

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Tamara M. Šljivančanin Jakovljević

**ULOGA POLIMORFIZAMA GENA ZA
ENDOTELNU AZOT-OKSID
SINTETAZU, KATEHOL-O-METIL
TRANSFERAZU, GLUTATION S
TRANSFERAZU M1 I T1 I EKSPRESIJA
PROINFLAMATORNIH CITOKINA U
POJAVI PREEKLAMPSIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Tamara M. Sljivancanin Jakovljevic

**ROLE OF ENDOTHELIAL NITRIC-
OXIDE SYNTHASE, CATECHOL-O-
METHYL TRANSFERASE AND
GLUTATHION S TRANSFERASE M1
AND T1 GENE POLYMORPHISMS AND
PROINFLAMMATORY CYTOKINE
EXPRESSION IN PREECLAMPSIA
DEVELOPMENT**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019

MENTOR

Prof. dr Olivera Kontić-Vučinić, vanredni profesor na katedri ginekologije i akušerstva, Klinika za ginekologiju i akušerstvo, Klinički centar Srbije, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

KOMENTOR

Prof. dr Jelena Milašin, redovni profesor na katedri za preventivnu stomatologiju, OJ Inštitutski predmeti, Humana genetika, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE ZA OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Prof. dr Željko Miković, redovni profesor na katedri ginekologije i akušerstva, Ginekološko-akušerska klinika „Narodni Front“, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Ivana Novaković, redovni profesor na katedri humane genetike, Institut za humanu genetiku, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Dimitrije Nikolić, vanredni profesor na katedri pedijatrije, Univerzitetna dečja klinika „Tiršova“, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Doc. dr Jelena Martić, docent na katedri pedijatrije, Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta „Dr Vukan Čupić“, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Nenad Šulović, redovni profesor na katedri ginekologije i akušerstva, Medicinski fakultet Univerziteta u Prištini sa privremenim sedištem u Kosovskoj Mitrovici

DATUM ODBRANE:

Veliku zahvalnost dugujem mojoj mentorki Prof. dr Oliveri Kontić-Vučinić za bezgranično poverenje koje mi je ukazala, nesebičnost u deljenju znanja i saveta, uvek pozitivnoj energiji i podršci koje mi je pružala tokom izrade ove doktorske disertacije.

Takođe, ogromnu zahvalnost dugujem mentorki Prof. dr Jeleni Milašin, rukovodiocu projekta „Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije“ Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (br. 175075) koja mi je bezrezervno otvorila vrata svoje laboratorije i sveta nauke i bez čije pomoći i podrške ovaj rad ne bi bio realizovan.

Zahvaljujem se i Prof. dr Željku Mikoviću koji je verovao u mene i podržao me na izazovnom i uzbudljivom putu nauke.

Za pomoć tokom realizacije ove doktorske disertacije zahvalnost dugujem i doktorima i sestrama sa odeljenja Humane reprodukcije, Klinike za ginekologiju i akušerstvo, KCS-a, a posebno glavnoj sestri Radi i sestri Milici koje su uvek bile tu za mene i nesebično mi pomagale u prikupljanju uzoraka.

Takođe, zahvalnost za stručnu i ljudsku pomoć i podršku u izvođenju laboratorijskog dela istraživanja dugujem koleginicama Nađi Nikolić i Jeleni Čarkić sa OJ Institutskih predmeta Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Najzad, neizmernu zahvalnost dugujem svojoj porodici, pre svega predivnim roditeljima, Milivoju i Snežani, koji su moja ogromna podrška kroz život i bez čije pomoći sve ovo ne bi bilo moguće.

A osoba koja je najodgovornija što ova doktorska disertacija postoji je moj suprug Aleksandar, čija mi ljubav, podrška, upornost, razumevanje i entuzijizam pružaju neizmernu snagu da koračam kroz život.

Beograd, maj 2019. godine

Tamara Šljivančanin Jakovljević

Mojoj ćerki Anđeliki

Mojoj baki Anki

KRATAK SADRŽAJ

ULOGA POLIMORFIZAMA GENA ZA ENDOTELNU AZOT-OKSID SINTETAZU, KATEHOL-O-METIL TRANSFERAZU, GLUTATION S TRANSFERAZU M1 I T1 I EKSPRESIJA PROINFLAMATORNIH CITOKINA U POJAVI PREEKLAMPSIJE

Uvod: Preeklampsija je multifaktorsko i multiorgansko hipertenzivno oboljenje specifično za trudnoću. Glavni je uzročnik maternalnog i perinatalnog morbiditeta i mortaliteta širom sveta. Loša placentacija, sa neadekvatnim remodelovanjem spiralnih arterija, posledičnom hipoksijom i ishemijom, i pojavom endotelne disfunkcije, dalje indukuje različite patofiziološke mehanizme koji doprinose razvoju preeklampsije. Smatra se da je oksidativni stres jedan od faktora rizika za pojavu preeklampsije. Glutation S-transferaze (GST) su porodica antioksidantnih enzima čije smanjenje aktivnosti je povezano sa pojavom oksidativnog stresa. Delecioni polimorfizmi gena za GST T1 i M1 dovode do odsustva enzima i samim tim izostanka enzimske aktivnosti. Dosadašnje studije o povezanosti ovih polimorfizama i preeklampsije nisu dale jasne zaključke. Endotelna azot oksid sintetaza (eNOS) odgovorna je za sintezu azot oksida (NO), čiji snižen nivo dovodi do pojave hipertenzije, aktivacije koagulacije i endotelne disfunkcije. Poslednjih dvadesetak godina brojne studije su pokušale da dovedu u vezu prisustvo tri najčešća polimorfizma u genu za eNOS sa pojavom preeklampsije (G894T – Glu298Asp; VNTR 4b/a; T-786C), ali su mišljenja o njihovoj ulozi takođe podeljena. Katehol O-metiltransferaza (COMT) je enzim koji u placenti učestvuje u razgradnji kateholnih estrogena, sa glavnim produktom 2-metoksiestradiolom (2-ME). On inhibiše hipoksija inducibilni faktor 1 α (HIF-1 α) čija je uloga regulisanje ćelijskog odgovora na hipoksiju. COMT Val108/158Met polimorfizam, doveden je u vezu sa povećanim rizikom za pojavu preeklampsije. Endotelna disfunkcija može da prouzrokuje poremećaj ravnoteže između proinflamatornih (TNF- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6) i antiinflamatornih citokina. Povećana produkcija proinflamatornih citokina deluje tako što ugrožava uteroplacentarnu perfuziju i dovodi do vaskularnog oštećenja.

Cilj istraživanja: Ovo istraživanje je imalo za cilj da odredi učestalost delecionih polimorfizama gena za GST T1 i M1, tri polimorfizma gena za eNOS (G894T, T-786C, 4b/a VNTR) i Val158Met polimorfizam gena za COMT u grupi preeklampsija i

nekomplikovanih trudnoća, kao i eventualno postojanje razlike u distribuciji genotipova i alela analiziranih polimorfizama. Takođe, cilj je bio da se utvrdi nivo ekspresije iRNK proinflammatoryh citokina TNF- α , IL-1 β i IL-6 kod trudnica sa preeklampsijom i uporedi sa nivoom kod zdravih trudnica. Takođe, cilj je bio da se ispita asocijacija genetičkih parametara i kliničkih karakteristika preeklampsije (rana/kasna, laka/teška), kao i povezanost analiziranih genskih polimorfizama sa nivoom ekspresije proinflammatoryh citokina. Dodatno, trebalo je ustanoviti da li postoji veza između genotipova proučavanih polimorfizama i epidemioloških faktora rizika, kao i veza između ekspresije proinflammatoryh citokina i ovih faktora.

Materijal i metod: Studija slučaj-kontrola obuhvatila je 50 žena sa preeklampsijom i 50 zdravih normotenzivnih trudnica. Grupe su bile uparene za godine života, paritet, graviditet, jednoplodne trudnoće i gestacijsku nedelju uzimanja uzorka za analizu. Uzorak venske krvi iz koje su izolovane RNK i DNK, uzet je kada je postavljena dijagnoza preeklampsije ili tokom rutinske kontrole u slučaju zdravih trudnica. Nivo relativne ekspresije gena za proinflammatoryh citokine utvrđen je primenom real-time PCR metode. Utvrđivanje polimorfizama u genima za eNOS i COMT izvršeno je primenom PCR/RFLP tehnike (tehnika lančane reakcije polimeraze/analiza dužine restrikcionih fragmenata), uz upotrebu odgovarajućih setova prajmera i specifičnih restrikcionih enzima. Delecioni polimorfizmi gena za GST M1 i GST T1 detektovani su primenom obične PCR metode. Svi eksperimentalni i klinički podaci obrađeni su odgovarajućim statističkim testovima.

Rezultati: Delecija gena za GST M1 bila je povezana sa povišenim rizikom za razvoj preeklampsije (OR=2.95, 95%CI (1.14-7.65)), posebno teške i rane forme. Nosioци GST T1-/GST M1- imali su 12 puta veći rizik za razvoj teške i rane preeklampsije. Prisustvo G894T polimorfizma u genu za eNOS je pokazalo sličnu distribuciju u grupi preeklampsije i kontrolnoj grupi. Homozigotna mutacija T-786C u eNOS genu statistički je značajno češće bila zastupljena u grupi sa preeklampsijom u odnosu na kontrolu (P=0.006). Nosioци alela C su imali povećan rizik za razvoj rane forme bolesti (OR=2.24, 95%CI (1.09-4.62)). VNTR polimorfizam gena za eNOS u homozigotnoj formi je bio značajno češći u grupi slučajeva u odnosu na kontrolu (P=0.040) i nosioци ovog genotipa su imali povišen rizik od razvoja preeklampsije (OR=7.68, 95%CI (0.89-65.98)), sa

najizraženijim rizikom za razvoj lakog (OR=9.33, 95%CI (0.98-88.57)) i kasnog oblika bolesti (OR=8.52, 95%CI (0.90-80.58)). Analiza učestalosti haplotipova tri ispitivana polimorfizma gena za eNOS pokazala je da haplotip "G-T-b" ima protektivni efekat, dok nosioci "G-C-b" haplotipa imaju povišen rizik za pojavu preeklampsije. Homozigotna mutacija Val158Met polimorfizma gena za COMT (AA) je bila značajno češća u grupi slučajeva u odnosu na kontrolu (P=0.002) i nosila je 3.7 puta povećan rizik za razvoj preeklampsije, sa još izraženijim rizikom za pojavu teške (OR=9.0, 95%CI (2.09-38.799)) i rane forme (OR=6.6, 95%CI (1.62-26.87)). Ekspresija TNF- α i IL-1 β je bila statistički značajno viša u grupi žena sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice (P=0.006, odnosno P=0.005). Pokazana je značajna pozitivna korelacija između ekspresije TNF- α i IL-1 β , kao i IL-1 β i IL-6 u grupi preeklampsije. U grupi žena sa preeklampsijom ekspresija IL-1 β je bila značajno niža kod osoba sa delecionim polimorfizmom za GST T1 u odnosu na žene sa pristunim genom (P=0.015), a ekspresija IL-6 je bila značajno niža u slučaju odsustva gena za GST M1 u odnosu na osobe sa prisutnim genom (P=0.015). Među našim ispitanicama, maternalni faktori rizika (visok indeks telesne mase i pušenje), kao i komplikacije trudnoće (prethodni pobačaji i intrauterusni zastoj u rastu) nisu bili značajno povezani sa ispitivanim genskim polimorfizmima i ekspresijom proinflamatornih citokina.

Zaključci: Nosioci delecionog polimorfizma u genima za GST T1 i GST M1 imaju povišen rizik za razvoj preeklampsije. Ovaj rizik je posebno izražen u slučaju dva nulta genotipa (GST T1-/GST M1-). Od tri ispitivana polimorfizma gena za eNOS, pokazano je da su homozigotne mutacije za T-786C i VNTR povezane sa rizikom za razvoj preeklampsije, kao i nosioci "G-C-b" haplotipa. Nosioci homozigotne mutacije za Val158Met COMT polimorfizam, takođe imaju povišen rizik za pojavu rane i teške forme preeklampsije. Preeklampsija je povezana sa udruženom povišenom ekspresijom proinflamatornih citokina TNF- α i IL-1 β . Asocijacija polimorfizma gena za COMT sa povišenom ekspresijom TNF- α objašnjava naglašeni inflamatorni odgovor u trudnoći kod žena sa sniženom COMT enzimskom aktivnošću, S druge strane, GST i citokini po svemu sudeći, imaju nezavisnu ulogu u etiopatogenezi preeklampsije. Takođe, izostala je i veza između maternalnih faktora rizika i ispitivanih genskih polimorfizama i proinflamatornih citokina.

Ključne reči: Preeklampsija; Glutation S-transferaza T1; Glutation S-transferaza M1; Azot oksid sintetaza tip III; Katehol O-metiltransferaza; Genski polimorfizam; Faktor nekroze tumora-alfa; Interleukin-1beta; Interleukin-6; zapaljenje.

Naučna oblast: Medicinske nauke

Uža naučna oblast: Humana reprodukcija, perinatologija i neonatologija

UDK broj:

SUMMARY

THE ROLE OF ENDOTHELIAL NITRIC-OXIDE SYNTHASE, CATECHOL-O-METHYL TRANSFERASE AND GLUTATHIONE S TRANSFERASE M1 AND T1 GENE POLYMORPHISMS AND EXPRESSION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN PREECLAMPSIA DEVELOPMENT

Introduction: Preeclampsia is a multifactorial and multiorgan pregnancy-related hypertensive disorder. It is the leading cause of maternal and perinatal morbidity and mortality worldwide. Poor placentation, along with inadequate spiral artery remodeling, hypoxia and ischemia, and endothelial dysfunction, leads to different pathophysiological mechanisms that contribute to preeclampsia development. One of the proposed contributing factor is oxidative stress. Glutathione S-transferases are important detoxifying enzymes and their decreased activity is related to oxidative stress occurrence. Deletion polymorphisms in GST T1 and M1 genes lead to absence of enzyme synthesis and loss of enzymatic activity. A relatively small number of studies dealing with the association of these polymorphisms and preeclampsia has been conducted, with rather inconclusive results. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) produces nitric oxide (NO). Decreased NO levels lead to hypertension, activation of coagulation and endothelial dysfunction. Numerous studies have tried to explain the relationship between three most common polymorphisms in eNOS gene (G894T – Glu298Asp; VNTR 4b/a; T-786C) and preeclampsia development, with conflicting results. Catechol O-methyltransferase (COMT) is an enzyme participating in the metabolism of catechol oestrogens in placenta. Its main product, 2-methoxyoestradiol (2-ME), inhibits hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) which regulates cellular response to hypoxia. COMT Val108/158Met polymorphism is associated with increased risk for preeclampsia. Endothelial dysfunction may be the cause of imbalance between pro- (TNF- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6) and anti-inflammatory cytokines. Increased production of proinflammatory cytokines leads to decreased uteroplacental perfusion and vascular damage.

Aims: The aims of this study were to determine the incidence of deletion polymorphisms in GST T1 and M1 genes, three polymorphisms in eNOS (G894T, T-786C, 4b/a VNTR) and Val158Met polymorphism in COMT genes in preeclampsia and normal pregnancy

groups, and possible differences in the distribution of their genotypes and alleles. Also, the aim was to determine relative mRNA expression levels of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β i IL-6) in preeclampsia patients and in controls. The aims were also to find a possible association between the investigated polymorphisms/proinflammatory cytokines expression and epidemiological risk factors and clinical characteristics of preeclampsia (early/late, mild/severe).

Materials and methods: This case-control study included 50 preeclampsia patients and 50 healthy normotensive pregnant women. Groups were matched for age, parity, gravity, singleton pregnancy and gestational age at sampling. RNA and DNA were isolated from venous blood sample taken when preeclampsia diagnosis was established or during routine antenatal control for healthy pregnant women. Real time PCR method was used to determine relative gene expression of proinflammatory cytokines. Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR/RFLP) technique, with appropriate sets of primers and specific restriction enzymes, was used to determine polymorphisms in eNOS and COMT genes. Deletion polymorphisms in GST T1 and GST M1 genes were detected using standard PCR. Appropriate statistical tests were applied for experimental and clinical data analysis.

Results: GST M1 null genotype carried increased risk for preeclampsia development (OR=2.95, 95%CI (1.14-7.65)), especially for its severe and early form. Carriers of GST T1-/GST M1- genotype had a 12-fold higher risk for severe and early preeclampsia. Distribution of G894T polymorphism in eNOS gene was similar in the study and control groups. T-786C eNOS gene polymorphism was significantly associated with preeclampsia (P=0.006). VNTR eNOS gene polymorphism was also associated with this disorder (P=0.040), and homozygous carriers of this mutation had higher risk for preeclampsia (OR=7.68, 95%CI (0.89-65.98)), especially for its mild (OR=9.33, 95%CI (0.98-88.57)) and late form (OR=8.52, 95%CI (0.90-80.58)). Haplotype analysis for three eNOS polymorphisms showed a protective effect of “G-T-b” haplotype, while carriers of “G-C-b” haplotype had increased risk for preeclampsia development. Homozygous mutation for Val158Met COMT gene polymorphism (AA) was more frequent in the study than in the control group (P=0.002) and carried a 3.7-fold risk increase for preeclampsia, especially its severe (OR=9.0, 95%CI (2.09-38.799)) and

early form (OR=6.6, 95% CI (1.62-26.87)). Relative mRNA expression of TNF- α and IL-1 β was significantly higher in preeclampsia than in healthy pregnant women (P=0.006 and P=0.005, respectively). Positive correlations between TNF- α and IL-1 β , and IL-1 β and IL-6 were shown among preeclampsia patients. Analysis of all examined patients revealed higher TNF- α expression in the presence of COMT polymorphism (P=0.012). In preeclampsia group, IL-1 β expression was significantly lower (P=0.015) in GSTT1 null genotype in comparison to non-null genotype, and IL-6 expression was significantly lower in patients with in GST M1 null genotype (P=0.015). Among our patients, maternal risk factor (high body mass index, smoking) and complications of pregnancy (miscarriages and intrauterine growth restriction) did not show association with examined gene polymorphisms and proinflammatory cytokine expression.

Conclusions: Carriers of deletion polymorphism in GST T1 and GST M1 genes had increased risk of preeclampsia development. This risk was more pronounced in the presence of combined GST T1-/GST M1- genotype. Endothelial NOS gene polymorphisms, T-786C and VNTR were associated with risk of preeclampsia, as was the haplotype “G-C-b”. Carriers of homozygous mutation for Val158Met COMT polymorphism showed increased risk of severe and early preeclampsia development. Preeclampsia was associated with higher expression of proinflammatory cytokine TNF- α and IL-1 β). Significantly higher TNF- α expression was related to the presence of Val158Met COMT polymorphism and could explain the marked inflammatory response in pregnancy among women with decreased COMT activity. As judged from the results, most probably, GST and cytokines are involved independently in the preeclampsia pathogenesis. This research did not find any relationship between maternal risk factors and pregnancy complications and investigated gene polymorphisms and proinflammatory cytokines.

Key words: Pre-Eclampsia; Glutathione S-transferase T1; glutathione S-transferase M1; Nitric Oxide Synthase Type III; Catechol O-Methyltransferase; Polymorphism, Genetic; Tumor Necrosis Factor-alpha; Interleukin-1beta; Interleukin-6; inflammation.

Scientific field: Medicine

Specific scientific field: Human reproduction, perinatology and neonatology

UDC number:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Klasifikacija hipertenzivnih poremećaja u trudnoći.....	1
1.2. Definicija preeklampsije.....	4
1.3. Epidemiologija preeklampsije i hipertenzivnih poremećaja u trudnoći.....	10
1.4. Predikcija preeklampsije.....	11
1.5. Prevencija preeklampsije.....	14
1.6. Terapijske mere i praćenje žena sa preeklampsijom.....	17
1.6.1. Laka preeklampsija.....	18
1.6.2. Teška preeklampsija.....	21
1.6.3. Antihipertenzivna terapija.....	25
1.6.4. Antikonvulzivna terapija.....	28
1.6.5. Ostale terapijske mere.....	29
1.6.6. Terapija postpartalne hipertenzije.....	31
1.7. Kardiovaskularni rizik i preeklampsija.....	31
1.8. Etiopatogeneza preeklampsije.....	32
1.9. Oksidativni stres u etiopatogenezi preeklampsije.....	37
1.10. Azot oksid/azot oksid sintetaza sistem u etiopatogenezi preeklampsije...39	
1.11. Estrogen i metaboliti estrogena u etiopatogenezi preeklampsije.....	40
1.12. Uloga nasleđivanja u etiopatogenezi preeklampsije.....	41
1.12.1. Polimorfizmi gena za glutation S-transferaze T1 i M1 u preeklampsiji...42	
1.12.2. Polimorfizmi gena za endotelnu azot oksid sintetazu u preeklampsiji....43	
1.12.3. Polimorfizam gena za katehol O-metiltransferazu u preeklampsiji.....46	

1.13.	Imunološki faktori i zapaljenje u etiopatogenezi preeklampsije.....	48
1.13.1.	Uloga inflamatornih citokina u preeklampsiji.....	50
1.13.1.1.	Faktor nekroze tumora- α	50
1.13.1.2.	Interleukin-1 β	51
1.13.1.3.	Interleukin-6.....	52
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	54
3.	MATERIJAL I METODE.....	56
3.1.	Etički standard istraživanja.....	56
3.2.	Studijska grupa.....	57
3.2.1.	Kriterijumi za uključenje u studiju.....	57
3.2.2.	Kriterijumi za isključenje iz studije za obe grupe istraživanja.....	59
3.3.	Klinička metodologija.....	59
3.3.1.	Prikupljanje uzoraka krvi za istraživanje.....	60
3.4.	Laboratorijska metodologija.....	60
3.4.1.	Izolacija DNK.....	61
3.4.2.	Lančana reakcija polimeraze (PCR metoda).....	62
3.4.3.	Elektroforeza na poliakrilamid (PAA) gelu.....	63
3.4.4.	Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (real-time PCR, qPCR).....	64
3.4.4.1.	Određivanje delecionog polimorfizma gena za GST T1 i GST M1.....	64
3.4.5.	Analiza dužine restrikcionih fragmenata (engl. “restriction fragments length polymorphism-RFLP).....	67
3.4.5.1.	RFLP u analizi polimorfizma pojedinačnog nukleotida u genu za eNOS T-786C.....	67
3.4.5.2.	RFLP u analizi polimorfizma pojedinačnog nukleotida eNOS G894T.....	69

3.4.5.3. Analiza polimorfizma varijabilnog broja tandemskih ponovaka u genu za eNOS.....	71
3.4.5.4. RFLP u analizi polimorfizma pojedinačnog nukleotida u genu za COMT.....	72
3.4.6. Analiza haplotipova.....	73
3.4.7. Izolacija RNK.....	74
3.4.8. Reverzna transkripcija i real-time (RT-q) PCR.....	75
3.4.8.1. Analiza ekspresije gena za proinflamatorne citokine (TNF- α , Il-6, Il-1 β).....	75
3.5. Statistička obrada podataka.....	77
4. REZULTATI.....	78
4.1. Opšte karakteristike ispitanica.....	78
4.2. Delecioni polimorfizam u GST T1 i GST M1.....	84
4.3. Polimorfizmi gena za eNOS.....	89
4.4. Analiza haplotipova.....	101
4.5. Polimorfizam gena za COMT.....	104
4.6. Relativna ekspresija proinflamatornih citokina.....	109
4.7. Analiza povezanosti ispitivanih parametara.....	114
5. DISKUSIJA.....	126
6. ZAKLJUČCI.....	154
7. LITERATURA.....	156

1. UVOD

1.1. KLASIFIKACIJA HIPERTENZIVNIH POREMEĆAJA U TRUDNOĆI

Klasifikacija hipertenzivnih poremećaja u trudnoći prvi put predložena od strane Američkog koledža za ginekologiju i akušerstvo (engl. *American College of obstetrics and gynecology* - ACOG) 1972. godine, modifikovana je 1990., a potom i 2000. godine od strane Radne grupe nacionalnog edukacijskog programa za povišeni krvni pritisak (engl. *National High Blood Pressure Education Program* - NHBPEP) (1). Ovu podelu su, uz minimalne izmene, prihvatila i implementirala u svoje vodiče i druga udruženja (2-5). Prema poslednjem izveštaju ACOG iz 2013. godine, hipertenzivni poremećaji u trudnoći su podeljeni u četiri glavne kategorije:

1. Gestacijska hipertenzija;
2. Hronična/preegzistirajuća hipertenzija (primarna i sekundarna);
3. Hronična hipertenzija sa superponiranom preeklampsijom;
4. Preeklampsija/eklampsija (6).

Termin gestacijska hipertenzija se odnosi na hipertenzivne poremećaje u trudnoći koji ne zadovoljavaju kriterijume za preeklampsiju i hroničnu hipertenziju. Prema ACOG *Practice Bulletin No 202* (7), gestacijska hipertenzija je klinička dijagnoza, koja se definiše kao de novo pojava povišenog krvnog pritiska (sistolni ≥ 140 i < 160 mmHg, i/ili dijastolni ≥ 90 i < 110 mmHg) najranije u 20.-oj nedelji gestacije, u odsustvu proteinurije, ili novih znakova end-organske disfunkcije. Iako trudnoće komplikovane gestacijskom hipertenzijom u najvećem broju slučajeva prolaze bez komplikacija, čak i kada vrednosti krvnog pritiska nisu izraženo visoke, zahtevaju strogi nadzor (8). Kod pojedinih trudnica sa gestacijskom hipertenzijom dolazi do naglog i izraženog porasta krvnog pritiska i tada su maternalni i perinatalni ishodi slični kao u slučaju pojave preeklampsije (9). Gestacijsku hipertenziju karakterišemo kao tešku, kada je sistolni pritisak ≥ 160 mmHg i/ili dijastolni pritisak ≥ 110 mmHg. Prema ACOG *Practice Bulletin No 202* (7), dalji razvoj proteinurije menja dijagnozu u preeklampsiju. Pojava sistolnog pritiska ≥ 160 mmHg i/ili dijastolnog ≥ 110 mmHg, ili drugih znakova teške bolesti, podiže dalje dijagnozu na tešku formu preeklampsije. Procenjuje se da oko 10-

25% trudnica sa gestacionom hipertenzijom kasnije razviju znake i simptome preeklampsije. Ukoliko se kompletno izlečenje ne desi tokom 12 postpartalnih nedelja, već bolest i dalje perzistira, dijagnoza se mora revidirati u hroničnu/preegzistirajuću hipertenziju, koja je bila maskirana fiziološkim smanjenjem krvnog pritiska u ranoj trudnoći. Ukoliko u postpartalnom periodu dođe do nestanka hipertenzije i ukoliko se ne razviju znaci i simptomi preeklampsije, dijagnoza se može revidirati i promeniti u tranzitornu hipertenziju trudnoće (7, 10).

Hronična/preegzistirajuća hipertenzija se definiše kao hipertenzija koja je prethodila trudnoći, ili je bila registrovana u najmanje dve prilike pre 20. nedelje gestacije, ili perzistira duže od 12 postpartalnih nedelja. U najvećem broju slučajeva je u pitanju primarna (ranije nazivana esencijalna) hipertenzija, a samo u oko 10% žena razlog za pojavu hronične hipertenzije je već postojeće bubrežno ili endokrino oboljenje (sekundarna hipertenzija).

Superponirana preeklampsija se definiše kao nova pojava proteinurije, značajne end-organske disfunkcije, ili oba ova stanja, posle 20. nedelje gestacije u žena sa hroničnom/preegzistirajućom hipertenzijom. Ukoliko se u žena sa hroničnom/preegzistirajućom hipertenzijom proteinurija javila pre ove gestacione starosti ili u ranoj trudnoći, superponirana preeklampsija se definiše kao pogoršanje ili rezistentnost hipertenzije (posebno akutno) u drugoj polovini trudnoće, ili razvoj teških simptoma/znaka iz spektra bolesti. Prognoza ishoda i za majku i za dete u slučaju superponirane preeklampsije je lošija u odnosu na izolovano javljanje preeklampsije ili bilo kog drugog hipertenzivnog poremećaja. Razlikovanje benignog povećanja krvnog pritiska uz prisutnu proteinuriju, stanja koje se često sreće kod hronične hipertenzije, u odnosu na superponiranu preeklampsiju predstavlja veliki izazov za kliničare. ACOG predlaže da se ovaj poremećaj podeli u dve grupe koje će indikovati dalje zbrinjavanje: superponirana preeklampsija i superponirana preeklampsija sa teškim karakteristikama (6). Dijagnoza superponirane preeklampsije je verovatna ukoliko je prisutna jedna od sledećih karakteristika:

1. iznenadno pogoršanje hipertenzije ili potreba za povećanjem doze antihipertenzivne terapije u slučajevim prethodno dobro kontrolisane hipertenzije već primenjenom terapijom,

2. de novo pojava proteniurije ili povećanje proteinurije koja je već bila prisutna prekonceptijski ili tokom rane trudnoće.

Dijagnoza superponirane preeklampsije sa teškim karakteristikama se postavlja kada je prisutan jedan od sledećih znakova:

- a. teška hipertenzija bez obzira na primenjenu antihipertenzivnu terapiju
- b. abnormalnosti jetre (jak, perzistentan bol u gornjem desnom kvadrantu ili u epigastrijumu koji ne reaguje na lekove i ne može se pripisati nekoj alternativnoj dijagnozi, ili porast koncentracije serumskih transaminaza ≥ 2 puta u odnosu na gornju granicu normalnih vrednosti, ili oboje)
- c. pad broja trombocita ispod $100000/\text{mm}^3$,
- d. plućna kongestija ili edem,
- e. de novo pojava renalne insuficijencije ili njeno pogoršanje (udvostručenje nivoa kreatinina ili porast njegovog nivoa iznad 1.1 mg/dL kod žena sa prethodno urednom bubrežnom funkcijom)
- f. simptomi disfunkcije centralnog nervnog sistema (perzistentni cerebralni ili vizuelni poremećaji) (6).

Iako u klasifikaciji hipertenzivnih poremećaja u trudnoći nije prepoznata kao zaseban entitet, "kasna postporodajna hipertenzija" zahteva posebnu pažnju, i najčešće biva dijagnostikovana samo kod žena koje su iz nekog drugog razloga ostale hospitalizovane najmanje dve nedelje nakon porođaja. Ovaj poremećaj se karakteriše pojavom hipertenzije (najčešće blage) u periodu od druge nedelje do 6 meseci postpartalno kod žena koje su bile normotenzivne tokom trudnoće. U slučaju kasne postporodajne hipertenzije vrednosti krvnog pritiska mogu varirati mesecima nakon porođaja i najčešće se normalizuju do kraja prve godine. Malo se zna o ovom entitetu, koji poput gestacijske hipertenzije može biti prediktor hronične hipertenzije kasnije u životu (6).

1.2. DEFINICIJA PREEKLAMPSIJE

Preeklampsija je multisistemski, hipertenzivni poremećaj u trudnoći koji se javlja posle 20 nedelja gestacije i može biti superponiran na prethodni hipertenzivni poremećaj. Procenjuje se da je 4,6% trudnoća širom sveta komplikovano ovim stanjem, te da prevalence varira sa gestacionom starošću. Naime, većina pacijentkinja ispolji kliničku sliku u gestacionoj starosti ≥ 34 nedelje, a ponekad tek tokom porođaja. Svega oko 10% aficiranih trudnica razvije simptome i znake pre 34. nedelje gestacije (rana preeklampsija), a veoma retko već u 20-22. nedelji (11). Prvobitno je bila definisana kao novootkrivena hipertenzija, uz de novo prisutnu proteinuriju. Iako su ova dva kriterijuma podrazumevala klasičnu definiciju preeklampsije, zapaženo je da kod se u nekih trudnica, uz povišen krvni pritisak, a u odsustvu proteinurije, uočavaju znaci multisistemskih poremećaja, inače indikativnih za težinu oboljenja. Hipertenzija se definiše kao sistolni krvni pritisak 140 mmHg i viši i/ili dijastolni krvni pritisak 90 mmHg i viši. Laka hipertenzija obuhvata vrednosti do 160 mmHg za sistolni i do 110 mmHg za dijastolni krvni pritisak (6). Preporučeno je da se dijagnoza hipertenzije postavi nakon dva uzastopna merenja u razmaku od najmanje 4 sata, iako u nekim slučajevima, posebno kada je u pitanju registrovanje teške hipertenzije, dijagnoza može biti postavljena u kraćem vremenskom intervalu (čak u periodu od nekoliko minuta), a u cilju što ranijeg započinjanja antihipertenzivne terapije. Proteinurija označava prisustvo 300 mg proteina i više u uzorku 24 h urina (ili ekstrapolacija ovih vrednosti u odnosu na vremenski period tokom kojeg je sakupljan uzorak urina) ili kada je odnos vrednosti proteina i kreatinina u jednokratnom uzorku urina 0.3 i više (kada su oba parametra merena u mg/dL). Kvalitativno merenje proteinurije na stapiću od 1+ i više, zbog čestih lažno-pozitivnih i lažno-negativnih rezultata, je metoda koja se uzima u obzir samo u slučaju kada ostale kvantitativne tehnike merenja nisu dostupne ili kada je neophodno što brže donošenje odluke.

U slučaju neregistrovane proteinurije, dijagnoza preeklampsije se postavlja kada je uz hipertenziju prisutna trombocitopenija ($< 100000/\text{mm}^3$ trombocita), poremećaj funkcije jetre (dvostruko povišen nivo transaminaza u serumu u odnosu na normalne vrednosti), novootkrivena renalna insuficijencija (povišen nivo kreatinina u serumu iznad 1.1 mg/dL ili udvostručavanje njegovih vrednosti u odsustvu drugih pokazatelja renalne disfunkcije), plućni edem, ili de novo pojava cerebralnih ili vizuelnih poremećaja.

Trombocitopenija je najčešći hematološki poremećaj koji se javlja u žena sa preeklampsijom. Njena incidencija zavisi od stepena težine poremećaja, i od prisutva/odsustva abrupcije posteljice. Jedno istraživanje je pokazalo da je kod 50% trudnica sa preeklampsijom zabeležen broj trombocita ispod $150000/\text{mm}^3$, dok je ispod $100000/\text{mm}^3$ trombocita imalo 36% žena (12). U nekih žena se javlja karakterističan nalaz laboratorijskih parametara – hemoliza, povišeni nivoi enzima jetre, nizak broj trombocita. Ovaj oblik preeklampsije se naziva HELLP sindrom (H- enlg. *hemolysis* (hemoliza), EL – enlg. *elevated liver enzymes* (povišeni enzimi jetre), LP – enlg. *low platet count* (nizak broj trombocita)). Većina autora smatra HELLP sindrom podtipom preeklampsije sa teškim karakteristikama u kojima su predominantni hemoliza, povišeni enzimi jetre i trombocitopenija, a ne hipertenzija, disfunkcija centralnog nervnog ili bubrežnog sistema, mada se i oni mogu kasnije javiti. Većina pacijentkinja (82-88%), ali ne i sve, ima hipertenziju i/ili proteinuriju (86-100%). Retke pacijentkinje nemaju ni jedan od ova dva simptoma, te se moraju isključiti druge dijagnoze udružene sa sličnim laboratorijskim nalazima, pre nego što se u ovih atipičnih pacijentkinja postavi dijagnoza HELLP. Upravo zbog činjenice postoje pacijentkinje koje nemaju istovremenu hipertenziju ili proteinuriju, određeni autori smatraju da je HELLP sindrom oboljenje koje treba u potpunosti razlikovati i odvojiti od preeklampsije. U slučaju odsustva ostalih simptoma i znakova preeklampsije, u cilju razlikovanja HELLP sindroma od trombotične trombocitopenijske purpure može pomoći određivanje odnosa serumske laktatne dehidrogenaze (LDH) i aspartat aminotransferaze (AST) (13).

Eklampsija podrazumeva de novo razvoj generalizovanih, toničko-kloničkih napada ili kome u žena sa preeklampsijom, u odsustvu drugih neuroloških stanja koja bi mogla biti uzrok napada. Radi se o konvulzivnoj (*grand mal*) manifestaciji preeklampsije i jednoj od najtežih kliničkih manifestaciji bolesti. Većina pacijentkinja u satima koji prethodne eklampsiji imaju simptome/znake koji mogu ukazivati na predstojeći poremećaj: hipertenzija (75%), teška i perzistirajuća okcipitalna ili frontalna glavobolja (66%), vizuelni poremećaji (27%), bol u epigastrijumum ili desnom gornjem kvadrantu abdomena (25%), poremećaj mentalnog statusa ili hiperrefleksija (14, 15). Ipak, jedna četvrtina pacijentkinja je asimptomatska. Eklamptični napadi značajno doprinose maternalnom i perinatalnom morbiditetu i mortalitetu, posebno u zemljama u razvoju (15). Ovo stanje se može razviti pre, tokom i posle porođaja. Diferencijalna dijagnoza de

novo pojave konvulzivnih napada u trudnice, uključuje razlikovanje napada koji se incidentalno desio u trudnoći (tumori mozga, rupturi aneurizme), egzacerbaciju u trudnoći (trombotična trombocitopenična purpura – TTP, hemolitičko uremični sindrom – HUS, cerebralne venske tromboze), od stanja koje je jedinstveno za trudnoću (eklampsija).

Neki simptomi, čak i kada dijagnoza preeklampsije nije potvrđena, nameću potrebu za temeljnim ispitivanjem trudnice. U njih spadaju glavobolja i/ili vizuelni poremećaji, abdominalni bol u gornjem desnom kvadrantu, i bol u epigastrijumu. Zastoj u rastu ploda i novootkrivena proteinurija u drugoj polovini trudnoće takođe su nalazi koji povećavaju sumnju da će doći do razvoja preeklampsije (16, 17). Povećanje krvnog pritiska u kasnoj u odnosu na ranu trudnoću za 30 mmHg i više u slučaju sistolnog i/ili 15 mmHg i više u slučaju dijastolnog pritiska je česta pojava u toku nekomplikovanih trudnoća (18). Ipak, prema preporukama NHBPEP Radne grupe trudnice sa ovakvim porastom krvnog pritiska zahtevaju pažljivo praćenje (1). Iako ne spadaju u dijagnostičke kriterijume preeklampsije, neki biohemijski markeri su dovedeni u vezu sa pojavom komplikacija i lošijim ishodom trudnoća kod trudnica kojima je postavljena dijagnoza preeklampsije, te njihovo otkrivanje može pomoći u pravovremenom zbrinjavanju ove grupe trudnica (npr. povišene vrednosti mokraćne kiseline) (19). Klinički prisutan edem i/ili ubrzano povećanje telesne mase, mogu da povećaju sumnju na razvoj preeklampsije, ali ovi znakovi ne spadaju u dijagnostičke kriterijume. Nezavisna pojava edema se javlja u 10-15% trudnica koje su normotenzivne tokom čitave trudnoće, što ga čini nespecifičnim i nesenzitivnim znakom za preeklampsiju (20).

Precizna podela preeklampsije prema stepenu težine bolesti i dalje nije sasvim jasna i pouzdana, pre svega zbog nedovoljne predvidivosti ishoda ovog stanja. Obzirom da su žene bez teških znakova preeklampsije i dalje u povećanom riziku za morbiditet i mortalitet, naziv laka preeklampsija može biti obmanjujući i po preporukama ACOG bi ga trebalo izbegavati. Predlog je da se termin “laka” zameni terminom “preeklampsija bez teških karakteristika” (6). Progresija lake u tešku formu bolesti može se desiti tokom prvih nekoliko dana od postavljanja dijagnoze (21). Identifikacija žena sa teškom formom preeklampsije i dalje predstavlja izazov za kliničare. Neki klinički pokazatelji dodatno povećavaju rizik od maternalnog i perinatalnog morbiditeta i mortaliteta, te

njihovo prisustvo pomaže u svrstavanju žena u grupu sa težim oblikom preeklampsije (22). Prema preporukama ACOG kod žena koje su prethodno ispunjavale osnovne kriterijume za dijagnozu preeklampsije, teška forma se potvrđuje kada je prisutan bilo koji od sledećih znakova (6): sistolni krvni pritisak 160 mmHg i viši i/ili dijastolni pritisak 110 mmHg i viši izmereni dva puta u razmaku od najmanje 4 sata tokom kojih pacijent miruje (osim u slučajevima kada je već započeta antihipertenzivna terapija); trombocitopenija ($< 100000/\text{mm}^3$); poremećaj funkcije jetre koji se ispoljava izraženim povećanjem nivoa jetrinih enzima (udvostručavanje vrednosti), jak prezistirajući bol u gornjem desnom kvadrantu abdomena i/ili bol u epigastrijumu, koji ne reaguju na terapiju i nisu povezani sa prisustvom nekog drugog poremećaja; progresivna renalna insuficijencija (povišenje serumskog kreatinina iznad 1.1 mg/dL ili udvostručavanje njenih vrednosti u odsustvu drugih pokazatelja renalne disfunkcije); plućni edem; de novo cerebralni ili vizuelni poremećaji. Dodatno, žene koje ispunjavaju osnovne kriterijume za postavljanje dijagnoze preeklampsije sa sistolnim pritiskom 140-160 mmHg i/ili dijastolnim pritiskom 90-110 mmHg, uz novorazvijenu trombocitopeniju, poremećaj funkcije jetre, renalnu insuficijenciju, plućni edem, ili vizuelne ili cerebralne poremećaje, takođe se svrstavaju u grupu sa teškim oblikom preeklampsije.

Nakon rezultata nedavnih istraživanja koji su pokazali da postoji minimalna povezanost između kvantitativnih vrednosti proteinurije i ishoda trudnoća komplikovanih preeklampsijom, masivna proteinurija (preko 5 g/dan) je eliminisana kao dijagnostički kriterijum teške forme bolesti. Takođe, obzirom na isti tretman intrauterusnog zastoja u rastu ploda kod žena sa i bez preeklampsije, ovaj pokazatelj takođe više ne predstavlja parametar koji se koristi u postavljanju dijagnoze teškog oblika preeklampsije (6).

Teška preeklampsija može dovesti, kako do trenutnih, tako i do dugoročnih maternalnih i neonatalnih komplikacija (23-27). Komplikacije koje se mogu javiti kod majke su: plućni edem, infarkt miokarda, moždani udar, akutni respiratorni distres sindrom, koagulopatija, teška bubrežna insuficijencija, oštećenje retine. Rizik za pojavu ovih komplikacija je veći ukoliko je prethodno već bila prisutna poremećena funkcija ovih organa ili ukoliko postoji akutna organska disfunkcija koja je povezana sa preeklampsijom (23-26). Fetalne i neonatalne komplikacije teške preeklampsije nastaju kao rezultat uteroplacentne insuficijencije i/ili pretermanskog porođaja (23-26). Ukoliko

se porođaj ne obavi pravovremeno, klinički tok teške preeklampsije najčešće karakteriše rapidno pogoršanje stanja majke i fetusa (23-26).

Ness i Roberts (28) su 1996. godine predložili podelu preeklampsije prema poreklu nastanka u dve velike kategorije: placentarna i maternalna. Drugi istraživači su ove dve grupe imenovali kao rana (< 34 nedelje gestacije) i kasna (> 34 nedelje gestacije) (29). Smatra se da ove dve podgrupe imaju različitu etiologiju i fenotipske karakteristike. Ova klasifikacija ima i prognostički značaj, s obzirom da rana (placentarna) preeklampsija nosi značajno povišen rizik za maternalne i fetalne komplikacije i zastoj u rastu ploda u odnosu na kasnu (maternalnu) preeklampsiju (29-33). Rana preeklampsija je takođe razlog veće prevalencije placentarnih lezija, koje se najčešće dešavaju između 28 i 32 gestacijske nedelje (34). U osnovi rane preeklampsije nalazi se neadekvatna placentacija usled neadekvatne transformacije spiralnih arterija, placentarne hipoksije i poremećaja produkcije angiogenih faktora (povišen nivo solubilne fms-slične tirozin kinaze-1 (sFlt-1), snižena koncentracija placentarnog faktora rasta (PlGF), i povišen odnos sFlt-1/PlGF) (35-37). Pretpostavlja se da maternalna (kasna) preeklampsija proističe iz interakcije između adekvatno razvijene placentae i maternalnih faktora koji su svojim delovanjem odgovorni za pojavu endotelne disfunkcije, čineći ove trudnice osetljivim za mikrovaskularna oštećenja. Endotelna disfunkcija, kao jedan oblik sistemskog inflamatornog odgovora, može dovesti do generalizovane vazokonstrikcije i redukovano krvnog protoka u brojnim organima, uključujući srce, bubrege i mozak. Dodatna nemogućnost adekvatnog odgovora na oksidativni stres u placenti, koja je rezultat disfunkcionalnog maternalnog endotela, predstavlja još jedno dešavanje za koje se pretpostavlja da leži u osnovi kasne preeklampsije (38).

Iako bi patofiziološke razlike između ova dva podtipa preeklampsije trebalo da budu jasna, podela nije uvek precizna, s obzirom da se njihovi mehanizmi mogu preklapati, kao u slučaju starijih žena sa prisutnim vaskularnim oboljenjima kod kojih se dešava neadekvatna placentacija. Iako ova podela može pomoći u boljem razumevanju i prognozi bolesti, većina žena sa preeklampsijom ima elemente oba stanja.

Preeklampsija može da komplikuje sve ostale hipertenzivne poremećaje u trudnoći, kada je njena incidencija 4 do 5 puta veća nego u slučaju pojave kod prethodno normotenzivnih trudnica (39). Kod žena sa blagom gestacijskom hipertenzijom

progresija u tešku hipertenziju ili preeklampsiju se najčešće dešava tokom 1-3 nedelje od postavljanja dijagnoze (21). Potrebno je naglasiti da se bilo koji oblik preeklampsije može prvi put pojaviti u postpartalnom periodu. U SAD praksa što ranijeg otpuštanja žena iz porodilišta nalaže da se porodilje prethodno edukuju u cilju samostalnog prepoznavanja simptoma (teške glavobolje, vizuelni poremećaji, bolovi u epigastrijumu) koje bi trebalo prijaviti zdravstvenoj službi. Nekoliko studija je naglasilo značaj edukacije žena za prepoznavanje simptoma i znakova koji prethode eklampsiji, hipertenzivnoj encefalopatiji, plućnom edemu ili moždanom udaru (40-43). Velika studija iz 2010. godine je pokazala da je razlog 0.3% postporođajnih poseta hitnoj medicinskoj službu upravo pojava hipertenzije i preeklampsije (44). Kod žena sa preeklampsijom ili superimponiranom preeklampsijom, krvni pritisak obično pada tokom 48 sati nakon porođaja, ali može opet porasti između 3. i 6. dana postpartalno (45). Postpartalna preeklampsija je redak poremećaj koji se najčešće ispoljava tokom prvih 48 sati nakon porođaja, iako se može razviti i nakon 6 nedelja, pa čak i kasnije (ovaj oblik se naziva kasna postpartalna preeklampsija). Ovaj oblik bolesti zahteva započinjanje terapije što pre, radi sprečavanja moguće pojave konvulzija i drugih komplikacija. Najveći broj žena koje razviju postpartalnu preeklampsiju, u toku trudnoće ne razvijaju bilo kakve simptome i znakove. Faktori rizika za razvoj postpartalne forme bolesti su: visok krvni pritisak tokom skorašnje trudnoće, gojaznost, višeploidne trudnoće, hronična hipertenzija, diabetes mellitus tip 1 i tip 2. Komplikacije postpartalne preeklampsije su: postpartalna eklampsija, plućni edem, moždani udar, tromboembolizam, HELLP sindrom. Nekoliko retrospektivnih studija je pokazalo da se kod žena sa potporođajnom eklampsijom ili moždanim udarom simptomi javljaju nekoliko sati, pa čak i dana pre pojave ovih komplikacija (40-43). Takođe, nesteroidni analgetici koji se često prepisuju ženama postpartalno, mogu uticati na povećajne krvnog pritiska. Stoga bi ih trebalo izbegavati kod žena kod kojih je potvrđena hipertenzija koja se održava više od jednog dana postpartalno.

1.3. EPIDEMIOLOGIJA PREEKLAMPSIJE I HIPERTENZIVNIH POREMEĆAJA U TRUDNOĆI

Prema podacima Centra za kontrolu i prevenciju bolesti (engl. *Centers for Disease Control and Prevention* - CDC) iz 2016. godine, poslednjih 25 godina u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) zabeležen je porast učestalosti smrtnih slučajeva povezanih sa trudnoćom (46). Iako je sveukupni rizik od smrti među trudnicama mali, kod nekih žena ovaj rizik je višestruko povišen. Žene afričkog porekla koje žive u Americi u odnosu na žene bele rase imaju za 3 do 4 puta veći rizik od umiranja kao posledice komplikacija u trudnoći. Žene starosti između 35 i 39 godina su u dvostruko većem riziku od umiranja u odnosu na žene starosti 20 do 24 godine. Ovaj rizik se višestruko povećava kod žena starijih od 40 godina. Svake godine u SAD umre 700 žena od posledica komplikacija u trudnoći, dok više od 50000 žena ima neki od teških poremećaja u trudnoći (ovaj broj je više nego udvostručen u periodu od 2000. do 2010. godine) (46).

Hipertenzivni poremećaji u trudnoći se javljaju u oko 10% svih trudnoća i predstavljaju jedan od vodećih uzročnika maternalnog i perinatalnog morbiditeta i mortaliteta širom sveta (6). Prepoznati su kao najznačajniji uzročnici pretermenskog porođaja (6). Incidencija povišenog krvnog pritiska u trudnoći i poremećaja koji ga prate, raste iz godine u godinu. U SAD povišeni krvni pritisak se javlja u 6 do 8% trudnica starosti između 22 i 44 godine života (47, 48). Stopa hronične hipertenzije je porasla sa 0.7% u 1993. na 1.7% u 2014. godini, dok je učestalost hipertenzije u trudnoći porasla sa 5.3% u 1993. na 9.1% u 2014. godini (49). Incidencija hronične hipertenzije u trudnoći iznosi oko 5%, sa varijacijama u zavisnosti od populacije i korišćenih dijagnostičkih kriterijuma (50-52). U poslednje dve decenije incidencija preeklampsije u SAD je porasla za 25% (53). Incidencija preeklampsije kreće se od 3 do 5% u zavisnosti od regiona. Od 1979 do 2013. godine publikovana je 31 epidemiološka studija na globalnom nivou, u pet različitih regiona i 29 zemalja, koje su pokazale da je incidencija preeklampsije 2.16%, a eklampsije oko 0.28% (54). Značajno veća učestalost ovog tipa hipertenzivnog poremećaja u trudnoći je zabeležena u Afričkoj, Američkoj, Hispano i Azijskoj populaciji žena u odnosu na žene bele rase, pri čemu je najveća stopa oboljevanja ustanovljena među Afro-amerikankama. Preeklampsija je vodeći uzročnik maternalnog

i perinatalnog morbiditeta i mortaliteta. Procenjuje se da je odgovorna za oko 50000 do 60000 smrtnih slučajeva godišnje širom sveta (55, 56). Na svaki smrtni slučaj povezan sa preeklampsijom u SAD, 50-100 žena prežive teške komplikacije koje za posledicu imaju ozbiljan zdravstveni rizik i veliki trošak za zdravstvenu negu (57, 58). Ipak, smatra se da određeni procenat neadekvatno lečenih slučajeva preeklampsije i ostalih hipertenzivnih poremećaja u trudnoći, koji je zabeležen na svetskom nivou, dovodi do pojave maternalnih i perinatalnih komplikacija koje bi adekvatnim tretmanom mogle biti izbegnute (59). Preeklampsija takođe predstavlja i faktor rizika za kardiovaskularne i metaboličke poremećaje kod žena kasnije tokom života.

1.4. PREDIKCIJA PREEKLAMPSIJE

Pojava povišenog krvnog pritiska u trudnoći koji nije adekvatno tertian, značajno povećava rizik od pojave maternalnih i/ili fetalnih komplikacija tokom trudnoće, porođaja ili posle porođaja (6). Veliki napori se sprovode u cilju identifikacije demografskih faktora, biohemijskih i biofizičkih pokazatelja koji bi, samostalno ili u kombinaciji, pomogli tokom rane gestacije u prepoznavanju rizika za razvoj preeklampsije u drugoj polovini trudnoće. Utvrđeni faktori rizika za razvoj preeklampsije su prikazani u Tabeli 1 (6).

Tabela 1. Faktori rizika za razvoj preeklampsije

Prvorotka
Pozitivna porodična anamneza za preeklampsiju
Prethodne trudnoće komplikovane preeklampsijom
Višeploidne trudnoće
Hronična hipertenzija i/ili hronična bolest bubrega
Trombofilija
Vantelesno oplodjenje
Diabetes mellitus tip 1 ili tip 2
Gojaznost
Lupus erythematosus systemicus
Starost žene preko 40 godina

Preeklampsija se najčešće javlja kod prvorođanke koje su prethodno bile zdrave i bez drugih prepoznatih faktora rizika. Ukoliko pacijentkinja ima rođaku prvog stepena koja je imala preeklampsiju rizik se povećava za 2 do 4 puta, a ukoliko je preeklampsija registrovana u prethodnoj trudnoći rizik je povećan čak 7 puta (60, 61). Što se višeplođnih trudnoća tiče, trojke nose veći rizik od blizanačke trudnoće. Klasični kardiovaskularni rizici su takođe predisponirajući faktori za razvoj preeklampsije, poput hronične hipertenzije, dijabetesa, gojaznosti i starosti preko 40 godina. Povećana prevalencija hronične hipertenzije kod žena starijih od 35 godina može predstavljati razlog veće verovatnoće za razvoj preeklampsije u grupi starijih žena. Rasne razlike u prevalenciji i stepenu težine bolesti je teško proceniti zbog doprinosećih faktora poput socioekonomskog statusa i kulturoloških razlika.

Do sada nijedan pojedinačni test nije pokazao dovoljnu preciznost u predikciji preeklampsije. Korisnost prediktivnog testa za preeklampsiju ogleda se kroz dostupnost efikasnih preventivnih pristupa i terapijskih intervencija, kao i kroz značajno poboljšanje maternalnih i perinatalnih ishoda trudnoća nakon dokazivanja predispozicije za razvoj ovog poremećaja.

Interesovanje brojnih istraživača usmereno je na korisnost određivanja doplerskih parametara protoka krvi u arterijama uterinama u cilju predikcije preeklampsije (62). Otpor protoku krvi u uterinim arterijama opada sa odmicanjem gestacione starosti u fiziološkoj trudnoći. Povećana impedanca za datu gestacionu starost predstavlja rani radiografski znak preeklampsije, koji verovatno reflektuje visoki otpor protoku krvi ka interviloznom prostoru, usled defektne/nezavršene invazije trofoblasta u spiralne arterije. Ultrazvučno izmereno povećanje rezistencije, kroz povišene indekse rezistencije/pulsatiliteta ili prisustvo uni ili bilateralnog dijastolnog notcha, ukazuju na pojavu povećanog otpora protoku kroz arterije uterine (63). Rezultati dosadašnjih studija koje su ispitivale dopler protok kroz arterije uterine, pokazali su da skrining postiže bolje rezultate korišćenjem u drugom, u odnosu na prvi trimestar, te da je tehnika korisnija u predikciji rane nego kasne preeklampsije (62). Najveći nedostaci ove tehnike se odnose na veliku varijabilnost njenih rezultata (pre svega zbog razlike u interpretaciji od strane onog koji je izvodi) i lošu prediktivnu preciznost (visoka stopa lažno pozitivnih rezultata). Do sada ni jedna randomizovana klinička studija koja se bavila arterijskim

dopler skriningom nije dokazala bolje maternalne i/ili fetalne ishode nakon upotrebe ove tehnike u cilju predviđanja pojave preeklampsije.

