51
 50. Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose Tissue: The New Endocrine Organ? A Review Article. *Dig Dis Sci.* 2009;54(9):1847–56.
 51. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998;395(6704):763–70.
 52. Baratta M. Leptin--from a signal of adiposity to a hormonal mediator in

- peripheral tissues. *Med Sci Monit.* 2002;8(12):RA282-92.
53. Funahashi H, Yada T, Suzuki R, Shioda S. Distribution, function, and properties of leptin receptors in the brain. *Int Rev Cytol.* 2003;224:1–27.
 54. Paz-Filho G, Mastronardi C, Franco CB, Wang KB, Wong M-L, Licinio J. Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2012;56(9):597–607.
 55. Park H-K, Ahima RS. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Metabolism.* 2015;64(1):24–34.
 56. Janeckova R. The role of leptin in human physiology and pathophysiology. *Physiol Res.* 2001;50(5):443–59.
 57. Koutkia P, Canavan B, Johnson ML, DePaoli A, Grinspoon S. Characterization of leptin pulse dynamics and relationship to fat mass, growth hormone, cortisol, and insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285(2):E372-9.
 58. Fried SK, Ricci MR, Russell CD, Laferrère B. Regulation of leptin production in humans. *J Nutr.* 2000;130(12):3127S–3131S.
 59. El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjørbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J Clin Invest.* 2000;105(12):1827–32.
 60. Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem.* 2004;50(9):1511–25.
 61. Henson MC, Castracane VD. Leptin in pregnancy: an update. *Biol Reprod.* 2006;74(2):218–29.
 62. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372(6505):425–32.

63. Elias CF, Purohit D. Leptin signaling and circuits in puberty and fertility. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(5):841–62.
64. Vázquez MJ, Romero-Ruiz A, Tena-Sempere M. Roles of leptin in reproduction, pregnancy and polycystic ovary syndrome: consensus knowledge and recent developments. *Metabolism.* 2015;64(1):79–91.
65. Sainsbury A, Cooney GJ, Herzog H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2002;16(4):623–37.
66. Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26(11):1407–33.
67. Mancuso P. The role of adipokines in chronic inflammation. *ImmunoTargets Ther.* 2016;5:47–56.
68. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, et al. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med.* 1997;3(9):1029–33.
69. Schubring C, Englaro P, Siebler T, Blum WF, Demirakca T, Kratzsch J, et al. Longitudinal analysis of maternal serum leptin levels during pregnancy, at birth and up to six weeks after birth: relation to body mass index, skinfolds, sex steroids and umbilical cord blood leptin levels. *Horm Res.* 1998;50(5):276–83.
70. Eriksson B, Löf M, Olausson H, Forsum E. Body fat, insulin resistance, energy expenditure and serum concentrations of leptin, adiponectin and resistin before, during and after pregnancy in healthy Swedish women. *Br J Nutr.* 2010;103(1):50–7.
71. Maymó JL, Pérez Pérez A, Sánchez-Margalet V, Dueñas JL, Calvo JC, Varone CL. Up-regulation of placental leptin by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology.* 2009;150(1):304–13.
72. Gambino YP, Pérez Pérez A, Dueñas JL, Calvo JC, Sánchez-Margalet V, Varone

- CL. Regulation of leptin expression by 17beta-estradiol in human placental cells involves membrane associated estrogen receptor alpha. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(4):900–10.
73. Nagaishi VS, Cardinali LI, Zampieri TT, Furigo IC, Metzger M, Donato J. Possible crosstalk between leptin and prolactin during pregnancy. *Neuroscience*. 2014;259:71–83.
74. McLachlan KA, O’Neal D, Jenkins A, Alford FP. Do adiponectin, TNF α , leptin and CRP relate to insulin resistance in pregnancy? Studies in women with and without gestational diabetes, during and after pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006;22(2):131–8.
75. Maghbooli Z, Hossein-nezhad A, Rahmani M, Shafaei A-R, Larijani B. Relationship between Leptin Concentration and Insulin Resistance. *Horm Metab Res*. 2007;39(12):903–7.
76. White V, González E, Capobianco E, Pustovrh C, Martínez N, Higa R, et al. Leptin modulates nitric oxide production and lipid metabolism in human placenta. *Reprod Fertil Dev*. 2006;18(4):425.
77. Konukoglu D, Serin O, Turhan MS. Plasma Leptin and its Relationship with Lipid Peroxidation and Nitric Oxide in Obese Female Patients with or without Hypertension. *Arch Med Res*. 2006;37(5):602–6.
78. Ruan H, Dong LQ. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *J Mol Cell Biol*. 2016;8(2):101–9.
79. White UA, Maier J, Zhao P, Richard AJ, Stephens JM. The modulation of adiponectin by STAT5-activating hormones. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2016;310(2):E129-36.
80. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*. 2005;26(3):439–51.

81. Saltiel AR. You are what you secrete. *Nat Med*. 2001;7(8):887–8.
82. Garaulet M, Hernández-Morante JJ, de Heredia FP, Tébar FJ. Adiponectin, the controversial hormone. *Public Health Nutr*. 2007;10(10A):1145–50.
83. Wang Z V, Scherer PE. Adiponectin, the past two decades. *J Mol Cell Biol*. 2016;8(2):93–100.
84. Luo X-H, Guo L-J, Yuan L-Q, Xie H, Zhou H-D, Wu X-P, et al. Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res*. 2005;309(1):99–109.
85. Spranger J, Kroke A, Möhlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet*. 2003;361(9353):226–8.
86. Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, Bang H, Couper D, Ballantyne CM, et al. Adiponectin and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes*. 2004;53(9):2473–8.
87. Matsushita K, Yatsuya H, Tamakoshi K, Wada K, Otsuka R, Takefuji S, et al. Comparison of Circulating Adiponectin and Proinflammatory Markers Regarding Their Association With Metabolic Syndrome in Japanese Men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(4):871–6.
88. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, et al. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(1):85–9.
89. Asai-Sato M, Okamoto M, Endo M, Yoshida H, Murase M, Ikeda M, et al. Hypoadiponectinemia in lean lactating women: Prolactin inhibits adiponectin secretion from human adipocytes. *Endocr J*. 2006;53(4):555–62.
90. Fuglsang J, Skjaerbaek C, Frystyk J, Flyvbjerg A, Ovesen P. A longitudinal study of serum adiponectin during normal pregnancy. *BJOG*. 2006;113(1):110–3.