Rezultati studija koje su ispitivale poreklo i patogenezu preeklampsije, ukazale su na mogućnost implementacije biomarkera iz cirkulacije i urina u testove za predikciju preeklampsije (64). Kao potencijalni markeri preeklampsije ispitivani su nivoi cirkulišućih angiogenetskih proteina (sFlt-1, PlGF, vaskularni endotelni faktora rasta (VEGF) i solubilni endoglin (sEng)) (64), čije promene koncentracije u majčinoj cirkulaciji prethode razvoju preeklampsije nekoliko nedelja ili meseci. Najveći broj studija se fokusirao na ispitivanje antiangiogenog proteina, sFlt-1, kao potencijalnog prediktora rane preeklampsije (65). Pokazano je da što je veća vrednost sFlt-1, veća je i šansa za razvoj rane preeklampsije (63). Ipak, kako se vrednosti sFlt-1 menjaju tek 4-5 nedelja pre pojave prvih simptoma, ovaj pokazatelj nije koristan kada se upotrebljava samostalno kao skrining test u ranoj trudnoći. Sa druge strane, vrednosti PlGF počinju da padaju 9-11 nedelja pre razvoja hipertenzije i proteinurije, sa ubrzanim smanjenjem koncentracije oko 5 nedelja pre pojave bolesti (35). Kombinacija PlGF-a sa drugim biomarkerima, i doplerom arterija uterina, značajno poboljšava stepen predikcije. Studija koja je ispitivala 7797 žena sa jednoplodnim trudnoćama između 11 i 13. nedelje gestacije, koristeći algoritam koji je obuhvatio vrednosti uterinog pulsatilnog indeksa, srednje vrednosti krvnog pritiska, sa trudnoćom-povezanog proteina plazme A (PAPP-A), serumske koncentracije slobodnog PlGF, indeks telesne mase (engl. *body mass index* - BMI), paritet i podatak o prethodnoj pojavi preeklampsije, pokazala je 5% lažno-pozitivnih rezultata, sa nivoom detekcije rane preeklampsije od 93.1% (66). S obzirom da je PlGF mali protein koji se lako filtrira u bubrežima, merenje urinarnog PlGFa u kombinaciji sa merenjem odnosa cirkulišućih vrednosti sFlt-1/PlGF je predloženo kao još jedan skrining metod u predikciji rane preeklampsije (67). Istraživanje sprovedeno na 1622 trudnica je pokazano da ova kombinacija markera ima senzitivnost 100% i specifičnost 98% za predikciju rane preeklampsije (68). Nekoliko studija je pokazalo da je nivo placentarnog proteina-13 značajno manji kod žena kod kojih dolazi do razvoja rane preeklampsije i preterminskog porođaja (69, 70). Kombinacija placentarnog proteina-13 sa drugim prediktivnim markerima mogla bi doprineti poboljšanju efikasnosti prediktivnih testova. Iako su došadašnji rezultati obećavajući, odgovarajuća paleta markera za predikciju preeklampsije i dalje nije implementirana u svakodnevnu

kliničku praksu zbog nedostatka dokaza o boljim maternalnim i/ili fetalnim ishodima nakon sprovođenja ove skrining metode.

Upotreba biomarkera može biti korisna i u proceni verovatnoće pojave negativnih ishoda kod žena sa gestacijskom hipertenzijom ili preeklampsijom. Iako su visoke vrednosti mokraćne kiseline uobičajene u žena sa preeklampsijom, sistematični pregled pet studija zaključio je da merenje serumskih vrednosti mokraćne kiseline pre 25. nedelje gestacije nije korisno u predikciji razvoja buduće preeklampsije (71). Povišena koncentracija mokraćne kiseline se pokazala kao korisnom u identifikacija žena sa gestacijskom hipertenzijom, koje su u povećanom riziku za razvoj preeklampsije, kao i za razvoj nepovoljnih maternalni i/ili fetalnih ishoda (72, 73). Nedavna prospektivna studija je pokazala pozitivnu prediktivnu vrednost za progresiju gestacijske hipertenzije u preeklampsiju od 93.3% kada je gornja granica za mokraćnu kiselinu 309 $\mu\text{mol/L}$ (74). Angiogeni faktori su se takođe pokazali kao korisni u proceni žena sa preeklampsijom koje su u povišenom riziku od razvoja maternalnih i/ili fetalnih komplikacija (75-77). Studija koja je obuhvatila žene koje su se porodile pre 34. nedelje gestacije, pokazala je da sFlt-1/PlGF odnos od 85 i više ima pozitivnu prediktivnu vrednost od 86% za predviđanje pojave negativnih maternalnih-fetalnih ishoda tokom dve nedelje od pojave preeklampsije, dok je sFlt-1/PlGF odnos od 85 i manje imao negativnu prediktivnu vrednost od 87.3% (76). Dostupnost biomarkera za brzu i tačnu procenu ispitivanja rizika za progresiju gestacijske hipertenzije u preeklampsiju i/ili za naknadnu pojavu komplikacija, može značajno poboljšati zbrinjavanje ove grupe pacijenata.

1.5. PREVENCIJA PREEKLAMPSIJE

Poslednje dve decenije intezivno se ispituju strategije koje bi pomogle u prevenciji preeklampsije, ali se ni jedna tehnika do sada nije dokazala kao pouzdano efikasna. Jedan od mogućih razloga neuspeha u prevenciji preeklampsije, nakon evaluacije predloženih prediktora i preporučene terapije dokazane da deluje na patofiziološke mehanizme, jeste da ona možda ne predstavlja jedinstven entitet, već više bolesti. Ova teorija je podržana kliničkim i epidemiološkim podacima, koji ukazuju na značajno različite efekte ovog poremećaja među različitim ženama, u različitim periodima trudnoće, kao i prisutne različite kardiovaskularne ishode rane preeklampsije u odnosu na kasnu formu bolesti (30). Buduća istraživanja bi trebalo usmeriti na

utvrđivanje podtipova preeklampsije, s obzirom da bi različito poreklo bolesti moglo zahtevati i različite preventivne i terapijske pristupe.

Jedna od teorija navodi da sistemski poremećaj ravnoteže između nivoa prostaciklina i tromboksana doprinosi razvoju preeklampsije. Upotreba malih doza aspirina, antiinflamatornog agensa koji blokira produkciju tromboksana, je ispitivana od strane brojnih studija. Meta-analiza iz 2007. godine koja je ispitivala efekat antitrombocitnih agenasa u prevenciji preeklampsije obuhvatila je više od 30000 žena iz 31 studije iz različitih grupa rizika, i pokazala je da antitrombocitni agensi imaju skroman efekat, sa relativnim rizikom (RR) za preeklampsiju od 0.9 i 95% intervalom poverenja (CI) 0.84-0.97, za grupu tretiranu aspirinom (78). Treba napomenuti i da primena niskodoznog aspirina nije povezana sa pojavom ozbiljnih neželjenih efekata i predispozicijom za obilna krvavljenja i/ili abrupciju placente. Skromna, ali efikasna profilaksa niskodoznim aspirinom (60-80 mg) bi mogla biti preporučena kao primarna preventivna mera kod žena u visokom riziku od razvoja preeklampsije (pozitivnu ličnu anamnezu za preeklampsiju i pretermijski porođaj pre 34 nedelje gestacije, hroničnu hipertenziju ili dijabetes), sa čijom bi se primenom započelo tokom kasnog prvog trimestra (12-13. nedelja gestacije), ili najkasnije do 16. nedelje gestacije. (6, 79). Primena ovih ili, kako novi dokazi sugerišu, doza aspirina od 100-150mg/dan, rezultuje u visokorizičnih pacijentkinja u redukciji incidence preeklampsije i njenih sekvela (restrikcija rasta, pretermijski porođaj) od barem 10% (80). Iako nisu definitivni, dostupni podaci konkluzivno ne podržavaju profilaktičku upotrebu nisko-molekularnog heparina kao dodatka niskodoznom aspirinu u redukciji rizika od preeklampsije ili njenih sekvela (81).

Smatra se da oksidativni stres igra značajnu ulogu u patogenezi preeklampsije, te je upotreba antioksidanasa predložena u cilju njene prevencije. Velike randomizovane, placebo-kontrolisane studije su pokazale da suplementacija vitaminom C i E tokom trudnoće ne dovodi do smanjenja rizika za razvoj preeklampsije, niti poboljšava maternalne i/ili fetalne ishode u različitim populacijama (82-85), što je potvrđeno i rezultatima Kohrejnovе meta-analize iz 2008. godine koja je obuhvatila 15 randomizovanih studija (20748 žena) (86). Shodno svim dosadašnjim rezultatima, u izveštaju radne grupe ACOG iz 2013. godine, upotreba vitamina C i E se ne preporučuje u cilju prevencije preeklampsije (6).

Nekoliko studija je ispitivalo efikasnost suplementacije kalcijumom u cilju prevencije preeklampsije. U velikoj SAD kohorti sprovedenoj na zdravim prvorotkama, suplementacija kalcijumom nije smanjila incidenciju preeklampsije (87). Međutim, kod žena koje imaju nedostatak kalcijuma suplementacija ovog elementa može imati značajno više koristi. Meta-analiza 13 studija koja je obuhvatila 15730 žena pokazala je da suplementacija kalcijumom značajno smanjuje rizik za razvoj preeklampsije (RR 0.45, 95% CI 0.31-0.65), sa najvećim smanjenjem rizika u grupi žena koje su prvobitno unosile nedovoljno kalcijuma (RR 0.36, 95% CI 0.20-0.65) (88). U cilju redukcije rizika od preeklampsije, Svetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization* - WHO) preporučuje suplementaciju elementarnim kalcijumom (1.5-2 g dnevno) za populaciju trudnica sa nedovoljnim dnevnim unosom kalcijuma i visokim rizikom od razvoja hipertenzije.

Nedostatak Vitamina D je takođe predstavljen kao mogući faktor rizika za razvoj preeklampsije (89), ali još uvek bez dokazane efikasnosti suplementacije ovim vitaminom. Pored ovoga, druge nutritivne intervencije koje se sprovode u cilju prevencije preeklampsije (upotreba ribljeg ulja ili belog luka u ishrani) takođe nisu klinički dokazane kao efikasne. Proteinska i kalorijska restrikcija u grupi gojaznih žena ne pokazuju smanjenje rizika za razvoj preeklampsije ili gestacijske hipertenzije, a mogu povećati rizik od intrauterusnog zastoja u rastu ploda, te bi ove postupke trebalo izbegavati. Sa druge strane, prekonceptioni gubitak težine u ovakvih pacijentkinja nosi sa sobom brojne koristi u smislu reproduktivnih ishoda i opšteg zdravstvenog stanja. Iako je nivo dokaza nizak, restrikcija unosa soli u cilju prevencije preeklampsije nije preporučena od strane ACOG. Sistematski pregled koji je obuhvatio sve studije koje su se do tada bavile ispitivanjem restrikcije unosa natrijuma (603 žene), nije pokazao značajan uticaj ovog postupka na prevenciju preeklampsije (90). Pored toga, meta-analiza koja je obuhvatila oko 7000 pacijenata je pokazala da primena diuretika ne dovodi do smanjenja incidencije preeklampsije (91).

Iako su do sada sprovedene samo dve studije na malom broju žena, i bez ispitivanja perinatalnog i maternalnog morbiditeta i mortaliteta, kao i eventualnih drugih negativnih efekata, mirovanje je preporučeno kao mera prevencije preeklampsije od strane nekih istraživača (92). Sa druge strane, smatra se da redovno vežbanje kroz poboljšanje

vaskularne funkcije može pomoći u smanjenju incidencije preeklampsije (93, 94). Trenutno aktuelna preporuka za žene sa nekomplikovanim trudnoćama je 30 minuta vežbanja nekoliko puta nedeljno (95). Pokazano je da umereno vežbanje stimuliše angiogenezu u placenti i poboljšava maternalnu endotelnu disfunkciju. Nekoliko malih kliničkih studija ispitivalo je korisnost umerenog vežbanja u prevenciji preeklampsije, ali je interval poverenja bio širok, te ovakvi rezultati nisu pouzdani za donošenje zaključka o njenoj efikasnosti (96). Prema preporuci ACOG mirovanje (restrikcija fizičkih aktivnosti) ne treba da bude primenjeno kao primarna preventivna mera za razvoj preeklampsije.

Obzirom da su statini efikasni u primarnoj i sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnog mortaliteta i morbiditeta, pretpostavilo se da bi ovi agensi, iako za sada kontraindikovani u trudnoći, mogli redukovati rizik od preeklampsije. Ovu hipotezu su podržali podaci iz studija na životinjama i malih humanih pilot studija. Radi se o potencijalno obećavajućoj terapiji u prevenciji preeklampsije, ali su za njeno razmatranje neophodne dodatne velike studije bezbednosti i efikasnosti (97, 98).

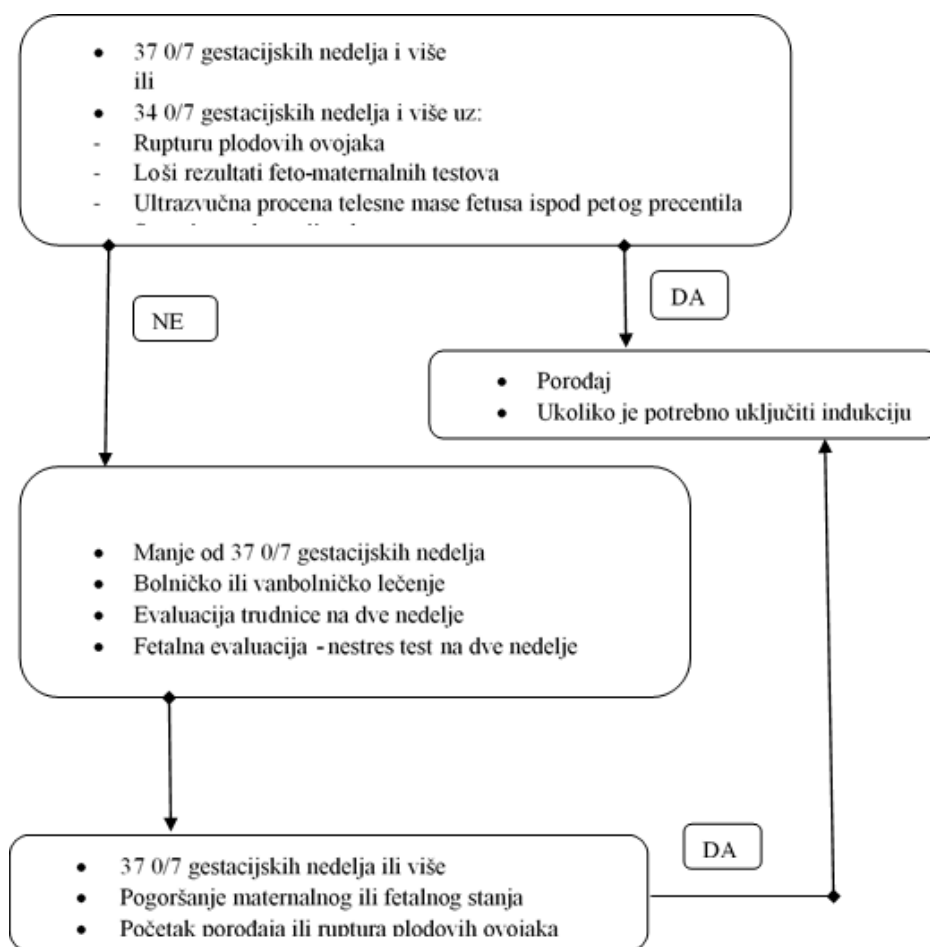
U slučaju žena koje su razvile preeklampsiju u prethodnoj trudnoći prekonceptijsko savetovanje je preporučeno od strane ACOG. Unaprediti majčino zdravlje pre začeća, pravovremena detekcija akušerskih komplikacija, i dostizanje zadovoljavajućih perinatalnih ishoda u idućoj trudnoći su glavni ciljevi u zbrinjavanju žena sa verifikovanom preeklampsijom u prethodnoj trudnoći. Ovi ciljevi se mogu postići racionalnim pristupom koji podrazumeva prekonceptijsku evaluaciju i savetovanje, ranu antenatalnu brigu, učestalo antepartalno ispitivanje i praćenje maternalnog i fetalnog statusa, uz utvrđivanje optimalnog vremena porođaja (99).

1.6. TERAPIJSKE MERE I PRAĆENJE ŽENA SA PREEKLAMPSIJOM

U slučajevima uspostavljene dijagnoze preeklampsije, definitivni tretman u cilju prevencije razvoja maternalnih i/ili fetalnih komplikacija jeste porođaj, koji rezultira u konačnoj rezoluciji bolesti. Vreme porođaja se određuje na osnovu kombinacije faktora, koji uključuju težinu bolesti, stanje trudnice i fetusa i gestacionu starost. Prilikom zbrinjavanja trudnica sa hipertenzijom ili preeklampsijom, glavna briga je dakle život majke i ploda. Drugi cilj je rođenje terminskog deteta koje neće zahtevati mere produžene nege i intenzivnog zbrinjavanja (23).

1.6.1. Laka preeklampsija

Odabir terapije i pravac zbrinjavanja lake preeklampsije će zavisi od procene stanja majke i ploda, gestacijske starosti, eventualnih znakova porođaja ili ruptore plodovih ovojaka, vaginalnog krvavljenja, ali i želje same trudnice (Šema 1). Jedinstvene sugestije autora odnose se na preporuke o porođaju trudnica sa preeklampsijom u ≥ 37 nedelja gestacije, čak i u odsustvu karakteristika teške forme bolesti. U preterminskoj trudnoći, rizik od teških sekvela usled progresije bolesti mora biti balansiran u odnosu na rizik od prematuriteta novorođenčeta. Kada su trudnica i plod stabilni i nema znakova teške organske disfunkcije, u cilju postizanja fetalnog rasta i maturiteta, racionalno je primeniti ekspektativni tretman sa pažljivim monitoringom dokaza progresije težine bolesti. Međutim, u bilo kojoj gestacionoj starosti, dokazi teške hipertenzije, ozbiljne maternalne organske disfunkcije, ili nestabilnog fetalnog stanja, predstavljaju indikaciju za promptni porođaj. Pre 34 0/7 nedelja gestacije, preporuke vodećih stručnih udruženja sugerišu ekspektativni tretman u ovoj formi bolesti.



Šema 1. Algoritam za zbrinjavanje trudnica sa lakom preeklampsijom (6).

U trenutku postavljanja dijagnoze svim ženama bi trebalo uraditi kompletnu krvnu sliku, nivo serumskog kreatinina i jetrinih enzima, prisustvo proteina u urinu (24 h uzorak urina, ili protein/kreatinin odnos iz jednokratnog uzorka), i ispitati ih o eventualnim simptomima i znacima teške preeklampsije. Određivanje broja trombocita, serumskog kreatinina i jetrinih enzima treba ponavljati bar dva puta nedeljno u žena sa preeklampsijom bez teških karakteristika, kako bi se procenila progresija bolesti i uočili znaci/simptomi pogoršanja. Fetalna procena bi trebalo da obuhvati ultrasonografsku procenu telesne mase fetusa i indeks plodove vode (mereno u cm), nestres test (NST), i biofizički profil (BPP) ukoliko je nestres test nereaktivan. Adekvatno zbrinjavanje podrazumeva hospitalizaciju ili porodaj u slučaju prisutnog jednog ili više znakova: 37 gestacijskih nedelja ili veću starost trudnoće, sumnja na abrupciju placente, 34

gestacijskih nedelja i manje uz prisustvo makar jednog od sledećih znakova: progresivni porođaj ili ruptura plodovih ovojnica, ultrasonografska procena telesne mase fetusa koja je ispod petog percentile za gestacijsku starost, oligohidramnion (trajno prisutan indeks plodove vode ispod 5 cm), BPP koji se održava u vrednost 6/10 i manje (normalan 8/10-10/10). Kod žena kod kojih se dijagnoza lake preeklampsije postavi između 34 i 37 nedelja nema dovoljno dokaza da li čekanje poboljšava ishode, i da li povećava rizik od pojave komplikacija (100). Sa druge strane, hitan porođaj u ovom periodu je povezan sa većom učestalošću prijema u neonatalnu intenzivnu negu, neonatalnih respiratornih komplikacija, i neznatnim porastom učestalosti neonatalne smrti u odnosu na porođaj završen u 37 gestacijskih nedelja i kasnije.

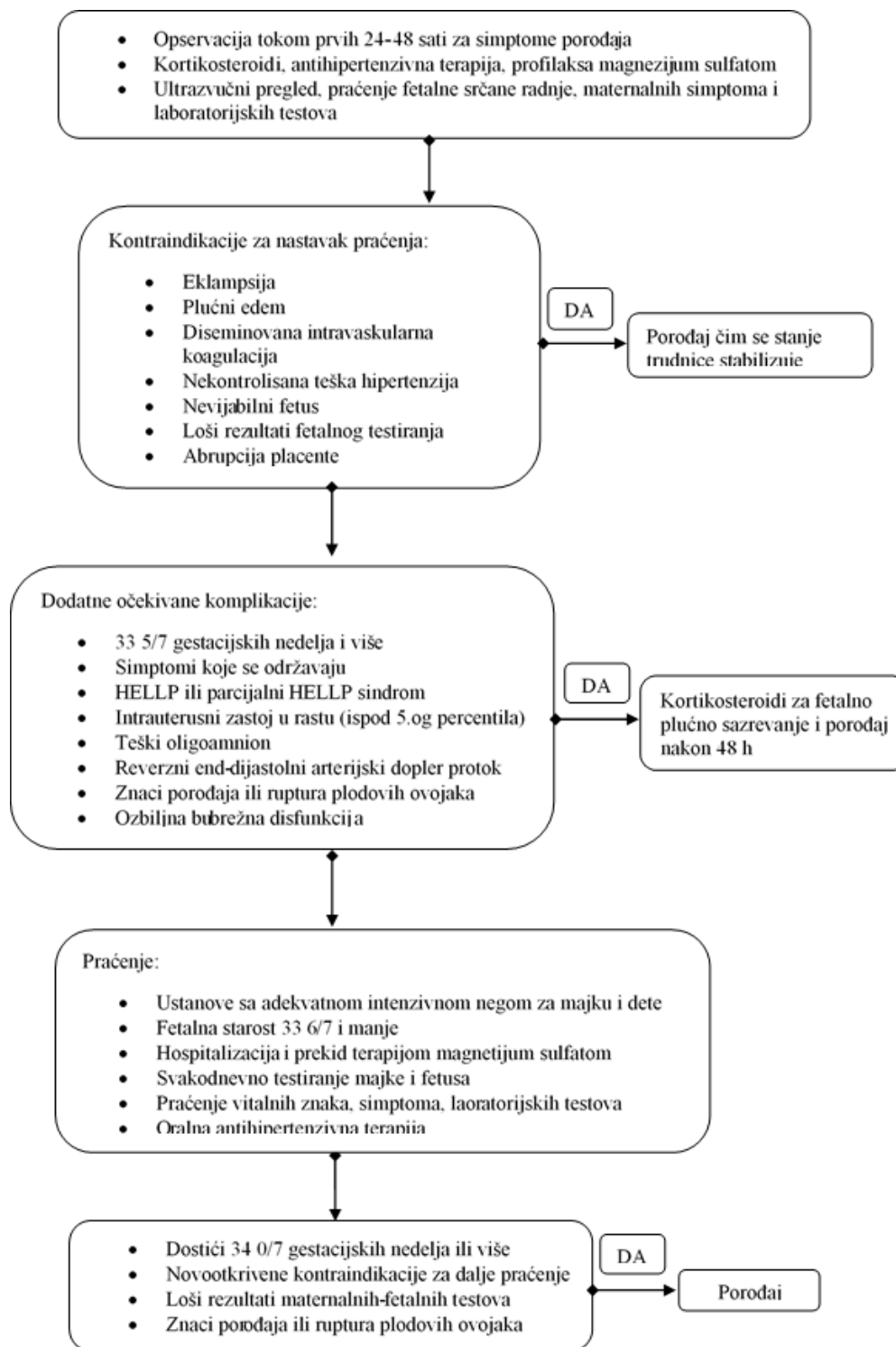
Kod žena koje nisu porođene, tretman se može sprovoditi u bolničkim i vanbolničkim uslovima, uz ograničenje fizičke aktivnosti i redovne kontrole. Žene se savetuju da se normalno hrane, bez restrikcije unosa soli. Kontinuirana evaluacija žena sa lakom preeklampsijom podrazumeva (6):

1. fetalna evaluacija - dnevno praćenje fetalnih pokreta od strane majke, ultrasonografsko praćenje rasta na svake tri nedelje, i procena količine plodove vode najmanje jednom nedeljno. Dodatno je predloženo izvođenje NST dva puta nedeljno. Ukoliko je NST nereaktivan trebalo bi uraditi BPP. Učestalost izvođenja ovih testova trebalo bi odrediti na osnovu rezultata drugih sprovedenih analiza. Ukoliko se konstatuje zastoj u rastu ploda, preporučen dopunski test je fetoplacentarna procena koja podrazumeva ultrasonografski dopler protoka kroz umbilikalnu arteriju. Frekvencija testiranja zavisi od procenjenog stanja, ali je u slučaju normalnih dopler indeksa racionalno testiranje na nedeljnom nivou.
2. Merenje krvnog pritiska – na dnevnoj osnovi i dva puta nedeljno u hospitalnim uslovima; nakon postavljanja dijagnoze preeklampsije dalje praćenje proteinurije nije neophodno, već se za monitoring bubrežne funkcije određuje serumski kreatinin.
3. Laboratorijska provera - kontrola krvne slike i serumskih nivoa enzima jetre i kreatinina najmanje jednom nedeljno. Učestalost izvođenja ovih analiza može se menjati na individualnom nivou shodno dobijenim rezultatima.

4. Edukacija žena u cilju prepoznavanja simptoma i znakova teškog oblika preeklampsije (jake glavobolje, vizuelne promene, epigastrični bol, nedostatak daha). Ako se simptomi održavaju, dođe do pojave abdominalnog bola, kontrakcija, vaginalnog tačkastog krvavljenja, ruptуре plodovih ovojaka, ili ukoliko se smanji učestalost fetalnih pokreta, savetuje se hitna poseta lekara.
5. U slučaju praćenja u vanbolničkim uslovima, ukoliko se registruje smanjenje fetalne pokretljivosti, ili poremećen rast visine uterusnog fundusa (manje od 3 cm u odnosu na očekivani za period gestacije) neophodno je što pre izvođenje NST i procena volumena amniomske tečnosti. Razvoj novih znakova za tešku preeklampsiju ili tešku hipertenziju (sistolni pritisak 160 mmHg i viši i/ili dijastolni 110 mmHg i viši) ili dokazi o postojanju zastoja u rastu ploda zahtevaju hitnu hospitalizaciju. Pored ovoga, pojava povišenih nivoa jetrinih enzima ili trombocitopenija su takođe indikacija za hospitalizaciju.

1.6.2. Teška preeklampsija

Ova forma bolesti se generalno smatra indikacijom za porođaj pri gestacionoj starosti $\geq 34+0$ posle stabilizacije majke, ili započetom porođaju ili preporođajnoj rupturi membrana. (Šema 2). Tešku preeklampsiju najčešće karakteriše rapidno pogoršanje stanja majke i fetusa ukoliko se porođaj ne obavi što pre je moguće (24, 25). Trudnoće sa previjabilnim fetusima, trudnoće ≥ 34 nedelje gestacije i trudnoće sa nestabilnim maternalnim i/ili fetalnim stanjem nisu kandidati za ekspektativni tretman.



Šema 2. Algoritam za zbrinjavanje trudnica sa teškom preeklampsijom (6).

Dodatno, bez obzira na gestacijsku nedelju trudnoće, hitan porođaj je neophodan u situacijama kada postoje dokazi o razvoju plućnog edema, progresivne renalne insuficijencije, abrupcije placente, teške trombocitopenije, diseminovane intravaskularne koagulacije, perzistentnih cerebralnih simptoma (24-26). Takođe, ukoliko se kliničko stanje hospitalizovane trudnice pogoršava ili ukoliko ne reaguje na bolničke mere (rekurentna teška hipertenzija i simptomi teške preeklampsije), eklampsija, HELLP sindrom, ukoliko se pojavi bol u epigastrijumu ili desnom gornjem kvadrantu abdomena, muka ili povraćanje, znaci preterminskog porođaja i ruptуре plodovih ovojaka, trebalo bi razmotriti završetak trudnoće (25, 26). Fetalne indikacije za porođaj su loši rezultati fetalnog testiranja (BPP 4/10 i manji najmanje dva puta u razmaku od 6 sati, reverzni end-dijastolni protok registrovan dopler merenjem protoka umbilikalnih arterija, rekurentne ili kasne decelereacije prilikom NST), preteća fetalna smrt, teški intrauterusni zastoj u rastu (ultrazvučna procena fetalnog rasta ispod 5.og percentila za uzrast), perzistentni oligohidramnion (najveći vertikalni džep ispod 2 cm).

Kod trudnoća ispod 34 gestacijske nedelje, pri čemu su i majka i plod stabilnog kliničkog stanja, preporuka je nastavak praćenja samo ukoliko ustanova sadrži program intenzivnog zbrinjavanja i za majku i za dete. Postojanje masivne proteinurije nije povezano za lošije ishode, te je preporuka ACOG da odluka o završetku trudnoće ne treba da bude bazirana na stepenu proteinurije ili promeni količine proteinurije (6).

Praćenje trudnice sa teškom preeklampsijom podrazumeva sledeće korake:

- na svakih 8 sati evaluacija vitalnih simptoma i znakova, unosa tečnosti i količine izlučenog urina, simptoma teške preeklampsije (glavobolje, vizuelne promene, bol ili pritisak retrosternalno, kratak udah, mučnina i povraćanje, bol u epigastrijumu), prisustva kontrakcija, ruptуре plodovih ovojaka, abdominalnog bola, krvavljenja.
- svakodnevno laboratorijsko testiranje: krvna slika uz naglasak na procenu broja trombocita, nivo enzima jetre i serumskog kreatinina. Ukoliko se rezultati ovih analiza stabilizuju tokom par dana i ukoliko je trudnica bez simptoma, učestalost analiza se može pomeriti na svaki drugi dan.

Praćenje fetalnog stanja kod teške preeklampsije:

- svakodnevno registrovanje fetalnih pokreta i NST, uz praćenje kontrakcija.
- BPP dva puta nedeljno, praćenje fetalnog rasta na svake dve nedelje i dopler procena protoka kroz umbilikalnu arteriju ukoliko spostoji sumnja na intrauterusni zastoj rasta.

Kod žena sa teškom preeklampsijom koja se razvila pre dostizanja fetalne vitalnosti preporuka ACOG je završetak trudnoće odmah nakon stabilizacije stanja trudnice. Razvoj teške preeklampsije u periodu blizu granice za fetalnu vitalnost je povezan sa visokom verovatnoćom za perinatalni morbiditet i mortalitet bez obzira na odluku o daljem praćenju te trudnoće (101, 102). Ukoliko je teška preeklampsija udružena sa zastojem u rastu ploda ispod 23 gestacijske nedelje, stopa perinatalne smrtnosti dostiže i 100% (101, 102).

Kod pojave eklampsije ili HELLP sindroma trudnoću treba završiti odmah nakon stabilizacije stanja trudnice ukoliko je gestacijska nedelja 34 i više, ili u slučaju manje gestacije i prisutne diseminovne intravaskularne koagulacije (DIK), infarkta ili hemoragije jetre, popuštanja bubrežne funkcije, plućnog edema, sumnje na abrupciju placente, lošeg fetalnog statusa (103). S obzirom da tretman žena sa ovim komplikacijama preeklampsije zahteva ustanovu sa osobljem i opremom za intenzivno zbrinjavanje majke i deteta, trudnice sa eklampsijom ili HELLP sindromom koje nisu blizu termina porođaja bi trebalo sprovesti i zbrinuti u ustanovi tercijarnog nivoa (103). Prema preporukama ACOG, trudnoće komplikovane HELLP sindromom ili eklampsijom u slučajevima gde još nije dostignuta fetalna vitalnost bi trebalo završavati odmah nakon stabilizacije stanja trudnice (6).

Kod žena sa superimponiranom preeklampsijom bez teških karakteristika uz stabilno kliničko stanje kako majke tako i ploda, preporuka je dalje praćenje trudnoće do navršene 37 gestacijske nedelje. Za superimponiranu preeklampsiju sa teškim karakteristikama preko 34 gestacijske nedelje preporučeno je završavanje trudnoće. Porođaj odmah nakon stabilizacije trudnice bez obzira na gestacijsku nedelju ili davanja pune doze kortikosteroida je preporučeno kod superimponirane preeklampsije koja je praćena nekim od sledećh znakova: nekontrolisana teška hipertenzija, eklampsija, plućni edem, abrupcija placente, DIK, loši rezultati fetalnog testiranja. Kod superimponirane preeklampsije sa teškim karakteristikama ispod 34 gestacijske nedelje uz stabilni status

majke i ploda, dalje praćenje trudnoće je preporučeno samo ukoliko se sprovodi u ustanovama koje poseduju adekvatne uslove za zbrinjavanje majke i deteta u jedinicama intenzivne nege (6).

Odluka o načinu završetka porođaja će zavisiti od gestacijske nedelje, fetalne prezentacije, cervikalnog statusa, i stanja majke i ploda. Verovatnoća za izvođenje carskog reza raste što je gestacijska starost trudnoće manja (104).

1.6.3. Antihipertenzivna terapija

Antihipertenzivna terapija se upotrebljava u cilju prevencije teške hipertenzije i maternalnog hemoragijskog infarkta, dok, zbog nedostatka dokaza o efektu lečenja na maternalne i perinatalne ishode, i dalje ne postoji konsenzus o zbrinjavanju blage forme hipertenzije i lake preeklampsije (27, 105). Pokazano je da terapija može sprečiti progresiju u tešku formu, ali zato može uticati na poremećaj u rastu ploda (27, 105-107). Postoji pretpostavka da bi smanjenje maternalnog krvnog pritiska dovelo do smanjenja dotoka krvi fetoplacentarnoj jedinici (108), što bi moglo uticati na dalji rast i razvoj ploda. Dalje, u studijama koje su poredile grupu sa blagom hipertenzijom u kojoj je primenjena terapija i grupu koja je primila placebo, rizik od razvoja teške preeklampsije je prepolovljen, ali je terapija bez uticaja na razvoj ili progresiju u preeklampsiju, eklampsiju, plućni edem, fetalnu ili neonatalnu smrt, pretermijski porođaj, i rođenje deteta malog za gestacijsku starost (109). S obzirom da su komplikacije trudnoće poput cerebralne hemoragije i kongestivne srčane insuficijencije vrlo retke, a koje se ne mogu sa sigurnošću dovesti u vezu sa gestacijskom hipertenzijom, primena antihipertenzivne terapije u cilju prevencije ovih stanja nije opravdana, dodatno što primena ove terapije izlaže i majku i plod riziku od razvoja neželjenih efekata leka (58, 5). Preporuka Nacionalnog Instituta za zdravlje i klinički izvrsnost (engl. *National Institute for Health and Clinical Excellence* - NICE) je da se antihipertenzivna terapija započne tek kada vrednosti sistolnog pritiska dostignu 150 mmHg i/ili dijastolnog 100 mmHg (5, 6), dok ACOG preporučuje primenu antihipertenzivne terapije kod trudnica sa minimalnim sistolnim pritiskom 160 mmHg i/ili dijastolnim 110 mmHg. Cilj ove terapije je prevencija kardiovaskularnih (kongestivna srčana insuficijencija, ishemija miokarda), bubrežnih (oštećenje bubrežne funkcije ili bubrežna insuficijencija) i cerebrovaskularnih komplikacija (ishemični ili hemoragični moždani udar) koje su povezane sa

nekontrolisanom teškom hipertenzijom. U tabeli 2 prikazani su lekovi koji se koriste u terapiji akutne teške hipertenzije u trudnoći, dok su u tabeli 3 prikazani lekovi koji se primenjuju u kontroli hipertenzije tokom trudnoće.

Tabela 2. Antihipertenzivna terapija za hitno smanjenje krvnog pritiska u trudnoći.

Lek	Doza	Komentar
Labetalol	10-20 mg iv, potom 20-80 mg svakih 20-30 minuta do postizanja maksimalne doze od 300 mg ili kontinuirana infuzija 1-2 mg/min/iv	<ul style="list-style-type: none"> • Razmotriti kao terapiju prve linije • Tahikardija retko neželjeno dejstvo • Kontraindikacija: astma, bolesti srca ili kongestivna srčana insuficijencija • Perzistentna fetalna bradikardija, hipotenzija, neonatalna hipoglikemija, astma
Hidralazin	5 mg iv ili im, potom 5-10 mg iv svakih 20-40 minuta ili kontinuirana infuzija 0.5-10 mg/h/iv do maksimalnih 20 mg	<ul style="list-style-type: none"> • Veće ili češće doze pojava hipotenzije, tahikardije, glavobolje, fetalni distres – češće nego kod upotrebe drugih lekova • Inhibicija porođaja, posebno u kombinaciji sa magnezijum sulfatom
Nifedipin	10-20 mg per os, ponovljeno svakih 30 minuta ako je potrebno; potom 10-20 mg na svakih 2-6 sati	<ul style="list-style-type: none"> • Refleksna tahikardija i glavobolje • Kontraindikacija aortna stenoza • Inhibicija dejstva u kombinaciji sa magnezijum sulfatom

Tabela 3. Lekovi za kontrolu hipertenzije u trudnoći.

Lek	Doza	Komentar
Methyldopa	0.5-3.0 g/dan per os, podeljeno u dve ili tri doze	<ul style="list-style-type: none"> • Možda neće biti efikasan u tretmanu teške hipertenzije • Periferni edem, anksioznost, košmari, pospanost, suva usta, hipotenzija, maternalni hepatitis • Bez ozbiljnih fetalnih komplikacija
Labetalol	200-2400 mg/dan per os, podeljeno u dve ili tri doze	<ul style="list-style-type: none"> • Dobro se tolerize • Rizik od bronhospazma, bradikardije • Izbegavati kod pacijenata sa astmom i kongestivnom srčanom insuficijencijom • Perzistentna fetalna bradikardija, hipotenzija, neonatalna hipoglikemija, astma
Nifedipin	30-120 mg/dan per os, preparati sa sporim otpuštanjem leka	<ul style="list-style-type: none"> • Ne koristiti sublingvalne forme leka • Kontraindikacija aortna stenoza • Inhibicija dejstva u kombinaciji sa magnezijum sulfatom
Nikardipin	Inicijalno 5 mg/h/iv, povećavati za 2.5 mg/h svakih 15 minuta do maksimalne doze od 15 mg/h/iv	<ul style="list-style-type: none"> • Glavobolja, edem, tahikardija • Povišen rizik od hipotenzije i inhibicije porođaja, posebno u kombinaciji sa magnezijum sulfatom
Nitroprusid	0.3–0.5 do 2 mg/kg/iv po minutu; maksimalno trajanje 24–48 h	<ul style="list-style-type: none"> • Doza 2 mg/kg/iv po minutu tokom 4 h nosi povećan rizik od intoksikacije cijanidom (korisiti kao poslednju opciju)
Tiazidni diuretici	Zavisi od odabira leka iz ove grupe	<ul style="list-style-type: none"> • Lekovi druge linije
ACE inhibitori/blokatori angiotenzinskih receptora		<ul style="list-style-type: none"> • Povezano sa pojavom fetalnih anomalija • Kontraindikovano u prekonceptijskoj fazi i tokom trudnoće

Kohrejnova sistematska analiza koja je ohuhvatila 3573 trudnice iz 35 studija nije pokazala značajnu razliku u efikasnosti primene između hidralazina i labetalola, kao ni između hidralazina i bilo kog kalcijumskog blokatora u tretmanu akutne teške hipertenzije (110). Ukoliko je lekar upoznat sa preporučenim dozama, vremenskim periodom koji je potreban za započinjanje efekta leka, kao i njegovim potencijalnim neželjenim efektima i kontraindikacijama, hidralazin, labetalol i oralni nifedipin se mogu jednako primeniti u lečenju akutne teške hipertenzije (110). Takođe, dostupnost leka kao i troškovi njegove primene su još neke odrednice koje će usmeriti lekara za koji će se lek odlučiti. Postoje teorije da kombinacija oralnog nifedipina i magnezijum sulfata može dovesti do pojave nagle hipotenzije i neuromišićne blokade, iako do sada nije pokazan povećan rizik za pojavu ove komplikacije (111).

1.6.4. Antikonvulzivna terapija

Terapija magnezijum sulfatom kod žena sa sistolnim pritiskom ispod 160 mmHg i/ili dijastolnim ispod 110 mmHg i bez prisutnih simptoma teške forme preeklampsije, nije preporučena kao obavezna profilaksa od strane ACOG (6). Međutim, ukoliko dođe do pojave određenih simptoma i znakova koji su poznati kao opominjući znaci za pojavu konvulzija (glavobolja, poremećaj mentalnog statusa, zamagljen vid, skotomi u vidnom polju, klonus, i abdominalni bol u desnom gornjem kvadrantu) trebalo bi razmotriti započinjanje ove terapije. Kontinuiran monitoring tokom porođaja (praćenje krvnog pritiska, i simptoma kod majke tokom i neposredno nakon porođaja) je neophodan kod žena sa lakom preeklampsijom s obzirom da se klinički tok bolesti može značajno i ubrzano pogoršati u tom periodu. Ukoliko se uoči progresija bolesti, preporuka je započinjanje terapije magnezijum sulfatom (6).

Nekoliko godina slučajevi eklampsije tretirani su sa više vrsta antikonvulzivnih lekova (112). Sistematski pregledi pokazali su superiornost primene magnezijum sulfata u odnosu na primenu fenitoina i diazepama (113). Kod žena sa eklampsijom, primena magnezijum sulfata treba da se sprovodi minimalno tokom prvih 24 h od poslednjeg napada. Žene tretirane u cilju prevencije eklamptičnih napada bi trebalo da primaju magnezijum sulfat u inicijalnoj bolus dozi od 4-6 g i.v., nakon čega se nastavlja sa dozom održavanja od 1-2 g/h najmanje tokom narednih 24 h (6). Kod žena sa teškom preeklampsijom preporuka je intra/postpartalna primena magnezijum sulfata. Žene sa

teškom preeklampsijom kod kojih se porođaj završava carskim rezom u povećanom su riziku od razvoja eklampsije. Davanje anestezije, uz prisutan stres majke zbog porođaja može sniziti prag provokacije napada i povećati verovatnoću za pojavu eklampsije. Interakcija diskontinuiranog intravenskog davanja magnezijum sulfata primenjenog intraoperativno sa anestetskim lekovima može dovesti do subterapijskih nivoa magnezijuma u krvi što povećava šansu za razvoj eklampsije postoperativno. Stoga je preporuka ACOG kontinuirana intravenska primena magnezijum sulfata tokom izvođenja carskog reza kod žena sa preeklampsijom u cilju sigurne prevencije eklampsije. Intra-postpartalna parenteralna primena magnezijum sulfata za prevenciju eklampsije indikovana je i kod superimponirane preeklampsije sa teškim karakteristikama (6).

1.6.5. Ostale terapijske mere

Iako je kompletno ili povremeno mirovanje je preporučeno od strane nekih kliničara u cilju poboljšanja ishoda trudnoća kod žena sa lakom preeklampsijom, Kohrejnova analiza četiri randomizovane studije koje su ispitivale efekat mirovanja je pokazala da ne postoji dovoljno dokaza u pogledu implementacije mirovanja u rutinsku kliničku praksu kod žena sa gestacijskom hipertenzijom (114). Dodatno, produženo mirovanje tokom trudnoće dovodi do povećanja rizika od pojave tromboembolizma. ACOG ne preporučuje striktno mirovanje kod blage hipertenzije i lake preeklampsije, uz predlog da se ove mere savetuju na individualnom nivou.

Istraživanja na trudnicama sa preeklampsijom pokazala su da antenatalna administracija kortikosteroida doprinosi značajnom smanjenju incidencije respiratornog distress sindroma, intraventrikularne hemoragije (115, 116) i neonatalne smrti (115). Antenatalna administracija kortikosteroida je preporučena u svim slučajevima gde prethodno nije davana, i ukoliko postoji procena da će biti dovoljno vremena za fetalnu korist od ove terapije bez obzira koji je plan za dalje praćenje. ACOG preporučuje antenatalnu primenu kortikosteroida u cilju fetalnog plućnog sazrevanja kod svih trudnica sa teškom preeklampsijom ispod 34 gestacijske nedelje i kod kojih se nastavlja dalje praćenje trudnoće (6). Davanje kortikosteroida i odlaganje porođaja za 48 sati preporučeno je u slučajevima teške preeklampsije, ukoliko su i majka i fetus stabilni, a trudnoća je manja od 34 nedelje, i ukoliko postoji jedan od sledećih znakova: pre vremena

ruptura plodovih ovojaka, prisutni znaci porođaja, trombocitopenija ($< 100000/\text{mm}^3$), održavanje povišenih vrednosti enzima jetre (dvostruko i više u odnosu na normalne vrednosti), zastoj u rastu ploda (ispod 5.og percentila za uzrast), teški oligohidramnion (indeks plodove vode ispod 5 cm), dopler reverzni end-dijastolni protok umbilikalnih arterija, de novo ili progresija već postojeće renalne disfunkcije. Prema preporukama ACOG, kortikosteroidi se daju nakon stabilizacije majke, uz neodlaganje porođaja bez obzira na gestacijsku nedelju kod žena sa teškom preeklampsijom koja je komplikovana sa nekim od sledećih stanja: nekontrolisana teška hipertenzija, eklampsija, plućni edem, abrupcija placente, diseminovana intravaskularna koagulacija, dokazi za loš fetalni status, intrapartalna smrt fetusa (6).

Nekoliko opservacionih i retrospektivnih studija je pokazalo da u slučaju eklampsije prolongirana gestacija u cilju fetalnog sazrevanja dovodi do značajnog povećanja maternalanog i perinatalnog morbiditeta i mortaliteta (117). Odlaganje porođaja za 24-48 sati radi administracije kortikosteroida u cilju fetalne plućne maturacije može da bude sprovedeno u slučaju pažljivog kontinuiranog praćenja tokom kojeg nema znakova patnje majke i ploda i tokom koje se sprovodi kontinuirana intravenska administracija magnezijum sulfata, kao i antihipertenzivna terapija (118). Administracija kortikosteroida je preporučena i u slučaju HELLP sindroma, isto kao i u slučaju teške preeklampsije. Osim poboljšanja neonatalnih ishoda, ova terapija je dovela do značajnog popravljanja broja trombocita kod majke (119). Za trudnoće sa superimponiranom preeklampsijom ispod 34 gestacijske nedelje kod kojih je planirano dalje praćenje preporuka ACOG je primena kortiskosteroida u cilju fetalne plućne maturacije (6).

U slučaju primene anestezije tokom carskog reza ili analgezije tokom vaginalnog porođaja žena sa preeklampsijom, preporuka ACOG je primena spinalne ili epiduralne anestezije (6). Kod žena sa teškom preeklampsijom nije preporučeno rutinsko sprovođenje invazivnog hemodinamskog monitoringa. Problem kod davanja spinalne anestezije, a u slučaju prisutne trombocitopenije je stvaranje epiduralnog hematoma. Američko udruženje anesteziologa (engl. *American Society of Anesthesiologists - ASA*) nije ustanovilo koja je to granica u broju trombocita koja bi bila sigurna za davanje anestezije i prema njihovoj preporuci procena lekara treba da bude individualna i zasnovana na laboratorijskim rezultatima (120). Pregledni rad iz 2010. godine je pokazao

da je broj trombocita od $80000/\text{mm}^3$ siguran za davanje epiduralne ili spinalne anestezije ili za otklanjanje epiduralnog katetera, ali samo u slučaju stabilnog broja trombocita i odsustva udružene koagulopatije (121).

1.6.6. Terapija postpartalne preeklampsije

Kod žena sa nekim hipertenzivnim poremećajem u trudnoći, preporuka ACOG je redovno merenje krvnog pritiska tokom 72 h nakon porođaja kako u bolničkim, tako i u vanbolničkim uslovima, i ponovno merenje nakon 7-10 dana ili ranije kod žena sa simptomima. Što se tiče postpartalne hipertenzije, postoji nesigurnost kada je u pitanju vrednost krvnog pritiska koja bi zahtevala započinjanje terapije, a potom vrednost koja bi ukazala na mogućnost za prekid terapije (45, 122, 123). Aktuelna preporuka je primena terapije kada je sistolni pritisak preko 150 mmHg i/ili dijastolni preko 100 mmHg (izmeren najmanje dva puta u razmaku od 4 do 6 sati) (122-124). Terapija sistolnog krvnog pritiska koji iznosi 160 mmHg i više i/ili dijastolnog 110 mmHg i više treba da bude započeta u okviru jednog sata (6). Terapija magnezijum sulfatom je preporučena u slučaju pojave hipertenzije ili preeklampsije uz prisustvo teške glavobolje, promena u vidnom polju, poremećenog mentalnog statusa, bola u epigastrijumu, kratkog daha, ili u slučaju postpartalne preeklampsije sa teškom hipertenzijom. On treba da se daje najmanje tokom 24 h od postavljanja dijagnoze (122).

1.7. KARDIOVASKULARNI RIZIK I PREEKLAMPSIJA

Nekoliko velikih epidemioloških studija potvrdilo je dvostruko povećan rizik od kardiovaskularnih bolesti (KVB) kasnije u životu kod žena čije su trudnoće bile komplikovane preeklampsijom (125). Dugo se smatralo da žene koje su razvile preeklampsiju samo u prvoj trudnoći nemaju povišen rizik za kasniju pojavu KVB, što je opovrguto skorašnjim studijama (126). Rizik za pojavu KVB se dodatno povećava kod rekurentnih preeklampsija (127), i prethodno verifikovanog zastoja u rastu ploda (30, 126, 128). U ovim slučajevima nivo rizika za KVB je skoro jednak kao i za gojaznost i pušenje (129). Žene sa rekurentnom preeklampsijom su u povišenom riziku od smrti kao posledice KVB ranije tokom života u odnosu na žene sa preeklampsijom samo u prvoj trudnoći (127). Kada je preeklampsija povezana sa pretermijskim porođajem, faktor rizika za KVB je povećan 8-10 puta, slično kao i uticaj dijabetesa (130). Američko udruženje za srce (engl. *American Heart Association*) je 2011. godine dodalo

preeklampsiju na svoju listu faktora rizika za KVB (131). Već prisutni prekonceptijski faktori rizika i preeklampsija mogu zajednički da doprinesu dugoročnom povećanju rizika za KVB. Ovoj grupi žena bi trebalo da bude savetovano održavanje optimalne telesne mase, aerobne vežbe pet puta nedeljno, konzumiranje namirnice bogate vlaknima i sa niskim procentom masti, kao i voće i povrće, i da izbegavaju pušenje. Prema preporukama ACOG kod žena koje su razvile preeklampsiju uz pojavu pretermiskog porođaja, kao i kod onih sa rekurentnom preeklampsijom jednom godišnje treba kontrolisati vrednost krvnog pritiska, nivo masti, glukoze našte, i BMI (6).

1.8. ETIOPATOGENEZA PREEKLAMPSIJE

U poslednjih desetak godina napravljen je veliki pomak u razumevanju patofiziologije preeklampsije, iako još uvek nisu do kraja razjašnjeni svi ćelijski i molekularni mehanizmi koji su uključeni u različite faze razvoja bolesti. Dokaz centralne uloge posteljice u etiologiji preeklampsije proizilazi iz činjenice da njeno uklanjanje dovodi do nestanka simptoma (132, 133). Histopatološka ispitivanja placenti iz trudnoća komplikovanih uznapredovalom preeklampsijom u najvećem broju slučajeva su potvrdila prisustvo brojnih placentarnih infarkta i sklerotskih suženja arteriola (134). Pretpostavka da poremećena trofoblastna invazija sa udruženom uteroplacentarnom hipoperfuzijom dovodi do razvoja preeklampsije, potvrđena je kako u animalnim, tako i u studijama na ljudima (135, 136). Od strane nekoliko istraživača predložena je teorija prema kojoj razvoj preeklampsije, posebno rane forme, prolazi kroz dva stadijuma (137-140).

Prvi stadijum (pre 20 nedelja gestacije) označava loša placentacija, koja podrazumeva placentarnu ishemiju i insuficijenciju nastale usled nezavršene trofoblastne invazije decidue i neadekvatnog remodelovanja spiralnih arterija. Kao rezultat složenog procesa remodelovanja spiralnih arterija dolazi do zamene visokorezistentnih krvnih sudova malog dijametra, sa krvnim sudovima visokog kapaciteta i niske rezistencije koji obezbeđuju adekvatan dotok maternalne krvi do uteroplacentarne jedinice koja se nalazi u periodu intenzivnog razvoja. Neadekvatno remodelovanje spiralnih arterija uočeno je i opisano još pre više od pet decenija kod hipertenzivnih trudnica (141), od kada se taj događaj smatra centralnim u trudnoćama komplikovanim zastojem u rastu ploda, gestacijskom hipertenzijom i preeklampsijom (142). Podatak da pojava neadekvatnog

remodelovanja maternalnih krvnih sudova nije svojstvena samo za preeklampsiju, može pomoći u razumevanju etioloških razlika između podtipova preeklampsije (maternalna i placentarna preeklampsija). Tačni mehanizmi odgovorni za neadekvatnu trofoblastnu invaziju i vaskularno remodelovanje su i dalje nedovoljno razjašnjeni. Postoje dokazi da Notch signalni put može imati centralnu ulogu u ovim procesima (143). Njega čine četiri transmembranska proteinska receptora Notch 1, 2, 3, 4, koji učestvuju u brojnim procesima odgovornim za međučelijsku komunikaciju i fetalni razvoj. Među ovim procesima nalazi se i uloga u angiogenezi i sudbini ćelija endotela. Nemogućnost adekvatne transformacije krvnih sudova uz odsustvo Notch 2 receptora povezano je sa smanjenjem dijametra krvnih sudova i placentarne perfuzije. Dalje je pokazano da perivaskularni i endovaskularni citotrofoblast ne eksprimira Notch ligand, JAG1, kod osoba sa preeklampsijom, što dodatno sugerše da Notch signalni put može imati značajnu ulogu u patogenezi ovog stanja u trudnoći. Prethodne studije su pokazale da izmene u genima za molekule glavnog histokompatibilnog kompleksa (MHC) i receptore ćelija ubica (engl. *natural killer* - NK ćelija) takođe mogu uticati na placentaciju (144). Specifična kombinacija gena fetalnih MHC molekula i maternalnih receptora na NK ćelijama je u korelaciji sa rizikom za pojavu preeklampsije, ponovljenih pobačaja, i zastoja u rastu ploda (144).

Drugi stadijum obuhvata mehanizme i procese koji su posledica loše placentacije, najverovatnije podstaknuti relativnom placentarnom hipoksijom i hipoksičnom reperfuzijom, dovodeći do oštećenja sincicijuma i poremećaja fetalnog rasta, događaja koji posledično vode do kliničkog ispoljavanja simptoma preeklampsije. Ova veza između relativno hipoksične placente i preeklampsije podrazumeva kaskadu sekundarnih efektorskih mehanizama, među kojima su poremećaj ravnoteže između proangiogenih i antiangiogenih faktora, oksidativni stres, endotelna i imunološka disfunkcija (138, 139). Vaskularni endotel žena koje su u povećanom riziku od razvoja preeklampsije najverovatnije predstavlja jednu od glavnih meta procesa koji se aktiviraju pod uticajem placentarne ishemije i hipoksije (138, 139, 145). Vaskularni endotel ima brojne značajne funkcije, poput kontrole glatkomišićnog tonusa kroz oslobađanje vazokonstriktora i vazodilatatora i regulacije antikoagulacije, antitrombocitne i fibrinolitičke funkcije oslobađanjem brojnih solubilnih faktora. Promena u koncentraciji cirkulišućih markera endotelne disfunkcije je dokazana kod žena koje su razvile preeklampsiju (138, 139,

145). Takođe, maternalni status može dodatno uticati na endotelni odgovor prema dejstvu faktora aktiviranih placentarnom ishemijom i hipoksijom. Postoje dokazi da, recimo, gojaznost povećava rizik od nastanka preeklampsije. BMI preko 39 kg/m² povećava rizik za razvoj preeklampsije za tri puta (146). Ipak, patofiziološki mehanizmi koji čine ovu vezu još uvek nisu poznati.

Patološki molekuli koje proizvodi posteljica kao odgovor na hipoksiju i ishemiju, i na koje je usmerena velika pažnja kada je u pitanju patogeneza preeklampsije su angiogeni faktori (147, 148). Kada u cirkulaciji dođe do povećanja koncentracije sFlt-1, solubilnog cirkulišućeg receptora za VEGF i PlGF-1, sprečava se njihovo vezivanje za membranski receptor (VEGF receptor 1), a potom i njihov uticaj na stimulaciju angiogeneze i održavanje endotelne integriteta. Na nivou bubrega, pretpostavlja se da inaktivacija slobodnog VEGF dovodi do glomerularne endotelioze koja je odgovorna za pojavu proteinurije (147, 148). Studije koje su ispitivale sFlt-1 na kulturama ćelija ili in vitro na tkivu posteljice pokazale su da se otpuštanje sFlt-1 dešava od strane placentarnih vilusa i ćelija trofoblasta kao odgovor na smanjenje pritiska kiseonika, stanje slično kao kod ishemične posteljice. Dalje, nakon ubacivanja sFlt-1 preko adenovirusa u pacove došlo je do razvoja hipertenzije i albuminurije, uz histološke promene karakteristične za preeklampsiju (uvećanje glomerula, endotelioza, fibrinske naslage u glomerulu) (149). Još jedan placentarni protein, čija je koncentracija povišena u preeklampsiji je sEng (150). Kada je prisutan u povišenim koncentracijama u plazmi, sEng vezuje i time inhibiše proangiogeni faktor, transformišući faktor rasta β (TGF- β). Studije na trudnim pacovima pokazale su da povišen nivo sEng indukuje znake teške preeklampsije (150).

Endotelini (ET) su grupa proteina koja svojim vazokonstriktornim dejstvom učestvuje u regulisanju krvnog pritiska. Eksperimentalni modeli preeklampsije pokazali su se osetljivi na antagoniste za ET receptor (ET_A), čija je administracija kod ovih modela dovela do sniženja krvnog pritiska (151, 152). Najveći nivoi endotelina-1 su zabeleženi na samom kraju preeklampičnih trudnoća, što bi moglo ukazivati da endotelin-1 ne utiče na inicijaciju hipertenzije, već na promovisanje daljeg skoka pritiska kod već prisutne hipertenzije (151, 152).

Aktivnost enzima hemoksigenaza (HO 1, 2), koji se eksprimira u trofoblastu, povećava se u uslovima hipoksije i ishemije. Pokazano je da inhibicija HO dovodi do

neadekvatne trofoblastne invazije *in vitro* (153). Studije na trudnicama su pokazale da je aktivnost HO snižena u preeklampsiji (154-157). Dalje, pokazano je da povećana ekspresija gena za HO dovodi do smanjenja cirkulišućeg sFlt-1 (158). Na uzorcima tkiva posteljičnih čupica pokazano je da ćelijsko oštećenje od strane TNF- α može biti prevenirano povećanjem aktivnosti HO-1 (154). CO, produkt HO, ima ulogu vazodilatatora i utiče na smanjenje pritiska u placenti, zbog čega se smatra da može imati ulogu u razvoju preeklampsije (159-161). Pokazano je da kardiovaskularni lekovi, statini, stimulišu ekspresiju HO-1 i inhibišu produkciju sFlt-1 u *in vivo* i *in vitro* uslovima. Sistematski pregled iz 2018. godine ukazao je na ulogu statina u prevenciji i lečenju teške preeklampsije (162).

Vodonik sulfid (H₂S) je gas poznat po svom vazodilatatornom, citoprotektivnom i angiogenom dejstvu slično CO (163). Iako u preeklampsiji nije registrovan snižen nivo H₂S, pokazan je njegov uticaj na koncentraciju sFlt-1 i sEng (164). Kod pacova sa povišenom ekspresijom sFlt-1 nakon tretmana sa H₂S došlo je do smanjenja nivoa sFlt-1 i povećanja koncentracije serumskog VEGF, uz primećenu povećanu gensku ekspresiju za VEGF u bubrezima (165). Klinički, nakon administracije H₂S kod ovih pacova je registrovan smanjen stepen proteinurije, redukcija hipertenzije i glomerularni oporavak (165).

U posteljicama iz preeklamptičnih trudnoća ustanovljeno je prisustvo loše modifikovanih proteina koji formiraju grupacije i na taj način mogu učestvovati u patogenezi ovog poremećaja (166). U uzorcima urina žena sa preeklampsijom ustanovljeno je prisustvo kongofilije (nestabilnih, loše modifikovanih proteina koji se boje Congo crvenom bojom) (166). U grupu ovih proteina njih spadaju proteoforme ceruloplazima, imunoglobulinski laki lanci, inhibitor serpin peptidaze 1, albumin, interferon (IFN)-inducibilni protein 6-16, Alchajmer β -amiloid. Pokazano je da je kongofilija u urinu značajno povišena u grupi visokorizičnih žena sa teškom preeklampsijom i sa medicinskim indikacijama za porođaj u odnosu na zdrave trudnice i trudnice sa hroničnom ili gestacijskom hipertenzijom (166).

Kod žena sa ranom preeklampsijom pokazano je da na nivou placente dolazi do pojave stresa endoplazmatskog retikuluma (ER) (167). Ovaj stres nastaje zbog neadekvatnog odgovora ER na akumulaciju loše konfigurisanih proteina (engl. *unfolded*

protein response - UPR) (168, 169). UPR pokreće brojne mehanizme koji narušavaju homeostazu. Dolazi do zaustavljanja proliferacije trofoblasta i apoptoze, oslobađanja mikro i nanopartikula u maternalnu cirkulaciju, koje imaju sposobnost stimulisanja proinflatarnog odgovora i endotelne aktivacije (170). Dodatno, hronični, nizak stres ER tokom drugog i trećeg trimestra, može uticati na pojavu zastoja u rastu ploda (168).

Vazokonstrikcija i trombocitopenija u preeklampsiji najverovatnije nastaju usled smanjenja sinteze prostaciklina i/ili povećanja koncentracije tromboksana A2 (171, 172). Aktivacija trombocita može dovesti do nastanka tromba u mikrocirkulaciji različitih organa i posteljice. Jedna od glavnih karakteristika preeklampsije je aktivacija koagulacione kaskade (173). U literaturi postoje brojna objašnjenja za povećanu produkciju trombina u preeklampsiji (174): endotelna disfunkcija, aktivacija trombocita, monocitna hemotaksa, limfocitna proliferacija i neutrofilna aktivacija, ali takođe i povećana sinteza tkivnih koagulacionih faktora koji se oslobađaju pod uticajem proinflatarnih citokina. Trombin dovodi do nastanka fibrinskih depozita u više organa u preeklampsiji. Ekscesivno stvaranje trombina može biti u rasponu od subkliničkih do pojave DIK-a, kao jedne od najozbiljnijih komplikacija preeklampsije.

Model pacova sa smanjenim perfuzijskim pritiskom u uterini (engl. *the reduced uterine perfusion pressure* - RUPP), napravljen je da imitira stanje placentarne ishemije kod trudnih pacova (175), kako bi omogućio ispitivanje puteva koji su stimulisani placentarnom ishemijom, a koji bi trebalo da podsećaju na patofiziološke mehanizme u preeklampsiji. Na RUPP modelu je pokazano i povećanje aktivnosti inflamatornih T ćelija (CD4+) i inflamatornih citokina (TNF- α , interleukin (IL)-6 i IL-17), praćeno smanjenjem Treg ćelija i regulatornih citokina (IL-10 i IL-4), stanja odgovornih za nastanak hroničnog zapaljenja kao poslednice placentarne ishemije u preeklampsiji (176, 177). Dodatno, antiangiogeni faktori, sFlt-1 i sEng su povećani u RUPP modelu, što dovodi do smanjenja krvnog dotoka placenti i fetusu (134, 178). Ovi pacovi pokazuju pojavu endotelne disfunkcije, smanjenje bioiskoristivosti azot oksida (NO) (176) i povećanje kontraktilnosti glatkih mišića krvnih sudova (179). Povećanje koncentracije AT1-AA dovodi do povećanja produkcije endotelina-1 u renalnom korteksu, placenti i cirkulaciji trudnih pacova (180). Smatra se da su ova autoantitela indukovana produkcijom TNF- α , s obzirom da infuzija ovog citokina kod trudnih pacova dovodi do

produkcije autoantitela i koncentracije koja je uporediva sa koncentracijom kod žena sa preeklampsijom i kod RUPP modela pacova (181). AT1-AA izolovani iz krvi žena sa preeklampsijom, kod trudnih pacova dovode do razvoja umerene hipertenzije, stimulišu stvaranje slobodnih kiseoničnih radikala (engl. reactive oxygen species – ROS), potom sistem dihidronikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NAPDH) oksigenaze, kao i NK- κ B (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (182, 183). Takođe, AT1-AA prehodno indukovano od strane TNF- α , stimuliše produkciju sFlt-1 i sEng (184). Pokazano je da AT1-AA indukuje oslobađanje sFlt-1 preko aktivacije kalcineurin/nuklearnog faktora iz aktiviranog puta T ćelija (185).

1.9. OKSIDATIVNI STRES U ETIOPATOGENZI PREEKLAMPSIJE

Oksidativni stres (OS) nastaje kao rezultat disbalansa između produkcije slobodnih radikala kiseonika (engl. *reactive oxygen species* – ROS) i azota (engl. *reactive nitrogen species* - RNS) i reaktivnih metabolita i njihove eliminacije tj. protektivnog efekta antioksidantnog sistema. ROS i RNS reaguju sa lipidima, proteinima i molekulima DNK, čime ispoljavaju svoj negativni efekat. Od rane trudnoće na nivou placente dolazi do pojave oksidativnog stresa usled povećane mitohondrijske aktivnosti i produkcije slobodnih kiseoničnih radikala, posebno superoksid anjona (186). Kod žena predodređenih za razvoj preeklampsije ovaj događaj je posebno izražen, usled pojave za sada nepoznatih grešaka u strogo kontrolisanom sledu događaja, koje dovode do nedovoljnog dotoka krvi do uteroplacentarne jedinice, što povećava stepen hipoksemije i pojave OS. Preeklampsija se odlikuje povećanom produkcijom slobodnih radikala i/ili nedovoljnim kapacitetom antioksidantne zaštite (187-189). Poremećaj u koncentraciji nekoliko markera oksidativnog stresa je zabeležen kod žena sa preeklampsijom. Među njima su povišene vrednosti peroksinitrita, uz smanjenje koncentracije superoksid dismutaze i azot oksid sintetaze (190). Pojava oksidativnog stresa je registrovana i u istraživanjima na RUPP modelu pacova, što je ukazalo na vezu placentarne ishemije i hipoksije sa povećanom produkcijom slobodnih kiseoničnih radikala (139). Davanje antioksidanata ovim pacovima (Vitamin C i Vitamin E) nije dovelo do normalizacije krvnog pritiska, dok je lek koji imitira dejstvo superoksid dismutaze, tempol, doveo do značajnog ublaženja hipertenzije. Davanje apocinina, redukovane forme inhibitora

NADPH oksigenaze, takođe je značajno snizilo pritisak kod RUPP pacova, ukazujući na značajnu ulogu ovog enzima u produkciji slobodnih kiseoničnih radikala (139).

ROS se proizvode od strane maternalnih leukocita, placentalnog endotela i trofoblasta. Mitohondrije su jedan od glavnih izvora ROS u trofoblastima, i one predstavljaju jedno od najbitnijih mesta za njihovo delovanje. Postoji uvreženo mišljenje da je OS uvek štetan, ali on ima veoma kompleksnu i značajnu ulogu u signalnim procesima, podstiče sintezu antioksidantnih enzima, i utiče na procese reparacije, inflamacije, apoptoze i ćelijske proliferacije (191). Tokom prvog trimestra, embrion se razvija u okruženju sa niskim pritiskom kiseonika, što je u suprotnosti sa drugim trimestrom kada su, u cilju zadovoljavanja potreba za rast i razvoj fetusa, prisutne značajno veće koncentracije kiseonika u placenti. Ova relativna hipoksija je u stvari značajna za proliferaciju trofoblasta tokom prvog trimestra. Genbačev i saradnici (192) su pokazali da niska oksigenacija u trofoblastima tokom prvog trimestra ima uticaj na dobru proliferaciju trofoblasta, ali ne i na njihovu invazivnost i diferencijaciju.

Oksidativni stres podstiče i druge humoralne procese: proinflamatorni odgovor i oslobađanje citokina: TNF- α , interleukin 6 (IL-6), IL-2 (193, 194), aktivaciju komplementa (195), stimulaciju sinteze antiangiogenih faktora: sFlt-1 i sEng, uz inhibiciju produkcije PlGFa (35, 196, 197). Dalje, OS ima uticaja na procese autofagije i apoptoze, dva međusobno povezana procesa. Na nivou placente, autofagija je protektivni, dok je apoptoza destruktivni proces. Autofagija se poslednjih godina našla u centru interesovanja brojnih istraživanja (198). To je samoograničavajući, katabolički proces, čiji je cilj uklanjanje nepoželjnih proteina, oštećenih organela i njihovih štetnih produkata. Prema poslednjim istraživanjima, autofagija je najvažniji sistem zaštite trofoblasta od oksidativnog stresa. Suprotno od stanja oksidativnog stresa, apoptoza je aktivirana preko složenog puta koji kao posledicu ima programiranu ćelijsku smrt trofoblasta i neadekvatno remodelovanje spiralnih arterija.

1.10. AZOT OKSID/AZOT OKSID SINTETAZA SISTEM U ETIOPATOGENZI PREEKLAMPSIJE

Azot oksid (NO) je glavna vazodilatatorna supstanca koju proizvodi endotel i koja se smatra ključnim regulatorom endotelne funkcije. Endotel ima ulogu u održavanju vaskularnog tonusa kroz regulisanje krvnog protoka i krvnog pritiska. Smatra se da endotelna disfunkcija predstavlja prognostički marker budućih kardiovaskularnih komplikacija. Dosadašnje studije su opisale značajnu ulogu NO u brojnim fiziološkim i patofiziološkim procesima kao regulatora arterijskog pritiska (139). Ovaj molekul ima ulogu u relaksaciji vaskularnih glatkih mišića preko puta cikličnog guanozin monofosfata (cGMP) (199). Produkcija NO je, zbog njegove vazodilatatorne uloge, povećana tokom normalne trudnoće. Zbog toga se smatra da nedostatak azot oksida igra značajnu ulogu u procesu nastanka preeklampsije. Postoje dokazi da je sistem NO/NOS poremećen u preeklampsiji. Pokazano je smanjenje koncentracije NO (200,201) i povećanje koncentracije arginaze, jedinjenja koje ima ulogu u degradaciji prekursora NOS puta u preeklampsiji (202, 203). Nekoliko istraživanja je pokazalo da hronična inhibicija azot oksid sintetaze kod trudnih pacova dovodi do razvoja hipertenzije koja je povezana sa skupom znakova koji se sreću u preeklampsiji (periferna i renalna vazokonstrikcija, proteinurija, intrauterusni zastoj u rastu, povećan fetalni morbiditet, disfunkcija trombocita) (139). Nedostatak NO kod trudnih miševa podstiče promene na uteroplacentarnom nivou karakteristične za preeklampsiju, smanjenje dijametra arterije uterine i dužine spiralnih arterija, kao i smanjenje uteroplacentarnog protoka (204). Ovakvi rezultati ukazuju na značaja NO sistema za normalno remodelovanje spiralnih arterija i trudnoću. Ipak, postojanje sniženih vrednosti NO kod osoba sa preeklampsijom je i dalje nejasno, zbog nemogućnosti direktne procene aktivnosti sistema azot oksida u kliničkim uslovima. Istraživači su pokušali da procene stepen produkcije azot oksida putem 24 h merenja ekskrecije nitrata/nitrita, ali su se rezultati međusobno razlikovali, usled otežane kontrole doprinosećih faktora, poput dnevnog unosa azotnih materija.

1.11. ESTROGEN I METABOLITI ESTROGENA U ETIOPATOGENEZI PREEKLAMPSIJE

Regulisanje vaskularne adaptacije tokom trudnoće ostvaruje se delom pod uticajem estrogena, čiji su nivoi povišeni tokom trudnoće (205). Razumevanje metabolizma estradiola-17 β (E2 β), kao i uloge vaskularne fiziologije E2 β i njegovih metabolita na nivou endotela maternalnih krvnih sudova, može obezbediti objašnjenje za normalnu vaskularnu adaptaciju na trudnoću, kao i pojavu endotelne disfunkcije u patofiziologiji preeklampsije i drugih kardiovaskularnih poremećaja (206-208). Infuzija E2 β kod ovaca dovela je do značajnog smanjenja sistemske i uterusne vaskularne rezistencije, što je uzrokovalo povećanje protoka kroz uterine krvne sudove i u sistemske cirkulaciji (209). Uloga u održavanju uterusne perfuzije vezivanjem estrogena za estrogenske receptore pokazana je kroz model trudnih ovaca kod kojih je nakon administracije neselektivnog antagoniste estrogenskih receptora u arterije uterine došlo do smanjenja krvnog protoka kroz ove krvne sudove (210). Pokazano je da kod ljudi u endotelnim ćelijama umbilikalne vene i mikrovaskulature miometrijuma, E2 β podstiče proliferaciju i angiogenezu (211).

Efekat estrogena na vaskularnu adaptaciju u trudnoći može biti dalje posredovan od strane njenih biološki aktivnih metabolita. Pod uticajem citohroma P450s (CYP450s) E2 β prelazi u kateholestradiol, 2-hidroksiestradiol (2-OHE2) i 4-hidroksiestradiol (4-OHE2), a dalje pod dejstvom katehol O-metiltransferaze (COMT) u metoksiestradiol, 2-metoksiestradiol (2-ME2) i 4-metoksiestradiol (4-ME2) (212, 213). 2-ME je prirodni metabolit estrogena koji se pod dejstvom COMT-a sintetise u placenti i čija se koncentracija povećava tokom trudnoće (214). Nedavno je predložena teorija da 2-ME ima centralnu ulogu u održavanju placentarne homeostaze, s obzirom da u sadejstvu sa sniženim koncentracijama kiseonika, stimuliše invaziju trofoblasta (215). 2-ME učestvuje u destabilizaciji mikrotubula i inhibiciji hipoksijom indukovano faktora-1 α (engl. *hypoxia inducible factor-1 α* - HIF-1 α) (216), transkripcionog faktora koji je osetljiv na promenu pritiska kiseonika u tkivima i koji reguliše ekspresiju hipoksijom indukovanih gena (217). Tretman sa niskim koncentracijama 2-OHE2, 4-OHE2, 2-ME2, ili 4-ME2 indukuje *in vitro* proliferaciju ćelija poreklom od endotela umbilikalne vene,

dok sa druge strane visoke koncentracije 2-OHE2 ili 2-ME2 dovode do inhibicije proliferacije (218).

Poremećaj homeostaze COMT i 2-ME može dovesti do poremećaja funkcije placente u različitim fazama trudnoće. Prevrtemeno povećanje koncentracije 2-ME može dovesti do ometanja stanja relativne hipoksije tokom trofoblastne invazije i remodelovanja krvnih sudova i na taj način doprineti razvoju preeklampsije (215). Kasnije tokom trudnoće, smanjenje COMT aktivnosti, i shodno tome, smanjenje koncentracije 2-ME i inhibicije HIF-1a potencijalno može da uzrokuje vaskularno oštećenje i inflamatornu aktivaciju (219). Pokazano je da je placentarna COMT aktivnost suprimirana kod žena sa teškom preeklampsijom (217). Studije koje bi se bavile proučavanjem aktivnosti COMT tokom trudnoće, mogle bi da rasvetle ulogu COMT/2-ME u različitim periodima gestacije. Dalje, pokazano je da 2-ME delujući kao prooksidans, ima značajnu ulogu u razvoju kardiovaskularnih poremećaja. Takođe, snižena aktivnost COMTa, kao značajnog enzima koji učestvuje u metabolizmu homocisteina, poznatog kardiovaskularnog riziko faktora (220), dovodi do pojave akutnih koronarnih događaja (221). Rezultati dosadašnjih studija ukazuju na potencijalni uticaj koji poremećaj u COMT aktivnosti i produkciji 2-ME imaju na pojavu preeklampsije i kardiovaskularnih bolesti, tako da bi COMT gen mogao biti kandidat za genetičku osnovu koja povezuje ova dva poremećaja (222).

1.12. ULOGA NASLEĐIVANJA U ETIOPATOGENEZI PREEKLAMPSIJE

Nasledna osnova je odavno prepoznata kao značajan faktor u pojavi preeklampsije, ali je još uvek nejasno koji su tačno geni odgovorni za ovo stanje. Sa epidemiološkog gledišta, veliki broj studija je ustanovio da je preeklampsija bolest sa jakim familijarnom predispozicijom, koja se razlikuje u zavisnosti od geografske lokacije, socioekonomskog statusa i rasne pripadnosti. Ekspanzivni razvoj i udruživanje molekularne biologije i informacionih tehnologija, doveli su do primene dva pristupa u svrhu ispitivanja uloge nasleđa u preeklampsiji: testiranje genskog polimorfizma, i integrativna sistemska studija celog humanog genoma. Veliki broj polimorfizama za široki spektar gena doveden je u vezu sa različitim fazama etiopatogeneze i pojave preeklampsije. Ovo predstavlja osnovu za buduća istraživanja koja bi mogla da pruže jasniju sliku o tome kada, kako i u kojim slučajevima će doći do razvoja preeklampsije.

Dobijeni rezultati bi pomogli u prevenciji bolesti, ali i u pravovremenom reagovanju i pružanju adekvatnog tretmana radi sprečavanja negativnih maternalnih/fetalnih/neonatalnih ishoda u slučajevima gde se bolest već razvila.

1.12.1. Polimorfizmi gena za glutathion S-transferaze T1 i M1 u preeklampsiji

U normalnim trudnoćama, efekat ROS može biti poništen delovanjem antioksidanasa poput glutathiona, vitamina C i E, i nekih enzima, uključujući glutathion peroksidazu (GPxs), superoksid dismutazu i glutathion S-transferazu (GST) (223, 224). U prethodnim istraživanjima pokazano je da smanjena aktivnost GST u preeklampsiji dovodi do slabljenja GST detoksifikacionog sistema i produbljivanja oksidativnog stresa (225).

Glutathion S-transferaze (EC 2.5.1.18) ili samo glutathion transferaze (GST) predstavljaju veliku familiju antioksidantnih enzima koji učestvuju u detoksifikaciji mnogih štetnih materija, i esencijalna su komponenta u zaštiti ćelije od oksidativnog stresa, kao i u reakcijama biotransformacije ksenobiotika i kancerogena. GST enzimi katalizuju konjugaciju redukovanog glutathiona (GSH) sa velikim brojem elektrofilnih jedinjenja nastalih kao produkt CYP450 enzima. Njihovi supstrati su alifatični i heterociklični radikali, epoksidi i arenski oksidi (226). Ovi enzimi su podeljeni u tri velike grupe proteina, na osnovu mesta ekspimiranja u ćeliji: membranske, mitohondrijske i citosolne GST.

Citosolne GST, kao i mitohondrijske su solubilni enzimi. Kod sisara su dimerne strukture sa subjedinicama koje se sastoje od 199–244 aminokiselina. Na osnovu sličnosti u sekvencama aminokiselina koje kodiraju, geni za citosolne GSTs su podeljeni u sedam različitih familija: alfa na hromozomu 6 (GST A), mu na hromozomu 1 (GST M), teta na hromozomu 22 (GST T), pi na hromozomu 11 (GST P), zeta na hromozomu 14 (GST Z), sigma na hromozomu 4 (GST S), i chi (takođe poznat kao omega) na hromozomu 10 (GST O) (226, 227). Druge klase citosolnih GST enzima, beta, delta, epsilon, lambda, phi, tau, i "U" klasa, su indentifikovane kod drugih vrsta (227). Kod glodara i ljudi, citosolni GST izoenzimi u okviru jedne klase najčešće imaju više od 40% sličnosti, dok klase međusobno imaju manje od 25% sličnosti. Pet gena mu klase su smešteni jedan iza drugog (5'-GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3-3') u grupama od po 20 kb na hromozomu 1p13.3 (228). Dva teta gena, GST T1 i GST T2, su lokalizovana na

hromozomu 22 i udaljena su oko 50 kb. Slične su strukture, sa 5 egzona i identičnim intron/egzon granicama (229).

Delecioni polimorfizam se sreće kod GST M1 i GST T1 gena i, podrazumeva odsustvo jednog ili oba alela. Kod osoba sa homozigotnom delecijom (nulti genotip) registruje se odsustvo enzimske aktivnosti (230). Prisustvo makar jedne kopije gena je dovoljno za ispoljavanje enzimske aktivnosti. GST T1 i GST M1 geni su do sada povezani sa brojnim patološkim stanjima uključujući oralni karcinom (231), cervikalnu neoplaziju (232), karcinom dojke (233), glaukom (234), hepatocelularni karcinom (235), diabetes mellitus tip 2 (236) i drugo. Do sada je više istraživača pokušalo da proceni ulogu GST gena u preeklampsiji (223, 237), ali je pouzdano utvrđena povezanost samo između delecije GST P1 gena i preeklampsije (223). Nekoliko studija se bavilo i asocijacijom GST M1 i GST T1 polimorfizama i preeklampsije, ali nema jasnih zaključaka. Jedna studija je pokazala povećan rizik od nastanka preeklampsije kod nosilaca ovih polimorfizama (237), dok je drugo istraživanje pokazalo značajno smanjen rizik za pojavu preeklampsije kod GST T1 homozigotne delecije, uz još izraženije smanjenje rizika kod prisutne dvostruke delecije (GST T1-/GST M1-) (238). S druge strane, preostale sprovedene studije nisu ustanovile vezu između delecionih polimorfizama GST T1 i GST M1 gena i preeklampsije (239-244).

1.12.2. Polimorfizmi gena za endotelnu azot oksid sintetazu u preeklampsiji

Familija enzima NOS je podeljena u tri izoforme, neuronalna NOS (nNOS; NOS1), inducibilna NOS (iNOS; NOS2), i endotelna NOS (eNOS; NOS3), koje se razlikuju u načinu ekspresije i svojoj fiziološkoj ulozi. nNOS se eksprimira u neuronima i poprečnoprugastim mišićnim ćelijama i ima ulogu ćelijskog signalnog molekula. iNOS se eksprimira u imunim ćelijama u kojima proizvodi NO kao prekursor citotoksičnih slobodnih radikala, koji učestvuju u borbi protiv bakterija.

eNOS je odgovorna za sintezu NO preko konverzije L-arginina u L-citrulin uz upotrebu molekularnog kiseonika. Ekspimiran je u endotelnim ćelijama (245), trombocitima (246), glatkim mišićnim ćelijama i miocitima (247), osteocitima (248) i neuronima (249). Efekat NO produkovanog od strane eNOS je višestruk. Pored relaksacije vaskularne muskulature (245), NO reguliše leukocitnu adheziju za endotel (250), inhibiše proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih ćelija (251) i agregaciju

trombocita (246), reguliše gustinu kosti (248), bubrežno snabdevanje kiseonikom (252), i angiogenezu (253). NO i njegovi metaboliti su nađeni kako u velikim krvnim sudovima (aorta i arterije srednjeg promera), tako i u mikrocirkulaciji (arteriole i kapilari). Na nivou placente, NO sa svojom signalnom kaskadom ima značajnu ulogu u regulaciji krvnog protoka i vaskularnog tonusa (254).

eNOS je homodimer čiji su monomeri kodirani genom NOS3, lokalizovanim na hromozomu 7q35–36, dužine 4,4 kb. Ovaj gen sadrži 26 egzona, koji kodiraju informacionu RNK dužine 4052 nukleotida. eNOS je potpuno funkcionalan samo kada se nalazi u dimernoj formi. Iako se smatra da se eNOS kontinuirano eksprimira, postoje brojni faktori koji utiču na bazalni nivo ekspresije i aktivnosti ovog enzima, poput hipoksije (255), jakog stresa (256), estrogena (257), oksidovanih lipoproteina male molekulske mase (LDLs) (258) i mehaničkih sila (259). Patološki efekti poremećene produkcije i bioiskoristivosti eNOS su povezani sa hipertenzijom (260), koronarnim bolestima i srčanim infarktom (261), hiperholesterolemijom i arteriosklerozom (262), srčanom slabošću (263) i sporim zarastanjem rana (264).

Pored opisanih faktora koji mogu uticati na aktivnost eNOS, promene na nivou gena odgovornog za sintezu eNOS monomera, mogu posledično dovesti do smanjene aktivnosti i bioiskoristivosti ovog enzima. Na humanom eNOS genu je do sada identifikovano više od 168 polimorfizama u egzonima, intronima i promotoru, ali je samo za neke ustanovljeno da imaju kliničkog značaja (265). Različiti polimorfizmi pojedinačnog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism* - SNP) i polimorfizmi varijabilnog broja tandemskih ponovaka (engl. *variable number of tandem repeats* - VNTR) zabeleženi su na većem broju introna (4, 13, 18, 23). Iako se formiraju funkcionalni enzimi, prisustvo ovih polimorfizama može dovesti do poremećaja transkripcije, što će uticati na normalnu enzimsku funkciju. Osobe sa polimorfizmom u intronu 13 imaju povišen rizik za bolest koronarnih arterija (266), dok polimorfizam u intronu 4 povećava rizik za dijabetičnu nefropatiju kod dijabetesa tip 1 (267) i podstiče progresiju IgA nefropatije (268). Na promotorskom regionu su identifikovana tri SNP-a, T-786C, A922G, i T1468A. Ovi polimorfizmi imaju sposobnost menjanja transkripcione aktivnosti i posledično nivoa enzima. T-786C polimorfizam je povezan sa infarktom miokarda (269) i dijabetesom (267), dok veza sa pojavom hipertenzije nije pokazana

(270). Opisan je i polimorfizam u egzonu 7, G894T, koji rezultuje zamenom glutaminske kiseline sa aspartatnom kiselinom na kodonu 298 (Glu298Asp) (271). Ovaj polimorfizam dovodi do poremećaja primarne strukture enzima, što može voditi do njegovih funkcionalnih promena. Neke studije su povezale ovaj polimorfizam sa hipertenzijom (272), bolestima koronarnih arterija (273) i spazmom koronarnih arterija (274), iako postoje studije koje nisu ustanovile ovu povezanost (273, 275, 276).

Uloga tri klinički važna polimorfizma eNOS gena, a to su: supstitucija timina (T) citozinom (C) na poziciji 786 (rs2070744), varijabilni broj tandemskih ponovaka od 27 bp u intronu 4 (VNTR 4b/a) (duži alel ima 5 tandemskih ponovaka od 27 bp (4b), dok kraći alel ima 4 ponovka (4a)) (rs61722009) i supstitucija guanina (G) timinom (T) u egzonu 7 na nukleotidnoj poziciji 894 (Glu298Asp) (rs1799983) ispitivana je od strane brojnih istraživača (277-289). Međutim, dobijeni rezultati studija o povezanosti eNOS polimorfizma i preeklampsije su veoma oprečni (278-282, 290-292). U 2013. godini rađene su dve meta analize koje su dale različite rezultate. Analiza Qu i saradnika (293) pokazala je značajno povišen rizik za pojavu preeklampsije u slučaju prisustva homozigota za G894T polimorfizam, dok veza između T-786C i VNTR polimorfizama i preeklampsije nije pokazana. Rezultati meta-analize Dai i saradnika (194) pokazali su da T786C dominantni model i VNTR recesivni model eNOS polimorfizama povećavaju rizik za razvoj preeklampsije, posebno u evropskoj populaciji, dok veza između G894T polimorfizma i preeklampsije nije pokazana. Meta-analiza iz 2016. godine koja je obuhvatila najveći uzorak, pokazala je povećan rizik za razvoj preeklampsije u slučaju recesivnog modela za G894T i T-786C, dok veza između VNTR 4b/a i preeklampsije nije ustanovljena (294).

Studija iz 2015. godine analizirala je interetničku varijabilnost u učestalosti alela eNOS gena za tri najčešća polimorfizma (G894T, -T786C, VNTR 4b/a), kako bi se kroz ekstrapolaciju dobijenih rezultata pružilo jasnije razumevanje mogućeg uticaja genskih polimorfizama na učestalost i progresiju preeklampsije ili bilo kojih drugih hipertenzivnih poremećaja trudnoće (295). U populaciji zdravih trudnih Indijki zabeležena je značajno veća frekvencija mutiranog alela za Glu298Asp u odnosu na sub-saharsku arapsku populaciju, dok je učestalost bila manja u odnosu na belu rasu (295). Sa druge strane, indijska populacija je imala značajno češće prisutan mutiran alel -za

786T>C polimorfizam u odnosu na japansku, kinesku i afroameričku, a značajno ređe u odnosu na sub-saharsku populaciju zdravih trudnica (296). VNTR polimorfizam u eNOS genu je značajno češće bio prisutan u grupi Indijki u odnosu na ostale ispitivane populacije, iako nešto manje izraženo u odnosu na Tunižanke i Nemice (295). Velika interetnička varijabilnost u distribuciji eNOS polimorfizama potvrđuje teoriju da prisustvo polimorfizama modifikuje tok bolesti, ali da verovatno nije presudno u njenom nastanku. Preeklampsija je poligeno i multifaktorsko oboljenje, kod kojeg je neophodno sadejstvo više činilaca koji bi doprineli razvoju ovog poremećaja.

Potencijalni efekti eNOS polimorfizama u patogenezi preeklampsije su još uvek nejasni, što nameće potrebu za sprovođenjem novih istraživanja koja bi pokušala da daju odgovor o njihovoj funkcionalnoj ulozi u etiopatogenezi ovog poremećaja.

1.12.3. Polimorfizam gena za katehol O-metiltransferazu u preeklampsiji

Katehol O-metiltransferaza (COMT; EC 2.1.1.6) je enzim koji učestvuje u inaktivaciju derivata katehola, uključujući kateholamine (adrenalin, noradrenalin i dopamin), kateholne estrogene, L-dopa i druge (297, 298). Ovaj enzim pripada grupi enzima II faze metabolizma lekova i učestvuje u procesu detoksifikacije (299). COMT učestvuje u hidrosilaciji estrogena, koja uz metilaciju predstavlja prve korake na putu njegove degradacije i ekskrecije (299).

Gen za COMT lokalizovan je na hromozomu 22q11.21 i obuhvata 27 kb (300). Ovaj gen kodira dva poznata oblika enzima, solubilna COMT (S-COMT) i membranska COMT (MB-COMT), koji se razlikuju u 50 aminokiselinskih ostataka (221 S-COMT naspram 271 MB-COMT) (301). Najčešći polimorfizam do sada opisan je supstitucija guanina (G) adeninom (A) (rs4680) koja dovodi do zamene aminokiseline valina sa metioninom na poziciji 108/158. Ovaj polimorfizam dovodi do snižene aktivnosti enzima za 3-4 puta (302-304) i/ili većeg spektra konformacionih oblika koje enzim zauzima i koje su odgovorne za njegovu povećanu nestabilnost (305, 306). Do sada je prisustvo Val108/158Met COMT polimorfizma povezano sa velikim brojem neuropsihijatrijskih poremećaja (307), povećanim rizikom za karcinom dojke (308, 309), nižim pragom bola (310), poboljšanom moždanom funkcijom u vidu bolje radne memorije (311), hipertenzijom (312-314) i bolestima srca (313, 315, 316).

Model COMT^{-/-} miševa pokazao je značajno češću pojavu pobačaja, preterminskog porođaja, zastoja u rastu ploda, pojave višeplođnih trudnoća, kao i značajno manju masu placente (317). Davanje estradiola ili 2-hidroksiestradiola pacovima nije dovelo do poboljšanja ishoda kod pacova sa COMT^{-/-} fenotipom, potvrđujući ulogu COMTa, kroz produkciju 2-ME, u adekvatnom razvoju placente i embriona (317). Arterije i decidua COMT^{-/-} miševa imale su hijaline depozite sa penastim ćelijama u zidu i trombozom u lumenu, promene koje podsećaju na akutnu ateroskleroza koja se sreće u preeklampsiji. Stanja koja se sreću u preeklampsiji, poput, hipertenzije, proteinurije, histoloških promena na bubregu (odvajanje endotelne ćelije glomerula, oticanje i vakuolizacija), hipoksija placente i decidue, kao i endotelno oštećenje, bili su značajno češći u COMT^{-/-} grupi miševa (317). Sve ove negativne promene spoljile su se i nakon davanja COMT inhibitora trudnim miševima sa normalnom COMT aktivnošću, dok je davanje 2-ME dovelo do ublažavanja simptoma kod COMT^{-/-} miševa (317).

Pokazana je povećana akumulacija HIF-1 α proteina u placenti (spongiotrofoblastima) trudnih COMT^{-/-} miševa. Dalje, pokazano je povećanje nivoa s-Flt1, TNF- α i INF- γ , i smanjenje aktivnosti eNOS u ovoj grupi (317). Povećanje HIF-1 α i njegova akumulacija u placenti može dovesti do neadekvatne invazije trofoblasta, poremećaja u vaskularnom remodelovanju i pojave hipoksije, inflamacije i daljeg vaskularnog oštećenja (318, 319). Sa druge strane, hipoksija i placentarna insuficijencija mogu dovesti do slabije proizvodnje estrogena i hidroksiestradiola od strane placente (320, 321), što će dovesti do daljeg smanjenja nivoa 2-ME i produbljivanja postojećih poremećaja. Shodno ovim otkrićima, naglašena je potencijalna upotreba 2-ME kao dijagnostičkog markera i terapijskog agenta u preeklampsiji.

Funkcionalni COMT polimorfizam koji dovodi do smanjenja aktivnosti enzima je povezan sa zastojem u rastu i fetalnim abnormalnostima (322). Takođe, nekoliko studija je utvrdilo asocijaciju između COMT Val108/158Met polimorfizma i povećanog rizika za pojavu preeklampsije (323, 324). S obzirom da će prisustvo više različitih polimorfizama na jednom genu dovesti do izraženijeg smanjenja enzimske aktivnosti, sprovedene su studije koje ukazuju na mogućnost veze između COMT haplotipova i preeklampsije. Pokazano je da kombinacija funkcionalnog Val158Met polimorfizma i SNP-a (rs6269) dovodi do značajnog povećanja rizika za razvoj preeklampsije (325). Pored toga, s obzirom da je opisano da poremećena aktivnost COMT enzima stimuliše

zapaljenje, kombinacija genskog polimorfizama i izmenjenog nivoa markera zapaljenja, može dati jasniju sliku porekla preeklampsije.

1.13. IMUNOLOŠKI FAKTORI I ZAPALJENJE U ETIOPATOGENEZI PREEKLAMPSIJE

Jedna od najranijih i najodrživijih teorija o poreklu preeklampsije zasniva se na pretpostavci da ona nastaje usled poremećaja imunoloških mehanizama i zapaljenskog odgovora (326).

U toku normalne trudnoće, imunski sistem majke ima veoma važnu ulogu u procesu trofoblastne invazije, remodelovanja spiralnih arterija i implantacije (327, 328). Decidua, sloj uterusa koji uz trofoblast fetusa učestvuje u nastanku posteljice, sadrži veliki broj imunskih ćelija neophodnih za adekvatnu migraciju trofoblastnih ćelija (329-331). Među njima su makrofagi, NK ćelije, dendritične ćelije (DC), T limfociti, i T regulatorne (Treg) ćelije, koje svoju ulogu ostvaruju kroz produkciju citokina i angiogenih faktora. Ove ćelije prodiru u deciduu i grupišu se oko citotrofoblasta, omogućujući im invaziju majčinih spiralnih arterija, i kontrolisano smenjivanje endotela, uz poprimanje njegovih fenotipskih karakteristika (332-335). Dodatno, smatra se da DC u decidui podstiču predominaciju T helper (h) 2 imunog odgovora u uterusu i placenti u cilju stvaranja imunotolerancije majke prema fetusu (336). Tokom normalne trudnoće, u perifernoj cirkulaciji dolazi do povećanja nivoa ćelija urođene imunosti (granulociti i monociti) uz pojačanje njihove aktivnosti (337, 338), dok su nivoi DC i NK ćelija sniženi (339, 349). Istraživanja su pokazala snižen Th1/Th2 profil, uz predominaciju Th2 ćelija u perifernoj cirkulaciji tokom normalne trudnoće, a sve u cilju imunske tolerancije majke prema fetusu (341-345). Treg ćelije su neophodne tokom trudnoće zbog njihove uloge u promovisanju imunske tolerancije preko regulisanja Th1 ćelija i produkcije IL-10 (346-349). Treg i IL-10 zajedno inhibišu Th1 ćelije, što posledično smanjuje produkciju proinflamatornih citokina, poput IL-6 i TNF- α (348, 350). Dalje, Th17 ćelije su prisutne tokom čitave trudnoće, sa registrovanim povećanjem nivoa u kasnoj trudnoći, potencijalno doprinoseći započinjanju porođaja (351). Ravnoteža između prisutnih imunskih ćelija i faktora koje produkuju je neophodna za zdravu trudnoću, i potencijalno bilo koji disbalans na nivou ovog lokalnog imunskog odgovora može dovesti do poremećaja u razvoju placente (341, 352).

Za razliku od normalne trudnoće, trudnoće komplikovane preeklampsijom su povezane sa neadekvatnim imunskim odgovorom i stvaranjem miljea alternativno aktiviranih imunskih ćelija i citokina (353, 354). Placentarna ishemija, koja nastaje kao posledica nedovoljne trofoblastne invazije viđene u preeklampsiji, podstiče neravnotežu u funkcionisanju imunskog odgovora, dovodeći do stanja nekontrolisane hronične inflamacije (352, 355, 356). Ova neravnoteža se ogleda kroz pojačanu produkciju T ćelija i proinflamatornih citokina, i smanjenje regulatornih imunskih ćelija i antiinflamatornih citokina (346, 354, 357, 358), koja se pogoršava sa odmicanjem trudnoće. Promovisanje zapaljenja u preeklampsiji se odvija kroz delovanje podklasa CD4+ T ćelija, Th1 i Th17 (359). Značaj inflamatornih T ćelija u patogenezi preeklampsije pokazan je delovanjem Th1 sličnih ćelija, dobijenih kultivacijom splenocita trudnih miševa (360). Transfer ovih Th1 sličnih ćelija u zdrave trudne miševe provocirao je simptome preeklampsije, povećanje krvnog pritiska, poremećaj burežne funkcije, povećanje nivoa inflamatornih markera u decidui. Transfer ovih ćelija u zdrave netrudne miševe nije doveo do promena imunske funkcije, krvnog pritiska, čime je potvrđeno da je naglašen vaskularni odgovor na Th1 slične ćelije specifičan za trudnoću (360).

U preeklampsiji, kao posledica placentalne ishemije, zabeleženo je smanjenje koncentracije Treg ćelija. Gubitak ovih ćelija povezan je sa pojavom autoimunih bolesti, i drugih poremećaja imuniteta, uključujući gubitak maternalne tolerancije fetusa tokom trudnoće (361). Treg ćelije pokazuju povećanje koncentracije tokom rane trudnoće sa pikom tokom drugog trimestra, i potom padanja na normalne vrednosti (362). Ovaj period povećanja broja Treg ćelija se podudara sa odvijanjem remodelovanja krvnih sudova i invazijom trofoblasta. Bez njihove funkcije, imunski procesi će hronično biti pomereni u pravcu nekontrolisane aktivacije i stimulacije zapaljenskih T ćelija i sekrecije proinflamatornih citokina. U preeklampsiji, dolazi do smanjenja funkcije Treg ćelija i njihove produkcije IL-10 i TGF- β (363), čiji stepen smanjenja je direktno proporcionalan težini poremećaja (364).

S obzirom da se intravaskularno zapaljenje, pored preeklampsije, može naći i kod pretermanskog porođaja (365), prevremene ruptore plodovih ovojaka (PPROM) (366), zastoja u rastu ploda (367, 368) i pijelonefritisa (338), bez hipertenzije i proteinurije, što ukazuje da inflamacija postoji u preeklampsiji, ali da nije samostalno dovoljna da dovede

do ispoljavanja bolesti. Danas se smatra da posteljična hipoksija dovodi do oslobađanja antiangiogenih faktora, sFlt-1 i sEng, koji zajedno sa inflamatornim citokinima dovode do endotelne aktivacije i vazospazma, tj endotelne disfunkcije (369). Nedavno je pokazano da povećanje maternalnog sistemskog inflamatornog odgovora kod preeklampsije ne koreliše sa nivoom sFlt-1 i sEng (370). Iako je nepoznat način interakcije između inflamatornog i angiogenog sistema, nije isključena mogućnost da zapaljenski sistem stimuliše angiogeni i obrnuto.

1.13.1. Uloga inflamatornih citokina u preeklampsiji

Anti-inflamatorni citokini, poput IL-10 i IL-4, imaju važnu ulogu u toku normalne, nekomplikovane trudnoće, održavajući ravnotežu imunskog sistema (371). Sa druge strane, proinflamatorni citokini, poput TNF- α , IL-6, IL-1 i IL-17, koje proizvode aktivirane Th1 i Th17 ćelije, promovišu citotoksičan i zapaljenski odgovor (176, 177, 372-375). Pokazano je da je u preeklampsiji prisutna povećana produkcija TNF- α , IL-1 i IL-6 u cirkulaciji i trofoblastima, dok je produkcija IL-10 i IL-4 smanjena (376-378). Ova neravnoteža dovodi do hronične periferne i posteljične inflamacije, komplikujući tok trudnoće. U cirkulaciji, povećana produkcija TNF- α i IL-6 doprinosi nastanku apoptoze trofoblasta i endotelne disfunkcije, glavne karakteristike preeklampsije, poznate po povećanju produkcije adhezivnih molekula i permeabilnosti endotelne ćelije (379, 380). Inflamatorni citokini utiču i na ostale patofiziološke mehanizme preeklampsije, koji podrazumevaju povećanje produkcije ROS (381, 382), smanjenje nivoa NO i produkcije azot oksid sintetaze (NOS) mRNA (383-385), uz povećanu ekspresiju endotelina-1 (176, 386, 387) i produkciju AT1-AA od strane B limfocita (356, 388-391).

1.13.1.1. Faktor nekroze tumora- α

TNF- α spada u grupu Th1 proinflamatornih citokina, a njegov se gen nalazi na hromozomu 6p21.3 (392). Ovaj citokin je ćelijski signalni protein, koji reguliše različite ćelijske funkcije, uključujući poliferaciju i apoptozu. Makrofagi i subkutano masno tkivo su primarno mesto produkcije TNF- α , dok u trudnoći ovo mesto zauzima i placenta. Povećana produkcija TNF- α je povezana sa patogeneom raznih bolesti, poput reumatoidnog artritisa, Kronove bolesti, spondiloartropatija, psorijaze, sistemskog lupus eritematozusa (SLE), i antifosfolipidnog sindroma, arterioskleroze, diabetesa, i metaboličkog sindroma (393). Tokom trudnoće, povećanje koncentracije TNF- α je

povezano sa pojavom pobačaja, gubitka ploda, preeklampsijom i prevremenim porođajem (394). Funkcija TNF- α i IL-10 tokom implantacije, placentacije i trudnoće je antagonistička, ali je njihova ravnoteža neophodna za normalno odvijanje ovih procesa. Povećanje odnosa TNF/IL-10 provocira rane i kasne komplikacije u trudnoći, preciznije neuspeh implantacije, gubitak ploda, hipertenzivne sindrome i gestacijski dijabetes (392, 395, 396). Povišeni nivoi TNF- α mogu da pogoršaju insulinsku rezistenciju, koja se normalno javlja u trudnoći, na taj način podstičući pojavu gestacijskog dijabetesa (397, 398). Dalje, nivo TNF- α je povišen u trudnoćama sa intrauterusnim zastojem rasta i preeklampsijom u odnosu na nekomplikovane i trudnoće komplikovane gestacijskom hipertenzijom (399).

Prema poslednjim preporukama terapijska strategija preeklampsije bi mogla biti usmerena na upotrebu TNF- α inhibitora.

1.13.1.2. Interleukin-1 β

IL-1 sistem je grupa veoma važnih reproduktivnih citokina kod sisara, i sastoji se od 2 agonistička citokina IL-1 α (intraćelijska forma) i IL-1 β (sekretorna forma), njihovog prirodnog antagoniste IL-1 receptora (IL-1Ra) i familije receptora koja obuvata IL-1 receptor tip I i II (400). IL-1 β kodiran je genom IL1 β koji se nalazi na hromozomu 2q13-14 (401). Prekursor IL-1 β se produkuje od strane aktiviranih makrofaga kao proprotein, koji se proteolitičkom aktivnošću kaspaze 1 (IL-1 β konvertaza) prevodi u aktivnu formu. IL-1 β je značajan medijator inflamatornog odgovora i uključen je u brojne ćelijske procese kao što su, proliferacija, diferencijacija i apoptoza. Produkuju ga brojne ćelije među kojima su najbitniji makrofagi, monociti i epitelne ćelije. Sekretija IL-1 β dovodi do proinflamatorne kaskade, koja uključuje proizvodnju TNF- α , interferona gamma (IFN- γ), IL-2, IL-6 i IL-12 (400).

U skladu sa delovanjem TNF- α i IL-6, IL-1 β je predložen kao potencijalni medijator maternalne endotelne disfunkcije u preeklampsiji (402). Novija istraživanja su pokazala da serumski nivo IL-1 β i njegovog prirodnog inhibitora IL-1Ra mogu biti povišena u trudnoćama komplikovanim preeklampsijom. Ipak, rezultati dosadašnjih studija su oprečni po pitanju nivoa IL-1 β kod žena sa preeklampsijom (403-409). Placenta je poznati izvor ova dva citokina tokom normalne i patološke trudnoće (410). Pored produkcije ova dva citokina od strane maternalnog endotela i perifernih mononukleara, pokazano je i da placenta doprinosi povećanju nivoa IL-1 β i IL-1Ra u

preeklampsiji u odnosu na normalne trudnoće (411). Povećana placentarna sekrecija IL-1 β ukazuje da ovaj citokin utiče na endotelnu disfunkciju indukujući strukturne i funkcionalne promene na endotelnim ćelijama (412), događaj koji je od presudnog značaja za pojavu maternalnog sindroma u preeklampsiji. Pokazano je da cirkulišući monociti kod žena sa preeklampsijom spontano sekretuju veće količine proinflammatoryh citokina, uključujući i IL-1 β (413). Takođe, zabeležen je i povećan nivo IL-1 β , TNF- α i IL-6 u fetalnoj cirkulaciji (411). S obzirom da su ova tri citokina povezana sa neuronalnim oštećenjima kod novorođenčeta (414), moguće je da placenta utiče na povećan rizik za neonatalni morbiditet u preeklampsiji, usled prekomerne sekrecije proinflammatoryh citokina u fetalnu cirkulaciju. Antiinflammatory agensi i monoklonska autocitokinska antitela mogli bi predstavljati budućnost terapije preeklampsije.

1.13.1.3. Interleukin 6

IL-6 je solubilni medijator sa anti i proinflammatorym plejotropnim dejstvom na inflamaciju, imunski odgovor, hematopoezu, traumatu i stress, iz IL-6 familije citokina. IL-6 je kodiran genom na hromozomu 7p21, a produkuju ga različiti tipovi ćelija (DC, makrofagi, limfociti, keratinociti, fibroblasti, miociti, epitelne ćelije, astrociti, i placentarni trofoblasti) (415, 416).

Eksperimenti na miševima su pokazali ekspresiju IL-6 proteina na nivou placente i decidualnog tkiva tokom trudnoće (417). Pokazano je da su endotelne ćelije glavno mesto ekspresije IL-6, što upućuje na ulogu ovog citokina u angiogenezi i vaskularnom remodelovanju neophodnom za placentarnu morfogenezu tokom rane gestacije (418). IL-6 nema direktno dejstvo na proliferaciju endotela već tu ulogu ostvaruje preko indukcije VEGF (419). Visok nivo IL-6 je zabeležen u gestacijskim tkivima, amnijskoj tečnosti i serumu u toku porođaja, što sugerise da povećana biološka rapoloživost IL-6 doprinosi fiziološkim procesima rađanja (420,421) zajedno sa nekoliko drugih proinflammatoryh citokina (422).

Nekoliko studija do sada je opisalo povezanost između IL-6 i pojave preeklampsije (403, 423, 424). Ipak, postoje studije koje nisu uspele da pokažu razliku u IL-6 ekspresiji u trudnoćama komplikovanim preeklampsijom u odnosu na nekomplikovane trudnoće (425, 426). Pokazano je da decidualne ćelije žena sa preeklampsijom produkuju visoke vrednosti IL-6 (385). Povećana ekspresija IL-6 zajedno sa smanjenjem broja regulatornih makrofaga u decidualnom tkivu žena koje će

kasnije tokom trudnoće razviti gestacijsku hipertenziju, sugeriraju da se ovi procesi dešavaju u prvom delu trudnoće, pre ispoljavanja simptoma bolesti (427). Jedna od funkcija IL-6 koja bi mogla posredovati u podsticanju progresije preeklampsije je i vaskularna aktivacija. Produkcija IL-6 od strane endotelih ćelija je povećana nakon fagocitoze nekrotičnog trofoblastnog debrisa (428). Povišen nivo cirkulišućeg IL-6 može pogoršavati ovaj odgovor, delujući na trofoblaste tako što će dodatno promovisati širenje nekrotičnog debrisa i podsticanje razvoja preeklampsije (428). Pokazano je da nivo serumskog IL-6 raste sa napredovanjem trudnoće (353) i da su cirkulišući monociti glavno mesto njegove sinteze i produkcije (413), sa najvišim nivoom zabeleženim u trećem trimestru (403, 423, 424). Kako još uvek nisu ustanovljene jasne granične vredosti van trudnoće i dalje je nejasno da li je povišen nivo IL-6 uzrok ili posledica preeklampsije (353).