91. Mastorakos G, Valsamakis G, Papatheodorou DC, Barlas I, Margeli A, Boutsiadis A, et al. The role of adipocytokines in insulin resistance in normal pregnancy: visfatin concentrations in early pregnancy predict insulin sensitivity. *Clin Chem*. 2007;53(8):1477–83.
92. Ogunyemi D, Xu J, Mahesan AM, Rad S, Kim E, Yano J, et al. Differentially expressed genes in adipocytokine signaling pathway of adipose tissue in pregnancy. *J diabetes Mellit*. 2013;3(2):86–95.
93. Aye ILMH, Powell TL, Jansson T, Hull HR, Dinger MK, Knehan AW, et al. Review: Adiponectin--the missing link between maternal adiposity, placental transport and fetal growth? *Placenta*. 2013;34 Suppl:S40-5.
94. Castro NP, Euclides V V, Simões FA, Vaz-de-Lima LRA, De Brito CA, Luzia LA, et al. The Relationship between Maternal Plasma Leptin and Adiponectin Concentrations and Newborn Adiposity. *Nutrients*. 2017;9(3).
95. Cseh K, Baranyi E, Melczer Z, Kaszás E, Palik E, Winkler G. Plasma adiponectin and pregnancy-induced insulin resistance. *Diabetes Care*. 2004;27(1):274–5.
96. Ritterath C, Rad NT, Siegmund T, Heinze T, Siebert G, Buhling KJ. Adiponectin during pregnancy: correlation with fat metabolism, but not with carbohydrate metabolism. *Arch Gynecol Obstet*. 2010;281(1):91–6.
97. Srichomkwun P, Houngngam N, Pasatrat S, Tharavanij T, Wattanachanya L, Khovidhunkit W. Undercarboxylated osteocalcin is associated with insulin resistance, but not adiponectin, during pregnancy. *Endocrine* 2016;53(1):129–35.
98. Lowe LP, Metzger BE, Lowe WL, Dyer AR, McDade TW, McIntyre HD, et al. Inflammatory mediators and glucose in pregnancy: results from a subset of the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(12):5427–34.
99. Telejko B, Kalejta K, Kuzmicki M, Wawrusiewicz-Kurylonek N, Lipinska D,

- Pliszka J, et al. The association of bone turnover markers with pro- and anti-inflammatory adipokines in patients with gestational diabetes. *Ann Agric Environ Med.* 2015;22(2):307–12.
100. Gustafsson S, Lind L, Söderberg S, Zilmer M, Hulthe J, Ingelsson E. Oxidative stress and inflammatory markers in relation to circulating levels of adiponectin. *Obesity.* 2013;21(7):1467–73.
101. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004;114(12):1752–61.
102. Eleuterio NM, Palei ACT, Machado JSR, Tanus-Santos JE, Cavalli RC, Sandrim VC. Role of adiponectin on antioxidant profile: evaluation during healthy and hypertensive disorders of pregnancy. *Blood Press.* 2016;25(4):241–3.
103. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev.* 2005;26(4):97–122.
104. Kovacs CS. Calcium Metabolism in Pregnancy and Lactation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(6):2344-48.
105. Kovacs CS. Calcium and Bone Metabolism Disorders During Pregnancy and Lactation. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2011;40(4):795–826.
106. Kovacs CS. Calcium and bone metabolism during pregnancy and lactation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2005;10(2):105–18.
107. Fudge NJ, Kovacs CS. Pregnancy Up-Regulates Intestinal Calcium Absorption and Skeletal Mineralization Independently of the Vitamin D Receptor. *Endocrinology.* 2010;151(3):886–95.
108. Charoenphandhu N, Wongdee K, Krishnamra N, Bowman BM, Miller SC, Laskey MA, et al. Is prolactin the cardinal calciotropic maternal hormone? *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(7):395–401.

109. Møller UK, við Streym S, Mosekilde L, Rejnmark L. Changes in bone mineral density and body composition during pregnancy and postpartum. A controlled cohort study. *Osteoporos Int.* 2012;23(4):1213–23.
110. Ulrich U, Miller PB, Eyre DR, Chesnut CH, Schlebusch H, Soules MR. Bone remodeling and bone mineral density during pregnancy. *Arch Gynecol Obstet.* 2003;268(4):309–16.
111. Akesson A, Vahter M, Berglund M, Eklöf T, Bremme K, Bjellerup P. Bone turnover from early pregnancy to postweaning. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004;83(11):1049–55.
112. Kovacs CS. Vitamin D in pregnancy and lactation: maternal, fetal, and neonatal outcomes from human and animal studies. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(2):520S–528S.
113. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone.* 2016; 82:42-9.
114. Foresta C, Strapazzon G, De Toni L, Gianesello L, Calcagno A, Pilon C, et al. Evidence for Osteocalcin Production by Adipose Tissue and Its Role in Human Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(7):3502–6.
115. Staal A, Van Wijnen AJ, Desai RK, Pols HA, Birkenhäger JC, Deluca HF, et al. Antagonistic effects of transforming growth factor-beta on vitamin D3 enhancement of osteocalcin and osteopontin transcription: reduced interactions of vitamin D receptor/retinoid X receptor complexes with vitamin E response elements. *Endocrinology.* 1996;137(5):2001–11.
116. Vergnaud P, Garnero P, Meunier PJ, Bréart G, Kamihagi K, Delmas PD. Undercarboxylated osteocalcin measured with a specific immunoassay predicts hip fracture in elderly women: the EPIDOS Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(3):719–24.
117. Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, et al. Increased bone

- formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 1996;382(6590):448–52.
118. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*. 2007;130(3):456–69.
 119. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamamoto M, Yamauchi M, Kurioka S, Yano S, et al. Serum osteocalcin level is associated with glucose metabolism and atherosclerosis parameters in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(1):45–9.
 120. Kanazawa I, Yamaguchi T, Sugimoto T. Relationship between bone biochemical markers versus glucose/lipid metabolism and atherosclerosis; a longitudinal study in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;92(3):393–9.
 121. Bao Y, Zhou M, Lu Z, Li H, Wang Y, Sun L, et al. Serum levels of osteocalcin are inversely associated with the metabolic syndrome and the severity of coronary artery disease in Chinese men. *Clin Endocrinol* . 2011;75(2):196–201.
 122. Sarkar PD, Choudhury AB. Relationship of serum osteocalcin levels with blood glucose, insulin resistance and lipid profile in central Indian men with type 2 diabetes. *Arch Physiol Biochem*. 2012;118(5):260–4.
 123. Im J-A, Yu B-P, Jeon JY, Kim S-H. Relationship between osteocalcin and glucose metabolism in postmenopausal women. *Clin Chim Acta*. 2008;396(1–2):66–9.
 124. Lucey AJ, Paschos GK, Thorsdottir I, Martínez JA, Cashman KD, Kiely M, et al. Young overweight and obese women with lower circulating osteocalcin concentrations exhibit higher insulin resistance and concentrations of C-reactive protein. *Nutr Res*. 2013;33(1):67–75.
 125. Pittas AG, Harris SS, Eliades M, Stark P, Dawson-Hughes B. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(3):827–32.

126. Kindblom JM, Ohlsson C, Ljunggren O, Karlsson MK, Tivesten A, Smith U, et al. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. *J Bone Miner Res.* 2009;24(5):785–91.
127. Buday B, Pach FP, Literati-Nagy B, Vitai M, Vecsei Z, Koranyi L. Serum osteocalcin is associated with improved metabolic state via adiponectin in females versus testosterone in males. Gender specific nature of the bone-energy homeostasis axis. *Bone.* 2013;57(1):98–104.
128. Caglar GS, Ozdemir ED, Kiseli M, Demirtas S, Cengiz SD. The association of osteocalcin and adiponectin with glucose metabolism in nondiabetic postmenopausal women. *Gynecol Obstet Invest.* 2014;77(4):255–60.
129. Liu D-M, Guo X-Z, Tong H-J, Tao B, Sun L-H, Zhao H-Y, et al. Association between osteocalcin and glucose metabolism: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2015; 26(12):2823-33.
130. Chen L, Li Q, Yang Z, Ye Z, Huang Y, He M, et al. Osteocalcin, glucose metabolism, lipid profile and chronic low-grade inflammation in middle-aged and elderly Chinese. *Diabet Med.* 2013;30(3):309–17.
131. Choudhury AB, Sarkar PD, Sakalley DK, Petkar SB. Role of adiponectin in mediating the association of osteocalcin with insulin resistance and type 2 diabetes: a cross sectional study in pre- and post-menopausal women. *Arch Physiol Biochem.* 2014;120(2):73–9.
132. Bao Y, Ma X, Yang R, Wang F, Hao Y, Dou J, et al. Inverse Relationship between Serum Osteocalcin Levels and Visceral Fat Area in Chinese Men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(1):345–51.
133. Hill HS, Grams J, Walton RG, Liu J, Moellering DR, Garvey WT. Carboxylated and uncarboxylated forms of osteocalcin directly modulate the glucose transport system and inflammation in adipocytes. *Horm Metab Res.* 2014;46(5):341–7.
134. Ritchie LD, Fung EB, Halloran BP, Turnlund JR, Van Loan MD, Cann CE, et al.

- A longitudinal study of calcium homeostasis during human pregnancy and lactation and after resumption of menses. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(4):693–701.
135. Winhofer Y, Handisurya A, Tura A, Bittighofer C, Klein K, Schneider B, et al. Osteocalcin is related to enhanced insulin secretion in gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2010;33(1):139–43.
 136. Tabatabaei N, Giguère Y, Forest J-C, Rodd CJ, Kremer R, Weiler HA. Osteocalcin is higher across pregnancy in Caucasian women with gestational diabetes mellitus. *Can J diabetes.* 2014;38(5):307–13.
 137. Papastefanou I, Eleftheriades M, Kappou D, Lambrinoudaki I, Lavranos D, Pervanidou P, et al. Maternal serum osteocalcin at 11-14 weeks of gestation in gestational diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest.* 2015;45(10):1025–31.
 138. Saucedo R, Rico G, Vega G, Basurto L, Cordova L, Galvan R, et al. Osteocalcin, under-carboxylated osteocalcin and osteopontin are not associated with gestational diabetes mellitus but are inversely associated with leptin in non-diabetic women. *J Endocrinol Invest.* 2015; 38(5):519-26.
 139. Berner HS, Lyngstadaas SP, Spahr A, Monjo M, Thommesen L, Drevon CA, et al. Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. *Bone.* 2004;35(4):842–9.
 140. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(13):5266–70.
 141. Ferron M, Lacombe J. Regulation of energy metabolism by the skeleton: osteocalcin and beyond. *Arch Biochem Biophys.* 2014;561:137–46.
 142. Reid IR. Fat and bone. *Arch Biochem Biophys.* 2010;503(1):20–7.
 143. Garnero P, Grimaux M, Seguin P, Delmas PD. Characterization of immunoreactive forms of human osteocalcin generated in vivo and in vitro. *J*