Imajući u vidu prethodno navedena saznanja o preeklampsiji i njenoj etiopatogenezi, postavljena je **radna hipoteza** da se delecioni polimorfizmi u GST T1 I GST M1 genima, Val158Met polimorfizam u genu za COMT i T-786C, G894T i VNTR polimorfizmi u eNOS genu, češće javljaju u grupi trudnica sa preeklampsijom, da su asocirani međusobno, potom sa epidemiološkim faktorima rizika trudnice, kliničkim karakteristikama poremećaja i rizikom za pojavu preeklampsije. Takođe, kod žena sa preeklampsijom vrednosti proinflamatornih citokina TNF- α , IL-1 β i IL-6 su povišene i u korelaciji su sa pomenutim polimorfizmima, epidemiološkim faktorima rizika trudnice i kliničkim karakteristikama preeklampsije.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu da su rezultati dosadašnjih istraživanja o ulozi polimorfizama u GST T1, GST M1, COMT i eNOS genima, kao i ekspresija proinflammatory citokina u preeklampsiji oprečni, te da do sada nije ispitivana međusobna veza između ove grupe polimorfizama, ekspresije TNF- α , IL-1 β i IL-6, kliničkih karakteristika preeklampsije i epidemioloških karakteristika trudnica sa preeklampsijom i zdravih normotenzivnih trudnica, postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Utvrditi učestalosti delecioni polimorfizama u GST T1 i GST M1 genima u grupi pacijentkinja sa preeklampsijom i u kontrolnoj grupi, eventualno postojanje razlike u distribuciji genotipova i alela analiziranih polimorfizama između dve grupe ispitanica, kao i u zavisnosti od kliničkih karakteristika preeklampsije (rana/kasna, laka/teška).
2. Utvrditi učestalosti polimorfizama eNOS gena (T-786C – u promotoru: rs2070744; G894T – Glu298Asp u egzonu 7: rs1799983; VNTR b/a u intronu 4) u grupi pacijentkinja sa preeklampsijom i u kontrolnoj grupi trudnica, eventualno postojanje razlike u distribuciji genotipova i alela analiziranih polimorfizama između dve grupe ispitanica, kao i u zavisnosti od kliničkih karakteristika preeklampsije (rana/kasna, laka/teška), uz moguće formiranje haplotipskih blokova.
3. Utvrditi učestalosti polimorfizma Val158Met u COMT genu (rs4680) u grupi pacijentkinja sa preeklampsijom i u kontrolnoj grupi, kao i eventualno postojanje razlike u distribuciji genotipova i alela analiziranog polimorfizma između dve grupe ispitanica, kao i u zavisnosti od kliničkih karakteristika preeklampsije (rana/kasna, laka/teška).
4. Ustanoviti da li postoji međusobna povezanost genotipova proučavanih polimorfizama u GST M1, GST T1, COMT i eNOS genima, kao i povezanost sa epidemiološkim faktorima rizika trudnice u grupi sa preeklampsijom i na nivou celog ispitivanog uzorka.
5. Utvrditi nivo ekspresije proinflammatory citokina TNF- α , IL-1 β i IL-6 kod trudnica sa preeklampsijom i uporediti sa nivoom kod zdravih trudnica, kao i u odnosu na kliničke karakteristike preeklampsije (rana/kasna, laka/teška).

6. Ustanoviti postojanje korelacije između nivoa citokina, i njihove veze sa epidemiološkim faktorima rizika trudnice u grupi sa preeklampsijom i u celom ispitivanom uzorku.
7. Ispitati povezanost analiziranih genskih polimorfizama sa nivoom ekspresije proinflamatornih citokina u grupi trudnica sa preeklampsijom i u celom uzorku.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. ETIČKI STANDARD ISTRAŽIVANJA

Ova prospektivna studija slučaj-kontrola, sprovedena je u period od januara 2018. do septembra 2018. godine. Istraživanje je obavljeno na Klinici za ginekologiju i akušerstvo, Kliničkog centra Srbije i u Laboratoriji za bazična istraživanja Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Istraživanje je odobreno od strane Etičkog komiteta Kliničkog centra Srbije (broj odluke – 715/14) i od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj odluke - 2650/XII-5). Sve ispitanice su prethodno dobile usmena i pisana obaveštenja o toku, ciljevima i očekivanim ishodima istraživanja, njenoj dobrobiti i eventualnim rizicima. Sve ispitanice su pre uključivanja u studiju potpisale informisani pristanak za učešće u istraživanju. Studija je planirana u skladu sa etičkim standardima datim u Helsinškoj deklaraciji (prema revidiranoj verziji iz 2008. godine) i etičkim standardima Dobre kliničke prakse. Ispitanice su imale mogućnost da, bilo kada u toku istraživanja, dobrovoljno prekinu sa učešćem, a da za to nisu bile u obavezi da navode razlog, uz garanciju da njihova odluka ni na koji način neće uticati na dalje praćenje trudnoće, porođaj i postporođajni tok. Takođe, ukoliko je bilo utvrđeno da se pacijentkinje nisu pridržavali predloženog protokola, ili su u nekom trenutku prestali da ispunjavaju uslove za uključenje u studiju, na zahtev lekara istraživača ispitanice su mogle biti isključeni iz daljeg istraživanja.

Izrada ove doktorske disertacije je podržana od strane projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Vlade Republike Srbije, OI175075, pod nazivom “Genetička kontrola i molekularni mehanizmi u malignim, inflamatornim i razvojnim patologijama orofacijalne regije”.

3.2.STUDIJSKA GRUPA

Klinički deo istraživanja je obuhvatio niz postupaka koji su podrazumevali prikupljanje uzoraka za dalja laboratorijska istraživanja, kao i prikupljanje podataka koji su korišćeni prilikom statističke obrade uzorka.

Istraživanje koje je predmet ove doktorske disertacije obuhvatilo je ukupno 100 trudnica čija je trudnoća praćena na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije. Sve trudnice su podeljene u dve grupe: grupa slučajeva i grupa kontrola.

3.2.1. Kriterijumi za uključenje u studiju

U istraživanje su uključene trudnice starije od 18 godina, čija trudnoća je bila starija od 20 gestacijskih nedelja prilikom uključanja u studiju, i sa ultrazvučno potvrđenom jednoplodnom trudnoćom. Grupa slučajeva i kontrolna grupa su uparene za godine života, graviditet, paritet i gestacijsku nedelju pri uključanju u studiju.

1. Grupa slučajeva je obuhvatila 50 trudnica koje su po prvi put u aktuelnoj trudnoći hospitalizovane pod dijagnozom preeklampsije. Kriterijumi za postavljanje dijagnoze preeklampsije su preuzeti iz vodiča za hipertenzivne poremećaje u trudnoći Američkog koledža za ginekologiju i akušerstvo (*engl.* The American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG):
 - a) sistolni pritisak jednak i viši od 140 mmHg ili dijastolni pritisak jednak i viši od 90 mmHg izmeren najmanje dva puta u intervalu ne kraćem od 4 sata, posle 20 nedelja gestacije i kod žena sa prethodno normalnim vrednostima krvnog pritiska, ili sistolni krvni pritisak jednak i viši od 160 mmHg ili dijastolni krvni pritisak jednak i viši od 110 mmHg kada je dijagnoza hipertenzije postavljena nakon ponovljenog merenja u kraćem vremenskom intervalu (minuti) radi blagovremenog započinjanja anihipertenzivne terapije, uz prisustvo
 - b) proteinurije koja je jednaka ili iznad 300 mg/24 h određeno kvantitativnom metodom; ili odnos protein/kreatinin čija vrednost iznosi 0,3 ili više (u slučaju kada su oba parametra određena u jedinicama mg/dL) ili 1+ očitani proteini na test traci (koristi se samo ukoliko nisu dostupne kvantitativne metode merenja); u odsustvu proteinurije, uz povišeni krvni pritisak, dijagnoza preeklampsije je postavljena kod žena sa prisutnim jednim od sledećih kliničkih znakova i simptoma:

- c) trombocitopenija (broj trombocita $\leq 100000/\mu\text{L}$),
- d) poremećaj funkcije jetre - povišen nivo jetrih transaminaza u krvi dva puta u odnosu na standardne vrednosti,
- e) bubrežna insuficijencija (povišen nivo serumskog kreatinina iznad $97 \mu\text{mol/L}$ (1.1 mg/dL) ili udvostručavanje njegovih vrednosti bez prisutnih drugih pokazatelja renalne disfunkcije),
- f) edem pluća, ili
- g) cerebralni ili vizuelni poremećaji (6).

Grupa slučajeva je naknadno podeljena u podgrupe u odnosu na gestacijsku nedelju postavljanja dijagnoze preeklampsije. Sve ispitanice kod kojih je dijagnoza postavljena pre 34 gestacijske nedelje pripadale su podgrupi rane preeklampsije, dok su ostale pripadale grupi kasne preeklampsije. Grupa preeklampsija je podeljena i prema težini bolesti na trudnice bez znakova teškog oblika preeklampsije (ranije označen kao laka forma) i trudnice sa teškim oblikom preeklampsije. Znaci teške forme preeklampsije su:

- a) sistolni krvni pritisak jednak i preko 160 mm Hg ili dijastolni krvni pritisak jednak i preko 110 mm Hg u najmanje dva merenja u intervalu ne kraćem od 4 sata tokom kojeg se pacijent odmara u ležećem položaju (ukoliko prethodno nije započeta antihipertenzivna terapija) uz prisustvo proteinurije, ili sistolni pritisak jednak i viši od 140 mmHg ili dijastolni pritisak jednak i viši od 90 mmHg (sa ili bez proteinurije) uz prisustvo jednog od sledećih znakova organske disfunkcije,
- b) trombocitopenija (broj trombocita $\leq 100000/\mu\text{L}$),
- c) poremećaj funkcije jetre (dvostruko povećanje nivoa jetrih transaminaza u krvi u odnosu na standardne vrednosti), jak i perzistirajući bol u gornjem desnom kvadrantu ili u epigastrijumu koji ne prolazi na primenjenu terapiju i/ili bez utvrđene druge moguće etiologije
- d) progresivna bubrežna insuficijencija (povišen nivo serumskog kreatinina iznad $97 \mu\text{mol/L}$ ili udvostručavanje njegovih vrednosti bez prisutnih drugih pokazatelja renalne disfunkcije),
- e) edem pluća, ili
- f) de novo registrovani cerebralni ili vizuelni poremećaji (6).

2. Kontrolna grupa je obuhvatila 50 zdravih žena sa nekomplikovanim trudnoćama, i urednim postporođajnim tokom.

3.2.2. Kriterijumi za isključenje iz studije za obe grupe istraživanja

- a) višeploidne trudnoće,
- b) akutni infektivni procesi poput infekcije urinarnog trakta ili infekcija gornjih respiratornih puteva u trenutku uzimanja uzorka,
- c) znaci i simptomi porođaja u trenutku uzimanja uzorka,
- d) bilo kakvi poremećaji krvnog pritiska pre trudnoće i pre 20 gestacijskih nedelja,
- e) hronične bolesti kardiovaskularnog sistema, jetre, bubrega, endokrinih organa, kao i poremećaji metabolizma,
- f) sistemski eritematozni lupus i drugi oblici sistemskih bolesti,
- g) Rh inkompatibilija,
- h) poremećaji krvavljenja,
- i) poremećaj u količini plodove vode,
- j) trudnoće komplikovane fetalnim anomalijama.

3.3. KLINIČKA METODOLOGIJA

Prenatalna nega je sprovedena prema vodičima i protokolima Klinike. Sva neophodna ispitivanja trudnica su obavljena u sklopu redovnih analiza tokom prve hospitalizacije i/ili u ambulantnim uslovima tokom redovne kontrole za zdrave trudnice. Pacijentkinje su po prijemu na Kliniku kompletno ginekološki pregledane, uz osnovni internistički pregled, i uzeta im je kompletna anamneza. Podatak o poslednjoj menstruaciji korišćen je za izračunavanje gestacijske starosti u trenutku uključenja u studiju. Analizirani podaci dobijeni iz anamneze prikupljeni su pomoću istraživačkog kartona. Registrovani su sledeći podaci: godine starosti pacijentkinje, sistolni i dijastolni krvni pritisak, indeks telesne mase (engl. body mass index, BMI), pušenje pre i tokom trudnoće, upotreba kontraceptivnih pilula, podaci o prethodnim trudnoćama i eventualnim pobačajima. Sistolni i dijastolni krvni pritisak su mereni u miru, pola sata nakon dolaska u bolnicu, u sedećem položaju, neprekrštenih nogu, sa osloncem za ruke i leđa, kada je manžetna za merenje postavljena na nadlaktici u nivou desne pretkomore (nivo sredogruđa). Svakoju pacijentkinji su uzete antropometrijske mere, telesna visina

(TV) i telesna masa (TM), i na osnovu njih je izračunat BMI po formuli: $BMI = TM \text{ (kg)} / TV^2 \text{ (cm}^2\text{)}$.

Podaci o ishodu porođaja će naknadno biti prikupljeni iz istorija bolesti na odeljenju neonatologije:

- a) način završetka porođaja,
- b) gestacijska nedelja rođenja,
- c) pol novorođenčeta,
- d) telesna masa, dužina i obim glave deteta,
- e) Apgar skor u 1. i 5. minutu,
- f) dužina hospitalizacije,
- g) eventualni boravak na odeljenju neonatalne intenzivne i/ili poluintenzivne nege,
- h) dijagnoze na otpustu.

3.3.1. Prikupljanje uzoraka krvi za istraživanje

Svakoj pacijentkinji je po prijemu na kliniku uzeta krv za analizu, u sedećem položaju, venepunkcijom iz kubitalne vene, po svim standardima asepsa i antiseptice. Analize iz krvi obuhvatile su osnovne kliničke laboratorijske analize (krvna slika i biohemija) i specifične (DNK i RNK analiza). Od trudnica koje pripadaju kontrolnoj grupi i čija je trudnoća praćena ambulantno na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Srbije, podaci o osnovnim laboratorijskim analizama preuzeti su iz njihove lične dokumentacije u slučaju da nisu bili stariji od deset dana.

Za potrebe specifičnih genetičkih analiza jednokratno je uzeto 9 ml krvi, po 4.5 ml u 2 epruvete sa natrijum citratom kao podlogom. Uzorak iz jedne epruvete je korišćen odmah u cilju izolovanja RNK i analize relativne ekspresije citokina. Druga epruveta je zamrznuta na -20°C , a potom korišćena za izolaciju DNK i genotipizaciju.

3.4. LABORATORIJSKA METODOLOGIJA

Molekularno genetičko istraživanje, sprovedeno u Laboratoriji za bazična istraživanja Stomatološkog fakulteta u Univerziteta u Beogradu, podrazumevalo je izolaciju genomske DNK i ukupne RNK iz limfocita krvi za obe grupe ispitanica. Sprovedena je analiza delecionih polimorfizama gena za GST M1 i GST T1 primenom metoda PCR (engl. *polymerase chain reaction*) i real-time PCR-a, polimorfizama

pojedinačnog nukleotida u genima za eNOS i COMT primenom PCR-RFLP (engl. *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) tehnike, kao i analiza relativne ekspresije gena za proinflamatorne citokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) primenom real-time PCR metode.

3.4.1. Izolacija DNK

Analizi polimorfizama prethodila je izolacija genomske DNK iz limfocita periferne krvi žena sa preeklampsijom i zdravih trudnica metodom “isolvavanja” (engl. *salting out*), koja podrazumeva hemijsku lizu ćelija i prevođenje DNK u vodenu fazu, uz hemijsko uklanjanje proteina i RNK molekula iz izolata. Višestruki koraci centrifugiranja imali su za cilj odstranjivanje membrane liziranih ćelija krvi i membrane jedara razbijenih leukocita. Tretman različitim jonskim deterdžentima (SDS, proteinaza K) omogućio je da se izvrši denaturacija proteina, što dovodi do oslobađanja DNK iz nukleoproteinskog kompleksa, kao i inaktivacija enzima DNK-aza, kako bi se izolacija mogla sprovesti na sobnoj temperaturi.

Celokupan metodološki proces izolacije DNK iz limfocita periferne krvi obuhvatio je sledeće korake:

1. pravljenje smeše od 4,5 ml venske krvi sa antikoagulansom (Na-citrat) i iste količine pufera za lizu (Tabela 4) koja se drži 15 do 20 minuta na temperaturi od + 4°C
2. dobra resuspenzija smeše i potom držanje na ledu 10 do 15 minuta
3. centrifugiranje uzorka 15 minuta na 2000 obrtaja (2000 rpm)
4. odbacivanje supernatanta i resuspenzija taloga u 5 ml fiziološkog pufera (Tabela 4)
5. centrifugiranje 15 minuta na 2000 rpm-a, uz ponavljanje postupka “ispiranja” 2 do 3 puta (talog treba da pobeli)
6. odbacivanje supernatanta nakon poslednjeg ispiranja i rastvaranje taloga u 3 ml pufera A (Tabela 4), nakon čega se dodaje 200 μ L 10% SDS (Na-dodecilsulfat) i 20 μ L proteinaze K (finalne koncentracije 200 μ g/mL)
7. dobra resuspenzija uzorka i njegova inkubacija preko noći u termostatu na 37 °C
8. dodavanje 1mL saturisanog 6 M NaCl, uz dobro mućkanje 15 sekundi (povećava rastvorljivost DNK)

9. centrifugiranje 15 minuta na 3000 rpm-a u cilju taloženja precipitiranih denaturisanih proteina
10. prebacivanje supernatanta (rastvorena DNK) u čiste epruvete i centrifugiranje 15 minuta na 3000 rpm-a
11. prelivanje supernatanta u graduisanu epruvetu, uz dodavanje izopropanola u istoj zapremini (omogućava precipitaciju molekula DNK)
12. pažljivo mućkanje, pri čemu se izdvaja DNK u vidu beličastog končića
13. hvatanje končića Pasterovom pipetom i potapanje u 70% etanol 30 sekundi radi uklanjanja viška soli
14. sušenje DNK na sobnom vazduhu 30 sekundi, potom rastvaranje u 100 µL TE pufera (Tabela 4) ili redestilovane vode
15. spektrofotometrijsko određivanje koncentracije i čistoće DNK na talasnoj dužini 260/280 nm.

Tabela 4. Sastav pufera korišćenih u procesu izolacije DNK.

Pufer za lizu	Fiziološki puffer	Pufer A	TE pufer
0,32 M saharoza	0.075 M NaCl	10 mM TRIS HCl, pH8	10 mM TRIS HCl
10 mM TRIS HCl, pH 7.5	0.025 M EDTA, pH 8	400 ml NaCl	1 mM EDTA
1% TRITON x 100		2 mM EDTA	
5 mM MgCl ₂			
Autoklavirati i čuvati na +4 °C			

3.4.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR metoda)

Lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) predstavlja umnožavanje definisane DNK sekvence u *in vitro* uslovima, imitirajući prirodni proces DNK replikacije. Za sintezu DNK koristi se enzim termostabilna *Taq* DNK polimeraza. PCR reakcija se izvodi u mikrotubama zapremine 700 µL, a sama reakciona smeša zapremine 25 µL se u PCR aparatima podvrgava preciznim, cikličnim promenama temperature. Eksponencijalno umnožavanje specifičnog DNK fragmenta sprovodi se kroz ponavljanje ciklusa (ukupno 35). Svaki ciklus sadrži faze denaturacije DNK, hibridizacije prajmera i ekstenzije hibridizovanih prajmera od strane termostabilne DNK polimeraze.

3.4.3. Elektroforeza na poliakrilamid (PAA) gelu

Gel elektroforeza je metoda koja se zasniva na razlikama u pokretljivosti biomakromolekula u gelu kada se nalaze u električnom polju. Razlika u koncentraciji, molekulskim masama, prostornoj konformaciji, a posebno u naelektrisanju koje i određuje smer kretanja u električnom polju, su osobine koje dovode do različite pokretljivost makromolekula u gelu pod uticajem električne struje, pri čemu manji molekuli putuju brže u odnosu na veće. Prisustvo velikog broja fosfatnih grupa koje su u uslovima fiziološkog pH negativno naelektrisane, čini da se molekul DNK kreće od katode (negativne elektrode) ka anodi (pozitivnoj elektrodi). U našem slučaju, analiza PCR produkata sprovedena je vertikalnom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu. Poliakrilamidni gel je dobijen mešanjem akrilamida i bis- akrilamida uz korišćenje adekvatnih katalizatora. Kao inicijatori i katalizatori procesa polimerizacije akrilamida korišćeni su amonijum persulfat (APS) i TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamin). Mrežasta struktura nastaje zahvaljujući bis-akrilamidu koji formira poprečne veze između polimera akrilamida koji predstavljaju dugačke lance monomera akrilamida. Brzina izvođenja i visoka rezolucija čine ovu metodu jednom od najboljih za razdvajanje i vizuelizaciju nukleinskih kiselina.

U sklopu ovog istraživanja elektroforeza je sprovedena na 8% poliakrilamid gelu (Tabela 5) u 1xTBE puferu, pri konstantnom naponu struje od 220 V u trajanju od 60 minuta. Za vizuelizaciju fragmenata, DNK gel je nakon elektroforeze potapan u vodeni rastvor etidijum bromida, supstanca koja se ugrađuje između lanaca DNK molekula i koja fluorescira kada se osvetli UV svetlom na transiluminatoru. Veličina (odnosno prisustvo) ciljne sekvence procenjavana je poređenjem položaja ispitivanih PCR produkata sa položajem DNK fragmenata poznatih dužina u gelu.

Tabela 5. Sastav 8% poliakrilamid gela.

ddH ₂ O 3,6 mL
5 x TBE 1.2 mL
Akrlamid / Bis-akrlamid 40 % 1.2 mL
APS 10% 42 μL
TEMED 7,8 μL

3.4.4. Lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu (real-time PCR, qPCR)

Metoda lančane reakcije polimeraze u realnom vremenu (engl. *real time polymerase chain reaction, real-time PCR - qPCR*) predstavlja PCR tehniku kojom je omogućeno praćenje toka reakcije. Za razliku od klasične PCR metode, u reakcionoj smeši se nalazi i fluorescentna boja SYBR Green (nespecifična interkalirajuća boja koja ima sposobnost ugrađivanja u dvolančane DNK produkte). PCR aparat sadrži pobuđivač i detektor fluorescence, koji na kraju svakog od ciklusa detektuje nivo ugrađenog SYBR Greena, čime se omogućava praćenje toka PCR reakcije. U trenutku započinjanja eksponencijalnog umnožavanja specifičnog PCR produkta, fluorescentni signal koji pratimo na ekranu kompjutera ulazi u eksponencijalnu fazu. Ciklus u kome se prelazi prag fluorescence se označava kao Ct (engl. *Cycle threshold*). Za proveru specifičnosti dobijenih PCR produkata reakciona smeša se izlaže gradijentu topljenja (engl. *Melting gradient*). Svaki produkt ima karakterističnu temperaturu topljenja koja predstavlja temperaturu na kojoj dolazi do denaturacije 50% molekula. Veličina DNK fragmenta i broj AT odnosno GC baznih parova određuju oblik i poziciju krive topljenja.

3.4.4.1. Određivanje delecionog polimorfizma gena za glutation S-transferazu T1 i M1 (GST T1 i GST M1)

Za određivanje prisustva polimorfizama delecionog tipa gena za GST M1 i GST T1 koristili smo metodu PCR, a u slučaju uzoraka sa manjom koncentracijom DNK primenjivana je dopunska analiza qPCR metodom (Tabela 6). Umnožavanje je rađeno kroz multipleks reakcije, a korišćeni prajmeri za GST M1 i GST T1 prikazani su u tabeli 7. Za kontrolu uspešnosti PCR reakcije korišćeni su prajmeri za β -globinski gen (Tabela 7).

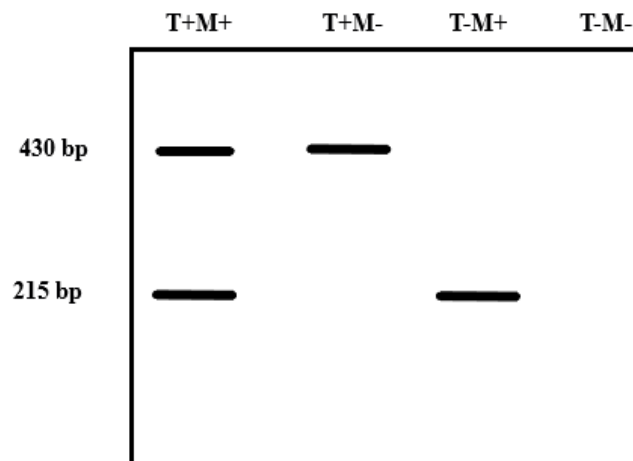
Tabela 6. Sastav reakcionih smeša za umnožavanje dela gena za GST T1 i M1.

	Klasičan PCR	qPCR
Reakciona smeša za multipleks reakciju (zapremina 25 µL za klasičan i 15 µL za qPCR)	Voda	Voda
	12,5 µL PCR Master Mix-a (2x) *	7,5µL real-time PCR Master Mix-a (2x)**
	0,2 µM svakog prajmera (tabela 7)	0,2 µM svakog prajmera (tabela 7)
	5 µL DNK uzorka	2µL DNK uzorka
Program za multipleks (M1/T1/β-globin) reakciju ^a	Inicijalna denaturacija 95°C/5 minuta	Inicijalna denaturacija 95°C/2 minuta
	Denaturacija 95°C/30 sekundi	Denaturacija 95°C/30 sekundi
	Aniling 59°C/45 sekundi	Aniling 59°C/45 sekundi
	Ekstenzija 72°C/1 minut	Ekstenzija 72°C/1 minut
	Finalna ekstenzija na 72°C/5 minuta	Finalna ekstenzija na 72°C/3 minuta
^a klasičan PCR - 30 ciklusa, od koraka 2 do 4; qPCR - 35 ciklusa, od koraka 2 do 4 *2x Thermo Scientific PCR Master Mix sadrži Taq DNA polimerazu (0,05 jedinica/µL), 4 mM MgCl ₂ i dNTP mix (0,4 mM svakog) ** 2x SensiFast SYBR Hi-Rox Master Mix		

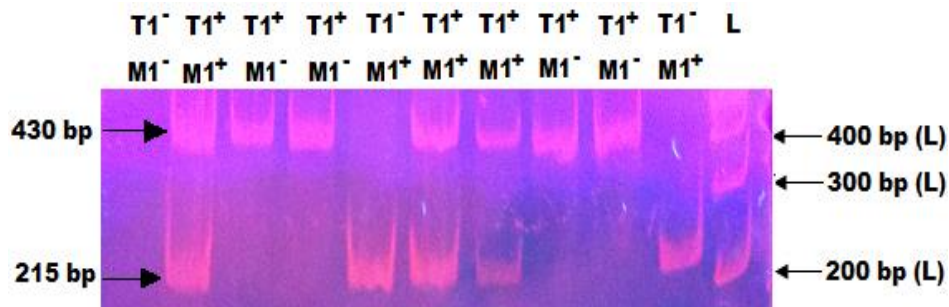
Tabela 7. Sekvence prajmera i restrikcioni enzimi za polimorfizam GST T1 i GST M1 gena.

Polimorfizam gena	Sekvenca prajmera
GSTT1	5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCT-3' 5'-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3'
GSTM1	5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3' 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'
β-globin (kontrolni gen)	5'-ACACAAGTGTGTTCAACTAGC-3' 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'

PCR reakcija je usporena snižavanjem temperature na 4°C u trajanju od 10 minuta. Prisustvo, odnosno odsustvo gena nakon klasičnog PCR-a proveravano je primenom elektroforeze na 8% poliakrilamidnom gelu (produkti dužine 480 bp za GST T1, 215 bp za GST M1 i 110 bp za β-globinski gen) (Slika 1 i 2), a nakon qPCR-a zahvaljujući različitim temperaturama topljenja produkata amplifikacije na qPCR aparatu (engl. *melting curve analysis*).



Slika 1. Šematski prikaz kombinacije genskih produkata na gel elektroforezi za GST T1 i GST M1.



Slika 2. Gel elektroforeza za GST T1 i GST M1 produkata PCR amplifikacije.

3.4.5. Analiza dužine restrikcionih fragmenata (engl. *“restriction fragments length polymorphism - RFLP”*)

U sklopu restrikcione analize koriste se restrikcione endonukleaze, enzimi koji prepoznaju specifične sekvence na dvolančanoj DNK, dužine 4-6 bp, a potom i isecaju DNK molekul u okviru ili veoma blizu tih specifičnih sekvenci. Restrikciona analiza ima primenu u detekciji polimorfizama restrikcionih mesta, kao markera u genetičkim istraživanjima. Postupak restrikcione analize obuhvata PCR umnožavanje specifične sekvence u kojoj se odigrava nukleotidna zamena, potom restrikciona digestija umnoženih fragmenata i provera veličine produkata digestije na poliakrilamid gelu. Prisustvo/odsustvo restrikcionog mesta je znak za prisustvo/odsustvo nukleotidne zamene. Prednost ove metode je njena jednostavnost, dostupnost i mogućnost analize većeg broja uzoraka.

3.4.5.1. RFLP u analizi polimorfizma pojedinačnog nukleotida u genu za eNOS (eNOS T-786C)

Prvi od tri ipitivana polimorfizma u genu za eNOS lokalizovan je u promotorskom regionu na poziciji -786 i podrazumeva zamenu timina u citozin.

PCR reakcija je rađena u reakcionoj smeši zapremine 25 μ L (Tabela 8). Sekvence prajmera korišćene u reakciji date su u Tabeli 9, a temperaturni profil PCR reakcije u tabeli 10.

Tabela 8. Sastav reakcione smeše za umnožavanje dela gena za eNOS i COMT.

PCR reakciona smeša
13 μ L 2 x PCR Master Mix
200 nM svakog prajmera (tabela 6, 8, 9, ili 10)
Voda
3 μ L

Tabela 9. Sekvence prajmera za eNOS T-786C.

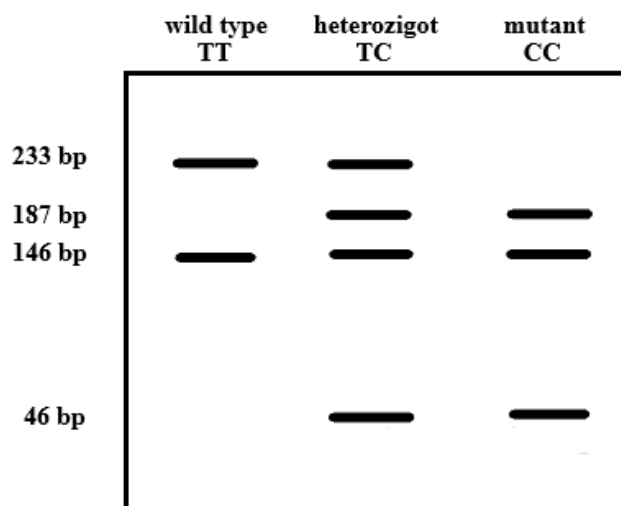
Polimorfizam gena	Sekvenca prajmera
eNOS -786 f	5'-CCCCTGTGGACCAGATGC-3'
eNOS -786 r	5'-ACATTAGGGTATCCCTTCC-3'

Tabela 10. Temperaturni profil PCR reakcije za eNOS i COMT.

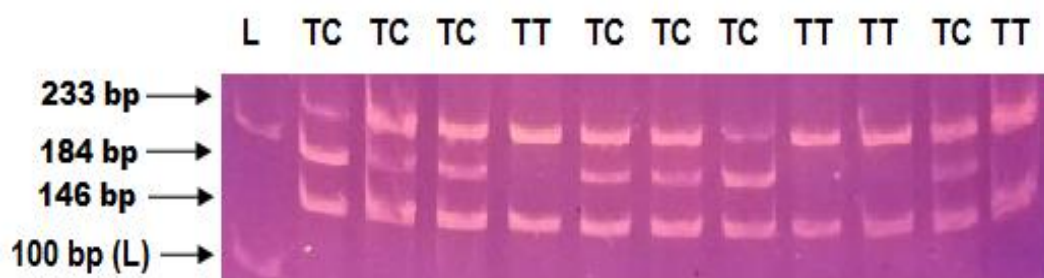
Inicijalna denaturacija	95 °C, 5 minuta
35 ciklusa	95 °C, 30 sekundi
	55 °C, 30 sekundi
	72 °C, 30 sekundi
Finalna ekstenzija	72 °C, 7 minuta

Restrikcija PCR produkata dužine 379 bp vršena restrikcionim enzimom Msp I (Thermo Scientific), 5 minuta na 37°C. Provera restrikcije vršena je na 8% PAA gelu.

U slučaju odsustva mutacije, enzim iseca PCR produkt na dva fragmenta, dužine 233 i 146 bp, dok prisustvo mutacije dovodi do isecanja produkta na tri fragmenta, dužine 187, 146 i 46 bp (Slika 3 i 4).



Slika 3. Šematski prikaz produkata restrikcijegena za eNOS.



Slika 4. Gel elektroforeza produkata restrikcije gena za eNOS.

3.4.5.2.RFLP u analizi polimorfizma pojedinačnog nukleotida eNOS G894T

Drugi ispitivani polimorfizam u genu za eNOS nalazi se u kodirajućoj sekvenci na poziciji +894 i podrazumeva zamenu guaninskog nukleotida timinskim.

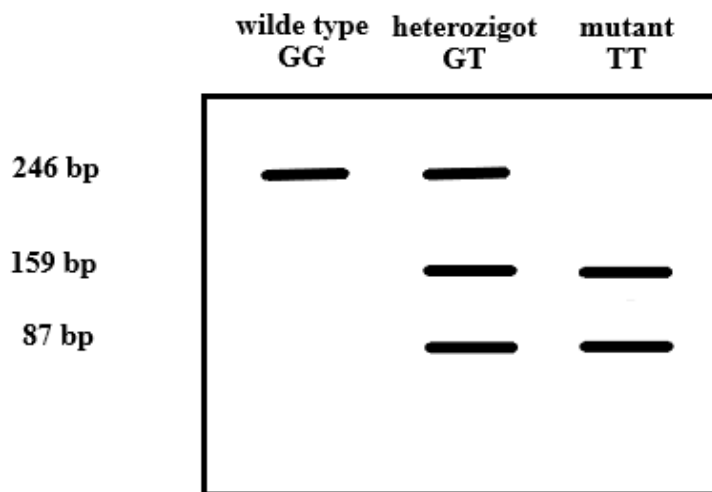
PCR reakcija je rađena u reakcionoj smeši zapremine 25 μ L (Tabela 8). Sekvence prajmera korišćene u reakciji date su u tabeli 11, a temperaturni profil PCR reakcije u tabeli 10.

Tabela 11. Sekvence prajmera za eNOS G894T.

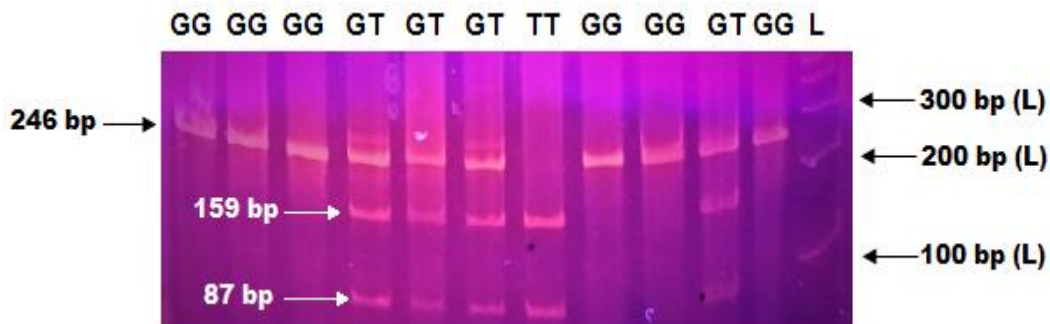
Polimorfizam gena	Sekvenca prajmera
G894T f	5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATG-3'
G894T r	5'-CAGTCAATCCCTTTGGTGCT-3'

Restrikcija PCR produkata dužine 246 bp vršena restrikcionim enzimom Mbo I (Thermo Scientific), 5 minuta na 37°C. Provera restrikcije vršena je na 8% PAA gelu.

U slučaju odsustva mutacije, enzim ne iseca PCR product (fragment dužine 246 bp), dok prisustvo mutacije dovodi do isecanja produkta na dva fragmenta dužine 159 i 87 bp (Slika 5 i 6).



Slika 5. Šematski prikaz produkata restrikcije gena za eNOS.



Slika 6. Gel elektroforeza produkata restrikcije gena za eNOS.

3.4.5.3. Analiza polimorfizma varijabilnog broja tandemskih ponovaka (VNTR) u genu za eNOS

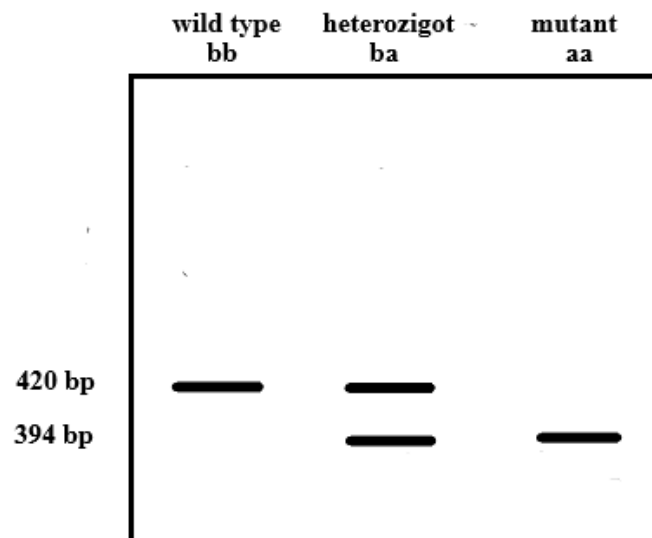
Treći ispitivani polimorfizam u genu za eNOS je po svojoj prirodi polimorfizam varijabilnog broja tandemskih ponovaka.

PCR reakcija je rađena u reakcionoj smeši zapremine 25 μ L (Tabela 8). Sekvence prajmera korišćene u reakciji date su u tabeli 12, a temperaturni profil PCR reakcije u tabeli 10.

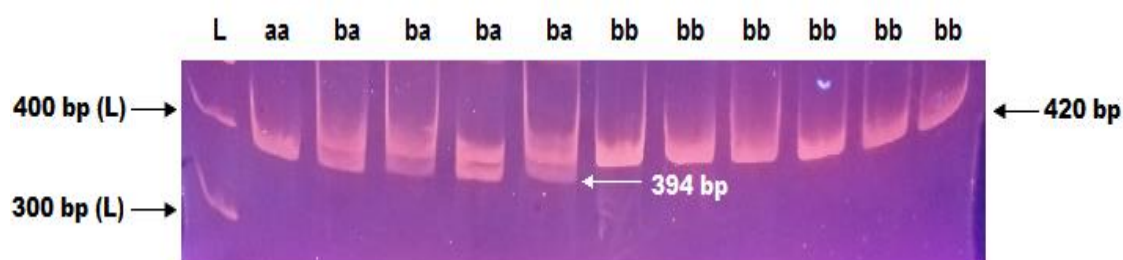
Tabela 12. Sekvence prajmera za eNOS VNTR.

Polimorfizam gena	Sekvenca prajmera
eNOS VNTR f	5'-AGGCCCTACGGTAGTGCCTT-3'
eNOS VNTR r	5'-TCTCTTAGTGCTGTGGTCAC-3'

Takozvani divlji tip alela (b alel) daje PCR produkt dužine 420 bp, dok manje učestali, odnosno mutirani alel (a alel) daje PCR produkt dužine 394 bp (Slika 7 i 8).



Slika 7. Šematski prikaz produkata restrikcije gena za eNOS.



Slika 8. Gel elektroforeza produkata restrikcije gena za eNOS.

3.4.5.4. RFLP u analizi polimorfizma pojedinačnog nukleotida u genu za COMT

U genu za COMT analiziran je polimorfizam tipa nukleotidne zamene na poziciji 158 u kodirajućoj sekvenci, koja dovodi do zamene aminokiseline valin u metionin.

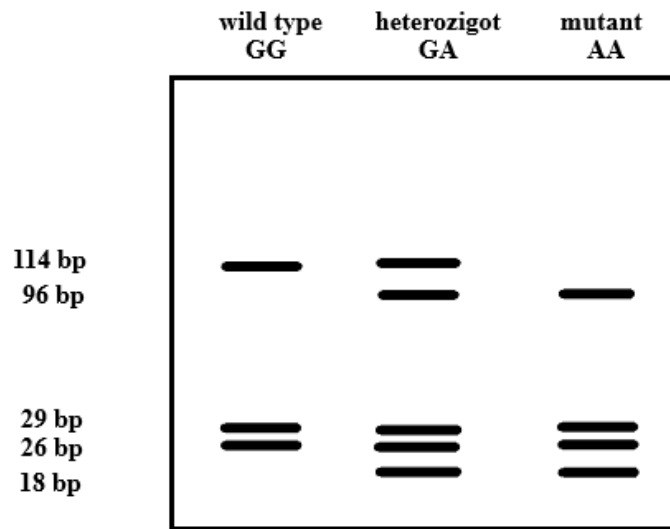
PCR reakcija je rađena u reakcionoj smeši zapremine 25 μ L (Tabela 8). Sekvence prajmera korišćene u reakciji date su u Tabeli 13, a temperaturni profil PCR reakcije u tabeli 10.

Tabela 13. Sekvence prajmera za COMT.

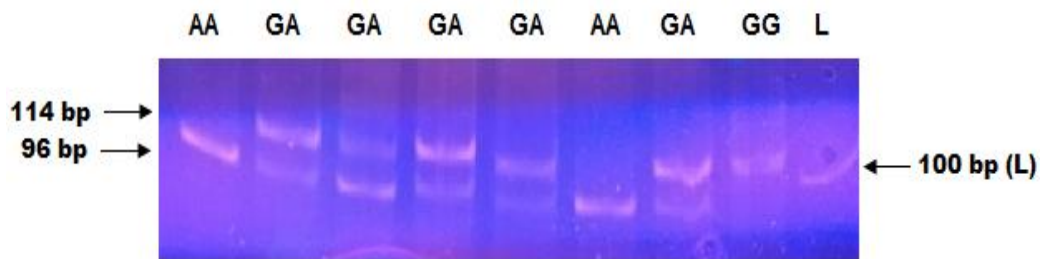
Polimorfizam gena	Sekvenca prajmera
COMT f	5'-ACTGTGGCTACTCAGCTGTG-3'
COMT r	5'-CCTTTTCCAGGTCTGACAA-3'

Restrikcija PCR produkata dužine 169 bp vršena restrikcionim enzimom Nla III (Thermo Scientific), 5 minuta na 37°C. Provera restrikcije vršena je na 8% PAA gelu.

U slučaju odsustva mutacije, enzim iseca PCR produkt na fragmente dužine 114, 29 i 26 bp, dok prisustvo mutacije dovodi do isecanja produkta na fragmente dužine 96,29, 26 i 18 bp (Slika 9 i 10).



Slika 9. Šematski prikaz produkata restrikcije gena za COMT.



Slika 10. Gel elektroforeza produkata restrikcije gena za COMT.

3.4.6. Analiza haplotipova

Analiza haplotipova izvršena je uz pomoć programa Haploview (Barrett i saradnici 2005). Obradom dobijenih genotipova za ispitivane polimorfizme ovaj program omogućava izračunavanje i grafički prikaz vrednosti neravnoteže povezanosti (LD, engl. *Linkage Disequilibrium*) i haplotipskih blokova. Opcija default algoritam je upotrebljena za identifikaciju haplotipskih blokova. U okviru LD grafikona, članovi haplotipskog bloka pozicionirani na krajevima trougla nalaze u jakom LD-u, dok se članovi između njih nalaze u slabijem LD-u. Takođe, Haploview omogućava proračun učestalosti haplotipova u analiziranim grupama nesrodnih osoba (pacijenti i kontrole), primenom matematičkog algoritma EM (engl. *Expectation Maximisation*) (Fallin i Schork 2000).

3.4.7. Izolacija RNK

Celokupan metodološki proces izolacije ukupne RNK iz limfocita periferne krvi podrazumeva sledeće korake (pufer za lizu i fiziološki pufer su istog sastava kao i kod izolacije genomske DNK):

1. pravljenje smeše od 4,5 ml venske krvi sa antikoagulansom (Na-citrat) i iste količine pufera za lizu koja se drži 15 do 20 minuta na temperaturi od + 4°C
2. dobra resuspenzija smeše i potom držanje na ledu 10 do 15 minuta
3. centrifugiranje uzorka 15 minuta na 2000 rpm-a
4. odbacivanje supernatanta i resuspenzija taloga u 5 ml fiziološkog pufera
5. centrifugiranje 15 minuta na 2000 rpm-a, uz ponavljanje postupka “ispiranja” 2 do 3 puta (talog treba da pobeli)
6. odbacivanje supernatanta nakon poslednjeg ispiranja i dodavanje 1 ml TRIzol[®] Reagent-a, liziranje ćelija resuspendovanjem pomoću nastavka pipete, inkubacija 5 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim prebacivanje u 1,5 mL ependorf tubu
7. dodavanje 0.2 ml hloroforma i jako mućkanje u ruci 15 sekundi
8. centrifugiranje uzorka na 12000 rpm-a 15 minuta na temperaturi od + 4°C, nakon čega se jasno odvajaju tri faze: donja-crvena, fenol-hloroformska, središnja i gornja koja je bezbojna. Gornja (vodena) faza čini oko 50% ukupne zapremine
9. pažljiva aspiracija i prebacivanje vodene faze u novu tubicu
10. dodavanje 0,5 ml izopropanola i inkubacija na sobnoj temperaturi 10 minuta
11. centrifugiranje na 12000 rpm-a 10 minuta na temperaturi od + 4°C
12. aspiracija i odstranjivanje supernatanta
13. ispranje peleta sa 1 ml 75% etanola
14. lagano vorteksovanje uzorka, a zatim centrifugiranje na 75000 rpm-a 5 minuta na temperaturi od + 4°C
15. aspiracija i odstranjivanje supernatanta
16. držanje otvorenih tubica 10 minuta na sobnoj temperaturi
17. resuspenzija peleta u 40 µL vode bez RNK-za
18. inkubacija u vodenom kupatilu na temperaturi od 55 °C 10-15 minuta

Uzorci izolovane RNK su do dalje analize čuvani na -80 °C.

3.4.8. Reverzna transkripcija i real-time (RT-q) PCR

Sinteza komplementarne DNK (cDNK) iz 1 μg izolovane RNK urađena je primenom komercijalnog kita za reverznu transkripciju (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), u prisustvu oligo(dT) prajmera (Tabela 14).

Tabela 14. Sastav reakcione smeše za prevođenje RNK u komplementarnu DNK.

4 μL reakcionog pufera
1 μL oligo(dT) prajmera
2 μL dNTP miksa
1 μL RiboLock (inhibitor RNKaza)
1 μL enzima reverzne transkriptaze
1 μg RNK
Vode do 20 μL

3.4.8.1. Analiza ekspresije gena za proinflamatorne citokine (TNF- α , IL-6, IL-1 β)

Nivo relativne ekspresije gena za TNF- α , IL-1 β i IL-6 utvrđen je primenom tzv. Kvantitativne PCR metode u realnom vremenu (engl. *quantitative real-time*). Metoda je zasnovana na određivanju količine specifičnog genskog produkta, pošto nam poznavanje Ct vrednosti za svaki analizirani gen omogućava posredno određivanje nivoa njegove ekspresije (što je ona veća, Ct vrednost će biti manja). Nivo ekspresije svakog analiziranog gena izražava se kao relativna vrednost u odnosu na gen koji se označava kao endogena kontrola. Ovaj oblik relativne kvantifikacije u literaturi je označen kao $\Delta\Delta\text{Ct}$ metod.

Reakciona smeša za amplifikaciju svakog ispitivanih gena sadržala je SenFast SYBR Hi-ROX (Bioline, Taunton, MA, USA), prema preporukama proizvođača, i odgovarajuće prajmere (po 200 nM svakog). Amplifikacija svakog od ispitivanih gena vršena je u zasebnim tubicama, a pored njih u odvojenim tubicama amplifikovan je i kontrolni gen (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza – GAPDH). Nakon amplifikacije utvrđivan je relativni odnos ekspresije gena od interesa prema kontrolnom GAPDH genu.

Sekvence prajmera koje su korišćene za qPCR prikazane su u Tabeli 15. Svi uzorci su urađeni u duplikatu i reakcija je sprovedena upotrebom “Line gene K” uređaja za kvantitativni PCR (BIOER Technology Co., Hangzhou, China). PCR koraci su bili sledeći: inicijalna denaturacija na 95°C tokom 2 minuta, potom faza rotacije koja je podrazumevala 45 ciklusa na 95°C tokom 30 s, 60°C tokom 30 s i 72°C, i završna produžena faza na 72°C tokom 10 minuta. Nakon svake PCR reakcije, sprovedena je analiza tzv. krive topljenja u cilju potvrde specifičnosti reakcije. Iz svake PCR reakcije su utvrđene Ct vrednosti, a nivo relativne ekspresije za svaki uzorak je prikazana kao odnos između ekspresije gena od interesa (TNF- α , IL-1 β and IL-6) i kontrolnog gena (GAPDH).

$$\Delta Ct = Ct_{\text{ispitivanog gena}} - Ct_{\text{GAPDH}}$$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(u \text{ drugom vremenu})} - \Delta Ct_{(u \text{ prvom vremenu})}$; pošto je određivana vrednost ΔCt samo u prvom vremenu, onda je $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(u \text{ prvom vremenu})}$

$$\text{Relativni nivo ekspresije} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Tabela 15. Sekvenca prajmera za qPCR.

Polimorfizam gena	Sekvenca prajmera	Bp
TNF-α	5'-CCTGCCCCAATCCCTTTATT-3' 5'-CCCTAAGCCCCCAATTCTCT-3'	81
IL-1β	5'-ACAACAGGAAAGTCCAGGCTA-3' 5'-TGGCAGAAAGGGAACAGAA-3'	59
IL-6	5'-TACATTTGCCGAAGAGCC-3' 5'-GTGAGGAACAAGCCAGAGC-3'	232
GAPDH	5'-TCATGACCACAGTCCATGCCATCA-3' 5'-CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT-3'	450

3.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička analiza prikupljenih podataka izvršena je u statističkom softverskom paketu IBM SPSS Statistics for Windows Software (Version 25.0; IBM Corp, Armonk, NY, SAD).

Kao metode deskriptivne statistike korišćene su mere centralne tendencije i mere disperzije za numerička obeležja posmatranja i apsolutni i relativni brojevi za atributivna obeležja posmatranja.

Hi-kvadrat (χ^2 , *Chi-square Test*) i Fišerov test egzaktne verovatnoće (*Fisher's exact Test*) korišćeni su za poređenje učestalosti pojavljivanja analiziranih atributivnih obeležja posmatranja između analiziranih grupa.

Izbor testa za analizu numeričkih obeležja posmatranja zavisio je od prirode raspodele podataka. U cilju određivanja normalnosti raspodele korišćen je Kolmogorov-Smirnov test (*Kolmogorov-Smirnov Test*). U slučaju normalne raspodele korišćen je Studentov T test (*Student's t-Test*), i jednofaktorska analiza varijanse (*ANOVA*). Kod raspodele različite od normalne korišćen je Kraskal-Volisov test (*Kruskal-Wallis Test*), a za međugrupnu analizu Man Vitnijev U test (*Mann Whitney U Test*). Korelacija između merenih parametara određivana je pomoću Pirsonovog i Spirmanovog koeficijenta korelacije (*Pearson's and Spearman's rank correlation coefficient*). Prethodno je izvršena logaritamska transformacija u cilju dobijanja normalne raspodele podataka. Procena rizika za nastanak oboljenja ispitivana je upotrebom bezuslovne logističke regresije kroz merenje odnosa šansi (OR) i njihovog 95% intervala poverenja (95% CI). Statistička značajnost definisana je za $p < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE ISPITANICA

U istraživanje je uključeno ukupno 100 pacijentkinja podeljenih u dve grupe – grupa slučajeva i kontrolna grupa. Grupa slučajeva se sastojala od 50 žena sa postavljenom dijagnozom preeklampsije, dok je kontrolna grupa obuhvatila 50 normotenzivnih žena sa nekomplikovanim trudnoćama. U grupi preeklampsija, 25 trudnica je imalo karakteristike teške forme, dok je 25 imalo laki oblik. U odnosu na vreme ispoljavanja bolesti, 23 žene je imalo ranu, a 27 kasnu preeklampsiju. Prema usmenim podacima dobijenim od ispitanica, u obe ispitivane grupe nije bilo slučajeva pozitivne porodične anamneze na pojavu preeklampsije. Opšte kliničke karakteristike pacijentkinja sa preeklampsijom i zdravih trudnica prikazane su u tabeli 16. Ispitivane grupe su bile uparene za starosnu dob i gestacijsku starost trudnoće u trenutku uzimanja uzorka. Uočene su statistički značajno veće vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, kao i vrednosti BMI pre i u trudnoći, u grupi žena sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice (Tabela 16).

Tabela 16. Kliničke karakteristike žena sa preeklampsijom i zdravih trudnica.

Parametar	Preeklampsija (n=50)	Kontrolna grupa (n=50)	P vrednost
Starost (godine)	32.44 ± 5.30	31.86 ± 3.10	0.554 ^a
Gestacijska starost uzimanja uzorka (nedelje)	34.06 ± 3.54	35.10 ± 2.61	0.589 ^a
Sistolni krvni pritisak (mm/Hg)	165.22 ± 20.64	112.30 ± 8.28	0.001^a
Dijastolni krvni pritisak (mm/Hg)	103.50 ± 11.12	70.70 ± 8.08	0.001^a
BMI pre trudnoće (kg/m ²)	25.46 ± 4.36	21.30 ± 2.49	0.001^a
BMI u trudnoći (kg/m ²)	30.57±4.90	26.17±3.25	0.001^a
Menarha (godine)	13.26±1.65	12.98±1.22	0.338 ^a
Dužina menstrualnog ciklusa (dani)	36.42±39.10	34.64±30.08	0.869 ^b
Menstrualno krvavljenje (dani)	5.18±1.34	5.50±1.05	0.187 ^a

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija; BMI – indeks telesne mase; ^a Student's t test; ^b Mann-Whitney U test

Laboratorijski parametri praćeni u obe ispitivane grupe prikazani su u tabeli 17. Vrednosti proteinurije i protein/kreatinin odnosa oćekivano su bile statistiĉki znaćajno veće u grupi preeklampsije u odnosu na kontrolu. Takoće, vrednosti nivoa uree, ukupnih proteina, AST, fibrinogena, laktat dehidrogenaze (LDH), mokraćne kiseline i kreatin kinaze (CK) u krvi su bili znaćajno veći u grupi slućajeva u odnosu na zdrave trudnice. Od parametara krvne slike jedino je vrednost Hgb-a pokazala statistiĉki znaćajnu razliku izmeću dve ispitivane grupe (Tabela 17).

Tabela 17. Laboratorijske karakteristike žena sa preeklampsijom i zdravih trudnica.

Parametar	Preeklampsija (n=50)	Kontrolna grupa (n=50)	P vrednost
Proteinurija (g/l)	2.10 ± 3.02	0.00 ± 0.02	0.001^b
Protein/kreatinin odnos	1.80 ± 2.74	0.00 ± 0.02	0.001^b
Urea (mmol/l)	4.14 ± 1.64	2.72 ± 0.75	0.001^a
Kreatinin (µmol/l)	59.33 ± 21.57	54.49 ± 10.42	0.158 ^a
Proteini ukupni (g/l)	57.10 ± 5.71	63.15 ± 3.98	0.001^a
Aspartat aminotransferaza (U/l)	24.64 ± 14.09	17.80 ± 6.57	0.005^b
Alanin aminotransferaza (U/l)	18.98 ± 13.83	14.62 ± 11.6	0.079 ^b
Fibrinogen (g/l)	4.79 ± 1.51	3.79 ± 1.37	0.001^a
Gama-glutamil transferaza (U/l)	20.56 ± 9.99	18.37 ± 8.69	0.098 ^a
Laktat dehidrogenaza (U/l)	380.82 ± 117.57	228.2 ± 123.40	0.001^a
Mokraćna kiselina (mmol/l)	353.00 ± 97.84	252.52 ± 59.02	0.001^b
Kreatin kinaza (U/l)	93.08 ± 76.78	50.60 ± 27.15	0.002^b
Glukoza (mmol/l)	4.43±1.02	4.40±0.54	0.839 ^a
Alkalna fosfataza (U/l)	136.14±50.40	145.02±75.77	0.860 ^b
Amilaza (U/l)	49.08±21.04	42.78±21.21	0.123 ^b
Eritrociti (*10 ¹² /l)	3.93±0.30	3.97±0.28	0.474 ^a
Hemoglobin (g/l)	111.89±11.64	116.64±9.35	0.027^a
Hematokrit (l/l)	33.89±3.06	34.69±2.51	0.154 ^a
MCV (fl)	86.89±5.76	88.55±6.00	0.160 ^a
Leukociti (*10 ⁹ /l)	9.99±3.53	9.68±2.67	0.630 ^a
Trombociti (*10 ⁹ /l)	212.08 ± 69.62	211.66 ± 50.97	0.973 ^a

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija;

^a Student's t test; ^bMann-Whitney U test

Ostale kliničke karakteristike i faktori rizika za trudnice sa preeklampsijom i zdrave trudnice prikazani su u Tabeli 18. Ispitivane grupe su bile uparene za paritet i graviditet. U grupi slučajeva, od 32 višerotke njih 8 je dalo podatak da im je prethodna trudnoća bila komplikovana gestacijskom hipertenzijom, dok je njih 5 imalo preeklampsiju u prethodnoj trudnoći. Višerotke u kontrolnoj grupi negirale su pojavu hipertenzivnih poremećaja u prethodnim trudnoćama. Učestalost prethodne upotrebe kontraceptivnih pilula je bila na granici statističke značajnosti kada su poređene naše dve grupe ispitanica. Kod žena sa preeklampsijom pojava edema je zabeležena u 43 (86%) slučajeva, dok je ova karakteristika bila značajno ređe zastupljena u grupi zdravih trudnica (ukupno 14 (28%)). Kvalitativna vrednost proteinurije je u saglasnosti sa rezultatima kvantitativne proteinurije i pokazuje značajno veće vrednosti u grupi slučajeva u odnosu na kontrolnu grupu.

Tabela 18. Kliničke karakteristike i faktori rizika žena sa preeklampsijom i zdravih trudnica.

Parametar		Preeklampsija (n=50)	Kontrolna grupa (n=50)	P vrednost
Paritet	Nulipara	25 (50%)	23 (46%)	0.674 ^a
	Primipara	17 (36%)	21 (42%)	
Graviditet	Multipara	8 (14%)	6 (12%)	1.000 ^a
	Primigravida	19 (38%)	19 (38%)	
Ukupan broj pobačaja	Multigravida	31 (62%)	31 (62%)	0.096 ^a
	0	35 (70%)	42 (84%)	
Broj namernih pobačaja	≥ 1	15 (30%)	8 (16%)	0.487 ^a
	0	44 (88%)	47 (94%)	
Broj spontanih pobačaja	≥ 1	6 (12%)	3 (6%)	0.249 ^a
	0	41 (82%)	45 (90%)	
Menstrualni ciklus	uredan	42 (84%)	46 (92%)	0.218 ^a
	neuredan	8 (16%)	4 (8%)	
Pokušaj začeća u mesecima	≤ 12 meseci	42 (84%)	47 (94%)	0.110 ^a
	> 12 meseci	8 (16%)	3 (6%)	
Upotreba kontraceptivnih pilula	da	11 (22%)	20 (40%)	0.052 ^a
	ne	39 (78%)	30 (60%)	
Pušenje pre trudnoće	da	15 (30%)	17 (34%)	0.668 ^a
	ne	35 (70%)	33 (66%)	
Broj cigareta/dan	0	35 (70%)	33 (66%)	0.796 ^b
	1-5 cigareta	4 (8%)	4 (8%)	
	6-10 cigareta	4 (8%)	8 (16%)	
	11-20 cigareta	5 (10%)	5 (10%)	
	> 20 cigareta	2 (4%)	0 (0%)	
Pušenje u trudnoći	da	9 (18%)	10 (20%)	0.799 ^a
	ne	41 (82%)	40 (80%)	
Edemi u trudnoći	da	43 (86%)	14 (28%)	0.001^a
	ne	7 (14%)	36 (72%)	
Tahikardija u trudnoći	da	13 (26%)	7 (14%)	0.134 ^a
	ne	37 (74%)	43 (86%)	
Kvalitativna vrednost proteinurije	0	6 (12%)	48 (96%)	0.001^b
	1+	22 (44%)	2 (4%)	
	2+	13 (26%)	0 (0%)	
	3+	8 (16%)	0 (0%)	
	4+	1 (2%)	0 (0%)	

n – broj uzoraka; ^a Pearson χ^2 - test; ^b Mann-Whitney U test

U grupi žena sa preeklampsijom završetak porođaja carskim rezom je bio zabeležen u 82% slučajeva, dok je u grupi zdravih trudnica ovaj način porođaja bio zastupljen u 36% slučajeva. Statističkom analizom pokazana je značajna razlika između posmatranih grupa ($P < 0.001$) (Tabela 19). U odnosu na termin porođaja, u kontrolnoj grupi svega je jedna trudnica imala kasni pretermijski porođaj, dok je ostalih 49 (98%) žena porođeno u terminu. Nasuprot ovome, 15 (30%) žena sa preeklampsijom je porođeno između 34 i 36 gestacijske nedelje, 12 (24%) pre 34 nedelje, dok je kod 23 (46%) porođaj nastupio u 37 nedelji gestacije i kasnije. Statistička obrada ovih podataka potvrdila je značajnu razliku u terminu porođaja između preeklampsije i kontrole ($P < 0.001$) (Tabela 19). Intrauterusni zastoj rasta (IUZR) je bio 14 puta češći u grupi trudnoća komplikovanih preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice ($P = 0.001$) (Tabela 19).

Tabela 19. Perinatalni ishodi u grupi žena sa preeklampsijom i grupi zdravih trudnica.

Parametar		Preeklampsija (n=50)	Kontrolna grupa (n=50)	P vrednost
Porođaj	vaginalni	9 (18%)	32 (64%)	<0.001 ^a
	carski rez	41 (82%)	18 (36%)	
Termin porođaja	termijski	23 (46%)	49 (98%)	<0.001 ^b
	pred	15 (30%)	1 (2%)	
	termijski			
IUZR	pre termijski	12 (24%)	0 (0%)	0.001 ^a
	Da	14 (28%)	1 (2%)	
Pol deteta	Ne	36 (72%)	49 (98%)	0.834 ^a
	muški	32 (64%)	33 (66%)	
	ženski	18 (36%)	17 (34%)	

n – broj uzoraka; IUZR – intrauterusni zastoj rasta; ^aPearson χ^2 - test; ^bFisher's Exact test

U Tabeli 20 prikazani su neonatalni ishodi u našim ispitivanim grupama. Prosečna gestacijska nedelja rođenja je za skoro 4 nedelje bila manja u grupi sa preeklampsijom u odnosu na kontrolu. Apgar score u prvom i petom minutu je bio značajno manji u grupi slučajeva u odnosu na nekomplikovane trudnoće. Telesna masa, dužina i obim glave deteta na rođenju su bili značajno manji u grupi sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnoće. Novorođenčad majki sa preeklampsijom su imala značajno duži boravak u bolnici u odnosu na novorođenčad iz nekomplikovanih trudnoća.

Tabela 20. Neonatalni ishodi u grupi žena sa preeklampsijom i grupi zdravih trudnica.

Parametar	Preeklampsija (n=50)	Kontrolna grupa (n=50)	P vrednost
Gestacijska nedelja rođenja	35.64 ± 3.44	39.16 ± 1.17	0.001^a
Apgar score u 1. minutu	7.08 ± 2.17	8.80 ± .67	0.001^b
Apgar score u 5. minutu	8.20 ± 1.86	9.84 ± .58	0.001^b
Telesna masa na rođenju (g)	2.467.00±934.30	3.458.80±508.71	0.001^a
Telesna dužina na rođenju (cm)	46.20±5.83	52.18±2.36	0.001^a
Obim glave na rođenju (cm)	32.20±3.68	35.42±1.42	0.001^a
Dužina hospitalizacije	18.76±23.84	4.28±1.64	0.001^b

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija;

^a Student's t test; ^bMann-Whitney U test

Distribucija pojave neonatalnih komplikacija u posmatranim grupama prikazana je u Tabeli 21. Prijem u neonatalnu intenzivnu ili poluintenzivnu negu zahtevalo je 28 (56%) novorođenčadi iz trudnoća komplikovanih preeklampsijom, dok je svega troje (6%) dece rođene iz nekomplikovanih trudnoća imalo potrebe za ovim vidom zbrinjavanja ($P<0.001$). Prisustvo perinatalne asfiksije je bilo statistčki značajno češće u grupi slučajeva u odnosu na kontrolnu grupu ($P<0.001$). Novorođenčad iz kontrolne grupe nisu razvila respiratorni distres sindrom, dok je u grupi preeklampsija ova plućna komplikacija zabeležena kod 16 (32%) slučajeva ($P<0.001$). Neonatalne konvulzije su značajno češće bile registrovane u grupi slučajeva u odnosu na kontrolu ($P=0.031$). Od ukupnog broja novorođenčadi iz grupe preeklampsija, kod 10 je ultrazvučnim pregledom centralnog nervnog sistema potvrđena intraventrikularna hemoragija. Od toga njih dvoje (4%) je imalo krvavljenje prvog, 6 (12%) drugog, i dvoje (4%) trećeg stepena. U grupi zdravih trudnica, samo jedno novorođenče (2%) je imalo intraventrikularnu hemoragiju i to prvog stepena, što je i statistički značajno ređe u odnosu na grupu slučajeva ($P=0.003$). Žutica je bila klinički ispoljena u 40 (60%) novorođenčadi iz grupe preeklampsija, dok je u kontrolnoj grupi njena pojava zabeležena kod 9 (18%) novorođenčadi ($P=0.015$). Anemija je zabeležena kod 13 (26%) dece rođene iz trudnoća komplikovanih preeklampsijom, dok novorođenčad iz nekomplikovanih trudnoća nisu razvila ovaj vid poremećaja ($P<0.001$). Perinatalna infekcija kao oblik komplikacije nije zabeležena u kontrolnoj grupi, dok se u grupi slučajeva javila kod 7 (14%) novorođenčadi ($P=0.012$) (Tabela 21). Od celog ispitivanog uzorka, samo u jednom slučaju trudnoće

komplikovane teškom i ranom preeklampsijom bio je zabeležen letalni ishod u četvrtom danu života.

Tabela 21. Neonatalne komplikacije nakon preeklampsije i nekomplikovane trudnoće.

Parametar		Preeklampsija (n=50)	Kontrolna grupa (n=50)	P vrednost
Neonatalna intenzivna /poluintenzivna nega	Da Ne	28 (56%) 22 (44%)	3 (6%) 47 (94%)	<0.001^a
Perinatalna asfiksija	da ne	20 (40%) 30 (60%)	2 (4%) 48 (96%)	
Respiratorni distres sindrom	da ne	16 (32%) 34 (68%)	0 (0%) 50 (100%)	<0.001^a
Konvulzije	da ne	8 (16%) 42 (84%)	1 (2%) 49 (98%)	
Intraventrikularna hemoragija	nema 1.stepen 2.stepen 3.stepen 4.stepen	40 (80%) 2 (4%) 6 (12%) 2 (4%) 0 (0%)	49 (98%) 1 (2%) 0 (0%) 0 (0%) 0 (0%)	0.003^a
Žutica	da ne	20 (40%) 30 (60%)	9 (18%) 41 (82%)	
Anemija	da ne	13 (26%) 37 (74%)	0 (0%) 50 (100%)	
Perinatalna infekcija	da ne	7 (14%) 43 (86%)	0 (0%) 50 (100%)	

n – broj uzoraka; ^aPearson chi square test; ^bFisher's exact test

4.2. DELECIONI POLIMORFIZAM U GST T1 I GST M1

U Tabeli 22 je prikazana učestalost delecionog polimorfizma za GST T1 i GST M1 u grupi trudnica sa dijagnozom preeklampsije i grupi nekomplikovanih trudnoća, kao i vrednost odnosa šansi sa 95% intervalom poverenja za razvoj preeklampsije. Delecija gena za GST M1 je bila značajno češća u grupi preeklampsija u odnosu na zdrave trudnice. Nosioci ove mutacije su imali skoro 3 puta veći rizik za razvoj preeklampsije (OR=2.95, 95%CI (1.14-7.65), P=0.023). Kada su posmatrane kombinacije GST genotipova, rizik za razvoj preeklampsije je bio 3,5 puta povećan u slučajevima kod kojih je zabeleženo prisustvo gena za GST T1, uz deleciju gena za GST M1 (OR=3.47, 95%CI (1.08-11.09), P=0.032) (Tabela 22).

Tabela 22. Delecioni polimorfizam za GST T1 i GST M1 u preeklampsiji i grupi zdravih trudnica.

GST	Preeklampsija (n=50)	Kontrolna grupa (n=50)	OR (95%CI)	P vrednost^a	
GST T1					
delecija	22 (44%)	20 (40%)			
prisutan	28 (56%)	30 (60%)	1.18 (0.53-2.61)	0.689	
GST M1					
delecija	18 (36%)	8 (16%)			
prisutan	32 (64%)	42 (84%)	2.95 (1.14-7.65)	0.023	
Kombinacija genotipova					
GST T1	GST M1				
prisutan	prisutan	15 (30%)	24 (48%)	1.0	
prisutan	delecija	13 (26%)	6 (12%)	3.47 (1.08-11.09)	0.032
delecija	prisutan	17 (34%)	18 (36%)	1.51 (0.60-3.81)	0.380
delecija	delecija	5 (10%)	2 (4%)	4.00 (0.69-23.30)	0.213

n – broj uzoraka; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; GST – glutation S-transferaza;

^aPearson chi square test

Distribucija GST genotipova i odnos šansi sa 95% intervalom poverenja za razvoj lakog i teškog oblika preeklampsije prikazani su u Tabeli 23. Učestalost delecije gena za GST T1 je bila značajno češća u podgrupi teške u odnosu na laku preeklampsiju (P=0.023), sa odnosom šansi 3.85 i 95% intervalom poverenja od 1.18 do 12.61. Odsustvo gena za GST M1 pokazalo je 3.5 veći rizik za razvoj teškog oblika preeklampsije u odnosu na kontrolnu grupu (OR=3.50, 95%CI (1.16-10.52), P=0.022). GST T1+/GST M1- kombinacija genotipova nosi sa sobom 6 puta veći rizik od razvoja teškog oblika preeklampsije u odnosu na zdrave trudnice (OR=6.00, 95%CI (1.27-28.26), P=0.041). Dalje, povećan rizik za razvoj teške preeklampsije u trudnoći zabeležen je i u grupi žena sa GST T1-/GST M1+ genotipom (OR=3.67, 95%CI (1.00-13.42), P=0.043). Distribucija ovog genotipa se značajno razlikovala i između posmatranih podgrupa preeklampsije (P=0.031), sa odnosom šansi 5.04 i 95% intervalom poverenja od 1.11 do 22.97. Prisustvo dvostruke delecije (GST T1-/GST M1-) nosi sa sobom 12 puta veći rizik od razvoja teškog oblika preeklampsije u odnosu na kontrolnu grupu (OR=12.0, 95%CI (1.62-88.71), P=0.018) (Tabela 23).

Tabela 23. Delecioni polimorfizam za GST T1 i GST M1 u grupi sa lakom i teškom preeklampsijom i grupi zdravih trudnica.

GST		Laka preeklampsija (n=25)	Teška preeklampsija (n=25)	Kontrolna grupa (n=50)	OR (95% CI)	P vrednost
GST T1						
delecija		7 (28%)	15 (60%)	20 (40%)	0.58 (0.21-1.65) ^a	0.307 [*]
prisutan		18 (72%)	10 (40%)	30 (60%)	2.25 (0.84-5.99) ^b	0.102 [*]
					3.85 (1.18-12.61) ^c	0.023 [*]
GST M1						
delecija		8 (32%)	10 (40%)	8 (16%)	2.47 (0.80-7.65) ^a	0.111 [*]
prisutan		17 (68%)	15 (60%)	42 (84%)	3.50 (1.16-10.52) ^b	0.022 [*]
					1.42 (0.44-4.52) ^c	0.554 [*]
Kombinacija genotipova						
GST T1	GST M1					
Prisutan	prisutan	11 (44%)	4 (16%)	24 (48%)	1.0	
Prisutan	delecija	7 (28%)	6 (24%)	6 (12%)	2.55 (0.69-9.37) ^a	0.190 ^{**}
					6.00 (1.27-28.26) ^b	0.041 ^{**}
					2.38 (0.49-11.45) ^c	0.433 ^{**}
delecija	prisutan	6 (24%)	11 (44%)	18 (36%)	0.72 (0.23-2.34) ^a	0.590 [*]
					3.67 (1.00-13.42) ^b	0.043 [*]
					5.04 (1.11-22.97) ^c	0.031 [*]
delecija	delecija	1 (4%)	4 (16%)	2 (4%)	1.10 (0.10-13.35) ^a	1.000 ^{**}
					12.0 (1.62-88.71) ^b	0.018 ^{**}
					11 (0.93-130.33) ^c	0.109 ^{**}

n – broj uzoraka; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; GST – glutation S-transferaza;

^a laka preeklampsija prema kontrolna grupa; ^b teška preeklampsija prema kontrolna grupa; ^c teška prema laka preeklampsija;

*Pearson chi square; **Fisher's Exact test

Distribucija GST genotipova i odnos šansi sa 95% intervalom poverenja za razvoj rane i kasne preeklampsije prikazani su u Tabeli 24. Odsustvo gena za GST T1 nosi sa sobom povećan rizik za razvoj rane preeklampsije (OR=3.43, 95%CI (1.2-9.83), P=0.019). Takođe, učestalost ovog delecionog polimorfizma je značajno češća u grupi rane u odnosu na kasnu preeklampsiju (P=0.001), sa odnosom šansi 8.00 i 95% intervalom poverenja od 2.25 do 28.48. Delecija gena za GST M1 povećava rizik za pojavu kasne preeklampsije za više od 3 puta (OR=3.61, 95%CI (1.23-10.60), P=0.016). Delecija gena za GST T1 uz prisustvo gena za GST M1 povećava rizik za razvoj ranog oblika ispitivanog hipertenzivnog poremećaja u trudnoći za skoro 6 puta (OR=5.78, 95%CI (1.13-23.34), P=0.009). Takođe, ova kombinacija genotipova je značajno češće zastupljena u grupi rane u odnosu na kasnu preeklampsiju (p=0.001), sa odnosom šansi 13.00 i 95% intervalom poverenja od 2.40 do 70.46. Dvostruka delecija (GST T1-/GST M1-) nosi sa sobom 12 puta veći rizik od razvoja rane preeklampsije u odnosu na kontrolnu grupu (OR=12.00, 95%CI (1.39-103.48), P=0.034) (Tabela 24).

Tabela 24. Delecioni polimorfizam za GST T1 i GST M1 u grupi sa ranom i kasnom preeklampsijom i grupi zdravih trudnica.

GST		Rana preeklampsija (n=23)	Kasna preeklampsija (n=27)	Kontrolna grupa (n=50)	OR (95% CI)	P vrednost
GST T1						
delecija		16 (69.6%)	6 (22.2%)	20 (40%)	3.43 (1.2-9.83) ^a	0.019 [*]
prisutan		7 (30.4%)	21 (77.8%)	30 (60%)	0.43 (0.15-1.25) ^b	0.115 [*]
					8.0 (2.25-28.48) ^c	0.001 [*]
GST M1						
delecija		7 (30.4%)	11 (40.7%)	8 (16%)	2.3 (0.72-7.37) ^a	0.213 [*]
prisutan		16 (69.6%)	16 (59.3%)	42 (84%)	3.61 (1.23-10.60) ^b	0.016 [*]
					0.64 (0.20-2.06) ^c	0.450 [*]
Kombinacija genotipova						
GST T1	GST M1					
prisutan	prisutan	3 (13%)	12 (44.4%)	24 (48%)	1.0	
prisutan	delecija	4 (17.4%)	9 (33.3%)	6 (12%)	5.33 (0.93-30.51) ^a	0.069 ^{**}
					3.00 (0.86-10.41) ^b	0.078 [*]
					1.78 (0.32-10.01) ^c	0.670 ^{**}
delecija	prisutan	13 (56.6%)	4 (14.8%)	18 (36%)	5.78 (1.13-23.34) ^a	0.009 [*]
					0.44 (0.12-1.61) ^b	0.210 [*]
					13.0 (2.40-70.46) ^c	0.001 [*]
delecija	delecija	3 (13%)	2 (7.4%)	2 (4%)	12.0 (1.39-103.48) ^a	0.034 ^{**}
					2.00 (0.25-15.99) ^b	0.602 [*]
					6.00 (0.67-53.68) ^c	0.260 [*]

n – broj uzoraka; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; GST – glutation S-transferaza;

^arana preeklampsija prema kontrolna grupa; ^bkasna preeklampsija prema kontrolna grupa; ^crana prema kasna preeklampsija;

^{*}Pearson chi square; ^{**}Fisher's Exact test

4.3. POLIMORFIZMI GENA ZA eNOS

Eksperimentalna i kontrolna grupa su u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži za G894T polimorfizam gena za eNOS (P=0,519 i P=0,729, redom).

Prisustvo G894T polimorfizma gena za eNOS je pokazalo sličnu distribuciju u grupi preeklampsije i kontrolnoj grupi, uz odsustvo rizika za razvoj preeklampsije za sva tri oblika genotipova (Tabela 25).

Tabela 25. G894T polimorfizam gena za eNOS u preeklampsiji i grupi zdravih trudnica.

eNOS G894T	Preeklampsija (n=50)	Kontrolna grupa (n=50)	OR (95% CI)	P vrednost
GG	25 (50%)	30 (60%)	1.0	
GT	22 (44%)	18 (36%)	1.47 (0.65-3.32)	0.359 *
TT	3 (6%)	2 (4%)	1.8 (0.28-11.64)	0.657 *
GG	25 (50%)	30 (60%)		
GT+TT	25 (50%)	20 (40%)	1.5 (0.68-3.31)	0.315 *
GG+GT	47 (94%)	48 (96%)		
TT	3 (6%)	2 (4%)	1.53 (0.24-9.59)	1.000 **
Aleli				
G	72 (72%)	78 (78%)		
T	28 (28%)	22 (22%)	1.38 (0.72-2.62)	0.327*

n-broj uzoraka; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza;

*Pearson chi square; **Fisher's Exact test

I nakon podele žena sa preeklampsijom u podgrupe u odnosu na stepen težine poremećaja, G894T polimorfizam gena za eNOS je imao sličnu distribuciju među podgrupama. Prisustvo dominantnog homozigota, heterozigota ili recesivnog homozigota ne nosi sa sobom rizik za razvoj lake ili teške preeklampsije (Tabela 26).

Tabela 26. G894T polimorfizam gena za eNOS u lakoj i teškoj preeklampsiji i grupi zdravih trudnica.

eNOS G894T	Laka preeklampsija (n=25)	Teška preeklampsija (n=25)	Kontrolna grupa (n=50)	OR (95% CI)	P vrednost
GG	13 (52%)	12 (48%)	30 (60%)	1.0	
GT	11 (44%)	11 (44%)	18 (36%)	1.41 (0.52-3.81) ^a	0.498 [*]
				1.53 (0.56-4.18) ^b	0.406 [*]
				1.08 (0.34-3.41) ^c	0.888 [*]
TT	1 (4%)	2 (8%)	2 (4%)	1.15 (0.1-13.88) ^a	1.000 ^{**}
				2.5 (0.32-19.84) ^b	0.574 ^{**}
				2.17 (0.17-27.08) ^c	1.000 ^{**}
GG	13 (52%)	12 (48%)	30 (60%)	1.0	
GT+TT	12 (48%)	13 (52%)	20 (40%)	1.38 (0.53-3.64) ^a	0.507 [*]
				1.63 (0.62-4.28) ^b	0.325 [*]
				1.17 (0.39-3.56) ^c	0.777 [*]
GG+GT	24 (96%)	23 (92%)	48 (96%)	1.0	
TT	1 (4%)	2 (8%)	2 (4%)	1.0 (0.09-11.59) ^a	1.000 ^{**}
				2.09 (0.28-15.76) ^b	0.597 ^{**}
				2.09 (0.18-24.62) ^c	1.000 ^{**}
Aleli					
G	37 (74%)	35 (70%)	78 (78%)	1.0	
T	13 (26%)	15 (30%)	22 (22%)	1.25 (0.57-2.74) ^a	0.584 [*]
				1.52 (0.71-3.26) ^b	0.284 [*]
				1.22 (0.51-2.93) ^c	0.655 [*]

n-broj uzoraka; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza;

^a laka preeklampsija prema kontrolna grupa; ^b teška preeklampsija prema kontrolna grupa; ^c teška prema laka preeklampsija;

^{*}Pearson chi square; ^{**}Fisher's Exact test

U Tabeli 27 prikazana je distribucija sve tri forme genotipova za G894T polimorfizam gena za eNOS u podgrupama preeklampsije određenim prema vremenu ispoljavanja poremećaja u odnosu na kontrolnu grupu. Nije uočena značajna razlika u učestalosti sve tri genotipske forme između grupa. Takođe, nije registrovano značajno povećanje rizika za ispoljavanje rane ili kasne preeklampsije u odnosu na prisustvo mutiranog gena. Učestalost alela G i alela T je bila slična između posmatranih grupa (Tabela 27).

Tabela 27. G894T polimorfizam gena za eNOS u ranoj i kasnoj preeklampsiji i grupi zdravih trudnica.

eNOS G894T	Rana preeklampsija (n=23)	Kasna preeklampsija (n=27)	Kontrolna grupa (n=50)	OR (95% CI)	P vrednost
GG	9 (39.1%)	16 (59.3%)	30 (60%)	1.0	
GT	12 (52.2%)	10 (37%)	18 (36%)	2.22 (0.78-6.31) ^a	0.130 [*]
				1.04 (0.39-2.78) ^b	0.920 [*]
				2.13 (0.66-.6.88) ^c	0.202 [*]
TT	2 (8.7%)	1 (3.7%)	2 (4%)	3.33 (0.41-27.13) ^a	1.000 ^{**}
				0.93 (0.08-11.15) ^b	1.000 ^{**}
				3.56 (0.28-44.89) ^c	0.543 ^{**}
GG	9 (39.1%)	16 (59.3%)	30 (60%)	1.0	
GT+TT	14 (60.9%)	11 (40.7%)	20 (40%)	2.33 (0.85-6.41) ^a	0.097 [*]
				1.03 (0.40-2.68) ^b	1.000 ^{**}
				2.26 (0.73-7.05) ^c	0.156 [*]
GG+GT	21 (91.3%)	26 (96.3%)	48 (96%)	1.0	
TT	2 (8.7%)	1 (3.7%)	2 (4%)	2.29 (0.30-17.33) ^a	0.586 ^{**}
				0.92 (0.08-10.67) ^b	1.000 ^{**}
				2.48 (0.21-29.23) ^c	0.588 ^{**}
Aleli					
G	30 (65.2%)	42 (77.8%)	78 (78%)	1.0	
T	16 (34.8%)	12 (22.2%)	22 (22%)	1.89 (0.0.88-4.08) ^a	0.102 [*]
				1.01 (0.46-2.25) ^b	1.000 [*]
				1.87 (0.77-4.51) ^c	0.164 [*]

n – broj uzoraka; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza;

^a rana preeklampsija prema kontrolna grupa; ^b kasna preeklampsija prema kontrolna grupa; ^c rana vs kasna preeklampsija;

^{*}Pearson chi square; ^{**}Fisher's Exact test

Rezultate dobijene u analizi T-786C polimorfizma gena za eNOS trebalo bi uzeti sa rezervom, pošto kontrolna grupa nije bila u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži (P=0,004). Eksperimentalna grupa je u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži za ovaj polimorfizam (P=1,000).

Homozigotna mutacija T786C za eNOS statistički je značajno češće bila zastupljena u grupi sa preeklampsijom u odnosu na kontrolu. Kako u grupi zdravih trudnica nije registrovan ni jedan slučaj recesivnog homozigota nije bilo moguće odrediti odnos šansi sa 95% intervalom poverenja za razvoj preeklampsije. Recesivni model je potvrdio značajno češće prisustvo homozigotne mutacije u odnosu na zbirno prisustvo dominantnog homozigota i heterozigota u grupi preeklampsije u odnosu na kontrolu (P=0.006) (Tabela 28).

Tabela 28. T786C polimorfizam gena za eNOS u preeklampsiji i grupi zdravih trudnica.

eNOS T786C	Preeklampsija (n=50)	Kontrolna grupa (n=50)	OR (95% CI)	P vrednost
TT	18 (36%)	21 (42%)	1.0	
TC	24 (48%)	29 (58%)	0.97 (0.42-2.21)	0.920 *
CC	8 (16%)	0 (0%)		0.006 **
TT	18 (36%)	21 (42%)	1.0	
TC+CC	32 (64%)	29 (58%)	1.29 (0.58-2.88)	0.538 *
TT+TC	42 (84%)	50 (100%)		
CC	8 (16%)	0 (0%)		0.006 **
Aleli				
T	60 (60%)	71 (71%)		
C	40 (40%)	29 (29%)	1.63 (0.91-2.94)	0.102

n – broj uzoraka; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza;

*Pearson chi square test; **Fisher's exact test

S obzirom da u kontrolnoj grupi nije zabeležena homozigotna mutacija nije bilo moguće odrediti odnos šansi sa 95% intervalom poverenja za razvoj lakog ili teškog oblika reeklampsije. Učestalost mutacije T786C na oba alela je značajno češća bila i u grupi lake (P=0.019) i u grupi teške preeklampsije (P=0.012) u odnosu na kontrolu (Tabela 29). Takođe, zbirno prisustvo dominantnog homozigota i heterozigota je bilo značajno ređe u obe posmatrane podgrupe u odnosu na zdrave trudnice (P=0.010) (Tabela 29).

Tabela 29. T786C polimorfizam gena za eNOS u lakoj i teškoj preeklampsiji i grupi zdravih trudnica.

eNOS T786C	Laka preeklampsija (n=25)	Teška preeklampsija (n=25)	Kontrolna grupa (n=50)	OR (95% CI)	P vrednost
TT	10 (40%)	8 (32%)	21 (42%)	1.0	
TC	11 (44%)	13 (52%)	29 (58%)	0.80 (0.29-2.22) ^a 1.18 (0.41-3.34) ^b 1.48 (0.43-5.05) ^c	0.663 [*] 0.764 [*] 0.532 [*]
CC	4 (16%)	4 (16%)	0 (0%)	1.25 (0.24-6.63) ^c	0.019 ^{**} 0.012 ^{**} 1.000 ^{**}
TT	10 (40%)	8 (32%)	21 (42%)	1.0	
TC+CC	15 (60%)	17 (68%)	29 (58%)	1.09 (0.41-2.89) ^a 1.54 (0.56-4.23) ^b 1.42 (0.44-4.25) ^c	0.862 [*] 0.403 [*] 0.554 [*]
TT+TC	21 (84%)	21 (84%)	50 (100%)	1.0	
CC	4 (16%)	4 (16%)	0 (0%)	1.00 (0.22-4.54) ^c	0.010 ^{**} 0.010 ^{**} 1.000 ^{**}
Aleli					
T	31 (62%)	29 (58%)	71 (71%)	1.0	
C	19 (38%)	21 (42%)	29 (29%)	1.5 (0.73-3.07) ^a 1.77 (0.87-3.6) ^b 1.18 (0.53-2.63) ^c	0.265 [*] 0.111 [*] 0.680 [*]

n – broj uzoraka; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza;

^a laka preeklampsija prema kontrolna grupa; ^b teška preeklampsija prema kontrolna grupa; ^c teška prema laka preeklampsija;

^{*}Pearson chi square test; ^{**}Fisher's exact test

U odnosu na vreme ispoljavanja preeklampsije, pokazano je značajno češće prisustvo homozigotne mutacije T786C za eNOS u obe ispitivane grupe u odnosu na kontrolu (rana $P=0.019$, kasna $P=0.012$). Recessivni model je potvrdio značajno češće prisustvo genotipa CC u grupi rane ($P=0.002$) i podgrupi kasne preeklampsije ($p=0.040$) u odnosu na nekomplikovane trudnoće (Tabela 30). Alel C je bio značajno zastupljeniji u grupi rane preeklampsije u odnosu na kontrolnu grupu ($P=0.027$), i nosioci mutiranog alela imaju preko 2 puta veći rizik od razvoja ove forme preeklampsije (OR=2.24, 95%CI (1.09-4.62)) (Tabela 30).

Tabela 30. T786C polimorfizam gena za eNOS u ranoj i kasnoj preeklampsiji i grupi zdravih trudnica.

eNOS T786C	Rana preeklampsija (n=23)	Kasna preeklampsija (n=27)	Kontrolna grupa (n=50)	OR (95% CI)	P vrednost
TT	6 (26.1%)	12 (44.4%)	21 (42%)	1.0	
TC	12 (52.2%)	12 (44.4%)	29 (58%)	1.45 (0.47-4.48) ^a 0.72 (0.27-1.92) ^b 2.0 (0.56-7.09) ^c	0.517* 0.517* 0.279*
CC	5 (21.7%)	3 (11.1%)	0 (0%)	0.80 (0.15-4.25) ^c	0.019 ** 0.012 ** 1.000**
TT	6 (26.1%)	12 (44.4%)	21 (42%)	1.0	
TC+CC	17 (73.9%)	15 (55.6%)	29 (58%)	2.05 (0.69-6.08) ^a 0.91 (0.35-2.33) ^b 0.70 (0.22-2.25) ^c	0.191* 0.841* 0.554*
TT+TC	18 (78.3%)	24 (88.9%)	50 (100%)	1.0	
CC	5 (21.7%)	3 (11.1%)	0 (0%)	2.22 (0.47-10.54) ^c	0.002 ** 0.040 ** 0.444*
Aleli					
T	24 (52.2%)	36 (66.7%)	71 (71%)	1.0	
C	22 (47.8%)	18 (33.3%)	29 (29%)	2.24 (1.09-4.62) ^a 1.22 (0.6-2.49) ^b 1.83 (0.82-4.12) ^c	0.027 * 0.578* 0.141*

n – broj uzoraka; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza;

^arana preeklampsija prema kontrolna grupa; ^bkasna preeklampsija prema kontrolna grupa; ^crana prema kasna preeklampsija;

*Pearson chi square test; **Fisher's exact test

Rezultate dobijene u analizi VNTR polimorfizma gena za eNOS trebalo bi uzeti sa rezervom, pošto eksperimentalna grupa nije bila u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži (P=0,008). Kontrolna grupa je u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži za ovaj polimorfizam (P=0,656).

VNTR polimorfizam gena za eNOS u homozigotnoj formi je bio značajno češći u grupi preeklampsije u odnosu na kontrolu (P=0.040) i nosioci ovog genotipa su bili u preko 7 puta većem riziku od razvoja preeklampsije (OR=7.68, 95%CI (0.89-65.98)) (Tabela 31).

Tabela 31. VNTR polimorfizam gena za eNOS u preeklampsiji i u grupi zdravih trudnica.

eNOS VNTR	Preeklampsija (n=50)	Kontrolna grupa (n=50)	OR (95% CI)	P vrednost
bb	31 (62%)	34 (68%)	1.0	
ba	12 (24%)	15 (30%)	0.88 (0.36-2.16)	0.777 *
aa	7 (14%)	1 (2%)	7.68 (0.89-65.98)	0.040 **
bb	31 (62%)	34 (68%)	1.0	
ba+aa	19 (38%)	16 (32%)	1.30 (0.57-2.97)	0.527 *
bb+ba	43 (86%)	49 (98%)	1.0	
aa	7 (14%)	1 (2%)	7.98 (0.94-67.46)	0.059 **
Aleli				
b	73 (73%)	83 (83%)		
a	27 (27%)	17 (17%)	1.81 (0.91-3.58)	0.088 *

n – broj uzoraka; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza;

*Pearson chi square test; **Fisher's exact test

Nakon podele žena u podgrupe u odnosu na stepen težine preeklampsije statističkom analizom je pokazano da su nosioci homozigotne mutacije za VNTR eNOS značajno češći bili u grupi lakog oblika preeklampsije (P=0.040) u odnosu na kontrolu, i da je takav genotip nosio 9 puta veći rizik od razvoja lake forme bolesti (OR=9.33, 95%CI (0.98-88.57)) (Tabela 32).

Tabela 32. VNTR polimorfizam gena za eNOS u lakoj i teškoj preeklampsiji i u grupi zdravih trudnica.

eNOS VNTR	Laka preeklampsija (n=25)	Teška preeklampsija (n=25)	Kontrolna grupa (n=50)	OR (95% CI)	P vrednost
bb	17 (68%)	14 (56%)	34 (68%)	1.0	
ba	4 (16%)	8 (32%)	15 (30%)	0.53 (0.15-1.86) ^a 1.3 (0.45-3.74) ^b 2.43 (0.60-9.78) ^c	0.320 [*] 0.632 [*] 0.210 [*]
aa	4 (16%)	3 (12%)	1 (2%)	8.0 (0.83-77.23) ^a 7.29 (0.7-76-18) ^b 0.91 (0.17-4.77) ^c	0.060 ^{**} 0.097 ^{**} 1.000 ^{**}
bb	17 (68%)	14 (56%)	34 (68%)	1.0	
ba+aa	8 (32%)	11 (44%)	16 (32%)	1.0 (0.36-2.8) ^a 1.67 (0.62-4.49) ^b 1.67 (0.53-5.29) ^c	1.000 [*] 0.308 [*] 0.383 [*]
ba+bb	21 (84%)	22 (88%)	49 (98%)	1.0	
aa	4 (16%)	3 (12%)	1 (2%)	9.33 (0.98-88.57) ^a 6.68 (0.66-67.89) ^b 0.71 (0.14-3.59) ^c	0.040 ^{**} 0.105 ^{**} 1.000 ^{**}
Aleli					
b	38 (76%)	36 (72%)	83 (83%)		
a	12 (24%)	14 (28%)	17 (17%)	1.54 (0.67-3.55) ^a 1.9 (0.85-4.25) ^b 1.23 (0.5-3.02) ^c	0.306 [*] 0.117 [*] 0.647 [*]

n – broj uzoraka; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza;

^a laka preeklampsija prema kontrolna grupa; ^b teška preeklampsija prema kontrolna grupa; ^c teška prema laka preeklampsija;

^{*}Pearson chi square test; ^{**}Fisher's exact test

U podgrupi žena koje su razvile kliničku sliku rane preeklampsije je bilo zabeleženo statistički značajno učestalije prisustvo heterozigotne forme mutacije za VNTR eNOS u odnosu na podgrupu sa kasnom formom bolesti ($P=0.020$), sa odnosom šansi 5.45 i 95% intervalom poverenja od 1.22 do 24.43 (Tabela 33). Recesivni model je pokazao da homozigotna mutacija u genu za eNOS (aa) nosi 8.5 veći rizik za razvoj kasne preeklampsije (OR=8.52, 95%CI (0.90-80.58), $P=0.048$). Mutirani alel (a) je bio značajno učestaliji u podgrupi rane preeklampsije u odnosu na kontrolu ($P=0.034$), a nosioci ovog tipa alela su bili u većem riziku od ranog razvoja bolesti (OR=2.36, 95%CI (1.05-5.3)) (Tabela 33).

Tabela 33. VNTR polimorfizam gena za eNOS u ranoj i kasnoj preeklampsiji i u grupi zdravih trudnica.

eNOS VNTR	Rana preeklampsija (n=25)	Kasna preeklampsija (n=25)	Kontrolna grupa (n=50)	OR (95% CI)	P vrednost
bb	11 (47.8%)	20 (74.1%)	34 (68%)	1.0	
ba	9 (39.1%)	3 (11.1%)	15 (30%)	1.85 (0.64-5.41) ^a 0.34 (0.09-1.32) ^b 5.45 (1.22-24.43)^c	0.254 [*] 0.108 [*] 0.020[*]
aa	3 (13.1%)	4 (14.8%)	1 (2%)	9.27 (0.87-98.51) ^a 6.8 (0.71-65.16) ^b 1.36 (0.26-7.23) ^c	0.065 ^{**} 0.148 ^{**} 1.000 ^{**}
bb	6 (26.1%)	12 (44.4%)	21 (42%)	1.0	
ba+aa	17 (73.9%)	15 (55.6%)	29 (58%)	2.05 (0.69-6.08) ^a 0.91 (0.35-2.33) ^b 2.27 (0.68-7.53) ^c	0.191 [*] 0.841 [*] 0.177 [*]
ba+bb	20 (87%)	23 (85.2%)	49 (98%)	1.0	
aa	3 (13%)	4 (14.8%)	1 (2%)	7.35 (0.72-74.96) ^a 8.52 (0.90-80.58)^b 0.86 (0.17-4.33) ^c	0.089 ^{**} 0.048^{**} 1.000 ^{**}
Aleli					
b	31 (67.4%)	43 (79.6%)	83 (83%)		
a	15 (32.6%)	11 (20.4%)	17 (17%)	2.36 (1.05-5.3)^a 1.25 (0.54-2.9) ^b 1.89 (0.77-4.67) ^c	0.034[*] 0.603 [*] 0.165 [*]

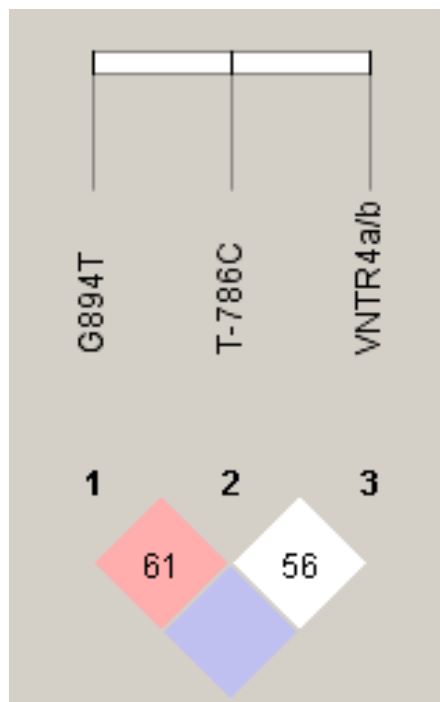
n – broj uzoraka; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza;

^arana preeklampsija prema kontrolna grupa; ^bkasna preeklampsija prema kontrolna grupa; ^crana prema kasna preeklampsija;

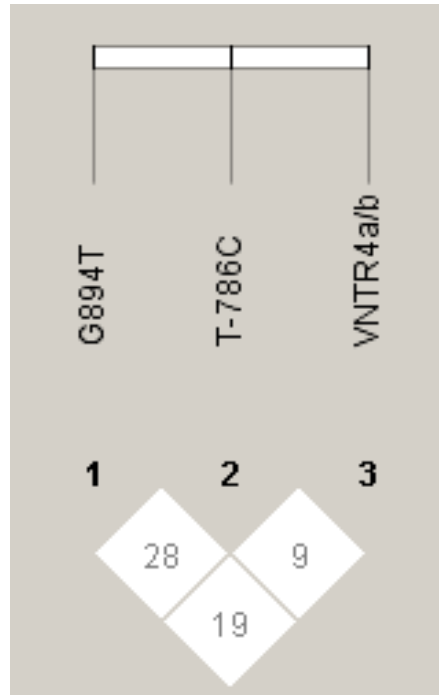
^{*}Pearson chi square test; ^{**}Fisher's exact test

4.4. ANALIZA HAPLOTIPOVA

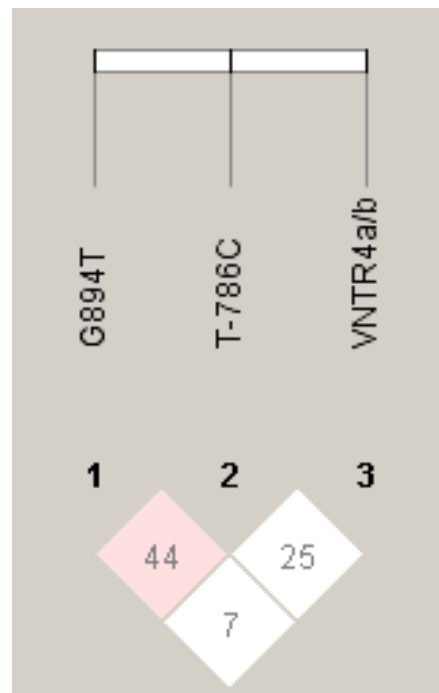
Neravnoteža vezanosti (LD) ispitivana je kod sva tri polimorfizma i izražena preko parametra D' (procentualne vrednosti su prikazane u kvadratićima) za celu studijsku grupu, trudnice sa preeklampsijom i kontrolnu grupu. Za definiciju haplotipskih blokova korišćena je opcija default algoritam. Neravnoteža vezanosti (LD) bila je slabo izražena u svim grupama (nije se približila vrednosti $D=1$). Najjača povezanost pokazana je između G894T i T-786C polimorfizama za eNOS u kontrolnoj grupi ($D=0.61$). Dalje, u grupi zdravih trudnica nivo LD između T-786C i VNTR je iznosio $D=0.56$, dok je povezanost između G894T i VNTR nije uopšte uočena ($D=0$) (Slika 11). Na nivou grupe žena sa preeklampsijom, kao i na nivou celog uzorka najizraženija povezanost je bila između G894T i T-786C (grupa preeklampsije, $D=0.28$) (Slika 12) (celi uzorak, $D=0.44$) (Slika 13). Ni u jednoj grupi nije identifikovan haplotipski blok.



Slika 11. Neravnoteža vezanosti (LD) u kontrolnoj grupi.



Slika 12. Neravnoteža vezanosti (LD) u grupi žena sa preeklampsijom.



Slika 13. Neravnoteža vezanosti (LD) u celoj studijskoj grupi.

Analizom kombinacije genotipova za tri ispitivana eNOS polymorfizma nismo dobili značajan uticaj na rizik za razvoj preeklampsije (Tabela 34). Dalje, analizom učestalosti haplotipova G894T, T-786C i VNTR 4b/a polymorfizama gena za eNOS dobili smo da haplotip sa divljim tipom alela, “G-T-b” ima protektivni efekat, dok “G-C-b” haplotip nosi 3 puta povećan rizik za razvoj preeklampsije (Tabela 35).

Tabela 34. Kombinacija genotipova eNOS G894T, T-786C i VNTR 4b/a polymorfizama u grupi preeklampsija i kontrolnoj grupi.

	Preeklampsija (n=50)	Kontrolna grupa (n=50)	OR (95% CI)	P vrednost
T-786C / G894T				
TT / GG	11 (22%)	18 (36%)	0.50 (0.21 – 1.21)	0.123
TT / GT	6 (12%)	3 (6%)	2.14 (0.50 – 9.07)	0.487
TT / TT	1 (2%)	0 (0%)	ND	ND
TC / GG	12 (24%)	12 (24%)	1.00 (0.40 – 2.50)	1.000
TC / GT	11 (22%)	15 (30%)	0.66 (0.27 – 1.62)	0.362
TC / TT	1 (2%)	2 (4%)	0.49 (0.04 – 5.58)	1.000
CC / GG	2 (4%)	0 (0%)	ND	ND
CC / GT	5 (10%)	0 (0%)	ND	ND
CC / TT	1 (2%)	0 (0%)	ND	ND
G894T / VNTR 4b/a				
GG / 4b4b	18 (36%)	19 (38%)	0.92 (0.41 – 2.07)	0.841
GG / 4b4a	4 (8%)	10 (20%)	0.35 (0.10 – 1.19)	0.084
GG / 4a4a	3 (6%)	1 (2%)	3.13 (0.31 – 31.14)	0.617
GT / 4b4b	12 (24%)	13 (26%)	0.90 (0.36 – 2.22)	0.823
GT / 4b4a	7 (14%)	5 (10%)	1.46 (0.43 – 4.97)	0.538
GT / 4a4a	3 (6%)	0 (0%)	ND	ND
TT / 4b4b	0 (0%)	2 (4%)	ND	ND
TT / 4b4a	2 (4%)	0 (0%)	ND	ND
TT / 4a4a	1 (2%)	0 (0%)	ND	ND
T-786C/ VNTR 4b/a				
TT / 4b4b	13 (26%)	18 (36%)	0.63 (0.27 – 1.47)	0.279
TT / 4b4a	3 (6%)	3 (6%)	1.00 (0.19 – 5.21)	1.000
TT / 4a4a	2 (4%)	0 (0%)	ND	ND
TC / 4b4b	14 (28%)	16 (32%)	0.83 (0.35 – 1.95)	0.663
TC / 4b4a	5 (10%)	12 (24%)	0.35 (0.11 – 1.09)	0.062
TC / 4a4a	5 (10%)	1 (2%)	5.44 (0.61 – 48.39)	0.204
CC / 4b4b	4 (8%)	0 (0%)	ND	ND
CC / 4b4a	4 (8%)	0 (0%)	ND	ND
CC / 4a4a	0 (0%)	0 (0%)	ND	ND

n – broj uzoraka; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; ND – nije određeno;

Tabela 35. Učestalosti haplotipova G894T, T-786C i VNTR 4b/a polimorfizama u grupi preeklampsija i kontrolnoj grupi.

Haplotip (G894T-T-786C-VNTR 4b/a)	Preeklampsija (n=50)	Kontrolna grupa (n=50)	OR (95 % CI)	P vrednost
G – T – 4b	40.9	59.2	0.48 (0.27 – 0.85)	0.011
G – C – 4b	14.1	4.7	3.09 (1.07 – 8.94)	0.030
T – C – 4b	13.7	12.8	1.09 (0.48 – 2.45)	0.841
G – C – 4a	9.4	8.6	1.00 (0.38 – 2.63)	1.000
G – T – 4a	7.7	5.5	1.36 (0.45 – 4.08)	0.578
T – T – 4a	6	0	ND	ND
T – T – 4b	5.4	6.3	0.82 (0.24 – 2.79)	0.752
T – C – 4a	2.9	2.9	1.00 (0.20 – 5.08)	1.000

n – broj uzoraka; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; ND – nije određeno

4.5. POLIMORFIZAM GENA ZA COMT

Eksperimentalna i kontrolna grupa su u Hardy-Weinberg-ovoj ravnoteži za Val158Met polimorfizam gena za COMT (P=0,267 i P=0,464, redom).

Prisustvo Val158Met polimorfizma gena za COMT na oba alela nosi sa sobom 3.7 puta veći rizik za razvoj preeklampsije (OR=3.69, 95%CI (1.14-12.00), P=0.027). Mutacija u homozigotnoj formi za COMT (AA) u odnosu na zbirnu učestalost dominantnih homozigota i heterozigota povećava rizik za pojavu preeklampsije za 3.45 puta (OR=3.45, 95%CI (1.22-9.76), P=0.016) (Tabela 36). Mutirani alel A nosio je blizu 2 puta veći rizik za razvoj preeklampsije u odnosu na divlji tip alela (G) (OR=1.84, 95%CI (1.05-3.23), P=0.047) (Tabela 36).

Tabela 36. Val158Met polimorfizam gena za COMT u preeklampsiji i grupi zdravih trudnica.

COMT	Preeklampsija (n=50)	Kontrolna grupa (n=50)	OR (95% CI)	P vrednost *
GG	13 (26%)	18 (36%)	1.0	
GA	21 (42%)	26 (52%)	1.12 (0.45-2.80)	0.806
AA	16 (32%)	6 (12%)	3.69 (1.14-12.00)	0.027
GG+GA	34 (68%)	44 (88%)		
AA	16 (32%)	6 (12%)	3.45 (1.22-9.76)	0.016
GG	13 (26%)	18 (36%)		
GA+AA	37 (74%)	32 (64%)	1.6 (0.68-3.77)	0.279
Aleli				
G	47 (47%)	62 (62%)		
A	53 (53%)	38 (38%)	1.84 (1.05-3.23)	0.047

n – broj uzoraka; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; COMT – katehol O-metiltransferaza;

*Pearson chi square test

Homozigotna mutacija za COMT 9 puta povećava rizik za pojavu teške forme preeklampsije (OR=9.0, 95%CI (2.09-38.799), P=0.002) (Tabela 37). Homozigoti su značajno češći u grupi teške u odnosu na laku preeklampsiju (P=0.017), sa odnosom šansi 6.75 i 95% intervalom poverenja od 1.32 do 34.57 (Tabela 37). Ovaj rezultat je potvrđen i kada je pojava recesivnog homozigota poređena u odnosu na zbirno prisustvo divljeg tipa i heterozigota (teška preeklampsija u odnosu na kontrolu OR=6.8, 95%CI (2.12-21.57), P=0.001; teška u odnosu na laku preeklampsiju OR=4.85, 95%CI (1.29-18.26), P=0.015) (Tabela 37). Alel A u odnosu na alel G je značajno češće zastupljen u teškoj preeklampsiji u odnosu na kontrolu (P=0.001) i nosi 3 puta veći rizik za razvoj ovog poremećaja (OR=3.17, 95%CI (1.56-6.45)). Takođe, mutirani alel (A) je značajno ređe prisutan kod osoba sa lakim oblikom u odnosu na grupu sa teškom preeklampsijom (P=0.009), sa odnosom šansi 2.91 i 95% intervalom poverenja od 1.29 do 6.57 (Tabela 37).

Tabela 37. Val158Met polimorfizam gena za COMT u lakoj i teškoj preeklampsiji i grupi zdravih trudnica.