- Bone Miner Res. 1994;9(2):255–64.
144. Melkko J, Kauppila S, Niemi S, Risteli L, Haukipuro K, Jukkola A, et al. Immunoassay for intact amino-terminal propeptide of human type I procollagen. *Clin Chem*. 1996;42(6 Pt 1):947–54.
 145. Brandt J, Krogh TN, Jensen CH, Frederiksen JK, Teisner B. Thermal instability of the trimeric structure of the N-terminal propeptide of human procollagen type I in relation to assay technology. *Clin Chem*. 1999;45(1):47–53.
 146. Naylor KE, Iqbal P, Fledelius C, Fraser RB, Eastell R. The effect of pregnancy on bone density and bone turnover. *J Bone Miner Res*. 2000;15(1):129–37.
 147. Hellmeyer L, Ziller V, Anderer G, Ossendorf A, Schmidt S, Hadji P. Biochemical markers of bone turnover during pregnancy: a longitudinal study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2006;114(9):506–10.
 148. Wagner CL, Taylor SN, Dawodu A, Johnson DD, Hollis BW. Vitamin D and its role during pregnancy in attaining optimal health of mother and fetus. *Nutrients*. 2012;4(3):208–30.
 149. Liu NQ, Hewison M. Vitamin D, the placenta and pregnancy. *Arch Biochem Biophys*. 2012;523(1):37–47.
 150. Pludowski P, Holick MF, Pilz S, Wagner CL, Hollis BW, Grant WB, et al. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality—a review of recent evidence. *Autoimmun Rev*. 2013;12(10):976–89.
 151. Jones G. Metabolism and biomarkers of vitamin D. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2012;243:7–13.
 152. Ginde AA, Sullivan AF, Mansbach JM, Camargo CA. Vitamin D insufficiency in pregnant and nonpregnant women of childbearing age in the United States. *Am J Obstet Gynecol*. 2010;202(5):436.e1-8.

153. Newhook LA, Sloka S, Grant M, Randell E, Kovacs CS, Twells LK. Vitamin D insufficiency common in newborns, children and pregnant women living in Newfoundland and Labrador, Canada. *Matern Child Nutr.* 2009;5(2):186–91.
154. Holmes VA, Barnes MS, Alexander HD, McFaul P, Wallace JMW. Vitamin D deficiency and insufficiency in pregnant women: a longitudinal study. *Br J Nutr.* 2009;102(6):876–81.
155. Djekic-Ivankovic M, Weiler H, Jones G, Kaufmann M, Kaludjerovic J, Aleksic-Velickovic V, et al. Vitamin D status in mothers with pre-eclampsia and their infants: a case–control study from Serbia, a country without a vitamin D fortification policy. *Public Health Nutr.* 2016;18:1–11.
156. Shin JS, Choi MY, Longtine MS, Nelson DM. Vitamin D effects on pregnancy and the placenta. *Placenta.* 2010;31(12):1027–34.
157. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O’Garra A. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol.* 2001;167(9):4974–80.
158. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, et al. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med.* 2002;195(5):603–16.
159. Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, Karimi F, Shafaei A-R, Larijani B. Correlation between vitamin D3 deficiency and insulin resistance in pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008;24(1):27–32.
160. Zhang C, Qiu C, Hu FBF, David RRM, van Dam RM, Bralley A, et al. Maternal plasma 25-hydroxyvitamin D concentrations and the risk for gestational diabetes mellitus. *PLoS One.* 2008;3(11):e3753.
161. Parlea L, Bromberg IL, Feig DS, Vieth R, Merman E, Lipscombe LL. Association between serum 25-hydroxyvitamin D in early pregnancy and risk

- of gestational diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2012;29(7):e25–32.
162. Baker AM, Haeri S, Camargo CA, Espinola JA, Stuebe AM. A nested case-control study of midgestation vitamin D deficiency and risk of severe preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(11):5105–9.
 163. Robinson CJ, Wagner CL, Hollis BW, Baatz JE, Johnson DD. Maternal vitamin D and fetal growth in early-onset severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;204(6):556.e1-4.
 164. Woodham PC, Brittain JE, Baker AM, Long DL, Haeri S, Camargo CA, et al. Midgestation maternal serum 25-hydroxyvitamin D level and soluble fms-like tyrosine kinase 1/placental growth factor ratio as predictors of severe preeclampsia. *Hypertension.* 2011;58(6):1120–5.
 165. Teegarden D, Donkin SS, Teegarden D, Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, et al. Vitamin D: emerging new roles in insulin sensitivity. *Nutr Res Rev.* 2009;22(1):82.
 166. Maestro B, Dávila N, Carranza MC, Calle C. Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003;84(2):223–30.
 167. Huang Y, Ishizuka T, Miura A, Kajita K, Ishizawa M, Kimura M, et al. Effect of 1 α ,25-dihydroxy vitamin D₃ and vitamin E on insulin-induced glucose uptake in rat adipocytes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2002;55(3):175–83.
 168. Giulietti A, van Etten E, Overbergh L, Stoffels K, Bouillon R, Mathieu C. Monocytes from type 2 diabetic patients have a pro-inflammatory profile. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;77(1):47–57.
 169. Jurutka PW, Bartik L, Whitfield GK, Mathern DR, Barthel TK, Gurevich M, et al. Vitamin D Receptor: Key Roles in Bone Mineral Pathophysiology, Molecular Mechanism of Action, and Novel Nutritional Ligands. *J Bone Miner Res.* 2007;22(S2):V2–10.

170. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005;38(12):1103–11.
171. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37(4):277–85.
172. Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant–antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clin Biochem.* 2007;40(3–4):248–54.
173. Girotti MJ, Khan N, McLellan BA. Early measurement of systemic lipid peroxidation products in the plasma of major blunt trauma patients. *J Trauma.* 1991;31(1):32–5.
174. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959 May;82(1):70–7.
175. Bland JM, Altman DG. Transformations, means, and confidence intervals. *BMJ.* 1996;312(7038):1079.
176. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2000;894:i–xii, 1-253.
177. Alvarez J, Montelongo A, Iglesias A, Lasuncion M, Herrera E. Longitudinal study on lipoprotein profile, high density lipoprotein subclass, and postheparin lipases during gestation in women. *J Lipid Res.* 1996;37(2):299–308.
178. Tranquilli AL, Cester N, Giannubilo SR, Corradetti A, Nanetti L, Mazzanti L. Plasma lipids and physicochemical properties of the erythrocyte plasma membrane throughout pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004;83(5):443–8.
179. Belo L, Caslake M, Santos-Silva A, Castro EMB, Pereira-Leite L, Quintanilha A,

- et al. LDL size, total antioxidant status and oxidised LDL in normal human pregnancy: a longitudinal study. *Atherosclerosis*. 2004;177(2):391–9.
180. Palinski W. Maternal-Fetal Cholesterol Transport in the Placenta: Good, Bad, and Target for Modulation. *Circ Res*. 2009;104(5):569–71.
 181. Belo L, Caslake M, Gaffney D, Santos-Silva A, Pereira-Leite L, Quintanilha A, et al. Changes in LDL size and HDL concentration in normal and preeclamptic pregnancies. *Atherosclerosis*. 2002;162(2):425–32.
 182. Ogura K, Miyatake T, Fukui O, Nakamura T, Kameda T, Yoshino G. Low-density lipoprotein particle diameter in normal pregnancy and preeclampsia. *J Atheroscler Thromb*. 2002;9(1):42–7.
 183. Troisi A, Moles A, Panepuccia L, Lo Russo D, Palla G, Scucchi S. Serum cholesterol levels and mood symptoms in the postpartum period. *Psychiatry Res*. 2002;109(3):213–9.
 184. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju v. Nacionalni vodič dobre kliničke prakse Lipidski poremećaji. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; 2012.
 185. Humphries KH, Westendorp ICD, Bots ML, Spinelli JJ, Carere RG, Hofman A, et al. Parity and Carotid Artery Atherosclerosis in Elderly Women. *Stroke*. 2001;32(10).
 186. Nicholson WK, Asao K, Brancati F, Coresh J, Pankow JS, Powe NR. Parity and Risk of Type 2 Diabetes The Atherosclerosis Risk in Communities study. *Diabetes Care*. 2006;29(11):2349-54.
 187. Gunderson EP, Lewis CE, Wei GS, Whitmer RA, Quesenberry CP, Sidney S. Lactation and changes in maternal metabolic risk factors. *Obstet Gynecol*. 2007;109(3):729–38.
 188. Ram KT, Bobby P, Hailpern SM, Lo JC, Schocken M, Skurnick J, et al. Duration

- of lactation is associated with lower prevalence of the metabolic syndrome in midlife—SWAN, the study of women’s health across the nation. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(3):268.e1-268.e6.
189. Amundsen AL, Khoury J, Iversen PO, Bergei C, Ose L, Tonstad S, et al. Marked changes in plasma lipids and lipoproteins during pregnancy in women with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2006;189(2):451–7.
 190. Bartels A, O’Donoghue K. Cholesterol in pregnancy: a review of knowns and unknowns. *Obstet Med.* 2011;4(4):147–51.
 191. Choi J, Pai S. Serum lipid concentrations change with serum alkaline phosphatase activity during pregnancy. *Ann Clin Lab Sci.* 2000;30(4):422–8.
 192. Gunderson EP, Lewis CE, Murtaugh MA, Quesenberry CP, Smith West D, Sidney S. Long-term plasma lipid changes associated with a first birth: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults study. *Am J Epidemiol.* 2004;159(11):1028–39.
 193. Ghio A, Bertolotto A, Resi V, Volpe L, Di Cianni G. Triglyceride metabolism in pregnancy. *Adv Clin Chem.* 2011;55:133–53.
 194. Herrera E. Implications of Dietary Fatty Acids During Pregnancy on Placental, Fetal and Postnatal Development—A Review. *Placenta.* 2002;23:S9–19.
 195. Lippi G, Albiero A, Montagnana M, Salvagno GL, Scevarolli S, Franchi M, et al. Lipid and lipoprotein profile in physiological pregnancy. *Clin Lab.* 2007;53(3–4):173–7.
 196. Sulaiman WNW, Caslake MJ, Delles C, Karlsson H, Mulder MT, Graham D, et al. Does high-density lipoprotein protect vascular function in healthy pregnancy? *Clin Sci.* 2016;130(7):491–7.
 197. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol.*

- 2010;21(4):312–8.
198. Merviel P, Ba R, Beaufils M, Breart G, Salat-Baroux J, Uzan S. Lone hyperuricemia during pregnancy: Maternal and fetal outcomes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1998;77(2):145–50.
 199. Bainbridge SA, Roberts JM. Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia. *Placenta.* 2008;29 Suppl A:S67-72.
 200. Johnson RJ, Kang D-H, Feig D, Kivlighn S, Kanellis J, Watanabe S, et al. Is There a Pathogenetic Role for Uric Acid in Hypertension and Cardiovascular and Renal Disease? *Hypertension.* 2003;41(6):1183–90.
 201. von Versen-Hoeynck FM, Hubel CA, Gallaher MJ, Gammill HS, Powers RW, PM R, et al. Plasma Levels of Inflammatory Markers Neopterin, Sialic Acid, and C-Reactive Protein in Pregnancy and Preeclampsia. *Am J Hypertens.* 2009;22(6):687–92.
 202. Belo L, Santos-Silva A, Rocha S, Caslake M, Cooney J, Pereira-Leite L, et al. Fluctuations in C-reactive protein concentration and neutrophil activation during normal human pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005;123(1):46–51.
 203. Hwang HS, Kwon JY, Kim MA, Park YW, Kim YH. Maternal serum highly sensitive C-reactive protein in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Int J Gynecol Obstet.* 2007;98(2):105–9.
 204. Oliveira LC de, Franco-Sena AB, Rebelo F, Farias DR, Lepsch J, Lima N da S, et al. Factors associated with maternal serum C-reactive protein throughout pregnancy: A longitudinal study in women of Rio de Janeiro, Brazil. *Nutrition.* 2015;31(9):1103–8.
 205. Ardalić DČ. Pokazatelji oksidativnog stresa, lipidni profil i status enzima paraoksonaza 1 tokom trudnoće bez komplikacija i nakon porođaja. *Doktorska disertacija, Univ u Beogradu-Farmaceutski fakultet.* 2014.