COMPT	Laka preeklampsija (n=25)	Teška preeklampsija (n=25)	Kontrolna grupa (n=50)	OR (95% CI)	P vrednost
GG	9 (36%)	4 (16%)	18 (36%)	1.0	
GA	12 (48%)	9 (36%)	26 (52%)	0.92 (0.32-2.64) ^a 1.38 (0.36-5.30) ^b 1.69 (0.39-7.27) ^c	0.888 [*] 0.746 ^{**} 0.718 ^{**}
AA	4 (16%)	12 (48%)	6 (12%)	1.33 (0.30-5.96) ^a 9.0 (2.09-38.79)^b 6.75 (1.32-34.57)^c	1.000 ^{**} 0.002[*] 0.017[*]
GG	9 (36%)	4 (16%)	18 (36%)	1.0	
GA+AA	16 (64%)	21 (84%)	32 (64%)	1.0 (0.37-2.72) ^a 0.34 (0.1-1.14) ^b 0.34 (0.09-1.30) ^c	1.000 [*] 0.073 [*] 0.107 [*]
GG+GA	21 (84%)	13 (52%)	44 (88%)	1.0	
AA	4 (16%)	12 (48%)	6 (12%)	1.4 (0.36-5.49) ^a 6.8 (2.12-21.57)^b 4.85 (1.29-18.26)^c	0.723 ^{**} 0.001[*] 0.015[*]
Aleli					
G	30 (60%)	17 (34%)	62 (62%)	1.0	
A	20 (40%)	33 (66%)	38 (38%)	1.09 (0.54-2.18) ^a 3.17 (1.56-6.45)^b 2.91 (1.29-6.57)^c	0.806 [*] 0.001[*] 0.009[*]

n – broj uzoraka; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; COMT – katehol O-metiltransferaza;

^a laka preeklampsija prema kontrolna grupa; ^b teška preeklampsija prema kontrolna grupa; ^c teška prema laka preeklampsija;

^{*}Pearson chi square, ^{**}Fisher's Exact test

U odnosu na gestacijsku nedelju ispoljavanja preeklampsije, pokazano je da nosilac dvostrukog Val158Met polimorfizma gena za COMT ima 6.5 puta veći rizik za pojavu ranog oblika poremećaja (OR=6.6, 95%CI (1.62-26.87), P=0.006) (Tabela 38). Recesivni model je pokazao povećan rizik za razvoj rane preeklampsije kod osoba sa homozigotnom mutacijom za COMT u odnosu na zbirno prisustvo dominantnog homozigota i heterozigotne forme mutacije (OR=6.72, 95%CI (2.06-21.92), P=0.001) (Tabela 38). Dalje, kada se zajedno posmatraju osobe sa odsustvom mutacije i heterozigoti, prisustvo homozigotne mutacije za COMT je značajno češće u grupi rane u odnosu na kasnu preeklampsiju (P=0.027), sa odnosom šansi 4.03 i 95% intervalom poverenja od 1.13 do 14.36. Mutirani alel za COMT (A) nosi sa sobom skoro 3 puta veći rizik za rani razvoj preeklampsije (OR=2.78, 95%CI (1.35-5.73), P=0.005) (Tabela 38).

Tabela 38. Val158Met polimorfizam gena za COMT u ranoj i kasnoj preeklampsiji i grupi zdravih trudnica.

COMT	Rana preeklampsija (n=23)	Kasna preeklampsija (n=27)	Kontrolna grupa (n=50)	OR (95% CI)	P vrednost
GG	5 (21.7%)	8 (29.6%)	18 (36%)	1.0	
GA	7 (30.4%)	14 (51.9%)	26 (52%)	0.97 (0.27-3.54) ^a	1.000 ^{**}
				0.83 (0.29-2.37) ^b	0.718 [*]
				0.8 (0.19-3.37) ^c	1.000 ^{**}
AA	11 (47.9%)	5 (18.5%)	6 (12%)	6.6 (1.62-26.87) ^a	0.006 [*]
				0.53 (0.12-2.27) ^b	0.465 ^{**}
				3.52 (0.76-16.39) ^c	0.102 [*]
GG	5 (21.7%)	8 (29.6%)	18 (36%)	1.0	
GA+AA	18 (78.3%)	19 (70.4%)	32 (64%)	2.03 (0.64-6.38) ^a	0.224 [*]
				1.34 (0.49-3.66) ^b	0.572 [*]
				1.52 (0.42-5.51) ^c	0.527 [*]
GG+GA	12 (52.2%)	22 (81.5%)	44 (88%)	1.0	
AA	11 (47.8%)	5 (18.5%)	6 (12%)	6.72 (2.06-21.92) ^a	0.001 [*]
				1.67 (0.46-6.01) ^b	0.503 ^{**}
				4.03 (1.13-14.36) ^c	0.027 [*]
Aleli					
G	17 (37%)	30 (55.6%)	62 (62%)	1.0	
A	29 (63%)	24 (44.4%)	38 (38%)	2.78 (1.35-5.73) ^a	0.005 [*]
				1.31 (0.67-2.55) ^b	0.435 [*]
				2.13 (0.95-4.77) ^c	0.063 [*]

n – broj uzoraka; OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; COMT – katehol O-metiltransferaza;

^a rana preeklampsija prema kontrolna grupa; ^b kasna preeklampsija prema kontrolna grupa; ^c rana prema kasna preeklampsija;

^{*}Pearson chi square, ^{**}Fisher's Exact test

4.6. RELATIVNA EKSPRESIJA PROINFLAMATORNIH CITOKINA

U Tabeli 39 je prikazana vrednost relativne ekspresije ispitivanih proinflamatornih citokina u obe studijske grupe. Nivo TNF- α iRNK je bio statistički značajno viši u grupi žena sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice (P=0.006). Takođe, ekspresija IL-1 β je bila značajno viša u grupi slučajeva u odnosu na kontrolu (P=0.005).

Tabela 39. Relativna ekspresija iRNK proinflamatornih citokina u preeklampsiji i zdravoj trudnoći.

Citokin	Preeklampsija (n=50)	Kontrolna grupa (n=50)	P vrednost ^a
TNF-α	0.0493 \pm 0.0616	0.0282 \pm 0.0234	0.006
IL1-β	0.0022 \pm 0.0041	0.0012 \pm 0.0011	0.005
IL-6	0.0019 \pm 0.0022	0.0024 \pm 0.0029	0.216

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija; TNF- α – faktor nekroze tumora α ; IL-1 β – interlekukin-1 β ; IL-6 – interleukin-6; ^aMann-Whitney U test

Nakon podele preeklampsije na podgrupe u odnosu na stepen težine poremećaja, značajno viša ekspresija TNF- α je bila zabeležena i u lakoj (P=0.015) i u teškoj preeklampsiji (P=0.042) u odnosu na kontrolu (Tabela 40). Teška forma preeklampsije je imala i značajno višu ekspresiju IL-1 β u odnosu na zdrave trudnice (P=0.005) (Tabela 40).

Tabela 40. Relativna ekspresija iRNK proinflamatornih citokina u lakoj i teškoj preeklampsiji i zdravoj trudnoći.

Citokin	Laka preeklampsija (n=25)	Teška preeklampsija (n=25)	Kontrolna grupa (n=50)	P vrednost
TNF-α	0.0473 \pm 0.0390	0.0513 \pm 0.0788	0.0282 \pm 0.0234	0.015^a 0.042^b 0.712 ^c
IL1-β	0.0015 \pm 0.0008	0.0029 \pm 0.0057	0.0012 \pm 0.0011	0.068 ^a 0.005^b 0.318 ^c
IL-6	0.0021 \pm 0.0029	0.0017 \pm 0.0012	0.0024 \pm 0.0029	0.183 ^a 0.493 ^b 0.655 ^c

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija; TNF- α – faktor nekroze tumora α ; IL-1 β – interleukin-1 β ; IL-6 – interleukin-6; Mann-Whitney U test – ^alaka preeklampsija vs. kontrola, ^bteška preeklampsija vs. kontrola, ^claka vs. teška preeklampsija

Nakon logaritmovanja vrednosti ekspresije proinflamatornih citokina u cilju dobijanja normalne raspodele, nije došlo do značajnog odstupanja rezultata. I dalje je ekspresija TNF- α bila značajno povišena u obe podgrupe, dok je ekspresija IL-1 β bila povišena samo u podgrupi teške preeklampsije u odnosu na kontrolu (Tabela 41).

Tabela 41. Logaritmovane vrednosti relativne ekspresije iRNK proinflamatornih citokina u lakoj i teškoj preeklampsiji i zdravoj trudnoći.

Citokin	Laka preeklampsija (n=25)	Teška preeklampsija (n=25)	Kontrolna grupa (n=50)	P vrednost
log TNF-α	-1.43 \pm 0.30	-1.47 \pm 0.34	-1.80 \pm 0.73	0.009^a 0.017^b 0.821 ^c
log IL1-β	-2.77 \pm .36	-2.93 \pm 0.37	-3.13 \pm 0.59	0.103 ^a 0.003^b 0.236 ^c
log IL-6	-2.91 \pm 0.44	-2.88 \pm 0.32	-2.83 \pm 0.49	0.488 ^a 0.656 ^b 0.822 ^c

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija; TNF- α – faktor nekroze tumora α ; IL-1 β – interleukin-1 β ; IL-6 – interleukin-6; ANOVA – ^alaka preeklampsija prema kontrola, ^bteška preeklampsija prema kontrola, ^claka prema teška preeklampsija

Kada su posmatrane podgrupe preeklampsije u odnosu na vreme ispoljavanja bolesti, povišena ekspresija TNF- α je zabeležena u obe podgrupe u odnosu na kontrolu (rana P=0.035, kasna P=0.019). Dalje, ekspresija IL-1 β je bila značajno viša u grupi kasne preeklampsije u odnosu na nekomplikovane trudnoće (P=0.007) (Tabela 42).

Tabela 42. Relativna ekspresija iRNK proinflamatornih citokina u ranoj i kasnoj preeklampsiji i zdravoj trudnoći.

Citokin	Rana preeklampsija (n=23)	Kasna preeklampsija (n=27)	Kontrolna grupa (n=50)	P vrednost
TNF-α	0.0529 \pm 0.0818	0.0462 \pm 0.0383	0.0282 \pm 0.0234	0.035^a 0.019^b 0.830 ^c
IL1-β	0.0015 \pm 0.0008	0.0028 \pm 0.0055	0.0012 \pm 0.0011	0.057 ^a 0.007^b 0.370 ^c
IL-6	0.0018 \pm 0.0012	0.0020 \pm 0.0028	0.0024 \pm 0.0029	0.691 ^a 0.119 ^b 0.216 ^c

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija; TNF- α – faktor nekroze tumora α ; IL-1 β – interleukin-1 β ; IL-6 – interleukin-6; Mann-Whitney U test – ^arana preeklampsija prema kontrola, ^bkasna preeklampsija prema kontrola, ^crana prema kasna preeklampsija

Logaritmovanjem prethodno opisanih vrednosti statistička analiza nije pokazala značajno odstupanje. I dalje je značajno viša ekspresija TNF- α bila zabeležena u obe podgrupe preeklampsije (rana P=0.015, kasna P=0.010), dok je IL-1 β bio značajno povišen samo kod kasnog oblika u odnosu na kontrolu (P=0.010) (Tabela 43).

Tabela 43. Logaritmovane vrednosti relativne iRNK ekspresije proinflamatornih citokina u ranoj i kasnoj preeklampsiji i zdravoj trudnoći.

Citokin	Rana preeklampsija (n=23)	Kasna preeklampsija (n=27)	Kontrolna grupa (n=50)	P vrednost
log TNF-α	-1.45 \pm 0.33	-1.45 \pm 0.32	-1.80 \pm 0.73	0.015^a 0.010^b 0.986 ^c
log IL-1β	-2.88 \pm 0.23	-2.82 \pm 0.46	-3.13 \pm 0.59	0.050 ^a 0.010^b 0.656 ^c
log IL-6	-2.84 \pm 0.29	-2.94 \pm 0.45	-2.83 \pm 0.49	0.941 ^a 0.304 ^b 0.424 ^c

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija; TNF- α – faktor nekroze tumora α ; IL-1 β – interleukin-1 β ; IL-6 – interleukin-6; ANOVA – ^arana preeklampsija prema kontrola, ^bkasna preeklampsija prema kontrola, ^crana prema kasna preeklampsija

Analizom povezanosti relativne ekspresije ispitivanih citokina na nivou celog uzorka, dobijena je značajno pozitivna korelacija između ekspresije TNF- α i IL-1 β (Spearman's $\rho=0.380$, $P<0.001$) (Tabela 44). Nako što je izvršeno logaritmovanje ovih vrednosti i dalje je postojala pozitivna korelacija u ekspresiji ova dva citokina (Pearson's $\rho=0.493$, $P<0.001$) (Tabela 45).

Tabela 44. Korelacija relativne ekspresije iRNK proinflamatornih citokina na nivou celog uzorka (Spearman-ov ρ koeficijent korelacije).

	TNF- α	IL-1 β	IL-6
TNF-α	-	0.380 **	0.039 *
IL-1β	0.380 **	-	0.109 [¥]
IL-6	0.039 *	0.109 [¥]	-

TNF- α – faktor nekroze tumora α ; IL-1 β – interleukin-1 β ; IL-6 – interleukin-6;
** značajna korelacija $P < 0.001$; * $P=0.703$; [¥] $P=0.281$

Tabela 45. Korelacija relativne ekspresije iRNK proinflamatornih citokina na nivou celog uzorka (Pearson-ov ρ koeficijent korelacije).

	TNF-α	IL-1β	IL-6
TNF-α	-	0.493 **	-0.019 *
IL-1β	0.493 **	-	0.171 ¥
IL-6	-0.019 *	0.171 ¥	-

TNF- α – faktor nekroze tumora α ; IL-1 β – interleukin-1 β ; IL-6 – interleukin-6;

** značajna korelacija $P < 0.001$; * $P=0.854$; $\text{¥}P=0.090$

Pozitivna korelacija ekspresije ispitivanih citokina posmatrana na nivou grupe žena sa preeklampsijom bila je značajna između IL-1 β i IL-6 (Spearman's $\rho=0.326$, $P=0.021$) (Tabela 46). Nakon svođenja vrednosti citokina na normalnu raspodelu i dalje je postojala statistički značajna pozitivna korelacija između ova dva parametra (Pearson's $\rho=0.296$, $P=0.037$), ali je pokazana pozitivna korelacija između ekspresije TNF- α i IL-1 β (Spearman's $\rho=0.312$, $P=0.028$) (Tabela 47).

Tabela 46. Korelacija relativne iRNK ekspresije proinflamatornih citokina u grupi preeklampsije (Spearman-ov ρ koeficijent korelacije).

	TNF-α	IL-1β	IL-6
TNF-α	-	0.225 *	0.149 ¥
IL-1β	0.225 *	-	0.326 **
IL-6	0.149 ¥	0.326 **	-

TNF- α – faktor nekroze tumora α ; IL-1 β – interleukin-1 β ; IL-6 – interleukin-6;

** značajna korelacija $P=0.021$; * $P=0.116$; $\text{¥}P=0.303$

Tabela 47. Korelacija relativne iRNK ekspresije proinflamatornih citokina u grupi preeklampsija (Pearson-ov ρ koeficijent korelacije).

	TNF-α	IL-1β	IL-6
TNF-α	-	0.312 **	0.160 ¥
IL-1β	0.312 **	-	0.296 *
IL-6	0.160 ¥	0.296 *	-

TNF- α – faktor nekroze tumora α ; IL-1 β – interleukin-1 β ; IL-6 – interleukin-6;

** značajna korelacija $P=0.028$; * značajna korelacija $P=0.037$; $\text{¥}P=0.266$

4.7. ANALIZA POVEZANOSTI ISPITIVANIH PARAMETARA

U Tabeli 48 prikazane su, na nivou celog uzorka (n=100), vrednosti relativne ekspresije TNF- α iRNK kod osoba sa i bez prisutnog polimorfizma gena za GST T1 i M1, eNOS i COMT. Kod osoba koje su bile nosioci Val158Met polimorfizma gena za COMT uočena je značajno viša ekspresija TNF- α u odnosu na žene sa dominantnim homozigotnim alelom (GG) (P=0.012). Relativna ekspresija TNF- α nije bila značajno različita u odnosu na prisustvo/odsustvo ostalih ispitivanih polimorfizama.

Tabela 48. Relativna ekspresija TNF- α iRNK u odnosu na prisustvo polimorfizama za ispitivane gene na nivou celog ispitivanog uzorka.

		TNF- α	P vrednost
GST T1	Delecija (n=42)	0.04428±0.06577	0.481
	Prisutan (n=58)	0.03472±0.02779	
GST M1	Delecija (n=26)	0.03689±0.02548	0.527
	Prisutan (n=74)	0.03938±0.05328	
COMT	GG (n=31)	0.03092±0.03662	0.012
	GA (n=47)	0.04226±0.06086	
	AA (n=22)	0.04220±0.02211	
eNOS G894T	GG (n=55)	0.03276±0.02437	0.540
	GT (n=40)	0.04655±0.06880	
	TT (n=5)	0.04190±0.02488	
eNOS T786C	TT (n=39)	0.03616±0.03557	0.640
	TC (n=53)	0.04076±0.05745	
	CC (n=8)	0.03782±0.02221	
eNOS VNTR	bb (n=65)	0.03381±0.02582	0.088
	ba (n=27)	0.04785±0.08186	
	aa (n=8)	0.04790±0.01780	

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija; GST – glutation S-transferaza; COMT – katehol O-metiltransferaza; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza; TNF- α – faktor nekroze tumora α

Kada je izvršeno poređenje ekspresije TNF- α na nivou 50 ispitanica sa preeklampsijom, rezultati za GST i eNOS genotipove su bili slični, a izgubljena je i značajnost u nivou ekspresije za COMT genotipove (Tabela 49).

Tabela 49. Relativna ekspresija TNF- α iRNK u odnosu na prisustvo polimorfizama za ispitivane gene u grupi trudnica sa preeklampsijom.

		TNF- α	p vrednost
GST T1	Delecija (n=22)	0.06272 \pm 0.08631	0.151
	Prisutan (n=28)	0.03873 \pm 0.02869	
GST M1	Delecija (n=18)	0.04170 \pm 0.02853	0.903
	Prisutan (n=32)	0.05355 \pm 0.07411	
COMT	GG (n=13)	0.04504 \pm 0.05117	0.132
	GA (n=21)	0.05393 \pm 0.08547	
	AA (n=16)	0.04665 \pm 0.02226	
eNOS G894T	GG (n=25)	0.03734 \pm 0.02018	0.891
	GT (n=22)	0.06461 \pm 0.08864	
	TT (n=3)	0.03641 \pm 0.02951	
eNOS T786C	TT (n=18)	0.04231 \pm 0.04288	0.342
	TC (n=24)	0.05834 \pm 0.07998	
	CC (n=8)	0.03782 \pm 0.02221	
eNOS VNTR	bb (n=31)	0.03960 \pm 0.02697	0.465
	ba (n=12)	0.07615 \pm 0.11686	
	aa (n=7)	0.04612 \pm 0.01844	

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija; GST – glutation S-transferaza; COMT – katehol O-metiltransferaza; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza; TNF- α – faktor nekroze tumora α

Kada je u pitanju relativna ekspresija IL-1 β iRNK i njena povezanost sa ispitivanim polimorfizmima na nivou celog uzorka, vrednosti su prikazane u Tabeli 50. Nije uočena povezanost između nivoa ekspresije IL-1 β i prisustva delecionih polimorfizama za GST T1 i GST M1, Val158Met za COMT, G894T, T-786C i VNTR za eNOS.

Tabela 50. Relativna ekspresija IL-1 β iRNK u odnosu na prisustvo polimorfizama za ispitivane gene na nivou celog ispitivanog uzorka.

		IL-1β	P vrednost
GST T1	Delecija (n=42)	0.00131 \pm 0.00095	0.248
	Prisutan (n=58)	0.00198 \pm 0.00389	
GST M1	Delecija (n=26)	0.00152 \pm 0.00131	0.817
	Prisutan (n=74)	0.00176 \pm 0.00345	
COMT	GG (n=31)	0.00139 \pm 0.00124	0.408
	GA (n=47)	0.00136 \pm 0.00088	
	AA (n=22)	0.00286 \pm 0.00614	
eNOS G894T	GG (n=55)	0.00135 \pm 0.00095	0.753
	GT (n=40)	0.00219 \pm 0.00465	
	TT (n=5)	0.00157 \pm 0.00100	
eNOS T786C	TT (n=39)	0.00221 \pm 0.00466	0.307
	TC (n=53)	0.00133 \pm 0.00109	
	CC (n=8)	0.00161 \pm 0.00086	
eNOS VNTR	bb (n=65)	0.00193 \pm 0.00368	0.363
	ba (n=27)	0.00132 \pm 0.00116	
	aa (n=8)	0.00112 \pm 0.00045	

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija; GST – glutation-S-transferaza; COMT – katehol-O-metil transferaza; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza; IL-1 β – interleukin-1 β

Međutim, kada smo izvršili poređenje nivoa ekspresije IL-1 β samo u grupi žena sa preeklampsijom pokazano je da su osobe sa delecionim polimorfizmom za GST T1 imale značajno nižu ekspresiju IL-1 β u odnosu na žene sa pristunim genom (P=0.015). Ostali polimorfizmi nisu bili povezani sa značajnim odstupanjem u nivou ekspresije IL-1 β (Tabela 51).

Tabela 51. Relativna ekspresija IL-1 β iRNK u odnosu na prisustvo polimorfizama za ispitivane gene u grupi trudnica sa preeklampsijom.

		IL-1 β	P vrednost
GST T1	Delecija (n=22)	0.00129 \pm 0.00074	0.015
	Prisutan (n=28)	0.00290 \pm 0.00540	
GST M1	Delecija (n=18)	0.00149 \pm 0.00121	0.113
	Prisutan (n=32)	0.00259 \pm 0.00506	
COMT	GG (n=13)	0.00174 \pm 0.00128	0.914
	GA (n=21)	0.00157 \pm 0.00090	
	AA (n=16)	0.00337 \pm 0.00713	
eNOS G894T	GG (n=25)	0.00159 \pm 0.00091	0.670
	GT (n=22)	0.00291 \pm 0.00613	
	TT (n=3)	0.00197 \pm 0.00086	
eNOS T786C	TT (n=18)	0.00334 \pm 0.00671	0.526
	TC (n=24)	0.00153 \pm 0.00100	
	CC (n=8)	0.00161 \pm 0.00086	
	bb (n=31)	0.00264 \pm 0.00518	
	ba (n=12)	0.00166 \pm 0.00082	
	aa (n=7)	0.00113 \pm 0.00049	0.310

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija; GST – glutation S-transferaza; COMT – katehol O-metiltransferaza; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza; IL-1 β – interleukin-1 β

Relativna ekspresija IL-6 iRNK na nivou celog uzorka nije pokazala statistički značajno odstupanje u odnosu na prisustvo/odsustvo ispitivanih polimorfizama gena za GST, COMT i eNOS (Tabela 52).

Tabela 52. Relativna ekspresija IL-6 iRNK u odnosu na prisustvo polimorfizama za ispitivane gene na nivou celog ispitivanog uzorka.

		IL-6	P vrednost
GST T1	Delecija (n=42)	0.00150±0.00100	0.196
	Prisutan (n=58)	0.00264±0.00315	
GST M1	Delecija (n=26)	0.00132±0.00091	0.065
	Prisutan (n=74)	0.00246±0.00285	
COMT	GG (n=31)	0.00196±0.00146	0.838
	GA (n=47)	0.00235±0.00312	
	AA (n=22)	0.00202±0.00242	
eNOS G894T	GG (n=55)	0.00207±0.00188	0.316
	GT (n=40)	0.00243±0.00334	
	TT (n=5)	0.00094±0.00068	
eNOS T786C	TT (n=39)	0.00246±0.00342	0.970
	TC (n=53)	0.00188±0.00152	
	CC (n=8)	0.00254±0.00308	
eNOS VNTR	bb (n=65)	0.00242±0.00295	0.301
	ba (n=27)	0.00178±0.00150	
	aa (n=8)	0.00128±0.00113	

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija; GST – glutation S-transferaza; COMT – katehol O-metiltransferaza; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza; IL-6 – interleukin-6

Kada je ispitivanje relativne iRNK ekspresije IL-6 posmatrano samo u grupi preeklampsije, pokazano je da je u slučaju delecionog polimorfizma za GST M1 značajno snižena ekspresija IL-6 u odnosu na osobe sa prisutnim genom (P=0.015). Ostali rezultati se nisu značajno razlikovali u odnosu na dobijene vrednosti na nivou celog studijskog uzorka (Tabela 53).

Tabela 53. Relativna iRNK ekspresija IL-6 u odnosu na prisustvo polimorfizama za ispitivane gene u grupi trudnica sa preeklampsijom.

		IL-6	P vrednost
GST T1	Delecija (n=22)	0.00155±0.00108	0.899
	Prisutan (n=28)	0.00219±0.00275	
GST M1	Delecija (n=18)	0.00103±0.00065	0.015
	Prisutan (n=32)	0.00240±0.00257	
COMT	GG (n=13)	0.00127±0.00102	0.302
	GA (n=21)	0.00224±0.00217	
	AA (n=16)	0.00198±0.00282	
eNOS G894T	GG (n=25)	0.00194±0.00209	0.998
	GT (n=22)	0.00195±0.00246	
	TT (n=3)	0.00130±0.00062	
eNOS T786C	TT (n=18)	0.00221±0.00285	0.801
	TC (n=24)	0.00146±0.00091	
	CC (n=8)	0.00254±0.00308	
eNOS VNTR	bb (n=31)	0.00229±0.00262	0.227
	ba (n=12)	0.00149±0.00106	
	aa (n=7)	0.00093±0.00057	

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija; GST – glutation S-transferaza; COMT – katehol O-metiltransferaza; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza; IL-6 – interleukin 6

Vrednost BMI pre trudnoće je bila značajno veća u grupi preeklampsije u odnosu na kontrolu (Tabela 16). Međutim, kada smo u okviru grupe žena sa preeklampsijom ispitivali vrednost BMI u odnosu na prisustvo ispitivanih genskih polimorfizama, nismo uspeli da ustanovimo međusobnu povezanost (Tabela 54). Relativna ekspresija proinflamatornih citokina nije bila u korelaciji sa vrednostima BMI pre trudnoće na nivou studjske grupe (n=50) (Tabela 55), čak i nakon svođenja njihovih vrednosti na normalnu raspodelu (Tabela 56).

Tabela 54. BMI pre trudnoće u odnosu na prisustvo polimorfizama ispitivanih gena u grupi žena sa preeklampsijom.

		BMI pre trudnoće	P vrednost
GST T1	Delecija (n=22)	25.45±5.01	0.987 ^a
	Prisutan (n=28)	25.47±3.87	
GST M1	Delecija (n=18)	25.61±4.30	0.852 ^a
	Prisutan (n=32)	25.37±4.45	
COMT	GG (n=13)	24.48±3.57	0.595 ^b
	GA (n=21)	25.54±3.74	
	AA (n=16)	26.15±5.64	
eNOS G894T	GG (n=25)	25.95±3.64	0.567 ^b
	GT (n=22)	25.21±5.25	
	TT (n=3)	23.23±2.37	
eNOS T786C	TT (n=18)	24.14±2.58	0.181 ^b
	TC (n=24)	26.63±5.50	
	CC (n=8)	24.92±2.81	
eNOS VNTR	bb (n=31)	24.68±3.78	0.164 ^b
	ba (n=12)	25.94±2.69	
	aa (n=7)	28.06±7.67	

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija; GST – glutation S-transferaza; COMT – katehol O-metiltransferaza; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza; BMI – indeks telesne mase; ^aStudent's T test ^bANOVA;

Tabela 55. Korelacija relativne ekspresije iRNK proinflamatornih citokina i vrednosti BMI kod žena sa preeklampsijom.

BMI pre trudnoće		
	Spearman-ov ρ koeficijent korelacije	P vrednost
TNF-α	0.259	0.070
IL-1β	-.044	0.764
IL-6	0.224	0.119

BMI – indeks telesne mase; TNF-α – faktor nekroze tumora α; IL-1β – interleukin-1β; IL-6 – interleukin-6

Tabela 56. Korelacija logaritmovane relativne ekspresije iRNK proinflamatornih citokina i vrednosti BMI kod žena sa preeklampsijom.

	BMI pre trudnoće	
	Pearson-ov ρ koeficijent korelacije	P vrednost
TNF-α	0.232	0.104
IL-1β	0.077	0.595
IL-6	0.137	0.344

BMI – indeks telesne mase; TNF- α – faktor nekroze tumora α ; IL-1 β – interleukin-1 β ; IL-6 – interleukin-6

Učestalost ukupnog broja pobačaja bila je slična između ispitivanih grupa. Ovakav rezultat je zadržan i kada je poređena učestalost spontanih pobačaja (Tabela 18). Relativna ekspresija TNF- α , IL-1 β i IL-6 je bila slična u grupi preeklampsije bez obzira na prethodno zabeleženu pojavu pobačaja (Tabela 57). U grupi preeklampsije ispitivali smo prethodnu pojavu pobačaja (ukupnih i spontanih) u odnosu na prisustvo posmatranih polimorfizama gena za GST, COMT i eNOS. Broj pobačaja se nije značajno razlikovao između ispitivanih genotipova (Tabela 58).

Tabela 57. Korelacija relativne ekspresije iRNK proinflamatornih citokina i pretodnih pobačaja kod žena sa preeklampsijom.

	Pobačaji		P vrednost	Spontani pobačaj		P vrednost
	Ne (n=35)	Da (n=15)		Ne (n=41)	Da (n=9)	
TNF-α	0.03947±0.03013	0.07219±0.10129	0.512	0.04099±0.03075	0.08707±0.12857	0.705
IL-1β	0.00164±0.00088	0.00348±0.00742	0.719	0.00166±0.00098	0.00460±0.00955	0.985
IL-6	0.00165±0.00133	0.00250±0.00344	0.891	0.00159±0.00126	0.00333±0.00430	0.581

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija; TNF- α – faktor nekroze tumora α ; IL-1 β – interleukin-1 β ; IL-6 – interleukin-6

Tabela 58. Učestalost prethodnih pobačaja u odnosu na prisustvo polimorfizama ispitivanih gena u grupi žena sa preeklampsijom.

		Pobačaji		<i>P</i>	Spontani pobačaji		<i>P</i>
		Ne (n=35)	Da (n=15)	vrednost	Ne (n=41)	Da (n=9)	vrednost
GST T1	Delecija (n=22)	16 (72.7%)	6 (27.3%)	0.709 ^a	19 (86.4%)	3 (13.6%)	0.713 ^b
	Prisutan (n=28)	19 (67.9%)	9 (32.1%)		22 (78.6%)	6 (21.4%)	
GST M1	Delecija (n=18)	13 (72.2%)	5 (27.8%)	0.797 ^a	15 (83.3%)	3 (16.7%)	1.000 ^b
	Prisutan (n=32)	22 (68.8%)	10 (31.3%)		26 (81.3%)	6 (18.8%)	
COMT	GG (n=13)	9 (69.2%)	4 (30.8%)	0.925 ^b	11 (84.6%)	2 (15.4%)	0.729 ^b
	GA (n=21)	14 (66.7%)	7 (33.3%)		16 (76.2%)	5 (23.8%)	
	AA (n=16)	12 (75.0%)	4 (25.0%)		14 (87.5%)	2 (12.5%)	
					22 (88.0%)	3 (12.0%)	
eNOS G894T	GG (n=25)	20 (80.0%)	5 (20.0%)	0.215 ^b	17 (77.3%)	5 (22.7%)	0.394 ^b
	GT (n=22)	13 (59.1%)	9 (40.9%)		2 (66.7%)	1 (33.3%)	
eNOS T786C	TT (n=3)	2 (66.7%)	1 (33.3%)	0.768 ^a	15 (83.3%)	3 (16.7%)	0.330 ^b
	TT (n=18)	12 (66.7%)	6 (33.3%)		21 (87.5%)	3 (12.5%)	
	TC (n=24)	18 (75.0%)	6 (25.0%)		5 (62.5%)	3 (37.5%)	
eNOS VNTR	CC (n=8)	5 (62.5%)	3 (37.5%)	0.180 ^b	25 (80.6%)	6 (19.4%)	0.434 ^b
	bb (n=31)	20 (64.5%)	11 (35.5%)		9 (75.0%)	3 (25.0%)	
	ba (n=12)	8 (66.7%)	4 (33.3%)		7 (100.0%)	0 (0.0%)	
	aa (n=7)	7 (100.0%)	0 (0.0%)				

n – broj uzoraka; GST – glutation-S-transferaza; COMT – katehol-O-metil transferaza; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza;

^aPearson chi square test, ^bFisher's Exact test

Pušački status je bio sličan u grupi preeklampsija i grupi zdravih trudnica (Tabela 18). U grupi preeklampsija učestalost pušenja se nije značajno razlikovala nakon podele u odnosu na ispitivane genotipove za GST T1 i GST M1, COMT i eNOS (Tabela 59). Dalje, nivo ekspresije proinflamatornih citokina nije pokazao značajno odstupanje u odnosu na pušački status u grupi trudnica sa preeklampsijom (Tabela 60).

Tabela 59. Učestalost pušenja u odnosu na prisustvo polimorfizama ispitivanih gena u grupi žena sa preeklampsijom.

		Pušenje		P vrednost
		Da (n=15)	Ne (n=35)	
GST T1	Delecija (n=22)	7 (31.8%)	15 (68.2%)	0.804 ^a
	Prisutan (n=28)	8 (28.6%)	20 (71.4%)	
GST M1	Delecija (n=18)	8 (44.4%)	10 (55.6%)	0.095 ^a
	Prisutan (n=32)	7 (21.9%)	25 (78.1%)	
COMT	GG (n=13)	4 (30.8%)	9 (69.2%)	0.925 ^b
	GA (n=21)	7 (33.3%)	14 (66.7%)	
	AA (n=16)	4 (25.0%)	12 (75.0%)	
eNOS G894T	GG (n=25)	9 (36.0%)	16 (64.0%)	0.626 ^b
	GT (n=22)	5 (22.7%)	17 (77.3%)	
	TT (n=3)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	
eNOS T786C	TT (n=18)	3 (16.7%)	15 (83.3%)	0.070 ^b
	TC (n=24)	7 (29.2%)	17 (70.8%)	
	CC (n=8)	5 (62.5%)	3 (37.5%)	
eNOS VNTR	bb (n=31)	8 (25.8%)	23 (74.2%)	0.618 ^b
	ba (n=12)	5 (41.7%)	7 (58.3%)	
	aa (n=7)	2 (28.6%)	5 (71.4%)	

n – broj uzoraka; GST – glutation S-transferaza; COMT – katehol O-metiltransferaza; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza;

^aPearson chi square test ^bFisher's Exact test

Tabela 60. Korelacija relativne ekspresije iRNK proinflamatornih citokina i pušačkog statusa kod žena sa preeklampsijom.

	Pušenje		P vrednost
	Da (n=15)	Ne (n=35)	
TNF-α	72.01 \pm 99.42	39.55 \pm 32.67	0.141
IL-1β	1.88 \pm 1.21	2.33 \pm 4.88	0.472
IL-6	2.14 \pm 2.33	1.81 \pm 2.14	0.271

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna devijacija; TNF- α – faktor nekroze tumora α ; IL-1 β – interlekukin-1 β ; IL-6 – interleukin-6

Iako je pojava IUZR-a bila značajno češća u grupi preeklampsija u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 19), analiza prikupljenih podataka nije uspela da pokaže povezanost prisustva IUZR-a i ispitivanih polimorfizama gena za GST, COMT i eNOS u grupi žena sa ovim poremećajem u trudnoći (Tabela 61). Takođe, relativna iRNK ekspresija TNF- α , IL-1 β i IL-6 se nije značajno razlikovala kod trudnica sa preeklampsijom i registrovanim IUZR-om u odnosu na trudnoće komplikovane ovim poremećajem, ali sa normalnim rastom i razvojem ploda (Tabela 62).

Tabela 61. Intrauterusni zastoj u rastu ploda u odnosu na prisustvo polimorfizama ispitivanih gena u grupi žena sa preeklampsijom.

		IUZR		P vrednost
		Da (n=14)	Ne (n=36)	
GST T1	Delecija (n=22)	8 (36.4%)	14 (63.6%)	0.243 ^a
	Prisutan (n=28)	6 (21.4%)	22 (78.6%)	
GST M1	Delecija (n=18)	4 (22.2%)	14 (77.8%)	0.495 ^a
	Prisutan (n=32)	10 (31.3%)	22 (68.8%)	
COMT	GG (n=13)	2 (15.4%)	11 (84.6%)	0.449 ^b
	GA (n=21)	6 (28.6%)	15 (71.4%)	
	AA (n=16)	6 (37.5%)	10 (62.5%)	
eNOS G894T	GG (n=25)	8 (32.0%)	17 (68.0%)	0.789 ^b
	GT (n=22)	5 (22.7%)	17 (77.3%)	
	TT (n=3)	1 (33.3%)	2 (66.7%)	
eNOS T786C	TT (n=18)	5 (27.8%)	13 (72.2%)	0.583 ^b
	TC (n=24)	8 (33.3%)	16 (66.7%)	
	CC (n=8)	1 (12.5%)	7 (87.5%)	
eNOS VNTR	bb (n=31)	7 (22.6%)	24 (77.4%)	0.486 ^b
	ba (n=12)	4 (33.3%)	8 (66.7%)	
	aa (n=7)	3 (42.9%)	4 (57.1%)	

n – broj uzorka; GST – glutation-S-transferaza; COMT – katehol-O-metil transferaza; eNOS – endotelna azot oksid sintetaza;

^aPearson chi square test; ^bFisher's Exact test

Tabela 62. Relativna iRNK ekspresija proinflamatornih citokina u odnosu na prisustvo intrauterusnog zastoja u rastu ploda u grupi žena sa preeklampsijom.

	IUZR		P vrednost
	Da (n=14)	Ne (n=36)	
TNF-α	0.067231±0.1040	0.04231±0.03320	0.658
IL-1β	0.00362±0.00765	0.00164±0.00095	0.871
IL-6	0.00206±0.00287	0.00184±0.00190	0.589

n – broj uzoraka; rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost±standardna devijacija; TNF- α – faktor nekroze tumora α ; IL-1 β – interlekukin-1 β ; IL-6 – interleukin-6

5. DISKUSIJA

Preeklampsija predstavlja najčešći oblik hipertenzivnih poremećaja u trudnoći, koji je povezan sa višestrukim rizikom za nepovoljni maternalni i perinatalni ishod. Do sada su uloženi veliki naponi kako bi se utvrdila priroda ovog poremećaja i ustanovili dijagnostički testovi za njenu predikciju i prevenciju. Međutim, iako je ostvaren veliki pomak u razumevanju etiopatogeneze ovog poremećaja, još uvek nisu utvrđeni tačni mehanizmi i procesi koji dovode do razvoja preeklampsije.

Naša studija obuhvatila je jednak broj trudnica sa preeklampsijom i normotenzivnih trudnica sa nekomplikovanom trudnoćom. Poznato je da se ekspresija i produkcija određenih faktora razlikuje u zavisnosti od perioda trudnoće, te je uzorkovanje u istom gestacijskom periodu obezbedilo adekvatno poređenje i utvrđivanje potencijalnih razlika između ispitivanih grupa. Uparivanjem slučajeva i kontrola smo eliminisali neke od potencijalnih faktora koji bi mogli dodatno uticati na pojavu preeklampsije, s obzirom da je poznato da starost preko 40 godina, prva trudnoća, kao i višeploidne trudnoće, nose sa sobom povišen rizik za razvoj preeklampsije (6). Hronična hipertenzija, hronične bolesti bubrega, diabetes mellitus tip 1 i 2, trombofilija, sistemski lupus eritematosus, vantelesno oplodjenje su faktori koji dodatno povećavaju verovatnoću za razvoj preeklampsije (6), stoga su sve trudnice uključene u ovo istraživanje prethodno bile zdrave i dale su podatak o spontanom začecu. Prema podacima usmeno dobijenim od svih ispitanica, u porodičnoj anamnezi nije bilo zabeležene pojave preeklampsije, još jednog potencijalnog faktora rizika za njenu pojavu (6). U grupi od 50 žena sa preeklampsijom, njih 5 je dalo podatak o pojavi preeklampsije u prethodnoj trudnoći, dok među zdravim trudnicama nije bilo podataka o komplikacijama u prethodnim trudnoćama. Takođe, postoje dokazi da gojaznost predstavlja doprinoseći faktor rizika za nastanak preeklampsije, uz prisutne patološke mehanizme koji se dešavaju na nivou placente tokom rane trudnoće. U našoj grupi žena sa preeklampsijom BMI je bio značajno veći i pre i u trudnoći u odnosu na normotenzivne trudnice. Pre trudnoće srednja vrednost BMI je u grupi slučajeva iznosila $25.46 \pm 4.36 \text{ kg/m}^2$, a u kontrolnoj grupi $21.30 \pm 2.49 \text{ kg/m}^2$. U trudnoći ove vrednosti su iznosile $30.57 \pm 4.90 \text{ kg/m}^2$ za preeklampsiju, odnosno $26.17 \pm 3.25 \text{ kg/m}^2$ za zdrave trudnice. Kao što je bilo i očekivano, vrednosti sistolnog i

dijastolnog krvnog pritiska su bile značajno veće u grupi žena sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice. Trombocitopenija ($< 100000/\text{mm}^3$) predstavlja jedan od dijagnostičkih kriterijuma za preeklampsiju i u direktnoj je korelaciji sa stepenom težine poremećaja. Pokazano je da je kod 50% trudnica sa preeklampsijom zabeležen broj trombocita ispod $150000/\text{mm}^3$, dok je ispod $100000/\text{mm}^3$ imalo 36% žena (12). U našim grupama srednja vrednost broja trombocita je bila u referentnim vrednostima i nije se značajno razlikovala bez obzira na prisustvo preeklampsije. Što se tiče pokazatelja bubrežne funkcije, kvantitativna i kvalitativna proteinurija, protein/kreatinin odnos i vrednosti serumske uree su bile značajno veće u grupi sa preeklampsijom, dok je nivo serumskog kreatinina u obe grupe bio sličan i u referentnim vrednostima. Bez obzira što spada u dijagnostičke kriterijume, jedno istraživanje je pokazalo da serumske vrednosti kreatinina imaju nisku senzitivnost i nisku pozitivnu prediktivnu vrednost za procenu težine preeklampsije (429). Proteinurija može biti posledica gubitka glomerularne selektivnosti i za veličinu i za količinu proteina koju je potrebno filtrirati (430). Kao verovatna posledica urinarnog gubitka proteina, naše istraživanje je pokazalo da je srednja vrednost nivoa ukupnih serumskih proteina bila značajno manja u grupi žena sa preeklampsijom u odnosu na kontrolu, što je u korelaciji sa rezultatima prethodnih istraživanja (431). Poremećaj funkcije jetre posmatrano kao udvostručavanje nivoa aktivnosti jetrih transaminaza, predstavlja još jedan znak preeklampsije. Pretpostavlja se da povećanje aktivnosti ovih enzima nastaje usled hipoksičnog efekta na jetru koji dovodi do nekroze i posledične degeneracije hepatocita (432). Naši rezultati nisu pokazali povećanje aktivnost transaminaza iznad referentnih vrednosti u grupi sa preeklampsijom, ali je nivo ASTa bio značajno viši u grupi sa preeklampsijom u odnosu na kontrolu. Pokazano je da testovi za procenu funkcije jetre imaju umerenu specifičnost i senzitivnost u proceni težine preeklampsije (433). Martin i saradnici (434) su predložili protokol za brzu procenu težine preeklampsije koji podrazumeva evaluaciju prisutnih simptoma uz serumski nivo AST, ALT, LDH, mokraćne kiseline, kreatinina i proteinurije. Studija iz 2008. godine (435) je pokazala da je 53% trudnica imalo poremećaj makar jednog markera za procenu funkcije jetre. Nivo LDH u našoj grupi slučajeva je pokazao značajno povišenu aktivnost u odnosu na zdrave normotenzivne trudnice. Vrednosti mokraćne kiseline su bile značajno povišene u grupi slučajeva

(353.00±97.84 μmol/L) u odnosu na kontrolu (252.52±59.02 μmol/L). Mokraćna kiselina, kao marker oksidativnog stresa, povrede tkiva i renalne disfunkcije, pokazuje povećanje vrednosti u uslovima hipoksije i ishemije posteljice (6). Iako ne spada u kriterijume za postavljanje dijagnoze, prisustvo povišene vrednosti mokraćne kiseline kod žena sa preeklampsijom nosi sa sobom povišen rizik za pojavu komplikacija i loših ishoda trudnoće, te nam ovaj podatak može pomoći u pravovremenom zbrinjavanju ove grupe trudnica (19). Pokazana je značajno veća srednja vrednost mokraćne kiseline u grupi sa teškom u odnosu na grupu sa lakom preeklampsijom (429). Osim toga, povišena koncentracija mokraćne kiseline je pokazana kao korisna u identifikaciji žena sa gestacijskom hipertenzijom koje su u povećanom riziku za razvoj preeklampsije (72, 73). Studija iz 2011. godine je pokazala da gornja granica mokraćne kiseline od 309 μmol/L ima pozitivnu prediktivnu vrednost za progresiju gestacijske hipertenzije u preeklampsiju od 93.3%, i 71.1% specifičnost za rođenje detata malog za gestacijsku starost (engl. *small for gestational age* - SGA) (74). Vrednosti serumske CK su bile značajno povišene u grupi sa preeklampsijom u odnosu na normotenzivne trudnice. Studija na RUPP modelu pacova pokazala je izraženo oštećenje miokarda, koje je prikazano kroz povišene vrednosti CK, ali i drugih srčanih markera poput mioglobina, troponina i moždanog natriuretskog peptida (436). Uz CK, serumske vrednosti AST, ALT, i LDH predstavljaju senzitivne pokazatelje za procenu težine miokardnog oštećenja.

Tokom uredne trudnoće, površina endotela je tromborezistentna i uspešno se štiti od stvaranja ugrušaka (437). Sa druge strane, pretpostavlja se da endotelna disfunkcija koja leži u osnovi preeklampsije remeti lokalne antikoagulantne mehanizme, što za posledicu ima znatno veći rizik za pojavu tromba. Stanje povećane koagulabilnosti u posteljličnoj mikrovaskularnoj mreži podrazumeva, ne samo poremećaj koagulacije, već i promene u fibrinolitičkom sistemu (438). Plazma nivo fibrinogena varira kako na individualnom nivou, tako i u zavisnosti od drugih parametara zapaljenja. Tokom normalne trudnoće, vrednosti fibrinogena rastu, a kod žena sa preeklampsijom one su još izraženije (438, 439). Dodatno, usled njegovog značaja u formiranju krvnog ugruška, pokazana je interakcija fibrinogena sa antiangiogenim faktorima, poput fibroblastnog faktora rasta-2 (12) i VEGF (13). Naše

trudnice sa preeklampsijom su pokazale značajno veće vrednosti fibrinogena (4.79 ± 1.51 g/L) u odnosu na kontrolu (3.79 ± 1.37 g/L) ($P=0.001$), što je u saglasnosti sa prethodno navedenim rezultatima.

Prema nedavnim izveštajima, izrazito visoke vrednosti hemoglobina mogu pomoći u predikciji preeklampsije, posebno kada je izmeren tokom prvog ili drugog trimestra (440-442). Pokazano je takođe da su izrazito visoke vrednosti hemoglobina povezane i sa drugim poremećajima, poput dijabetesa, gestacijske hipertenzije, pretermanskog porođaja i SGA (441-444). Naši rezultati su u suprotnosti sa prethodno navedenim istraživanjima, s obzirom da je srednja vrednost hemoglobina u grupi preeklampsije iznosila 111.89 ± 11.64 g/L i bila je značajno manja u odnosu na vrednost od 116.64 ± 9.35 g/L u grupi zdravih trudnica. Razlog za ovo neslaganje može biti vreme ispitivanja, s obzirom da je najveći broj uzoraka od naših ispitanica uzet posle 28 nedelje gestacije, odnosno tokom trećeg trimestra.

Klinički prisutan edem i/ili ubrzano povećanje telesne mase, mogu da povećaju sumnju na razvoj preeklampsije, ali ovi znakovi ne spadaju u dijagnostičke kriterijume. Naši rezultati su pokazali značajno češću pojavu edema kod žena sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice (86% prema 28%). Nezavisna pojava edema se javlja u 10-15% trudnica koje su normotenzivne tokom čitave trudnoće, što ga čini nespecifičnim i nesenzitivnim znakom za preeklampsiju (21).

Preeklampsija predstavlja jedan od najčešćih uzroka maternalnog i neonatalnog morbiditeta i mortaliteta. Težina poremećaja je u direktnoj korelaciji sa stepenom rizika od pojave komplikacija ovih trudnoća. Iako preeklampsija ne predstavlja apsolutnu indikaciju za carski rez, učestalost ovog načina završetka porođaja se povećava što je gestacija manja i ukoliko dođe do razvoja teških formi poremećaja (6). Naše istraživanje je pokazalo značajno veću učestalost carskog reza u grupi slučajeva u odnosu na zdrave trudnice. U grupi zdravih trudnica jedino je kod jedne žene bio zabeležen pretermanski porođaj, dok je kod ostalih ispitanica porođaj bio u terminu. Sa druge strane, grupa sa preeklampsijom je imala 15 (30%) slučajeva pretermanskog i 12 (24%) žena sa pretermanskim porođajem, što znači da je više od pola trudnoća komplikovanih preeklampsijom moralo biti završeno pre termina. Srednja vrednost gestacijske nedelje porođaja je bila značajno niža u grupi sa

preeklampsijom (35.64 ± 3.44) u odnosu na grupu nekomplikovanih trudnoća (39.16 ± 1.17). Neki klinički pokazatelji, čak i kada dijagnoza preeklampsije nije potvrđena, nameću potrebu za temeljnim ispitivanjem trudnice. Jedan od njih je i pojava IUZR zabeležena u drugoj polovini trudnoće (16, 17). Naše istraživanje je pokazalo da je zastoj u rastu ploda značajno češće registrovan u trudnoćama komplikovanim preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice. Pretpostavlja se da se ovaj poremećaj dešava usled smanjenog snabdevanja fetusa nutritivnim elementima nastalog kao posledica loše placentacije i neadekvatnog remodelovanja spiralnih arterija. Srednja vrednost telesne mase na rođenju u grupi sa preeklampsijom je iznosila $2.467.00 \pm 934.30$ g, a u kontrolnoj grupi $3.458.80 \pm 508.71$ g, što potvrđuje i češće prisustvo SGA u grupi slučajeva.

Što se tiče posmatranih negativnih perinatalnih i neonatalnih ishoda, učestalost je značajno bila češća nakon trudnoća komplikovanih preeklampsijom u odnosu na nekomplikovane trudnoće. Među njima su značajno niži Apgar skor u 1. i 5. minutu i antropometrijske mere deteta na rođenju, značajno češća pojava respiratornog distres sindroma, konvulzija, intraventrikularne hemoragije, anemije, žutice, perinatalne infekcije. Potrebe za završetkom trudnoće pre termina usled nastalih komplikacija preeklampsije i potvrde o ugroženosti majke i deteta, predstavlja najverovatniji uzrok za pojavu loših neonatalnih ishoda. Velika učestalost ovih komplikacija nameće potrebu za produženom negom i pojačanim monitoringom ove grupe novorođenčadi, što objašnjava dobijen rezultat da su boravak u neonatalnoj poluintenzivnoj i/ili intenzivnoj nezi, kao i dužina hospitalizacije značajno produženi nakon trudnoća sa preeklampsijom u odnosu na nekomplikovane trudnoće.

Tokom normalne trudnoće, maternalna intraplacentarna cirkulacija uspostavljena na kraju prvog trimestra, obezbeđuje snižen otpor krvnom protoku, koji je neophodan za adekvatno snabdevanje ploda svim potrebnim nutritivnim elementima. U ovakvoj sredini doći će do povećanja relativne koncentracije kiseonika, usled čega nastaje pojačana produkcija slobodnih kiseoničnih radikala (445), koji se u normalnoj trudnoći uspešno uklanjaju delovanjem mehanizama za detoksifikaciju. Međutim, ukoliko antioksidantni sistem nije u mogućnosti da adekvatno odgovori na povišenu sintezu prooksidanasa doći će do pojave oksidativnog stresa (446, 447) za koji se smatra da ima značajnu ulogu u

patofiziologiji preeklampsije (445, 448). Odavno je prepoznata uloga genetičkih faktora kao doprinosećih činilaca u razvoju preeklampsije, uključujući i uticaj polimorfizama brojnih gena, koji kodiraju proteine sa različitim funkcijama u organizmu. GST, važna familija antioksidantnih enzima, katalizuje konjugaciju redukovane forme glutationa i ksenobiotika u cilju njihove detoksifikacije (449). Do sada je nekoliko studija pokušalo da ispita ulogu GST gena u preeklampsiji (239, 241-244, 450), ali je jedino delecija GST P1 gena dovedena u vezu sa povećanim rizikom za pojavu ovog poremećaja (450).

Delecioni polimorfizam za GST M1 i/ili GST T1 gene je doveden u vezu sa različitim poremećajima, poput oralnog karcinoma (231), cervikalne neoplazije (232), karcinoma dojke (233), glaukoma (234), hepatocelularnog karcinoma (235), sindroma policističnih jajnika (451), diabetes mellitus-a tip 1 i 2 (236, 452), arteroskleroze (453), koronarne bolesti (454), hipertenzije (455) i drugo. Do sada je nekoliko studija ispitivalo vezu između GST M1 i GST T1 polimorfizama i pojave preeklampsije i dobijeni su vrlo oprečni rezultati. Studija sprovedena na populaciji Meksikanki pokazala je povišen rizik za preeklampsiju u prisustvu GST T1 nultog genotipa i još izraženiji porast rizika kod nosilaca homozigotne delecije i za GST M1 i za GST T1 gen (237). Suprotno ovome, studija na populaciji Kineskinja je opisala čak protektivan efekat GST T1 delecije (238), dok ostale studije nisu uspele da ustanove vezu između GST delecionog polimorfizma i preeklampsije (239-243, 450). Naši rezultati su pokazali da homozigotni nosioci GST M1 delecionog polimorfizma imaju značajno veći rizik za pojavu preeklampsije. Kada smo posmatrali kombinaciju genotipova, pokazano je da GST M1- / GST T1+ genotip nosi 3.5 puta veći rizik za razvoj preeklampsije. Razlika u dobijenim rezultatima u odnosu na ostale studije se može objasniti geografsko-etničkim specifičnostima.

Učestalost GST M1 nultog genotipa kod bele rase u celini iznosi oko 40–50%, dok je u Evropskoj populaciji zabeležena u svega 10-30% (456). Homozigotna delecija za GST T1 gen se u beloj rasi javlja u 13–28%, kod Azijata u oko 60%, a u afričkoj populaciji u 40% (457, 458). Naša studija je pokazala prisustvo homozigotne delecije za GST M1 gen u 36%, a za GST T1 gen u 44% kod žena sa preeklampsijom, odnosno 16% i 40% kod zdravih trudnica. Ova distribucija se razlikovala u drugim populacijama, pa je tako kod žena

meksičke Mestizo populacije distribucija između ove dve grupe iznosila po 44% za GST M1 deleciju i 10% odnosno 18% za GST T1 nultigenotip (237). Kod Kineskinja sa preeklampsijom i zdravih trudnica ovaj procenat je iznosio 54% i oko 60% za GST M1 nulti genotip, odnosno 46% i 50% za GST T1 deleciju (238). U Turskoj populaciji žena GST M1 delecioni polimorfizam je zabeležen u 58% preeklampsija, i 55% kontrola, a gledajući na nivou celog uzorka učestalost ovog polimorfizma je iznosila 56%. Što se tiče GST T1 nultog genotipa učestalost je bila 22% u grupi preeklampsija, 24% u kontrolnoj grupi, a na nivou celog uzorka 23% (239).