206. D'Souza V, Rani A, Patil V, Pisal H, Randhir K, Mehendale S, et al. Increased oxidative stress from early pregnancy in women who develop preeclampsia. *Clin Exp Hypertens*. 2016;38(2):225–32.
207. Stefanović A, Ardalic D, Kotur-Stevuljević J, Vujović A, Spasic S, Spasojević-Kalimanovska V, et al. Longitudinal changes in PON1 activities, PON1 phenotype distribution and oxidative status throughout normal pregnancy. *Reprod Toxicol*. 2012;33(1):20–6.
208. Prakash M, Shetty M, Tilak P, Anwar N. Total thiols: biomedical importance and their alteration in various disorders. *Online J Health Allied Sci*. 2009;8(2):2
209. Dennery PA. Role of Redox in Fetal Development and Neonatal Diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2004;6(1):147–53.
210. Poston L, Briley A, Seed P, Kelly F, Shennan A. Vitamin C and vitamin E in pregnant women at risk for pre-eclampsia (VIP trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2006;367(9517):1145–54.
211. Rumbold AR, Crowther CA, Haslam RR, Dekker GA, Robinson JS. Vitamins C and E and the Risks of Preeclampsia and Perinatal Complications. *N Engl J Med*. 2006;354(17):1796–806.
212. Roberts JM, Myatt L, Spong CY, Thom EA, Hauth JC, Leveno KJ, et al. Vitamins C and E to Prevent Complications of Pregnancy-Associated Hypertension. *N Engl J Med*. 2010;362(14):1282–91.
213. Haider BA, Bhutta ZA. Multiple-micronutrient supplementation for women during pregnancy. In: Bhutta ZA, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2015. p. CD004905.
214. Republička stručna komisija za izradu i implementaciju vodiča u kliničkoj praksi. Zdravstvena zaštita žena u toku trudnoće. Nacionalni vodič za lekare u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Ministarstvo zdravlja Republike Srbije; 2005. str. 25–7.

215. Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165(6 Pt 1):1667–72.
216. Kirwan JP, Huston-Presley L, Kalhan SC, Catalano PM. Clinically Useful Estimates of Insulin Sensitivity During Pregnancy. *Diabetes Care.* 2001;24(9).
217. Butler AE, Cao-Minh L, Galasso R, Rizza RA, Corradin A, Cobelli C, et al. Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy. *Diabetologia.* 2010;53(10):2167–76.
218. Kim H, Toyofuku Y, Lynn FC, Chak E, Uchida T, Mizukami H, et al. Serotonin regulates pancreatic beta cell mass during pregnancy. *Nat Med.* 2010;16(7):804–8.
219. Endo S, Maeda K, Suto M, Kaji T, Morine M, Kinoshita T, et al. Differences in insulin sensitivity in pregnant women with overweight and gestational diabetes mellitus. *Gynecol Endocrinol.* 2006;22(6):343–9.
220. Das S, Behera MK, Misra S, Baliarsihna AK. Beta-cell function and insulin resistance in pregnancy and their relation to fetal development. *Metab Syndr Relat Disord.* 2010;8(1):25–32.
221. Ozcimen EE, Uckuyu A, Ciftci FC, Yanik FF, Bakar C. Diagnosis of gestational diabetes mellitus by use of the homeostasis model assessment–insulin resistance index in the first trimester. *Gynecol Endocrinol.* 2008;24(4):224–9.
222. Zavalza-Gómez AB, Anaya-Prado R, Rincón-Sánchez AR, Mora-Martínez JM. Adipokines and insulin resistance during pregnancy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2008;80(1):8–15.
223. Misra VK, Trudeau S, Perni U. Maternal serum lipids during pregnancy and infant birth weight: the influence of prepregnancy BMI. *Obesity.* 2011;19(7):1476–81.

224. Qiu C, Williams MA, Vadachkoria S, Frederick IO, Luthy DA. Increased Maternal Plasma Leptin in Early Pregnancy and Risk of Gestational Diabetes Mellitus. *Obstet Gynecol.* 2004;103(3):519–25.
225. Honnorat D, Disse E, Millot L, Mathiotte E, Claret M, Charrie A, et al. Are third-trimester adipokines associated with higher metabolic risk among women with gestational diabetes? *Diabetes Metab.* 2015;41(5):393–400.
226. Yang M, Peng S, Li W, Wan Z, Fan L, Du Y. Relationships between plasma leptin levels, leptin G2548A, leptin receptor Gln223Arg polymorphisms and gestational diabetes mellitus in Chinese population. *Sci Rep.* 2016;6:23948.
227. Castellano Filho DS, do Amaral Correa JO, Dos Santos Ramos P, de Oliveira Montessi M, Aarestrup BJV, Aarestrup FM. Body weight gain and serum leptin levels of non-overweight and overweight/obese pregnant women. *Med Sci Monit.* 2013;19:1043–9.
228. Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Maymó J, Dueñas JL, Varone C, Sánchez-Margalet V. Role of leptin in female reproduction. *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(1):15–28.
229. Perez-Perez A, Maymo J, Gambino Y, Guadix P, Duenas JL, Varone C, et al. Insulin Enhances Leptin Expression in Human Trophoblastic Cells. *Biol Reprod.* 2013;89(1):20–20.
230. Borer KT. Counterregulation of insulin by leptin as key component of autonomic regulation of body weight. *World J Diabetes.* 2014;5(5):606–29.
231. Coppari R, Bjørbæk C. Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(9):692–708.
232. Hauguel-de Mouzon S, Lepercq J, Catalano P. The known and unknown of leptin in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194(6):1537–45.
233. Miehle K, Stepan H, Fasshauer M. Leptin, adiponectin and other adipokines in

- gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia. *Clin Endocrinol.* 2012;76(1):2–11.
234. Kharb S, Panjeta P, Ghalaut VS, Bala J, Nanda S. Maternal Factors Affecting Serum Leptin Levels in Preeclampsia and Normotensive Pregnant Women and Outcome of Pregnancy. *J Preg Child Health.* 2016;3(223):2.
235. Anim-Nyame N, Sooranna SR, Steer PJ, Johnson MR. Longitudinal analysis of maternal plasma leptin concentrations during normal pregnancy and pre-eclampsia. *Hum Reprod.* 2000;15(9):2033–6.
236. Bedir A, Topbas M, Tanyeri F, Alvur M, Arik N. Leptin might be a regulator of serum uric acid concentrations in humans. *Jpn Heart J.* 2003;44(4):527–36.
237. Cesar HC, Pisani LP. Fatty-acid-mediated hypothalamic inflammation and epigenetic programming. *J Nutr Biochem.* 2017;42:1–5.
238. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, et al. Leptin Inhibits Bone Formation through a Hypothalamic Relay. *Cell.* 2000;100(2):197–207.
239. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Klein J, et al. Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;301(4):1045–50.
240. Degawa-Yamauchi M, Moss KA, Bovenkerk JE, Shankar SS, Morrison CL, Lelliott CJ, et al. Regulation of Adiponectin Expression in Human Adipocytes: Effects of Adiposity, Glucocorticoids, and Tumor Necrosis Factor α . *Obes Res.* 2005;13(4):662–9.
241. Ahlsson F, Diderholm B, Ewald U, Jonsson B, Forslund A, Stridsberg M, et al. Adipokines and their relation to maternal energy substrate production, insulin resistance and fetal size. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;168(1):26–9.
242. Vernini JM, Moreli JB, Costa RAA, Negrato CA, Rudge MVC, Calderon IMP.

- Maternal adipokines and insulin as biomarkers of pregnancies complicated by overweight and obesity. *Diabetol Metab Syndr*. 2016;8(1):68.
243. Jansson N, Nilfeldt A, Gellerstedt M, Wennergren M, Rossander-Hulthén L, Powell TL, et al. Maternal hormones linking maternal body mass index and dietary intake to birth weight. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(6):1743–9.
 244. Lara-Castro C, Fu Y, Chung BH, Garvey WT. Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*. 2007;18(3):263–70.
 245. Izadi V, Farabad E, Azadbakht L. Epidemiologic evidence on serum adiponectin level and lipid profile. *Int J Prev Med*. 2013;4(2):133–40.
 246. Toth PP. Adiponectin and high-density lipoprotein: a metabolic association through thick and thin. *Eur Heart J*. 2005;26(16):1579–81.
 247. Vergès B, Petit JM, Duvillard L, Dautin G, Florentin E, Galland F, et al. Adiponectin Is an Important Determinant of ApoA-I Catabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(6):1364–9.
 248. Van Linthout S, Foryst-Ludwig A, Spillmann F, Peng J, Feng Y, Meloni M, et al. Impact of HDL on adipose tissue metabolism and adiponectin expression. *Atherosclerosis*. 2010;210(2):438–44.
 249. Geloneze B, Pereira JA, Pareja JC, Lima MM de O, Lazarin MACT, Souza ICP de, et al. Overcoming metabolic syndrome in severe obesity: adiponectin as a marker of insulin sensitivity and HDL-cholesterol improvements after gastric bypass. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53(2):293–300.
 250. Schneider JG, von Eynatten M, Schiekofer S, Nawroth PP, Dugi KA. Low Plasma Adiponectin Levels Are Associated With Increased Hepatic Lipase Activity In Vivo. *Diabetes Care*. 2005;28(9).
 251. Matsubara M, Maruoka S, Katayose S. Inverse relationship between plasma

- adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *Eur J Endocrinol*. 2002;147(2):173–80.
252. Barazzoni R, Bernardi A, Biasia F, Semolic A, Bosutti A, Mucci M, et al. Low fat adiponectin expression is associated with oxidative stress in nondiabetic humans with chronic kidney disease--impact on plasma adiponectin concentration. *AJP Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293(1):R47–54.
253. Indulekha K, Surendar J, Anjana RM, Gokulakrishnan K, Balasubramanyam M, Aravindhan V, et al. Circulating levels of high molecular weight (HMW) adiponectin and total adiponectin in relation to fat distribution, oxidative stress and inflammation in Asian Indians. *Dis Markers*. 2012;33(4):185–92.
254. Detopoulou P, Panagiotakos DB, Chrysohoou C, Fragopoulou E, Nomikos T, Antonopoulou S, et al. Dietary antioxidant capacity and concentration of adiponectin in apparently healthy adults: the ATTICA study. *Eur J Clin Nutr*. 2010;64(2):161–8.
255. Motoshima H, Wu X, Mahadev K, Goldstein BJ. Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;315(2):264–71.
256. Shinoda Y, Yamaguchi M, Ogata N, Akune T, Kubota N, Yamauchi T, et al. Regulation of bone formation by adiponectin through autocrine/paracrine and endocrine pathways. *J Cell Biochem*. 2006;99(1):196–208.
257. Lee NK, Karsenty G. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2008;19(5):161–6.
258. Kaur M, Godber IM, Lawson N, Baker PN, Pearson D, Hosking DJ. Changes in serum markers of bone turnover during normal pregnancy. *Ann Clin Biochem*. 2003;40(Pt 5):508–13.
259. Lee SW, Yang JH, Hong DS, Kim MY, Chung JH, Han KO, et al. Changes in