U prethodnim istraživanjima zabeležena je povišena GST enzimska aktivnost u grupi žena sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice (459). S obzirom da naša studija nije ispitivala nivo GST (ukupnog i različitih izoenzima) ne možemo reći da li je povišena aktivnost opisana od strane prethodnih istraživača ustvari kompenzatorni mehanizam drugih izoenzima kao odgovor na prisustvo delecionog polimorfizma za GST M1 i/ili GST T1 gen, koji inače dovodi do potpunog odusustva sinteze proteina. U istraživanju koje je ispitivalo povezanost GST M1 i GST T1 genskog polimorfizma i visine krvnog pritiska, veza nije ustanovljena ni u grupi žena sa preeklampsijom, niti u grupi zdravih trudnica. Takođe, postoji teorija da fetalni genetski materijal može imati uticaja na podložnost majke za razvoj preeklampsije (460). Ipak, istraživanje koje je ispitivalo fetalni genotip nije uspelo da pronade vezu između delecionih polimorfizama za GST M1 i GST T1 i preeklampsije (241).

Ovo je prvo istraživanje koje je ispitivalo vezu između težine preeklampsije i vremena njenog ispoljavanja sa genskim polimorfizmima za GST. GST M1 delecija je pokazala povišen rizik za razvoj kasne i preeklampsije sa teškim karakteristikama. Kombinacija genotipova GST T1+/GST M1- je pokazala 6 puta povišen rizik od razvoja teške forme preeklampsije. Iako GST T1 homozigotna delecija nije pokazala značajno povećanje rizika za razvoj lakog ili teškog oblika bolesti, njegova distribucija je bila značajno češća u grupi sa teškim karakteristikama u odnosu na laku preeklampsiju, a GST T1-/GST M1+ genotip je bio povezan sa povišenim rizikom od razvoja teškog oblika preeklampsije. Identifikacija žena sa teškom formom preeklampsije i dalje predstavlja izazov za kliničare, posebno što laki oblik može progredirati u teški za svega nekoliko dana

od postavljanja dijagnoze. S obzirom da je teška forma povezana sa značajno povišenim rizikom od pojave komplikacija i lošijih prenatalnih ishoda, otkrivanje mehanizama koji doprinose njenom razvoju bi imalo velikog značaja u cilju poboljšanja zbrinjavanja ove grupe trudnica. Što se tiče perioda gestacije kada dolazi do ispoljavanja poremećaja, pretpostavlja se da kod kasnog oblika preeklampsije glavna uloga u njenoj patogenezi pripada maternalnim faktorima. Sa druge strane, poremećaji na nivou implantacije su najčešće povezivani sa ranim oblikom bolesti. Međutim, GST T1 nulti genotip je u ovoj studiji povezan sa razvojem preeklampsije pre 34. nedelje gestacije, a učestalost ovog genotipa se značajno razlikovala i na nivou podgrupa preeklampsije i to u korist ranog oblika. Kada su posmatrane kombinacije genotipova, prisustvo GST T1-/GST M1+ genotipa je pokazalo značajno povišen rizik za razvoj rane forme, i bio je značajno češći u grupi rane u odnosu na kasnu preeklampsiju. Dodatno, kombinacija oba nulta genotipa (GST M1-/GST T1-) dovela je do povećanja rizika od 12 puta za razvoj i rane i teške preeklampsije. Pretpostavka je da bi delecija ispitivanih gena trebalo da dovede do smanjenja GST enzimske aktivnosti koja bi za posledicu mogla imati intraplacentarno smanjenje kapaciteta antioksidantne odbrane i prekomernu produkciju ROS tokom rane trudnoće, koji će dovesti do lipidne peroksidacije, proteinske karboksilacije, i DNK oksidacije, procesa koji se dešavaju u oksidativnom stresu i koji će dalje provocirati intravaskularno zapaljenje i pogoršanje endotelne disfunkcije (448, 458). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa pretpostavkom da u najvećem broju slučajeva preeklampsije dolazi do preklapanja mehanizama odgovornih za razvoj placentarne (rane) i maternalne (kasne) preeklampsije. Iako ova podela može pomoći u boljem razumevanju i prognozi bolesti, većina žena sa preeklampsijom ima elemente oba stanja.

Pokazano je da poremećaj funkcije eNOS enzima koji učestvuje u sintezi NO u ćelijama endotela, može indukovati pojavu patofizioloških događaja koji će za posledicu imati razvoj kardiovaskularnih bolesti poput hipertenzije, infarkta miokarda, ateroskleroze, koronarnih bolesti, srčane slabosti i dr. (260-263). Ovaj poremećaj funkcije eNOS može nastati kao rezultat prisustva polimorfizama u genu koji kodira ovaj enzim. Do sada najviše proučavani polimorfizmi eNOS gena koji su dovedeni u vezu sa pojavom kardiovaskularnih

komplikacija su Glu298Asp (G894T) lociran u egzonu 7, -786T>C u promoterskom regionu i 27 bp VNTR u intronu 4. Normalna trudnoća je praćena intenzivnim hemodinamskim fluktuacijama koje za rezultat imaju izraženu endotelno-zavisnu i protokom-posredovanu vazodilataciju (461). Ovi procesi su praćeni smanjenjem sistemske vaskularne rezistencije, koja je verovatno najvećim delom posledica dejstva NO (462). Prisustvo polimorfizama eNOS gena utiču na NO produkciju preko različitih mehanizama. Pretpostavlja se da T -786C varijanta dovodi do smanjenja genske ekspresije, što će za posledicu imati redukciju oslobađanja NO (463). Sa druge strane, Glu298Asp (G894T) polimorfizam utiče na aktivnost eNOS proteina preko dva mehanizma. Smatra se da Asp298 varijanta indukuje stvaranje proteolitičkih proteinskih fragmenata koji pokazuju različitu sklonost ka cepanju (464). Dodatno, Glu298Asp utiče na NOS aktivnost reagovanjem sa proteinima koji su uključeni u degradaciju njegovih produkata, na taj način delujući na njegovu intracelularnu distribuciju (465). Dalje, 4a varijanta koja nastaje kao rezultat delecije jednog od pet nukleotidnih ponovaka u intronu 4 eNOS gena, može promeniti enzimsku aktivnost kroz modifikovanje stepena NOS transkripcije i/ili posttranskripcije (267, 268).

Do sada je sproveden veliki broj istraživanja koji su pokušali da ustanove vezu između eNOS genskog polimorfizma i pojave preeklampsije, ali su rezultati veoma oprečni. Naše istraživanje nije uspelo da ustanovi vezu između G894T polimorfizma i pojave preeklampsije, što je u saglasnosti sa nekim prethodnim studijama (277, 466-468). Sa druge strane, nekoliko istraživanja je pokazalo povezanost G894T eNOS polimorfizma i preeklampsije (201, 469, 470). Opisano je smanjenje nivoa NO kao posledice Glu298Asp polimorfizma u grupi žena sa preeklampsijom (471). Takođe, alel 894T je povezan sa pojavom hipertenzije i nižim nivoom NO u opštoj populaciji (472).

Što se tiče težine preeklampsije, naše istraživanje takođe nije ustanovilo povezanost ovog polimorfizma sa lakim ili teškim oblikom bolesti. Međutim, neke studije su G894T polimorfizam povezale sa pojavom teške preeklampsije (289, 290, 473), iako ova veza nije potvrđena u svim ispitivanim populacijama (281, 283, 468, 474-476). Što se tiče perioda razvoja teške preeklampsije, pokazano je da je alel 894T značajno povezan sa pojavom i ranog i kasnog oblika (477). Suprotno ovome, Chen i saradnici (478) su pokazali da je alel

T povezan sa povišenim koncentracijama nitrata, kao i sa smanjenim rizikom za pojavu preeklampsije.

Naši rezultati su pokazali da je homozigotna mutacija za T-786C polimorfizam u odnosu na divlji tip gena značajno češće bila prisutna u grupi žena sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice. Ova razlika u distribuciji je zadržana i nakon poređenja frekvencije homozigotne mutacije u odnosu na zbirnu učestalost dominantnog homozigota i heterozigota (recesivni model). Do sada je opisana povezanost T-786C polimorfizma i pojave preeklampsije u evropskoj (470, 479), azijskoj (277, 292, 466) i američkoj populaciji (280, 290). Meta analiza 11 studija slučaj-kontrola pokazala je da je eNOS -786C/C genotip povezan sa povećanim rizikom za razvoj preeklampsije u odnosu na -786T/T genotip (201). Sa druge strane, postoje studije koje nisu ustanovile vezu između ovog polimorfizma i endotelne disfunkcije (293, 480). Prethodne studije su pokazale da se efekat -786T>C polimorfizma ogleda kroz smanjenje promotorske aktivnosti eNOS gena, što će za posledicu imati izmene u produkciji NO (481). Pokazano je smanjenje aktivnosti promotora za 50% kod osoba sa homozigotnom CC varijantom, usled čega dolazi do neadekvatnog funkcionisanja L-arginin-NO puta i posledično pojave endotelne disfunkcije. Jedno istraživanje je pokazalo da je, iako je distribucija T-786C genotipova bila slična između preeklampsije u kontrola, alel C786 bio povezan sa nižim placentalnim nivoom iRNK i nivoom serumskih nitrata/nitrita (482). Sa druge strane, alel -786C je doveden u vezu sa pojavom hipertenzije i smanjenjem nivoa NO (483). Meta analiza iz 2016. godine pokazala je veliku interetničku varijabilnost u distribuciji T-786C polimorfizma, a najjača povezanost između prisustva ovog polimorfizma i pojave preeklampsije u studijama na beloj rasi i Afrikancima (294).

Kada je u pitanju težina preeklampsije homozigotna mutacija za T-786C je bila značajno češće prisutna u grupi lake i u grupi teške u odnosu na kontrolu, a slična između posmatranih podgrupa preeklampsije. U odnosu na period gestacije u kojem je došlo do ispoljavanja kliničke slike preeklampsije, CC genotipovi su bili značajno češći u grupi rane i kasne u odnosu na kontrolu, a slične učestalosti unutar podgrupa preeklampsije. Dobijeni rezultati između podgrupa potvrđuju predispoziciju za razvoj preeklampsije kod nosilaca

homozigotne mutacije i potvrđuju značajnu ulogu eNOS gena u održavanju strukturnog integriteta arterijskog zida, ali pokazuju da se prisustvo ovog SNP-a ne može koristiti u predviđanju težine kliničke slike niti vremena ispoljavanja poremećaja. Ipak, recesivan alel C je bio značajno učestaliji samo u grupi rane preeklampsije u odnosu na kontrolu, a njegovi nosioci su imali dva puta veći rizik za razvoj ovog oblika poremećaja. Istraživanje na poljskoj populaciji pokazalo je značajnu povezanost alela C sa pojavom teške preeklampsije (467), dok prethodno istraživanje nije ustanovilo vezu između ove varijante i teške preeklampsije u beloj rasi (281). Istraživanje Leonarda i saradnika (484), osim ustanovljene veze ovog polimorfizma sa preeklampsijom, posebno je istaklo njegovu povezanost sa pojavom najozbiljnijih komplikacija (HELLP sindrom i eklampsija). Pokazano je da nedostatak NO indukuje aktivaciju trombocita, stvarajući uslove za razvoj mikroangiopatske hemolitičke anemije i trombocitopenije, koji se sreću u HELLP sindromu. Intravaskularna hemoliza dovodi do povećanog otpuštanja slobodnog hemoglobina koji dalje reaguje sa dostupnim NO, stvarajući začarani krug sa dodatnim smanjenjem nivoa NO.

Rezultati o povezanosti VNTR 4b/a polimorfizma u genu za eNOS i preeklampsije su takođe podeljeni. Naše istraživanje je pokazalo da je homozigotna mutacija bila značajno češća u grupi žena sa preeklampsijom, rezultujući 7 puta povišenim rizikom za razvoj ovog poremećaja. Dve meta-analize nisu pokazale značajnu povezanost VNTR 4b/a polimorfizma i preeklampsije (201, 466), što je u korelaciji sa rezultatima studija na evropskoj (470, 479), azijskoj (277, 282), i američkoj populaciji (277, 280). Sa druge strane, pokazana je direktna veza između VNTR i nižih vrednosti NO metabolita u plazmi (485, 486). Pretpostavlja se da alel a može imati ulogu u modifikovanju splajsinga iRNK transkripta, što će dovesti do značajnih promena u funkciji gena. Slično našim rezultatima, dve studije su pokazale vezu između ovog polimorfizma i preeklampsije (487, 291). Dodatno, opisane su značano više vrednosti krvnog pritiska tokom niže gestacije u prisustvu aa genotipa (291).

Naše istraživanje je pokazalo značajno češće prisustvo aa homozigota u odnosu na zbirnu učestalost bb i ba u grupi lake preeklampsije u odnosu na zdrave trudnice, sa 9 puta povišenim rizikom za razvoj ovog oblika poremećaja. Što se tiče gestacijske nedelje razvoja preeklampsije, pokazano je da je prisustvo heterozigota za VNTR polimorfizam značajno

češće u grupi rane u odnosu na kasnu preeklampsiju. Nosioци aa genotipa u odnosu na bb i ba imali su 8 puta povišen rizik za razvoj kasne preeklampsije. Sa druge strane, učestalost alela a je značajno viša bila u grupi rane preeklampsije u odnosu na kontrolu, sa povišenim rizikom od razvoja ovog oblika poremećaja. Do sada je mali broj studija ispitivao povezanost ovog polimorfizma i sa stepenom težine i gestacijskom nedeljom razvoja preeklampsije. Jedno istraživanje je pokazalo značajnu povezanost VNTR alela a sa pojavom rane i kasne teške preeklampsije (477), dok drugo istraživanje nije pokazalo asocijaciju VNTR 4a/b polimorfizma sa preeklampsijom, niti sa stepenom težine poremećaja (476). Za razliku od ovog, istraživanje na kineskoj populaciji trudnica je pokazalo da je alel 4a povezan sa povišenim koncentracijama nitrata, kao i sa smanjenim rizikom za pojavu preeklampsije (478).

Rezultati prethodnih istraživanja su se međusobno razlikovali i kada je u pitanju analiza distribucije eNOS haplotipova u preeklampsiji. Neravnoteža vezanosti bila je slabo izražena u svim našim grupama za tri posmatrana eNOS polimorfizma, i ni u jednoj grupi nije identifikovan haplotipski blok, što je u korelaciji sa prethodnim istraživanjem (470). Ispitivanjem učestalosti haplotipova na našem uzorku pokazano je da haplotip sa sva tri divlja tipa alela, "G-T-b", ima protektivni efekat, dok nosioци haplotipa "G-C-b" imaju 3 puta povećan rizik za pojavu preeklampsije. Istraživanje na mekičkoj Mestizo populaciji žena nije pokazalo vezu ova tri polimorfizma posmatrana posebno, kao ni njihovih haplotipova, sa razvojem teške preeklampsije (488), sa pretpostavkom da se ove tri genetičke varijante ne nasleđuju u vidu bloka s obzirom na slab LD koji je dobijen. Suprotno ovome, jedno istraživanje pokazalo pozitivnu povezanost između GT-CT-bb haplotipa i preeklampsije (466), dok su druge studije našle protektivni efekat "C-Glu-b" haplotipa za razvoj preeklampsije, objašnjen efektom ovog haplotipskog bloka na povećanje produkcije endogenog NO (471, 489). Dalje, nekoliko studija je opisalo vezu između „Asp-b-C“ haplotipa i pojave preeklampsije (290, 477, 490). Studija iz 2008. godine nije pokazala uticaj ovih polimorfizama na povećanje rizika za razvoj preeklampsije, ali je zato ustanovila vezu između Glu-a-C haplotipa i pojave poremećaja (489). Jedno istraživanje je čak ustanovilo povezanost tri haplotipska bloka sa pojavom preeklampsije ("C-b-Asp", "T-b-

Asp”, “C-b-Glu”) (490). Neki istraživači smatraju da haplotipovi eNOS gena mogu uticati na stepen odgovora na primenjenu antihipertenzivnu terapiju kod žena sa preeklampsijom (280), ali da se ovi haplotipovi razlikuju između populacija.

Razlika u dobijenim rezultatima našeg i ostalih istraživanja je verovatno posledica etničke različitosti u distribuciji različitih varijanti eNOS gena, namećući teoriju o različitoj etničkoj predispoziciji za razvoj preeklampsije. Dodatno, kriterijumi za uključanje u studiju i veličina uzorka takođe mogu biti dobrinoseći faktori za dobijene rezultate. Jedan od nedostataka naše studije je što nismo izvršili merenje nivoa NO i/ili njegovih metabolita i te vrednosti korelirali sa genotipovima kako bi pojačali snagu dobijenih rezultata.

Tokom trudnoće dolazi do značajnog povećanja produkcije kateholnih estrogena od strane posteljice. Jedan od ključnih enzima koji učestvuje u metabolizmu ovih metabolita i njihovoj inaktivaciji je COMT, prevodeći 2- i 4-hidroksiestradiol u 2-ME (491), koji dalje inhibiše akumulaciju HIF-1 α i produkciju sFlt-1 (214, 492), omogućavajući na taj način adekvatnu angiogenezu i modifikaciju spiralnih arterija. Snižena placentarna COMT aktivnost zabeležena je u grupi žena sa gestacijskom hipertenzijom (493). Jedan od gena kandidata nedavno predloženih u etiopatogenezi preeklampsije je i gen za COMT (317). Istraživanja na knockout miševima za COMT pokazala su značajno smanjenje COMT ekspresije, povećanje koncentracije 2-ME, koji dalje indukuje akumulaciju HIF-1 α i ubranu produkciju sFlt-1 i dovodi do zapaljenske reakcije i endotelne disfunkcije (317). Pokazano je da i prisustvo SNP polimorfizma G158A (Val108Met) dovodi do smanjenja aktivnosti ovog enzima (494). Zamena valina metioninom na poziciji 108 dovodi do smanjenja enzimske aktivnosti 4 puta u grupi homozigota (298). Ispitivana je povezanost ovog polimorfizma sa pojavom hipertenzije u opštoj populaciji. Tako je studija na Norveškoj populaciji pokazala povezanost između visokog krvnog pritiska i Val/Val genotipa (313), dok je studija na Švedskoj populaciji pokazala vezu između Met/Met genotipa i povišenog sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska (314). Ispitivanje Japanske populacije pokazalo je graničnu povezanost Met/Met kombinacije alela i hipertenzije (495).

Naše istraživanje je pokazalo značajno veću učestalost homozigota AA u odnosu na homozigote GG u grupi preeklampsije u odnosu na zdrave trudnice i ova razlika u distribuciji

je zadržana i nakon poređenja AA genotipa sa zbirnom učestalošću GG i GA genotipova u ispitivanim grupama. Met/Met genotip je nosio skoro 4 puta povećan rizik za razvoj preeklampsije. Ovi rezultati su u saglasnosti sa nedavnim studijama koje su pokazale vezu između Val158Met COMT polimorfizma i preeklampsije u različitim populacijama. Istraživanja na korejskoj i azijskoj populaciji prikazala su povezanost Val158Met polimorfizma sa povišenim rizikom za preeklampsiju (323, 324). Naši rezultati su pokazali da su nosioci AA genotipa imali 9 puta veći rizik za razvoj teškog oblika preeklampsije i skoro 7 puta veći rizik za razvoj rane preeklampsije. Homozigotna mutacija je značajno češće bila zastupljena u grupi teške u odnosu na laku preeklampsiju, kao i u grupi rane u odnosu na kasni oblik poremećaja. Prethodno istraživanje na našoj populaciji je, suprotno navedenim rezultatima, pokazalo protektivni efekat COMT Met/Met genotipa za razvoj rane i teške preeklampsije (496). Meta-analiza iz 2017. godine (497), koja je uključila šest studija je potvrdila da je COMT Val158Met polimorfizam povezan sa povećanim rizikom za pojavu preeklampsije, posebno kod nosilaca homozigotne mutacije.

Među našim ispitanicima, i učestalost alela A je bila značajno viša u grupi slučajeva (53%) i ovaj alel je bio povezan sa dvostruko većim rizikom za pojavu preeklampsije. Takođe, mutirani alel je nosio sa sobom 3 puta veći rizik od razvoja rane i teške preeklampsije. Učestalost alela A za Val158Met COMT polimorfizam se značajno razlikovala u do sada ispitivanim populacijama – kineska i koreanska 21.2% i 26.6% (323, 324), norveška 56% (325) i čileanska 36% (326). Značajno veća učestalost ovog tipa hipertenzivnog poremećaja u trudnoći je zabeležena u afričkoj, američkoj, hispano i azijskoj populaciji žena u odnosu na žene bele rase, pri čemu je najveća stopa oboljevanja ustanovljena među Afro-amerikankama (498).

Kako se pretpostavlja da placenta igra centralnu ulogu u razvoju preeklampsije, a da je ona pre svega fetalno tkivo, smatra se da je identifikacija fetalnih genetičkih faktora rizika za razvoj preeklampsije neophodan korak u razjašnjenju etiopatogeneze ovog poremećaja. Postoji sve više dokaza o uticaju kako maternalnih, tako i fetalnih gena na tok trudnoće. Prospektivna studija slučaj-kontrola, koja je ispitala zajednički uticaj maternalnog i fetalnog Val158Met COMT polimorfizam na placentarnu COMT aktivnost i maternalni

plazmatski nivo 2-ME, pokazala je značajno povišen rizik za razvoj preeklampsije u prisustvu fetalnog COMT Met/Met genotipa (499). Sa druge strane, Liang i saradnici nisu uspjeli da ustanove ovu vezu (323). Iako su Pertegal i saradnici (499) uočili uticaj genotipa na placentarnu COMT aktivnost, ova razlika nije bila statistički značajna između preeklampsija i zdravih trudnoća, kao što nije ustanovljena ni veza između genotipa i maternalnog plazmatskog nivoa 2-ME. Međutim, nivo homocisteina je bio značajno povišen u grupi sa preeklampsijom u odnosu na normalne trudnoće, i bio je obrnuto proporcionalan nivou 2-ME, što ukazuje na mogući *in vivo* uticaj poremećenog metabolizma metionin-homocistein na smanjenje COMT aktivnosti i posledično smanjenje koncentracije 2-ME u žena sa preeklampsijom (499).

Smatra se da ispitivanje prisustva samo jednog COMT polimorfizma ne daje dovoljno informacija, s obzirom da ne pruža mogućnost prepoznavanja haplotipskih struktura, koje verovatno imaju veći uticaj na izmene u enzimskoj aktivnosti. Identifikacija haplotipova koji modifikuju enzimsku aktivnost u većem stepenu u odnosu na jedan polimorfizam mogla bi biti objašnjenje za dobijene kontradiktorne rezultate među dosadašnjim studijama (500, 501). Ustanovljeno je da, uz rs4680 (Val158Met), tri dodatna SNP-a, rs6269, rs4633, i rs4818, ispoljavaju visoku neravnotežu povezanosti i učestvuju u formiranju haplotipskih blokova (502, 503). Iako samo rs4680 dovodi do izmene u aminokiselinama, ostali polimorfizmi dovode do promena u sekundarnoj strukturi RNK, i remete translaciju. Identifikovana su tri najčešća haplotipa, GCGG, ATCA, i ACCG, koja su pokazala međusobnu razliku u nivou enzimske aktivnosti. Najveća aktivnost je zabeležena kod nosilaca GCGG haplotipa, intermedijarni haplotip, ATCA, ima 2.5-3 puta manju aktivnost, dok je kod haplotipa sa niskom aktivnošću, ACCG, zabeleženo smanjenje aktivnosti za 18–25 puta (503).

Hill i saradnici (504) su pokazali da je maternalni ACCG haplotip COMT gena, koji je povezan sa niskom aktivnošću enzima, povezan sa značajno smanjenim rizikom za razvoj preeklampsije, uz linearni trend povećanja rizika od haplotipa sa niskom do haplotipa sa visokom enzimskom aktivnošću. Sa druge strane, fetalni genotip koji dovodi do snižene enzimske aktivnosti, bio je povezan sa povećanjem 2-ME koncentracije i povećanim rizikom

za pojavu preeklampsije. Suprotno ovome, na modelu knockout miševa za COMT pokazano je odsustvo i maternalne i fetalne COMT aktivnosti, ali se na osnovu toga ne može reći da li je razvoj simptoma preeklampsije nastao usled odsustva enzima u oba kompartmana ili je presudan bio uticaj samo jednog (317). Shodno dobijenim rezultatima, Hill i saradnici (504) su predložili teoriju prema kojoj snižena maternalna COMT aktivnost stimuliše produkciju 2-ME u placenti, a da odsustvo COMT aktivnosti na nivou placentе, kao rezultat izmene fetalnog genotipa, doprinosi razvoju preeklampsije. Sa druge strane, Roten i saradnici (325) su ispitivali uticaj najčešćih haplotipova i pokazali da je enzimaska aktivnost snižena 58 puta u sučaju maternalnog ACCG haplotipa, koji je dalje značajno povezan sa pojavom rekurentne preeklampsije. Shodno lošijim perinatalnim ishodima koji su pratili ispitanice sa rekurentnim preeklampsijama, Roten i saradnici (325) su ukazali na potencijalnu povezanost smanjene COMT aktivnosti i pojave teških oblika preeklampsije. Međutim, veliki broj SNP u okviru COMT gena može formirati ogorman broj haplotipskih kombinacija, gde bi i najmanje razlike mogle da dovedu do značajnih izmena u COMT aktivnosti. Stoga bi trebalo sprovesti studije koje bi proširile haplotipsku analizu koja bi uključila čitav COMT gen. Jedino tako bi se mogao dati tačan odgovor o nivou aktivnosti koji je vezan za prisustvo određenog haplotipa, i o jasnijem efektu varijanti gena za COMT u etiopatogenezi preeklampsije.

Ravnoteža između produkcije Th1, Th2, Th17 citokina i funkcije Treg ćelija predstavlja uslov za održavanje normalnog toka trudnoće (347-350). Rezultati istraživanja iz 2017. godine su potvrdili polarizaciju limfocitnih klasa u trudnoćama komplikovanim preeklampsijom, uz povećanje Th1/Th17 inflamatornog profila i smanjenje Th2/Treg anti-inflamatornog profila (505). Ova neravnoteža u odnosu subklasa limfocita zabeležena je i u uzorku tkiva placentе kod žena sa preeklampsijom (506). Poremećaj odnosa Treg/Th17 može biti odgovoran za još izraženiji zapaljenski odgovor zabeležen u ozbiljnijim formama bolesti (rana i teška preeklampsija) (507, 508). Pokazano je da poremećaj produkcije limfocita u pravcu Th17 ukazuje na intenzivniji zapaljenski odgovor kod rane u odnosu na kasnu preeklampsiju (507). Takođe je poznato da pro-inflamatorni citokini mogu indukovati razvoj Th17 od ćelija predaka koje su iste kao i za Treg (509, 510), tako da se pretpostavlja

da će kod žena sa preeklampsijom povišena koncentracija ovih citokina dovesti do diferencijacije Treg ćelija u Th17 ćelije (511). Pokazano je da pro-inflamatorni citokini imaju bitnu ulogu u zapaljenskim mehanizmima koji utiču na proces implantacije, placentacije i sam tok trudnoće. Povećana produkcija proinflamatornih citokina je povezana sa pojavom endotelne disfunkcije, pojačane apoptoze ćelija, inhibicije angiogenih procesa, i bubrežnih poremećaja (512, 513). Prethodna istraživanja su pokazala da povećanje ekspresije Th1 citokina predstavlja doprinoseći faktor za pojavu ponovljenih neuspešnih implantacija, ponovljenih pobačaja, i preeklampsije (350).

Naše istraživanje analiziralo je relativnu iRNK ekspresiju pro-inflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6) u grupi žena sa preeklampsijom i grupi zdravih trudnica. Relativna ekspresija TNF- α i IL-1 β iRNK je bila značajno viša u grupi slučajeva u odnosu na kontrolu. Posmatrano u odnosu na težinu poremećaja, relativna iRNK ekspresija TNF- α je bila značajno viša u obe podgrupe preeklampsije, dok je ekspresija IL-1 β bila značajno veća jedino u grupi teške preeklampsije u odnosu na nekomplikovane trudnoće. Relativna ekspresija TNF- α iRNK je bila značajno povišena u grupi rane i kasne preeklampsije, dok je značajno povećanje ekspresije IL-1 β zabeleženo jedino u grupi kasne preeklampsije u odnosu na kontrolu. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima. Ribeiro i saradnici (505) su pokazali povećanu produkciju proinflamatornih citokina, kao i smanjenje nivoa anti-inflamatornih citokina u grupi žena sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice. U sistematskom pregledu i meta-analizi Lau-a i saradnika (514) zabeležena je značajna povezanost između povećanja nivoa cirkulišućeg TNF- α i preeklampsije. Nekoliko skorašnjih studija je takođe potvrdilo veće vrednosti TNF- α u preeklampsiji u odnosu na normotenzivne trudnice (515-517). Vitoratos i saradnici (512) su pokazali moguću povezanost između nivoa TNF- α i težine preeklampsije. Udenze i saradnici (518) su takođe pokazali značajno povećan nivo TNF- α u grupi teške preeklampsije u odnosu na zdrave normotenzivne trudnice. Jedno istraživanje je pokazalo pozitivnu korelaciju između serumske koncentracije TNF- α i vrednosti sistolnog/dijastolnog krvnog pritiska (519). Slično našim rezultatima, Lau i saradnici (514) su pokazali povišene vrednosti TNF- α i u lakoj i u teškoj preeklampsiji u odnosu na zdrave trudnice i bez razlike između ovih podgrupa

preeklampsije. Pokazano je takođe značajno povećanje nivoa TNF- α u plazmi u grupi rane u odnosu na kasnu preeklampsiju (505, 507), što ukazuje na moguću povezanost negativnih efekata TNF- α i najtežih oblika preeklampsije. Suprotno ovim rezultatima, postoje studije koje nisu uspele da ustanove vezu između nivoa TNF- α i pojave preeklampsije (520, 521). TNF- α indukuje apoptozu trofoblasta preko stimulacije produkcije slobodnih radikala od strane makrofaga i monocita, te je povišena ekspresija TNF- α očekivana u grupi žena sa preeklampsijom (512). U placenti, TNF- α može da poremeti proces placentacije i ravnotežu između vazodilatatornih i vazokonstriktornih agenasa koji se nalaze u maternalnoj cirkulaciji.

Dosadašnje interesovanje istraživača bilo je usmereno i na ispitivanje uloge IL-1 β u preeklampsiji. Prethodne studije slučaj-kontrola (409, 516, 517, 522, 523) su pokazale značajno veće vrednosti IL-1 β u preeklampsiji u odnosu na normotenzivne trudnice. Nivo IL-1 β je bio sličan u grupi lake preeklampsije i kontroli (524), što je podudarno sa našim rezultatima. Campos-Canas i saradnici (523) su takođe pokazali značajno povećanje nivoa IL-1 β u grupi lake, ali i u grupi teške preeklampsije u odnosu na kontrolu. Međutim, bez obzira što većina studija ukazuje na povećanje nivoa IL-1 β , neke studije ipak nisu uspele da ustanove povezanost nivoa IL-1 β i preeklampsije (525, 526). IL-1 β proizvode monociti i makrofagi nakon stimulacije bakterijskim produktima, kao i pod dejstvom TNF- α . Ovaj citokin učestvuje u mnogim procesima i funkcijama kao i TNF- α , dovodeći do poremećaja na nivou endotela preko aktivacije neutrofila, koji indukuju endotelno oštećenje preko oslobađanja elastaze i laktoferina. Takođe, oba citokina indukuju produkciju IL-6 od strane monocita, makrofaga i T ćelija parakrinim i autokrinim putevima, te na taj način sva tri citokina doprinose pojavi sistemske endotelne aktivacije i vaskularnog oštećenja (527, 528).

Pokazano je da IL-6, koji je negativno regulisan od strane IL-10 i na taj način može inhibisati i produkciju TNF- α , ima uticaj na stepen invazije posteljice tokom procesa implantacije (403). Međutim, kada je u pitanju nivo IL-6 kod žena sa preeklampsijom rezultati dosadašnjih istraživanja su oprečni (409, 426, 515, 521, 522, 527, 529-531). Naše istraživanje nije uspelo da ustanovi razliku u ekspresiji IL-6 u grupi preeklampsija i kontrolnoj grupi, što je u saglasnosti sa nedavno sprovedenim studijama (521, 531).

Relativna ekspresija IL-6 iRNK se nije razlikovala između preeklampsije i kontrole ni nakon podele prema težini poremećaja i prema gestacijskoj nedelji u kojoj se javio poremećaj. Slično ovome, Mihi i saradnici (515) su pokazali da IL-6 ne može poslužiti u evaluaciji težine preeklampsije. Ispitivanja nivoa IL-6 u amnionskoj tečnosti pokazala su čak snižen nivo ovog citokina (424, 532), za šta se pretpostavlja da je posledica smanjene produkcije IL-6 od strane posteljice (533-535). IL-6 produkuje mononuklearni fagociti i T ćelije, i pokazano je da dolazi do povećanja permeabilnosti endotelnih ćelija preko izmene u strukturi uskih međućelijskih veza (engl. *tight junctions*). IL-6 doprinosi pojavi sistemske endotelne aktivacije i vaskularnog oštećenja, posebno na nivou bubrega, organa koji ima ključnu ulogu u razvoju hipertenzije i proteinurije identifikovane u grupi žena sa preeklampsijom (385). IL-6 utiče na razvoj hipertenzije preko indukovanja produkcije AT1-AA, aktivacije endotelina-1, oksidativnog stresa, antiangiogenih faktora i povećane senzitivnosti prema angiotenzinogenu II (536). Eksperiment na trudnim pacovima je pokazao da hronična infuzija IL-6 dovodi do povećanja arterijskog pritiska i smanjenja krvnog protoka u bubrezima, kao i smanjenja stepena glomerularne filtracije (537).

Naša studija uočila je postojanje značajne pozitivne korelacije između ekspresije IL-1 β i TNF- α na nivou čitavog ispitivanog uzorka, čak i nakon logaritmovanja vrednosti u cilju dobijanja normalne raspodele. Ovaj odnos ekspresije dva citokina je zadržan i na nivou grupe preeklampsija. Analnbay i saradnici (524) su pokazali pozitivnu korelaciju između nivoa TNF- α i IL-1 β u grupi zdravih trudnih žena, ali se ovaj odnos nije zadržao u grupi preeklampsije, predlažući teoriju da je određena količina citokina neophodna za uredan tok trudnoće. Nasuprot Kalinderis-u i saradnicima (409), naše istraživanje je pokazalo pozitivnu korelaciju između ekspresije IL-1 β i IL-6 u grupi žena sa preeklampsijom. Neadekvatna trofoblastna invazija je opisana kao provocirajući faktor za povišenu ekspresiju IL-1 β , koja će dalje stimulisati hiperprodukciju proinflamatornih Th1 citokina (TNF- α , IL-2 i IL-6) tokom čitave trudnoće (538).

Nekoliko razloga može biti objašnjenje za dobijene drugačije rezultate našeg istraživanja i ostalih sprovedenih studija. Jedan od njih je i razlika u primenjenim metodama za kvantifikaciju citokina i njihove senzitivnosti. Različite metode pripreme seruma ili

plazme mogu uticati na oslobađanje inflamatornih medijatora i dovesti do smanjenja izmerenih nivoa proinflamatornih citokina (539-541). Potencijalni problemi tokom sakupljanja uzoraka za analizu, vreme čuvanja uzorka proteklo od uzimanja uzorka do analize, kratak poluživot citokina, gestacijska nedelja uzimanja uzorka i dr., su takođe potencijalni faktori koji mogu uticati na krajnji rezultat merenja. Lau i saradnici (514) su prikazali izraženu varijaciju u apsolutnim vrednostima nivoa citokina između studija uključenih u njihov sistematski pregled, objašnjavajući ih nekim maternalnim faktorima koji mogu uticati na izmenjenu produkciju citokina. Na primer, TNF- α i IL-6 proizvode, između ostalog i adipociti, tako da njihove vrednosti mogu biti povišene u grupi gojaznih žena (542, 543). Drugo moguće objašnjenje za pokazane razlike između studija je efekat cirkadijalnog ritma (nivo TNF- α pokazuje ubrzani porast tokom ranih jutarnjih sati (544)) ili načina ishrane (obroci bogati mastima neposredno pre uzimanja uzoraka krvi dovode do supresije nivoa TNF- α i povećanja nivoa IL-6 u plazmi (545)). Drugi faktori, poput fizičkog i emotivnog stresa, takođe mogu uticati na nivo cirkulišućih citokina (546).

Takođe, potrebno je ustanoviti da li je produkcija proinflamatornih citokina povišena od rane trudnoće, što bi moglo pomoći u predikciji i sprovođenju ranih tretmana u grupi žena kod kojih se smatra da će doći do razvoja preeklampsije. Do sada je mali broj studija ispitivao nivo citokina tokom prvog i drugog trimestra trudnoće. Pokazano je da serumski nivo IL-1 β i TNF- α raste pre ispoljavanja bolesti kod žena koje će kasnije tokom trudnoće razviti preeklampsiju (522, 547). Međutim, studija iz 2015. godine uzorcima prikupljenim između 11 i 13 nedelje gestacije pokazala je značajno povećanje nivoa IL-1 β u grupi sa gestacijskom hipertenzijom, ali ne i u grupi žena koje su kasnije razvile preeklampsiju (548). Studija iz 2017. godine pokazala je da markeri zapaljenja i oksidativnog stresa imaju drugačiji obrazac produkcije tokom trudnoće (mereni u toku 4 različita perioda gestacije), u grupi žena koje su razvile preeklampsiju i u grupi zdravih normotenzivnih trudnica. Početak drugog trimestra je pokazao najupečatljiviju razliku u nivoima ovih biomarkera u ispitivanim grupama, dok je TNF- α bio konstantno značajno povišen pri svakom merenju tokom trudnoće. Nivoi biomarkera sistemskog zapaljenja i oksidativnog stresa su bili viši u grupi terminske u odnosu na preterminsku preeklampsiju (549). Meta-analiza Lau-a i saradnika

(514) pokazala je značajno povećanje koncentracija TNF- α tokom prvog trimestra, dok je nivo IL-6 bio sličan među ženama koje će kasnije razviti preeklampsiju i zdravim trudnicama. Rezultati za drugi trimestar su bili oprečni što se tiče TNF- α , dok je IL-6 i dalje bio sličnih vrednosti između dve ispitivane grupe (514).

Genetski činioci, u sadejstvu sa imunološkim i zapaljenskim poremećajima tokom procesa implantacije i placentacije, poremećajem angiogeneze, naglašenim oksidativnim stresom i drugim faktorima, igraju bitnu ulogu u etiopatogenezi preeklampsije. Smatra se da poremećaj jednog od navedenih mehanizama nije dovoljan da dovede do nastanka ovog multifaktorskog oboljenja, već da je neophodna međusobna interakcija nekoliko činilaca. Pored teorije prema kojoj razvoj preeklampsije, posebno rane forme, prolazi kroz dva stadijuma (137-140), Llorca i saradnici (376) su 2015. godine predložili model od tri stadijuma. Za razliku od dvostadijuskog modela, gde loša perfuzija na nivou pacente (stadijum 1) dovodi do produkcije faktora koji su odgovorni za provociranje simptoma i znakova preeklampsije (stadijum 2) (137-140), u trostadijuskom modelu prvi stadijum karakteriše nedovoljna ekspresija VEGF i PlGF, uz produkciju hipoksijom indukovanih faktora od strane decidue, koji za posledicu imaju neadekvatno remodelovanje spiralnih arterija i invaziju trofoblasta. U drugom stadijumu se javlja poremećaj placentarne perfuzije i oksidativno oštećenje, dok treći stadijum obuhvata procese koji nastaju kao posledica patološke placente: apoptoza, zapaljenje, i oslobađanje antiangiogenih faktora (sFlt1 i sEnd), koji dalje indukuju sistemsku endotelnu disfunkciju, sa vazokonstrikcijom i end-organskom ishemijom, dovodeći na kraju do simptoma i znakova preeklampsije (376). Pretpostavlja se da razvoj preeklampsije ne nastaje usled promene na jednom genu, već predstavlja posledicu prisustva izmene u većem broju različitih gena istovremeno. Prethodna istraživanja su pokušala da ustanove vezu između genskih polimorfizama čiji produkti učestvuju u istim, ali i u različitim patološkim mehanizmima za koje se smatra da leže u osnovi preeklampsije, ali su njihovi rezultati vrlo nekonzistentni.

Naša studija je prva koja je iporedo ispitivala polimorfizme gena za enzime koji učestvuju u različitim biološkim procesima (GST T1, GST M1, eNOS i COMT), ali čije bi zajedničko delovanje tačnije njihove izmenjene funkcije indukovale patofiziološke mehanizme

(oksidativni stres, vazokonstrikciju, hipoksiju i ishemiju), za koje se smatra da se međusobno prepliću i potencijalno utiču jedan na drugog u etiopatogenezi preeklampsije.

Pored genetičkih činilaca, pojave oksidativnog stresa, vazokonstrikcije, hipoksije i ishemije, smatra se da poremećaj imunoloških mehanizama, konkretno sistemskog zapaljenskog odgovora koji se pogoršava tokom trudnoće, takođe predstavlja značajan doprinoseći faktor za pojavu preeklampsije. S tim u vezi, naše istraživanje je ispitalo povezanosti prisustva genskih polimorfizama za GSTT1 i M1, eNOS i COMT, sa relativnom iRNK ekspresijom pro-inflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6) na celom posmatranom uzorku, kao i u grupi žena sa preeklampsijom. Značajna povezanost na nivou celog uzorka ustanovljena je između Val158Met polimorfizma u COMT genu i ekspresije TNF- α iRNK. Recessivni homozigoti (AA) i heterozigoti (GA) su imali sličnu relativnu ekspresiju TNF- α iRNK, a koja je bila značajno viša u odnosu na grupu dominantnih homozigota. Na osnovu dobijenih rezultata možemo reći da je prisustvo SNP polimorfizma za COMT u vezi za izraženijim proinflamatornim odgovorom u trudnoći generalno, tačnije da snižena aktivnost ovog enzima može biti povezana sa zapaljenskim procesima koji su posredovani delovanjem TNF- α . Pokazana je i veza između prisustva gena za GST T1 i povišene ekspresije IL-1 β u grupi sa preeklampsijom. Slično ovome, IL-6 je pokazao značajno povišenu ekspresiju u grupi žena sa preeklampsijom kod kojih je ustanovljeno prisustvo gena za GST M1 u odnosu na one sa GST M1 nultim genotipom. Na osnovu dobijenih rezultata, možemo reći da GST i citokini najverovatnije utiču nezavisno na razvoj preeklampsije. S obzirom da je ovo studija koja je prvi put ispitala asocijaciju između delecionih polimorfizama za GST T1 i GST M1 i ekspresije proinflamatornih citokina, uloga detoksifikujućih enzima i proinflamatornih citokina, kao i njihova međusobna veza u etiopatogenezi preeklampsije treba da bude dalje ispitana i razjašnjena.

Naše istraživanje nije uspeo da ustanovi vezu između tri najčešća polimorfizma za eNOS gen i ekspresije iRNK proinflamatornih citokina, kako na nivou celog uzorka, tako i posebno u grupi žena sa preeklampsijom. Ranije studije su pokazale uticaj povišenih nivoa IL-6 na ekspresiju divljeg tipa eNOS gena (556, 557). Efekat IL-6 na eNOS je pokazan u eksperimentalnim studijama u kojima je umeren nivo lipopolisaharida doveo do aktivacije

IL-6 i TNF- α , koji su potom doveli do supresije eNOSa (556). Akutni efekat IL-6 na produkciju NO je verovatno u vezi sa posttranskripcijskim i posttranslacijskim izmenama eNOS aktivnosti (557). Singh i saradnici (558) nisu pokazali vezu između eNOS Glu298Asp polimorfizma i preeklampsije, ali su osobe sa GT genotipom pokazale smanjenje NO produkcije za 50% i značajno povišen nivo IL-6 u odnosu na osobe sa GG genotipom. Nivo IL-6 je bio značajno veći kod žena sa GT genotipom u grupi sa preeklampsijom u odnosu na kontrolu. Značajna negativna korelacija između nivoa NO i IL-6 koja je pokazana u ovoj studiji objašnjena je uticajem IL-6 na pojavu izraženije vaskularne rezistencije u preeklampsiji. Studija na trudnim pacovima je pokazala da IL-6 dovodi do vazokonstrikcije i inhibicije NO-cGMP-posredovane vaskularne relaksacije (559).

Maternalni faktori rizika (visok BMI i pušenje), kao i komplikacije trudnoće (prethodni pobačaji, ukupni i spontani, i IUZR) među našim ispitanicama nisu bili značajno povezani sa ispitivanim genskim polimorfizmima i ekspresijom proinflamatornih citokina, kako na nivou celog uzorka, tako i posebno u grupi žena sa preeklampsijom. Povećan BMI je prepoznat kao nezavisni maternalni faktor rizika za razvoj preeklampsije (560). I na nivou našeg uzorka BMI je bio značajno viši u grupi žena sa preeklampsijom u odnosu na zdrave trudnice. Ovo je prvo istraživanje koje je pokušalo da ustanovi vezu između gojaznosti i genskih polimorfizama za GST T1, GST M1 i eNOS u preeklampsiji. Do sada su sprovedena istraživanja koja su pokušala da dovedu u vezu polimorfizme gena za GST i eNOS sa pojavom gojaznosti. Studija na mladim Arapima je pokazala da je prisustvo GST M1+/GST T1- i GST M1-/GST T1- kombinacije genotipova povezano sa povećanjem rizika za pojavu gojaznosti (561). Istraživanje na opštoj populaciji je pokazalo da nosioci varijantnog alela G894T i VNTR eNOS polimorfizama imaju povećan rizik za gojaznost (562). Pokazano je da kateholamini utiču na mobilizaciju lipida preko lipolize masnog tkiva (563). Konkretno, estrogen i androgeni su uključeni u regulaciju telesne masnoće, dok estradiol verovatno stimuliše preadipocitnu proliferaciju i diferencijaciju. Dodatno, pokazano je da 2-ME inhibiše preadipocitnu proliferaciju i diferencijaciju in vitro (563). Studija iz 2004. godine (564) je pokazala da rs4680 SNP COMT gena umereno utiče na vežbanjem indukovani gubitak masti, a istraživanje iz 2008. godine (565) je pokazalo da je isti ovaj polimorfizam

povezan sa povišenim odnosom obima struk/kuk i abdominalnim sagitalnim dijametrom. Pokazano je da su trudnice sa BMI >25 kg/m² i homozigotnom mutacijom Met/Met imale značajno viši nivo dijastolnog krvnog pritiska u odnosu na dominantne homozigote (Val/Val), što ukazuje na potencijalni zajednički uticaj genetičkih i maternalnih faktora na nivo krvnog pritiska (323). Međutim, slično našim rezultatima, Hill i saradnici (504) nisu uspeli da ustanove vezu između maternalnih COMT haplotipova ili individualnih SNP i BMI u grupi žena sa preeklampsijom.

Naše istraživanje je prvi put pokušalo da ispita vezu između relativne iRNK ekspresije proinflamatornih citokina i gojaznosti u preeklampsiji. Međutim, na nivou celog ispitivanog uzorka, ali i posmatrano samo u grupi preeklampsija, nije ustanovljena veza između vrednosti BMI i ekspresije TNF- α , IL-1 β i IL-6. Pokazano je da gojaznost ili ishrana bogata mastima utiču na remodelovanje uteroplacentarnih i fetalnih krvnih sudova, kao i na krvni protok, koji posledično dovode do pojave placentarne hipoksije i ishemije. Endotelna disfunkcija, koja nastaje kao posledica prethodno navedenih mehanizama dovodi do indukcije sistemskog zapaljenskog odgovora. Istraživanje na majmunima je pokazalo da je placenta gojaznih majmuna imala značajno povećan broj proinflamatornih makrofaga, uz prisustvo insulinske rezistencije, povećanje koncentracije leptina, IL-6, i TNF- α (566). Kako bi se dobila jasnija slika potencijalne veze između gojaznosti i zapaljenja u preeklampsiji, potrebno je sprovesti istraživanja na većem uzorku žena, sa praćenjem nivoa citokina tokom različitih perioda trudnoće kod gojaznih i negojaznih žena sa preeklampsijom. Takođe, ekspresija citokina može zavisiti i od stepena gojaznosti, sa mogućim izraženijim zapaljenskim odgovorom kod ekstremno gojaznih (BMI > 30 kg/m²), tako da bi buduća istraživanja mogla biti usmerena na praćenje nivoa proinflamatornih citokina u zavisnosti od vrednosti BMI. Naše ispitanice sa preeklampsijom su imale srednju vrednost BMI-a pre trudnoće 25.46 ± 4.36 kg/m², što je moglo uticati na dobijene rezultate.

Ovim istraživanjem nismo uspeli da ustanovimo vezu između prethodnih pobačaja sa ispitivanim genskim polimorfizmima, kada je analiziran ceo uzorak, ali ni na nivou grupe žena sa preeklampsijom. Od GST porodice enzima, do sada je ispitivan uticaj GST P1 i GST O1 na pojavu ponovljenih spontanih pobačaja, s obzirom da je njihova aktivnost najviše

izražena na nivou placente i decidue (567, 568). Rezultati su pokazali da je GST P1 b-1b genotip bio značajno češći u grupi sa ponovljenim ranim spontanim pobačajima u odnosu na kontrole (567). Takođe, prisustvo SNP za GST O1 E208K je bilo povezano sa pojavom ponovljenih pobačaja (568). Pretpostavlja da polimorfizmi gena za GST P1 i GST O1 dovode do smanjenja enzimske aktivnosti i posledično poremećaja placentalne detoksifikacije, koja će predstavljati faktor rizika za pojavu ponovljenih ranih pobačaja. Studija koja je spitala vezu između GST T1 i GST M1 delecionog polimorfizma i ponovljenih pobačaja, ustanovila je da jedino osobe sa GST M1 nulnim genotipom imaju povećan rizik od pojave rekurentnih pobačaja, i to češćih i ranih (569).

Što se tiče polimorfizama za eNOS gen, pokazano je postojanje značajne povezanosti između T-786C polimorfizma i -786C-4a-894G haplotipa sa povećanim rizikom za pojavu ponovljenih spontanih pobačaja (570). Međutim, rezultati drugih studija na različitim populacijama to ne potvrđuju (571, 572). Meta-analiza objavljena ove godine, koja je ispitivala povezanost između tri najčešća eNOS polimorfizma (VNTR 4b/a, G894Z, T-786C) i povećanog rizika za pojavu ponovljenih spontanih pobačaja, (573) je u odnosu na prethodne meta-analize na istu temu, u obzir uzela više podataka iz literature, ispitivano je više genskih lokusa, i analizirano je više podgrupa ispitanica (574-576). Rezultati ove meta-analize su pokazali da je VNTR polimorfizam povezan sa pojavom ponovljenih spontanih pobačaja u svim genskim modelima izuzev za recesivni model (aa u odnosu na bb + ab). G894T polimorfizam je takođe pokazao značajnu povezanost sa ponovljenim pobačajima, kao i polimorfizam T-786C. Razlog za nepodudarnost rezultata naše i drugih studija može biti razlika u rasnoj i etničkoj pripadnosti, kao i mali broj ispitivanih trudnica.

S obzirom da steroidni hormoni imaju značajnu ulogu u održavanju trudnoće, neravnoteža u njihovom metabolizmu može uzrokovati mnoge poremećaje trudnoće. Tokom normalne trudnoće nivo 2-ME raste u skladu sa porastom nivoa hormona trudnoće (214). Smanjena koncentracija 2-ME, glavnog metabolita COMT enzima, dovodi do povećanja ekspresije HIF-1a i smanjenja pritiska kiseonika na nivou placente, koji je praćen poremećajem angiogeneze i adekvatne modifikacije spiralnih arterija (492). Iako su naši rezultati pokazali vezu između COMT polimorfizma i rizika za pojavu preeklampsije, ova genska varijanta

nije bila u vezi sa prethodnom pojavom spontanih pobačaja. Do sada veza između Val158Met COMT polimorfizma i spontanih pobačaja nije ispitivana, tako da su potrebne studije na većem uzorku i u okviru različitih etničkih grupa kako bi se dobila jasnija slika o njihovoj povezanosti.

Dobro je poznato da je adekvatan imunološki odgovor majke, zajedno sa uravnoteženim zapaljenskim odgovorom, ekvivalent uspešne trudnoće (512, 513). Izražen zapaljenski odgovor je direktno povezan sa povećanjem maternalnog i fetalnog morbiditeta i mortaliteta. Poremećaj zapaljenske reakcije dovodi do pojave spontanih pobačaja, prevremenih porođaja, IUZR-a, i fetalne smrti (350). Utvrđivanje konkretnih zapaljenskih procesa koji su u vezi sa određenim tipovima komplikacija u trudnoći u budućnosti bi moglo pomoći u implementiranju novih dijagnostičkih i terapijskih modela. Ipak, naši rezultati nisu uspeli da ustanove vezu između ekspresije proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β i IL-6) sa pojavom pobačaja i IUZR-om. Razlog je verovatno drugačiji patofziološki mehanizam preko kog zapaljenski odgovor utiče na pojavu preeklampsije i drugih poremećaja trudnoće, poput pobačaja i IUZR-a. Takođe, nedovoljan broj ispitanica sa ovim poremećajima na nivou našeg uzorka, bi mogao uticati na dobijene rezultate.

Preeklampsija je prepoznata kao najčešći uzročnik pojave IUZR, posebno njena rana forma. Što se tiče eNOS polimorfizma i pojave IUZR-a, studija koja je poredila grupu žena sa preeklampsijom i bez IUZR-a sa zdravim trudnicama dobila je sličnu distribuciju alela i genotipova za Glu289Asp eNOS polimorfizam. Nisu uzimali u obzir težinu poremećaja, kao ni gestacijsku nedelju, s obzirom da je poznato da je rana i teška preeklampsija najčešće praćena i poremećajem u rastu ploda (577). Dalje, u grupi žena homozigota za eNOS 894T alel pokazan je povećan rizik za razvoj preeklampsije, kao i za pojavu IUZR, sa dodatnim povećanjem rizika u prisustvu polimorfizma gena za angiotenzin konvertujući enzim (ACE) (578). S obzirom da naše istraživanje nije uspelo da ustanovi vezu između eNOS genskih polimorfizama i pojave IUZR-a, potrebno je sprovesti još studija na većem uzorku, sa proširenjem ispitivanja na sve najčešće polimorfizme.