- biochemical markers of bone turnover and bone mineral density during pregnancy and postpartum in Korean women. *Korean J Obstet Gynecol.* 2009;52(2):166–79.
260. Møller UK, Strey M, Mosekilde L, Heickendorff L, Flyvbjerg A, Frystyk J, et al. Changes in calcitropic hormones, bone markers and insulin-like growth factor I (IGF-I) during pregnancy and postpartum: a controlled cohort study. *Osteoporos.* 2013;24(4):1307–20.
261. Barbour LA, McCurdy CE, Hernandez TL, Kirwan JP, Catalano PM, Friedman JE. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30 Suppl 2:S112-9.
262. Clemens TL, Karsenty G. The osteoblast: An insulin target cell controlling glucose homeostasis. *J Bone Miner Res.* 2011;26(4):677–80.
263. Thrailkill KM, Lumpkin CK, Bunn RC, Kemp SF, Fowlkes JL. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;289(5):E735-45.
264. Fulzele K, Clemens TL. Novel functions for insulin in bone. *Bone.* 2012;50(2):452–6.
265. Terzi H, Terzi R, Kale E, Kale A. Effect of multiparity on bone mineral density, evaluated with bone turnover markers. *Rev Bras Reumatol.* 2015; in press, corrected proof, Available online 7 September 2015.
266. Klein GL. Insulin and bone: Recent developments. *World J Diabetes.* 2014;5(1):14–6.
267. Fernández-Real JM, Izquierdo M, Ortega F, Gorostiaga E, Gómez-Ambrosi J, Moreno-Navarrete JM, et al. The relationship of serum osteocalcin concentration to insulin secretion, sensitivity, and disposal with hypocaloric diet and resistance training. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(1):237–45.

268. Altindag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatol Int.* 2008;28(4):317–21.
269. Lean JM, Davies JT, Fuller K, Jagger CJ, Kirstein B, Partington GA, et al. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *J Clin Invest.* 2003;112(6):915–23.
270. Dreher I, Schütze N, Baur A, Hesse K, Schneider D, Köhrle J, et al. Selenoproteins are expressed in fetal human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245(1):101–7.
271. Tumber A, Meikle MC, Hill PA. Autocrine signals promote osteoblast survival in culture. *J Endocrinol.* 2000;167(3):383–90.
272. Oury F, Khrimian L, Denny CA, Gardin A, Chamouni A, Goeden N, et al. Maternal and Offspring Pools of Osteocalcin Influence Brain Development and Functions. *Cell.* 2013;155(1):228–41.
273. Halhali A, Villa AR, Madrazo E, Soria MC, Mercado E, Díaz L, et al. Longitudinal changes in maternal serum 1,25-dihydroxyvitamin D and insulin like growth factor I levels in pregnant women who developed preeclampsia: comparison with normotensive pregnant women. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;89–90(1–5):553–6.
274. Barrett H, McElduff A. Vitamin D and pregnancy: An old problem revisited. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010;24(4):527–39.
275. Fernández-Alonso AM, Dionis-Sánchez EC, Chedraui P, González-Salmerón MD, Pérez-López FR, Spanish Vitamin D and Women’s Health Research Group. First-trimester maternal serum 25-hydroxyvitamin D3 status and pregnancy outcome. *Int J Gynecol Obstet.* 2012;116(1):6–9.
276. Zhang JY, Lucey AJ, Horgan R, Kenny LC, Kiely M, Brannon PM, et al. Impact of pregnancy on vitamin D status: a longitudinal study. *Br J Nutr.*

2014;112(7):1081–7.

277. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(7):1911–30.
278. Urrutia RP, Thorp JM. Vitamin D in pregnancy: current concepts. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2012;24(2):57–64.
279. Al-Garawi A, Carey VJ, Chhabra D, Mirzakhani H, Morrow J, Lasky-Su J, et al. The Role of Vitamin D in the Transcriptional Program of Human Pregnancy. Roemer K, editor. *PLoS One. Public Library of Science*; 2016;11(10):e0163832.

Biografija

Marina Pijanović je rođena 2.8.1982. u Požegi. Završila je osnovnu školu i gimnaziju u Arilju. Farmaceutski fakultet u Beogradu, smer medicinska biohemija, završila je 2007. godine sa prosečnom ocenom 9,75. Bila je stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka 2003-2007, dobitnik godišnje nagrade Regionalne privredne komore u Užicu za najbolje studente regiona 2004 i 2005 i Eurobanke EFG za najbolje studente završnih godina 2006. Učestvovala je u programu razmene studenata tokom jula i avgusta 2006. god na Univerzitetu Kvinslend u Brizbejnu, Australija.

Specijalizaciju iz medicinske biohemije završila je u septembru 2015. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od 2008-2015. bila je zaposlena u Poliklinici Medilab u Čačku, a od februara 2015. zaposlena je u Laboratoriji za medicinsku biohemiju Medilab Požega.

Doktorske akademske studije iz medicinske biohemije upisala je školske 2008/2009.godine.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марина Пијановић

Број индекса 8/08

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Лонгитудиналне промене параметара за процену инсулинске резистенције, адипоцитокина и маркера формирања костију код здравих негојазних трудница

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

Потпис аутора

У Београду, 30.06.2017.

Марина Пијановић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марина Пијановић

Број индекса 8/08

Студијски програм Докторске академске студије Фармација - модул Медицинска биохемија

Наслов рада Лонгитудиналне промене параметара за процену инсулинске резистенције, адипоцитокина и маркера формирања костију код здравих негојазних трудница

Ментор др Славица Спасић, професор емеритус, Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет
др Александра Стефановић, доцент, Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, 30.06.2017.

Марина Пијановић

Изјава о коришћењу

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

Лонгитудиналне промене параметара за процену инсулинске резистенције, адипоцитокина и маркера формирања костију код здравих негојазних трудница

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 30.06.2017.

Марина Тијановић

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

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

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

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

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

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