Prethodne studije su dovele u vezu polimorfizme gena za citohrom P450 1A1 (CYP1A1), GST T1 i insulinu sličnom faktoru rasta-I (IGF-I) sa pojavom SGA (579, 580). Dve studije

su pokazale da je homozigotna varijanta MetMet COMT gena bila povezana sa povišenim rizikom za SGA u preeklampsiji (322, 324). Lim i saradnici (324) su takođe pokazali da je kombinacija polimorfizama u COMT i CYP1A1 genu nosila preko 15 puta povećan rizik za SGA kod osoba sa preeklampsijom. Snižena COMT aktivnost onemogućava adekvatno metabolisanje kateholnih estrogena, stoga dovodi do njihove akumulacije, i posledično pojave oksidativnog oštećenja DNK (581-583), što se povezuje sa SGA na kraju trudnoće (584). Suprotno ovome, rezultati Krnjete i saradnika (496) su ukazali na smanjenje rizika za pojavu SGA za MetMet nosioce u grupi žena sa ranom teškom preeklampsijom. Oprečni rezultati prethodnih istraživanja, uz naše rezultate koji nisu ustanovili vezu između polimorfizma u COMT i pojave IUZR-a u preeklampsiji, nameću potrebu za novim istraživanjima na različitim populacijama i na većem uzorku.

Studija iz 2012. godine (585) ispitala je uticaj pušenja u kombinaciji sa polimorfizmima za GST T1 i GST M1 na porođajnu telesnu masu kod jednoplodnih trudnoća, nakon uparivanja za godine starosti, BMI, arterijski pritisak i paritet. Pokazano je da GST T1 nulti genotip samostalno, ili u kombinaciji sa GST M1 nultim genotipom ima značajan efekat na pojavu SGA kod pušača. Uticaj delecionog polimorfizma GST T1 na pojavu IUZR-a kod trudnica pušača je takođe ustanovljena (586). Nikotin, glavni alkaloid u duvanskom dimu, dovodi do vazokonstrikcije krvnih sudova materice i dovodi do izražene apoptoze sinciotrofoblasta placentе (587-589). Pokazano je da se nikotin i drugi štetni metabolički produkti policikličnih aromatičnih ugljovodonika sakupljaju u, i prolaze placentu pušača (587-592). Uz činjenicu da hronična hipoksija nastala nakon izlaganja duvanu može uticati na zastoj u rastu ploda, fetalna podložnost slabijem napredovanju koje je posredovano pušenjem najverovatnije nastaje kao rezultat fetalnih i/ili maternalnih polimorfizama u enzimima koji učestuju u dvofaznoj metaboličkoj reakciji neutralisanja hemijskih kancerogena i toksina, među kojima se nalazi i GST T1 kao enzim II faze.

Ipak, naše istraživanje nije uspeo da ustanovi vezu između pušenja i polimorfizama gena za GST T1, GST M1 i eNOS, u celom ispitivanom uzorku trudnica, i u grupi žena sa preeklampsijom. Iako je pušenje prepoznato kao faktor rizika za pojavu različitih oboljenja, rezultati dosadašnjih istraživanja upućuju na potencijalni protektivni efekat pušenja kada je

u pitanju pojava preeklampsije. Njegov pozitivni efekat se ogleda kroz dejstvo produkta sagorevanja duvana, ugljen monoksida (CO), za koji je pokazano da ima vazodilatatorno dejstvo na nivou placente i čiji nivo je povišen kod pušača (158, 593-595).

Naši rezultati, sagledani zajedno sa rezultatima prethodnih istraživanja bi mogli pomoći u boljem razumevanju potencijalnih markera koji bi poslužili u identifikaciji žena koje pokazuju genetsku predispoziciju za razvoj preeklampsije i doprineti razvijanju novih prognostičkih i terapijskih pristupa za ovu grupu trudnica. Neophodno je sprovesti još multicentričnih studija na većem uzorku, kako bi se dao jasniji odgovor o ulozi određenih faktora rizika i njihovom efektu na potencijalne patofiziološke mehanizme koji su značajni u etiopatogenezi preeklampsije. Pored genetičkih ispitivanja majke, neophodno je iste markere ispitati i kod fetusa, i u tkivu posteljice, radi jasnije procene odnosa majčinog i fetalnog genotip i njihovog uticaja na procese za koje se smatra da dovode do razvoja preeklampsije.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata sprovedenog istraživanja mogu se doneti sledeći zaključci:

1. Vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska i BMI pre i u trudnoći su bile značajno veće u grupi preeklampsije u odnosu na kontrolu.
2. Serumske vrednosti uree, ukupnih proteina, fibrinogena, mokraćne kiseline, AST, LDH, CK, i proteinurije su bile značajno povišene, dok je vrednost hemoglobina bila značajno manja u grupi preeklampsije u odnosu na kontrolu; prisustvo edema je bilo značajno češće u grupi preeklampsije u odnosu na kontrolu.
3. Od posmatranih perinatalnih ishoda učestalost carskog reza je bila značajno veća, a gestacijska nedelja rođenja, Apgar score u 1. i 5. minutu i antropometrijske mere novorođenčeta su bili značajno manji u grupi preeklampsija u odnosu na zdrave trudnice;
4. Svi posmatrani negativni neonatalni ishodi su bili značajno češći u grupi slučajeva u odnosu na kontrolu.
5. GSTM1 nulti genotip je nosio povećan rizik za pojavu preeklampsije, i to teške i kasne forme, dok su nosioci GSTT1 nultog genotipa bili u povećanom riziku za razvoj rane preeklampsije. Kombinacija genotipova GST T1-/GST M1+ je bila povezana sa pojavom teške i rane, GST T1+/GST M1- samo sa teškom formom preeklampsije, dok su trudnice sa GST T1-/GST M1- genotipom imale čak 12 puta veći rizik za razvoj teške i rane forme preeklampsije.
6. Polimorfizam T-786C eNOS polimorfizam je takođe pokazao asocijaciju sa preeklampsijom. Trudnice nosioci varijantnog alela C su imale povećan rizik od razvoja rane preeklampsije.
7. Trudnice homozigoti za VNTR polimorfizam eNOS gena imale su 7,5 puta povećan rizik za pojavu preeklampsije, sa najizraženijim rizikom za razvoj lakog i kasnog oblika bolesti.

8. Haplotip sa tri divlja tipa alela ispitivanih polimorfizama gena za eNOS, "G-T-b" pokazao je protektivni efekat, dok su nosioci haplotipa "G-C-b" imali 3 puta povećan rizik za pojavu ovog hipertenzivnog poremećaja u trudnoći.
9. Homozigoti za Val158Met COMT polimorfizam imali su povećan rizik za pojavu preeklampsije i to 9 puta za razvoj teške, i blizu 7 puta za razvoj rane preeklampsije.
10. Ekspresija TNF- α i IL-1 β gena bila je značajno povišena u grupi preeklampsije u odnosu na kontrolu. Za TNF- α ovaj trend je zadržan bez obzira na stepen težine preeklampsije (laka/teška) i gestacijsku nedelju ispoljavanja simptoma i znakova (rana/kasna), dok je nakon podele na podgrupe ekspresija IL-1 β bila značajno povišena u grupi teške i kasne preeklampsije u odnosu na zdrave trudnice.
11. Pozitivna korelacija proinflamatornih citokina zabeležena je između TNF- α i IL-1 β na nivou celog ispitivanog uzorka, i između IL-1 β i IL-6 u grupi preeklampsije.
12. Uočena je značajna povezanost između COMT GA i AA genotipova i povišene relativne ekspresije TNF- α na nivou celog uzorka.
13. Uočena je značajna povezanost između prisustva GST T1 gena i povišene relativne ekspresije IL-1 β , kao i između prisustva GST M1 gena i povišene relativne ekspresije IL-6 u grupi preeklampsije.
14. Nije uočena povezanost između epidemioloških faktora rizika trudnice (BMI, pušenje, prethodni pobačaji, IUZR) sa ispitivanim polimorfizmima, kao ni sa ekspresijom proinflamatornih citokina.

7. LITERATURA

1. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183(1):S1-S22.
2. Magee LA, Pels A, HelewaM, Rey E, von Dadelszen P; Canadian Hypertensive Disorders of Pregnancy (HDP) Working Group: Diagnosis, evaluation, and management of the hypertensive disorders of pregnancy. *Pregnancy Hypertens.* 2014; 4:105–45.
3. Lowe SA, Bowyer L, Lust K, McMahon LP, Morton MR, North RA, et al. Society of Obstetric Medicine of Australia and New Zealand: The SOMANZ Guidelines for the Management of Hypertensive Disorders of Pregnancy 2014. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2015; 55:11–6.
4. Tranquilli AL, Dekker G, Magee L, Roberts J, Sibai BM, Steyn W, et al. The classification, diagnosis and management of the hypertensive disorders of pregnancy: A revised statement from the ISSHP. *Pregnancy Hypertens.* 2014; 4:97–104.
5. National Institute for Health and Clinical Excellence. Hypertension in pregnancy: the management of hypertensive disorders during pregnancy. NICE Clinical Guideline 107. London: NICE; 2010. Available at: <https://www.nice.org.uk/guidance/cg107>. Retrieved December 31, 2018.
6. American College of Obstetricians and Gynecologists; Task Force on Hypertension in Pregnancy: Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2013; 122:1122–31.
7. Gestation hypertension and Preeclampsia, *Obstet Gynecol.* 2019;133(1):e1.
8. Williams D. Long-term complications of preeclampsia. *Semin Nephrol.* 2011; 31(1):111-22.
9. Buchbinder A, Sibai BM, Caritis S, Macpherson C, Hauth J, Lindheimer MD, et al. Adverse perinatal outcomes are significantly higher in severe gestational hypertension than in mild preeclampsia. National Institute of Child Health and

- Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 186(1):66-71.
10. Saudan P, Brown MA, Buddle ML, Jones M. Does gestational hypertension become pre-eclampsia? *Br J Obstet Gynaecol.* 1998; 105(11):1177-84.
 11. Abalos E, Cuesta C, Grosso AL, Chou D, Say L. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013 Sep;170(1):1-7. Epub 2013 Jun 7.
 12. Rakoczi I, Tallian F, Bagdany S, Gati I. Platelet life-span in normal pregnancy and pre-eclampsia as determined by a non-radioisotope technique. *Thromb Res.* 1979; 15(3-4):553-6.
 13. Keiser SD, Boyd KW, Rehberg JF, Elkins S, Owens MY, Sunesara I, et al. A high LDH to AST ratio helps to differentiate pregnancy-associated thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) from HELLP syndrome. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012; 25(7):1059-63.
 14. Sibai BM. Diagnosis, prevention, and management of eclampsia. *Obstet Gynecol.* 2005; 105(2):402-10.
 15. Cooray SD, Edmonds SM, Tong S, Samarasekera SP, Whitehead CL. Characterization of symptoms immediately preceding eclampsia. *Obstet Gynecol.* 2011; 118(5):995-9.
 16. Fox NS, Huang M, Chasen ST. Second-trimester fetal growth and the risk of poor obstetric and neonatal outcomes. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008; 32(1):61-5.
 17. Morikawa M, Yamada T, Yamada T, Cho K, Yamada H, Sakuragi N, Minakami H. Pregnancy outcome of women who developed proteinuria in the absence of hypertension after mid-gestation. *J Perinat Med.* 2008; 36(5):419-24.
 18. MacGillivray I, Rose GA, Rowe B. Blood pressure survey in pregnancy. *Clin Sci.* 1969 Oct; 37(2):395-407.
 19. Hawkins TL, Roberts JM, Mangos GJ, Davis GK, Roberts LM, Brown MA. Plasma uric acid remains a marker of poor outcome in hypertensive pregnancy: a retrospective cohort study. *BJOG.* 2012; 119(4):484-92.

20. Thomson AM, Hytten FE, Billewicz WZ. The epidemiology of oedema during pregnancy. *J Obstet Gynaecol Br Commonw.* 1967; 74(1):1-10.
21. Barton JR, O'Brien JM, Bergauer NK, Jacques DL, Sibai BM. Mild gestational hypertension remote from term: progression and outcome. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184(5):979-83.
22. von Dadelszen P, Payne B, Li J, Ansermino JM, Broughton Pipkin F, Cote AM, et al.; PIERS Study Group. Prediction of adverse maternal outcomes in pre-eclampsia: development and validation of the fullPIERS model. *Lancet.* 2011; 377(9761):219-27.
23. Sibai BM. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2003; 102(1):181-92.
24. Sibai BM, Barton JR. Expectant management of severe preeclampsia remote from term: patient selection, treatment, and delivery indications. *Am J Obstet Gynecol.* 2007; 196(6):514.e1-9.
25. Ganzevoort W, Sibai BM. Temporising versus interventionist management (preterm and at term). *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011; 25(4):463-76.
26. Publications Committee, Society for Maternal-Fetal Medicine, Sibai BM. Evaluation and management of severe preeclampsia before 34 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 205(3):191-8.
27. Abalos E, Duley L, Steyn DW, Henderson-Smart DJ. Antihypertensive drug therapy for mild to moderate hypertension during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007; (1):CD002252.
28. Ness RB, Roberts JM. Heterogeneous causes constituting the single syndrome of preeclampsia: A hypothesis and its implications. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 175:1365-70.
29. von Dadelszen P, Magee LA, Roberts JM. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2003; 22:143-8.
30. Mongraw-Chaffin ML, Cirillo PM, Cohn BA. Preeclampsia and cardiovascular disease death: Prospective evidence from the child health and development studies cohort. *Hypertension.* 2010; 56:166-71.

31. Paruk F, Moodley J. Maternal and neonatal outcome in early- and late-onset preeclampsia. *Semin Neonatol.* 2000; 5:197–207.
32. Murphy DJ, Stirrat GM. Mortality and morbidity associated with early-onset preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2000; 19:221–31.
33. Ness RB, Sibai BM. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 195:40–9.
34. Moldenhauer JS, Stanek J, Warshak C, Khoury J, Sibai B. The frequency and severity of placental findings in women with preeclampsia are gestational age dependent. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189:1173–7.
35. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, et al. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.* 2004; 350:672–83.
36. Masuyama H, Segawa T, Sumida Y, Masumoto A, Inoue S, Akahori Y, et al. Different profiles of circulating angiogenic factors and adipocytokines between early- and late-onset pre-eclampsia. *BJOG.* 2010; 117:314–20.
37. Espinoza J, Romero R, Mee Kim Y, Kusanovic JP, Hassan S, Erez O, Gotsch F, ThanNG, Papp Z, Jai KimC. Normal and abnormal transformation of the spiral arteries during pregnancy. *J Perinat Med.* 2006; 34:447–58.
38. Amaral LM, Cunningham MW Jr., Cornelius DC, LaMarca B. Preeclampsia: Long-term consequences for vascular health. *Vasc Health Risk Manag.* 2015; 11:403–15.
39. Caritis S, Sibai B, Hauth J, Lindheimer MD, Klebanoff M, Thom E, et al. Low-dose aspirin to prevent preeclampsia in women at high risk. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *N Engl J Med.* 1998; 338(11):701-5.
40. Matthys LA, Coppage KH, Lambers DS, Barton JR, Sibai BM. Delayed postpartum preeclampsia: an experience of 151 cases. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 190(5):1464-6.
41. Filetti LC, Imudia AN, Al-Safi Z, Hobson DT, Awonuga AO, Bahado-Singh RO. New onset delayed postpartum preeclampsia: different disorders? *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012; 25(7):957-60.

42. Chames MC, Livingston JC, Ivester TS, Barton JR, Sibai BM. Late postpartum eclampsia: a preventable disease? *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 186(6):1174-7.
43. Al-Safi Z, Imudia AN, Filetti LC, Hobson DT, Bahado-Singh RO, Awonuga AO. Delayed postpartum preeclampsia and eclampsia: demographics, clinical course, and complications. *Obstet Gynecol.* 2011; 118(5):1102-7.
44. Clark SL, Belfort MA, Dildy GA, Englebright J, Meints L, Meyers JA, et al. Emergency department use during the postpartum period: implications for current management of the puerperium. *Am J Obstet Gynecol.* 2010; 203(1):38.e1-6.
45. Sibai BM. Etiology and management of postpartum hypertension-preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 206(6):470-5.
46. Centers for Disease Control and Prevention. Advancing the Health of Mothers in the 21st Century (Revised October 2017). Available from URL: <https://www.cdc.gov/chronicdisease/resources/publications/aag/pdf/2016/aag-maternal-health.pdf>.
47. National Heart, Lung, and Blood Institute. High blood pressure in pregnancy. (cited 20 Oct 2017).
48. Bateman BT, Shaw KM, Kuklina EV, Callaghan WM, Seely EW, Hernandez-Diaz S. Hypertension in women of reproductive age in the United States: NHANES 1999-2008. *PLoS One.* 2012; 7(4):e36171.
49. Centers for Disease Control and Prevention. Data on selected pregnancy complications in the United States. [cited 20 Oct 2017]. Available from URL: <https://www.cdc.gov/reproductivehealth/maternalinfanthealth/pregnancy-complications-data.htm>.
50. Sibai BM. Chronic hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2002; 100(2):369-77.
51. Vanek M, Sheiner E, Levy A, Mazor M. Chronic hypertension and the risk for adverse pregnancy outcome after superimposed pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet.* 2004; 86(1):7-11.
52. Lawler J, Osman M, Shelton JA, Yeh J. Population-based analysis of hypertensive disorders in pregnancy. *Hypertens Pregnancy.* 2007; 26(1):67-76.

53. Wallis AB, Saftlas AF, Hsia J, Atrash HK. Secular trends in the rates of preeclampsia, eclampsia, and gestational hypertension, United States, 1987-2004. *Am J Hypertens*. 2008; 21(5):521-6.
54. Abalos E, Cuesta C, Carroli G, Qureshi Z, Widmer M, Vogel JP, et al. WHO Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health Research Network. Preeclampsia, eclampsia and adverse maternal and perinatal outcomes: a secondary analysis of the World Health Organization Multicountry Survey on Maternal and Newborn Health. *BJOG*. 2014; 121(Suppl 1):14–24.
55. World Health Organization. The world health report: 2005: make every mother and child count. Geneva: WHO; 2005. Available at: https://www.who.int/whr/2005/whr2005_en.pdf. Retrieved December 31, 2018.
56. Duley L. Maternal mortality associated with hypertensive disorders of pregnancy in Africa, Asia, Latin America and the Caribbean. *Br J Obstet Gynaecol*. 1992; 99(7):547-53.
57. Callaghan WM, Mackay AP, Berg CJ. Identification of severe maternal morbidity during delivery hospitalizations, United States, 1991-2003. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 199(2):133.e1-8.
58. Kuklina EV, Ayala C, Callaghan WM. Hypertensive disorders and severe obstetric morbidity in the United States. *Obstet Gynecol*. 2009; 113(6):1299-306.
59. van Dillen J, Mesman JA, Zwart JJ, Bloemenkamp KW, van Roosmalen J. Introducing maternal morbidity audit in the Netherlands. *BJOG*. 2010; 117(4):416-21.
60. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*. 2005; 330(7491):565.
61. Carr DB, Epplein M, Johnson CO, Easterling TR, Critchlow CW. A sister's risk: family history as a predictor of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 193(3 Pt 2):965-72.
62. Cnossen JS, Morris RK, ter Riet G, Mol BW, van der Post JA, Coomarasamy A, et al. Use of uterine artery Doppler ultrasonography to predict pre-eclampsia and

- intrauterine growth restriction: a systematic review and bivariable meta-analysis. *CMAJ*. 2008; 178(6):701-11.
63. Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*. 2011; 123(24):2856-69.
 64. Lam C, Lim KH, Karumanchi SA. Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. *Hypertension*. 2005; 46(5):1077-85.
 65. Cerdeira AS, Karumanchi SA. Biomarkers in preeclampsia. In: Edelstein CL, editor. *Biomarkers of kidney disease*. 1st ed. Amsterdam; Boston: Academic Press/Elsevier; 2011. p. 385-426.
 66. Poon LC, Kametas NA, Maiz N, Akolekar R, Nicolaides KH. First-trimester prediction of hypertensive disorders in pregnancy. *Hypertension*. 2009; 53(5):812-8.
 67. Levine RJ, Thadhani R, Qian C, Lam C, Lim KH, Yu KF, et al. Urinary placental growth factor and risk of preeclampsia. *JAMA*. 2005; 293(1):77-85.
 68. Kusanovic JP, Romero R, Chaiworapongsa T, Erez O, Mittal P, Vaisbuch E, et al. A prospective cohort study of the value of maternal plasma concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors in early pregnancy and midtrimester in the identification of patients destined to develop preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009; 22(11):1021-38.
 69. Gonen R, Shahar R, Grimpel YI, Chefetz I, Sammar M, Meiri H, et al. Placental protein 13 as an early marker for pre-eclampsia: a prospective longitudinal study. *BJOG*. 2008; 115(12):1465-72.
 70. Wortelboer EJ, Koster MP, Cuckle HS, Stoutenbeek PH, Schielen PC, Visser GH. First-trimester placental protein 13 and placental growth factor: markers for identification of women destined to develop early-onset pre-eclampsia. *BJOG*. 2010; 117(11):1384-9.
 71. Cnossen JS, de Ruyter-Hanhijärvi H, van der Post JA, Mol BW, Khan KS, ter Riet G. Accuracy of serum uric acid determination in predicting pre-eclampsia: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2006;85(5):519.

72. Wu Y, Xiong X, Fraser WD, Luo ZC. Association of uric acid with progression to preeclampsia and development of adverse conditions in gestational hypertensive pregnancies. *Am J Hypertens.* 2012; 25(6):711-7.
73. Hawkins TL, Roberts JM, Mangos GJ, Davis GK, Roberts LM, Brown MA. Plasma uric acid remains a marker of poor outcome in hypertensive pregnancy: a retrospective cohort study. *BJOG.* 2012; 119(4):484-92.
74. Bellomo G, Venanzi S, Saronio P, Verdura C, Narducci PL. Prognostic significance of serum uric acid in women with gestational hypertension. *Hypertension.* 2011; 58(4):704-8.
75. Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Moertl M, Zeisler H, et al. The sFlt-1/PIGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol.* 2012; 206(1):58.e1-8.
76. Rana S, Powe CE, Salahuddin S, Verlohren S, Perschel FH, Levine RJ, et al. Angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. *Circulation.* 2012; 125(7):911-9.
77. Chaiworapongsa T, Romero R, Savasan ZA, Kusanovic JP, Ogge G, Soto E, et al. Maternal plasma concentrations of angiogenic/anti-angiogenic factors are of prognostic value in patients presenting to the obstetrical triage area with the suspicion of preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011; 24(10):1187-207.
78. Duley L, Henderson-Smart DJ, Meher S, King JF. Antiplatelet agents for preventing pre-eclampsia and its complications. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007; (2):CD004659.
79. Bujold E, Roberge S, Lacasse Y, Bureau M, Audibert F, Marcoux S, Forest JC, Giguère Y. Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2010; 116(2 Pt 1):402-14.
80. Roberge S, Bujold E, Nicolaides KH. Aspirin for the prevention of preterm and term preeclampsia: systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2018;218(3):287.

81. Haddad B, Winer N, Chitrit Y, Houfflin-Debarge V, Chauleur C, Bages K, Tsatsaris V, Benachi A, Bretelle F, Gris JC, Bastuji-Garin S, Heparin-Preeclampsia (HEPEPE) Trial Investigators. Enoxaparin and Aspirin Compared With Aspirin Alone to Prevent Placenta-Mediated Pregnancy Complications: A Randomized Controlled Trial. *Obstet Gynecol.* 2016 Nov;128(5):1053-1063.
82. Poston L, Briley AL, Seed PT, Kelly FJ, Shennan AH; Vitamins in Pre-eclampsia (VIP) Trial Consortium. 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.
83. Roberts JM, Myatt L, Spong CY, Thom EA, Hauth JC, Leveno KJ, et al.; Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. Vitamins C and E to prevent complications of pregnancy-associated hypertension. *N Engl J Med.* 2010; 362(14):1282-91.
84. Rumbold AR, Crowther CA, Haslam RR, Dekker GA, Robinson JS; ACTS Study Group. Vitamins C and E and the risks of preeclampsia and perinatal complications. *N Engl J Med.* 2006; 354(17):1796-806.
85. Spinnato JA 2nd, Freire S, Pinto E, Silva JL, Cunha Rudge MV, Martins-Costa S, et al. Antioxidant therapy to prevent preeclampsia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol.* 2007; 110(6):1311-8.
86. Rumbold A, Duley L, Crowther CA, Haslam RR. Antioxidants for preventing pre-eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; (1):CD004227.
87. Levine RJ, Hauth JC, Curet LB, Sibai BM, Catalano PM, Morris CD, et al. Trial of calcium to prevent preeclampsia. *N Engl J Med.* 1997; 337(2):69-76.
88. Hofmeyr GJ, Lawrie TA, Atallah AN, Duley L. Calcium supplementation during pregnancy for preventing hypertensive disorders and related problems. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; (8):CD001059.
89. Bodnar LM, Catov JM, Simhan HN, Holick MF, Powers RW, Roberts JM. Maternal vitamin D deficiency increases the risk of preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(9):3517-22.

90. Duley L, Henderson-Smart D, Meher S. Altered dietary salt for preventing pre-eclampsia, and its complications. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005; (4):CD005548.
91. Collins R, Yusuf S, Peto R. Overview of randomised trials of diuretics in pregnancy. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1985; 290(6461):17-23.
92. Meher S, Duley L. Rest during pregnancy for preventing pre-eclampsia and its complications in women with normal blood pressure. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; (2):CD005939.
93. Weissgerber TL, Wolfe LA, Davies GA. The role of regular physical activity in preeclampsia prevention. *Med Sci Sports Exerc.* 2004; 36(12):2024-31.
94. Yeo S, Davidge ST. Possible beneficial effect of exercise, by reducing oxidative stress, on the incidence of preeclampsia. *J Womens Health Gend Based Med.* 2001; 10(10):983-9.
95. Zavorsky GS, Longo LD. Adding strength training, exercise intensity, and caloric expenditure to exercise guidelines in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2011; 117(6):1399-402.
96. Meher S, Duley L. Exercise or other physical activity for preventing pre-eclampsia and its complications. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; (2):CD005942.
97. Kusters DM, Hassani Lahsinoui H, van de Post JA, Wiegman A, Wijburg FA, Kastelein JJ, Hutten BA. Statin use during pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2012;10(3):363.
98. McGrogan A, Snowball J, Charlton RA. Statins during pregnancy: a cohort study using the General Practice Research Database to investigate pregnancy loss. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2017;26(7):843.
99. Barton JR, Sibai BM. Prediction and prevention of recurrent preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2008; 112(2 Pt 1):359-72.
100. Sibai BM. Management of late preterm and early-term pregnancies complicated by mild gestational hypertension/pre-eclampsia. *Semin Perinatol.* 2011; 35(5):292-6.

101. Bombrys AE, Barton JR, Nowacki EA, Habli M, Pinder L, How H, et al. Expectant management of severe preeclampsia at less than 27 weeks' gestation: maternal and perinatal outcomes according to gestational age by weeks at onset of expectant management. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 199(3):247.e1-6.
102. Belghiti J, Kayem G, Tsatsaris V, Goffinet F, Sibai BM, Haddad B. Benefits and risks of expectant management of severe preeclampsia at less than 26 weeks gestation: the impact of gestational age and severe fetal growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 205(5):465.e1-6.
103. Sibai BM. Diagnosis, controversies, and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count. *Obstet Gynecol.* 2004; 103(5 Pt 1):981-91.
104. Alanis MC, Robinson CJ, Hulsey TC, Ebeling M, Johnson DD. Early-onset severe preeclampsia: induction of labor vs elective cesarean delivery and neonatal outcomes. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 199(3):262.e1-6.
105. Magee LA, Abalos E, von Dadelszen P, Sibai B, Easterling T, Walkinshaw S; CHIPS Study Group. How to manage hypertension in pregnancy effectively. *Br J Clin Pharmacol.* 2011; 72(3):394-401.
106. von Dadelszen P, Magee LA. Fall in mean arterial pressure and fetal growth restriction in pregnancy hypertension: an updated metaregression analysis. *J Obstet Gynaecol Can.* 2002; 24(12):941-5.
107. Nabhan AF, Elsedawy MM. Tight control of mild-moderate pre-existing or non-proteinuric gestational hypertension. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011; (7):CD006907.
108. Brown CM, Garovic VD. Mechanisms and management of hypertension in pregnant women. *Curr Hypertens Rep.* 2011; 13(5):338-46.
109. Magee LA, Duley L. Oral beta-blockers for mild to moderate hypertension during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003; (3):CD002863.
110. Duley L, Meher S, Jones L. Drugs for treatment of very high blood pressure during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013; (7):CD001449.

111. Magee LA, Miremadi S, Li J, Cheng C, Ensom MH, Carleton B, et al. Therapy with both magnesium sulfate and nifedipine does not increase the risk of serious magnesium-related maternal side effects in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 193(1):153-63.
112. Which anticonvulsant for women with eclampsia? Evidence from the Collaborative Eclampsia Trial. *Lancet.* 1995 Jun; 345(8963):1455-63.
113. Duley L, Henderson-Smart DJ, Walker GJ, Chou D. Magnesium sulphate versus diazepam for eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; (12):CD000127.
114. Meher S, Abalos E, Carroli G. Bed rest with or without hospitalisation for hypertension during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005; (4):CD003514.
115. Roberts D, Dalziel S. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; (3):CD004454.
116. Amorim MM, Santos LC, Faúndes A. Corticosteroid therapy for prevention of respiratory distress syndrome in severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1999 May; 180(5):1283-8.
117. Chhabra S, Goyal D, Kakani A. Need for relooking into management eclampsia. *Asian Pac J Trop Dis.* 2011; 1241-4.
118. Tam Tam KB, Keiser SD, Sims S, Brewer J, Owens MY, Martin JN Jr. Antepartum eclampsia <34 weeks case series: advisable to postpone delivery to administer corticosteroids for fetal pulmonary benefit? *J Perinatol.* 2011; 31(3):161-5.
119. Woudstra DM, Chandra S, Hofmeyr GJ, Dowswell T. Corticosteroids for HELLP (hemolysis, elevated liver enzymes, low platelets) syndrome in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010; (9):CD008148.
120. American Society of Anesthesiologists Task Force on Obstetric Anesthesia. Practice guidelines for obstetric anesthesia: an updated report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Obstetric Anesthesia. *Anesthesiology.* 2007; 106(4):843-63.

121. van Veen JJ, Nokes TJ, Makris M. The risk of spinal haematoma following neuraxial anaesthesia or lumbar puncture in thrombocytopenic individuals. *Br J Haematol.* 2010; 148(1):15-25.
122. Tan LK, de Swiet M. The management of postpartum hypertension. *BJOG.* 2002; 109(7):733-6.
123. Magee L, Sadeghi S. Prevention and treatment of postpartum hypertension. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005; (1):CD004351.
124. Podymow T, August P. Postpartum course of gestational hypertension and preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2010; 29(3):294-300.
125. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams DJ. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2007; 335(7627):974.
126. Irgens HU, Reisaeter L, Irgens LM, Lie RT. Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: population based cohort study. *BMJ.* 2001; 323(7323):1213-7.
127. Funai EF, Paltiel OB, Malaspina D, Friedlander Y, Deutsch L, Harlap S. Risk factors for pre-eclampsia in nulliparous and parous women: the Jerusalem perinatal study. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2005; 19(1):59-68.
128. Ray JG, Vermeulen MJ, Schull MJ, Redelmeier DA. Cardiovascular health after maternal placental syndromes (CHAMPS): population-based retrospective cohort study. *Lancet.* 2005; 366(9499):1797-803.
129. Roberts JM, Hubel CA. Pregnancy: a screening test for later life cardiovascular disease. *Womens Health Issues.* 2010; 20(5):304-7.
130. Romundstad PR, Magnussen EB, Smith GD, Vatten LJ. Hypertension in pregnancy and later cardiovascular risk: common antecedents? *Circulation.* 2010; 122(6):579-84.
131. Mosca L, Benjamin EJ, Berra K, Bezanson JL, Dolor RJ, Lloyd-Jones DM, et al.; American Heart Association. Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women-2011 update: a guideline from the American Heart Association. *J Am Coll Cardiol.* 2011; 57(12):1404-23.

132. Roberts JM, Hubel CA. The two stage model of preeclampsia: Variations on the theme. *Placenta*. 2009; 30(Suppl A): S32–S37.
133. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: An endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol*. 1989; 161:1200–4.
134. Sircar M, Thadhani R, Karumanchi SA. Pathogenesis of preeclampsia. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015; 24:131–8.
135. Gilbert JS, Babcock SA, Granger JP. Hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats is associated with increased soluble fms-like tyrosine kinase-1 expression. *Hypertension*. 2007; 50:1142–7.
136. Makris A, Thornton C, Thompson J, Thomson S, Martin R, Ogle R, et al. Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFLT-1. *Kidney Int*. 2007; 71:977–84.
137. Nelissen EC, van Montfoort AP, Dumoulin JC, Evers JL. Epigenetics and the placenta. *Hum Reprod Update*. 2011; 17(3):397-417.
138. Roberts JM, Gammill HS. Preeclampsia: recent insights. *Hypertension*. 2005; 46(6):1243-9.
139. LaMarca BD, Gilbert J, Granger JP. Recent progress toward the understanding of the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. *Hypertension*. 2008; 51(4):982-8.
140. Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG. The role of the spiral arteries in the pathogenesis of preeclampsia. *Obstet Gynecol Annu*. 1972; 1:177-91.
141. Brosens I. A study of the spiral arteries of the decidua basalis in normotensive and hypertensive pregnancies. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*. 1964; 71:222–30.
142. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion. Implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod*. 2003; 69:1–7.
143. Hunkapiller NM, Gasperowicz M, Kapidzic M, Plaks V, Maltepe E, Kitajewski J, et al. A role for Notch signaling in trophoblast endovascular invasion and in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Development*. 2011; 138(14):2987-98.

144. Colucci F, Boulenouar S, Kieckbusch J, Moffett A. How does variability of immune system genes affect placentation? *Placenta*. 2011; 32(8):539-45.
145. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, Granger JP. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 294(2):H541-50.
146. Roberts JM, Bodnar LM, Patrick TE, Powers RW. The Role of Obesity in Preeclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2011; 1(1):6-16.
147. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology (Bethesda)*. 2009; 24:147-58.
148. Mutter WP, Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res*. 2008; 75(1):1-8.
149. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003; 111:649–58.
150. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2006; 12:642–9.
151. George EM, Granger JP. Endothelin: key mediator of hypertension in preeclampsia. *Am J Hypertens*. 2011; 24(9):964-9.
152. LaMarca B, Parrish M, Ray LF, Murphy SR, Roberts L, Glover P, et al. Hypertension in response to autoantibodies to the angiotensin II type I receptor (AT1-AA) in pregnant rats: Role of endothelin-1. *Hypertension*. 2009; 54:905–9.
153. McCaig D, Lyall F. Inhibitors of heme oxygenase reduce invasion of human primary cytotrophoblast cells in vitro. *Placenta*. 2009; 30:536–8.
154. Ahmed A, Rahman M, Zhang X, Acevedo CH, Nijjar S, Rushton I, et al. Induction of placental heme oxygenase-1 is protective against TNFalpha-induced cytotoxicity and promotes vessel relaxation. *Mol Med*. 2000; 6:391–409.

155. Zhao H, Wong RJ, Kalish FS, Nayak NR, Stevenson DK. Effect of heme oxygenase-1 deficiency on placental development. *Placenta*. 2009; 30:861–8.
156. Linzke N, Schumacher A, Woidacki K, Croy BA, Zenclussen AC. Carbon monoxide promotes proliferation of uterine natural killer cells and remodeling of spiral arteries in pregnant hypertensive heme oxygenase-1 mutant mice. *Hypertension*. 2014; 63: 580–8.
157. Barber A, Robson SC, Myatt L, Bulmer JN, Lyall F. Heme oxygenase expression in human placenta and placental bed: Reduced expression of placenta endothelial HO-2 in preeclampsia and fetal growth restriction. *FASEB J*. 2001; 15:1158–68.
158. Cudmore M, Ahmad S, Al-Ani B, Fujisawa T, Coxall H, Chudasama K, et al. Negative regulation of soluble Flt-1 and soluble endoglin release by heme oxygenase-1. *Circulation*. 2007; 115:1789–97.
159. Bainbridge SA, Farley AE, McLaughlin BE, Graham CH, Marks GS, Nakatsu K, et al. Carbon monoxide decreases perfusion pressure in isolated human placenta. *Placenta*. 2002; 23:563–9.
160. Zhao H, Wong RJ, Doyle TC, Nayak N, Vreman HJ, Contag CH, et al. Regulation of maternal and fetal hemodynamics by heme oxygenase in mice. *Biol Reprod*. 2008; 78: 744–51.
161. Lyall F, Barber A, Myatt L, Bulmer JN, Robson SC. Hemeoxygenase expression in human placenta and placental bed implies a role in regulation of trophoblast invasion and placental function. *FASEB J*. 2000; 14:208–19.
162. Esteve-Valverde E, Ferrer-Oliveras R, Gil-Aliberas N, Baraldès-Farré A, Llurba E, Alijotas-Reig J. Pravastatin for Preventing and Treating Preeclampsia: A Systematic Review. *Obstet Gynecol Surv*. 2018; 73(1):40-55.
163. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J*. 2001; 20:6008–16.
164. Wang K, Ahmad S, Cai M, Rennie J, Fujisawa T, Crispi F, et al. Dysregulation of hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine γ -lyase

- contributes to maternal hypertension and placental abnormalities in preeclampsia. *Circulation*.2013; 127:2514–22.
165. Holwerda KM, Burke SD, Faas MM, Zsengeller Z, Stillman IE, Kang PM, et al. Hydrogen sulfide attenuates sFlt1-induced hypertension and renal damage by upregulating vascular endothelial growth factor. *J Am Soc Nephrol*. 2014; 25:717–25.
 166. Buhimschi IA, Nayeri UA, Zhao G, Shook LL, Pensalfini A, Funai EF, et al. Protein misfolding, congophilia, oligomerization, and defective amyloid processing in preeclampsia. *Sci Transl Med*. 2014; 6:245ra92.
 167. Burton GJ, Yung HW. Endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of early-onset pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertens*. 2011; 1(1-2):72-8.
 168. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*. 2008; 454(7203):455–62.
 169. Burton GJ, Yung HW, Cindrova-Davies T, Charnock-Jones DS. Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia. *Placenta*. 2009; 30 (Suppl A): S43–8.
 170. Redman CW, Sargent IL. Microparticles and immunomodulation in pregnancy and pre-eclampsia. *J Reprod Immunol*. 2007; 76(1–2):61–7.
 171. Romero R, Lockwood C, Oyarzun E, Hobbins JC. Toxemia: new concepts in an old disease. *Semin Perinatol*. 1988; 12(4):302–23.
 172. Walsh SW. Preeclampsia: an imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. *Am J Obstet Gynecol*. 1985; 152(3):335–40.
 173. Cadroy Y, Grandjean H, Pichon J, Desprats R, Berrebi A, Fournié A, et al. Evaluation of six markers of haemostatic system in normal pregnancy and pregnancy complicated by hypertension or pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol*. 1993; 100(5):416–20.
 174. Chaiworapongsa T, Yoshimatsu J, Espinoza J, Kim YM, Berman S, Edwin S, et al. Evidence of in vivo generation of thrombin in patients with small-for-

- gestational-age fetuses and preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2002; 11(6):362–7.
175. Crews JK, Herrington JN, Granger JP, Khalil RA. Decreased endothelium-dependent vascular relaxation during reduction of uterine perfusion pressure in pregnant rat. *Hypertension.* 2000; 35(1 Pt 2):367–72.
176. LaMarca BB, Cockrell K, Sullivan E, Bennett W, Granger JP. Role of endothelin in mediating tumor necrosis factor-induced hypertension in pregnant rats. *Hypertension.* 2005; 46(1):82–6.
177. Gadonski G, LaMarca BB, Sullivan E, Bennett W, Chandler D, Granger JP. Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of interleukin 6. *Hypertension.* 2006; 48(4):711–6.
178. Gilbert JS, Gilbert SA, Arany M, Granger JP. Hypertension produced by placental ischemia in pregnant rats is associated with increased soluble endoglin expression. *Hypertension.* 2009; 53(2):399–403.
179. Murphy JG, Herrington JN, Granger JP, Khalil RA. Enhanced $[Ca^{2+}]_i$ in renal arterial smooth muscle cells of pregnant rats with reduced uterine perfusion pressure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2003; 284(1):H393–403.
180. Roberts L, LaMarca BB, Fournier L, Bain J, Cockrell K, Granger JP. Enhanced endothelin synthesis by endothelial cells exposed to sera from pregnant rats with decreased uterine perfusion. *Hypertension.* 2006; 47(3):615–8.
181. LaMarca BD, Ryan MJ, Gilbert JS, Murphy SR, Granger JP. Inflammatory cytokines in the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. *Curr Hypertens Rep.* 2007; 9(6):480-5.
182. Dechend R, Viedt C, Muller DN, Ugele B, Brandes RP, Wallukat G, et al. AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation.* 2003; 107:1632–9.
183. Sedeek M, Gilbert JS, LaMarca BB, Sholook M, Chandler DL, Wang Y, et al. Role of reactive oxygen species in hypertension produced by reduced uterine perfusion in pregnant rats. *American journal of hypertension.* 2008; 21(10):1152–6.

184. Zhou CC, Irani RA, Zhang Y, Blackwell SC, Mi T, Wen J, et al. Angiotensin receptor agonistic autoantibody-mediated tumor necrosis factor- α induction contributes to increased soluble endoglin production in preeclampsia. *Circulation*. 2010; 121:436–44.
185. Zhou CC, Ahmad S, Mi T, Xia L, Abbasi S, Hewett PW, et al. Angiotensin II induces soluble fms-Like tyrosine kinase-1 release via calcineurin signaling pathway in pregnancy. *Circ Res*. 2007; 100:88–95.
186. Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*. 2004; 122:369–82.
187. Mistry HD, Wilson V, Ramsay MM, Symonds ME, Broughton Pipkin F. Reduced selenium concentrations and glutathione peroxidase activity in preeclamptic pregnancies. *Hypertension*. 2008; 52(5): 881–8.
188. Poston L, Raijmakers MT. Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome: A review. *Placenta*. 2004; 25(Suppl A): S72–8.
189. Critchley H, MacLean A, Poston L, Walker JJ. *Pre-eclampsia*. London: RCOG Press; 2004.
190. Roggensack AM, Zhang Y, Davidge ST. Evidence for peroxynitrite formation in the vasculature of women with preeclampsia. *Hypertension*. 1999; 33(1):83-9.
191. Duracková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res*. 2010; 59(4):459–69.
192. Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*. 1997; 277(5332):1669–72.
193. Cackovic M, Buhimschi CS, Zhao G, Funai EF, Norwitz ER, Kuczynski E, et al. Fractional excretion of tumor necrosis factor- α in women with severe preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2008; 112(1): 93–100.
194. Sunder-Plassmann G, Derfler K, Wagner L, Stockenhuber F, Endler M, Nowotny C, et al. Increased serum activity of interleukin-2 in patients with preeclampsia. *J Autoimmun* 1989; 2(2): 203–5.

195. Wang W, Irani RA, Zhang Y, Ramin SM, Blackwell SC, Tao L, et al. Autoantibody-mediated complement C3a receptor activation contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Hypertension* 2012; 60(3): 712–21.
196. Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res.* 2004; 95(9): 884–91.
197. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med.* 2006; 12(6): 642–9.
198. Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. *Biochem J.* 2012; 441(2): 523–40.
199. Quillon A, Fromy B, Debret R. Endothelium microenvironment sensing leading to nitric oxidemediated vasodilation: A review of nervous and biomechanical signals. *Nitric Oxide.* 2015; 45:20–6.
200. Lowe DT. Nitric oxide dysfunction in the pathophysiology of preeclampsia. *Nitric Oxide.* 2000; 4:441–58.
201. Dai B, Liu T, Zhang B, Zhang X, Wang Z. The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: A meta-analysis. *Gene.* 2013; 519:187–93.
202. Bernardi F, Constantino L, Machado R, Petronilho F, Dal-Pizzol F. Plasma nitric oxide, endothelin-1, arginase and superoxide dismutase in pre-eclamptic women. *J Obstet Gynaecol Res.* 2008; 34:957–63.
203. Sankaralingam S, Xu H, Davidge ST. Arginase contributes to endothelial cell oxidative stress in response to plasma from women with preeclampsia. *Cardiovasc Res.* 2010; 85:194–203.
204. Kulandavelu S, Whiteley KJ, Qu D, Mu J, Bainbridge SA, Adamson SL. Endothelial nitric oxide synthase deficiency reduces uterine blood flow, spiral artery elongation, and placental oxygenation in pregnant mice. *Hypertension.* 2012; 60:231–8.

205. Albrecht ED, Pepe GJ. Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr Rev.* 1990;11:124–50.
206. Pipkin FB. Risk Factors for Preeclampsia. *N Engl J Med.* 2001;344:925–926.
207. Luft FC. Pieces of the preeclampsia puzzle. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18:2209–10.
208. Jobe SO, Ramadoss J, Koch JM, Jiang Y, Zheng J, Magness RR. Estradiol-17 β , and its CYP450- and COMT-Derived Metabolites Stimulate Proliferation in Uterine Artery ECs: Role of ER- α vs. ER- β . *Hypertension.* 2010; 55(4):1005–11.
209. Rosenfeld CR, Morriss FH Jr. Battaglia FC, Makowski EL, Meschia G. Effect of estradiol-17beta on blood flow to reproductive and nonreproductive tissues in pregnant ewes. *Am J Obstet Gynecol.* 1976; 124:618–29.
210. Magness RR, Phernetton TM, Gibson TC, Chen DB. Uterine blood flow responses to ICI 182 780 in ovariectomized oestradiol-17beta-treated, intact follicular and pregnant sheep. *J Physiol.* 2005; 565:71–83.
211. Gargett CE, Zaitseva M, Bucak K, Chu S, Fuller PJ, Rogers PA. 17Beta-estradiol up-regulates vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in human myometrial microvascular endothelial cells: role of estrogen receptor-alpha and -beta. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87: 4341–49.
212. Zhu BT, Conney AH. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis.* 1998;19:1–27.
213. Dubey RK, Tofovic SP, Jackson EK. Cardiovascular pharmacology of estradiol metabolites. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308:403–9.
214. Berg D, Sonsalla R, Kuss E. Concentrations of 2-methoxyoestrogens in human serum measured by a heterologous immunoassay with an 125I-labelled ligand. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 1983; 103:282-8.
215. Lee SB, Wong AP, Kanasaki K, Xu Y, Shenoy VK, McElrath TF, et al. Preeclampsia: 2-methoxyestradiol induces cytotrophoblast invasion and vascular development specifically under hypoxic conditions. *Am J Pathol.* 2010;176:710–20.

216. Mabjeesh NJ, Escuin D, LaVallee TM, Pribluda VS, Swartz GM, Johnson MS, et al. 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell*. 2003; 3:363–75.
217. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev*. 1998; 8:588–94.
218. Lippert C, Seeger H, Mueck AO, Lippert TH. The effects of A-ring and D-ring metabolites of estradiol on the proliferation of vascular endothelial cells. *Life Sci*. 2000; 67:1653–8.
219. Banerjee S, Randeve H, Chambers AE. Mouse models for preeclampsia: disruption of redox-regulated signaling. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009;7:4.
220. Shenoy V, Kanasaki K, Kalluri R. Pre-eclampsia: connecting angiogenic and metabolic pathways. *Trends Endocrinol Metab*. 2010; 21:529–36.
221. Voutilainen S, Tuomainen TP, Korhonen M, Mursu J, Virtanen JK, Happonen P, et al. Functional COMT Val158Met polymorphism, risk of acute coronary events and serum homocysteine: the kuopio ischaemic heart disease risk factor study. *PLoS ONE*. 2007; 2:e181.
222. Dubey RK, Imthurn B, Jackson EK. 2-Methoxyestradiol: a potential treatment for multiple proliferative disorders. *Endocrinology*. 2007; 148:4125–7.
223. Poranen AK, Ekblad U, Uotila P, Ahotupa M. Lipid peroxidation and antioxidants in normal and preeclamptic pregnancies. *Placenta*. 1996;17:401-5.
224. Seidegard J, Ekstrom G. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect*. 1997; 105(Suppl 4): 791-9.
225. Jakobsson P-J, Morgenstern R, Mancini J, Ford-Hutchinson A, Persson B. Common structural features of MAPEG—a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Sci*. 1999; 8:689–92.
226. Ladner JE, Parsons JF, Rife CL, Gilliland GL, Armstrong RN. Parallel evolutionary pathways for glutathione transferases: structure and mechanism of the mitochondrial class Kappa enzyme rGSTK1-1. *Biochemistry*. 2004; 43:352–61.

227. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of nonmammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 2001; 360:1–16.
228. Xu S, Wang Y, Roe B, Pearson WR. Characterization of the human class mu glutathione-S-transferase gene cluster and the GSTM1 deletion, *J. Biol. Chem.* 1988; 273:3517–27.
229. Coggan M, Whitbread L, Whittington A, Board P. Structure and organization of the human theta-class glutathione-S-transferase and d-dopachrome tautomerase gene complex, *Biochem. J.* 1998; 334:617–23.
230. Hayes JD, Strange RC. Glutathione-S-transferase polymorphisms and their biological consequence, *Pharmacology.* 2000; 61:154–66.
231. Zhang ZJ, Hao K, Shi R, Zhao G, Jiang GX, Song Y, et al. Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and glutathione S-transferase T1 (GSTT1) null polymorphisms, smoking, and their interaction in oral cancer: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2011; 173:847-57.
232. Gao LB, Pan XM, Li LJ, Liang WB, Bai P, Rao L, et al. Null genotypes of GSTM1 and GSTT1 contribute to risk of cervical neoplasia: an evidence-based meta-analysis. *PLoS One* 2011; 6:e20157.
233. Sohail A, Kanwal N, Ali M, Sadia S, Masood AI, Ali F, et al. Effects of glutathione-S-transferase polymorphisms on the risk of breast cancer: a population-based case-control study in Pakistan. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2013; 35:143-53.
234. Yu Y, Weng Y, Guo J, Chen G, Yao K. Association of glutathione S transferases polymorphisms with glaucoma: a meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8:e54037.
235. Song K, Yi J, Shen X and Cai Y. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase genes GSTM1, GSTT1 and risk of hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2012; 7:e48924.
236. Yi R, Liu B and Dong Q. Assessment of the association between GSTM1 null genotype and risk of type 2 diabetes. *Mol Biol Rep.* 2013; 40:3961-7.

237. Sandoval-Carrillo A, Aguilar-Duran M, Vázquez-Alaniz F, Castellanos-Juárez FX, Barraza-Salas M, Sierra-Campos E, et al. Polymorphisms in the GSTT1 and GSTM1 genes are associated with increased risk of preeclampsia in the Mexican mestizo population. *Genet Mol Res.* 2014; 13:2160–5.
238. Guan L, Fan P, Liu X, Liu R, Chen Y, Ye L, et al. Association study between GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and risk of preeclampsia in Chinese population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016; 204:31-5.
239. Cetin M, Pinarbasi E, Percin FE, Akgun E, Percin S, Pinarbasi H, et al. No association of polymorphisms in the glutathione S-transferase genes with preeclampsia, eclampsia and HELLP syndrome in a Turkish population. *J Obstet Gynaecol Res.* 2005; 31(3):236–41.
240. Anvar Z, Saadat I, Namavar-Jahromi B, Saadat M. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) and susceptibility to preeclampsia: a case-control study and a meta-analysis. *EXCLI J.* 2011; 10:44-51.
241. Zhang J, Masciocchi M, Lewis D, Sun W, Liu A, Wang Y. Placental antioxidant gene polymorphisms, enzyme activity, and oxidative stress in preeclampsia. *Placenta.* 2008; 29:439-443.
242. Atalay MA, Ozerkan K, Karkucak M, Yakut T, Atik Y, Develioglu OH. Polymorphisms in angiotensin-converting enzyme and glutathione s-transferase genes in Turkish population and risk for preeclampsia. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2012; 39:466–9.
243. Kim YJ, Park HS, Park MH, Suh SH, Pang MG. Oxidative stress-related gene polymorphism and the risk of preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005; 119:42–6.
244. Saadat M, Anvar Z, Namavar-Jahromi B, Saadat I. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase Z1 (GSTZ1) and susceptibility to preeclampsia. *Mol Biol Rep.* 2012; 39:8995-8.
245. Palmer RM, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664–6.

246. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 57:5193–6197.
247. Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O'Hara DS, et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 1995; 270:14852–6.
248. Armour KE, Armour KJ, Gallagher ME, et al. Defective bone formation and anabolic response to exogenous estrogen in mice with targeted disruption of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology.* 2001; 142:760–6.
249. Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 1990; 347:768–70.
250. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci.* 1991; 88:4651–5.
251. Scott-Burden T, Schini VB, Elizondo E, Junquero DC, Vanhoutte PM. Platelet-derived growth factor suppresses and fibroblast growth factor enhances cytokine-induced production of nitric oxide by cultured smooth muscle cells. Effects on cell proliferation. *Circ Res.* 1992; 71:1088–100.
252. Laycock SK, Vogel T, Forfia PR, Tuzman J, Xu X, Ochoa M, et al. Role of nitric oxide in the control of renal oxygen consumption and the regulation of chemical work in the kidney. *Circ Res.* 1998; 82:1263–71.
253. Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol.* 2000; 50:139-48.
254. Vatish M, Randeve HS, Grammatopoulos DK. Hormonal regulation of placental nitric oxide and pathogenesis of preeclampsia. *Trends Mol Med.* 2006; 12:223–33.
255. Hoffman A, Gloe T, Pohl U. Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism. *J Cell Physiol.* 2001; 188:33–44.

256. Malek AM, Izumo S, Alper SL. Modulation by pathophysiological stimuli of the shear stress-induced up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Neurosurgery*. 1999; 45:334–44.
257. Ruehlmann DO, Mann GE. Rapid non-genomic vasodilator actions of oestrogens and sex steroids. *Curr Med Chem*. 2000; 7:533–41.
258. Ramasamy S, Parthasarathy S, Harrison DG. Regulation of endothelial nitric oxide synthase gene expression by oxidized linoleic acid. *J Lipid Res*. 1998; 39:268–76.
259. Ziegler T, Silacci P, Harrison VJ, Hayoz D. Nitric oxide synthase expression in endothelial cells exposed to mechanical forces. *Hypertension*. 1998; 32:351–5.
260. Panza JA. Endothelial dysfunction in essential hypertension. *Clin Cardiol*. 1997; 20: II-26–II-33.
261. Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*. 1989;2(8670):997-1000.
262. Kumar RG, Spurthi MK, Kumar KG, Sahu SK, Rani SH. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism G298T in association with oxidative DNA damage in coronary atherosclerosis. *J Genet*. 2012;91(3):349-52.
263. Watanabe G, Tomiyama H, Doba N. Effects of oral administration of L-arginine on renal function in patients with heart failure. *J Hypertens*. 2000; 18:229–34.
264. Lee PC, Salyapongse AN, Bragdon GA, Shears LL 2nd, Watkins SC, Edington HD, et al. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Am J Physiol*. 1999; 277:H1600–8.
265. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol*. 2003; 199(1):8-17.
266. Stangl K, Cascorbo I, Laule M, Klein T, Stangl V, Rost S, et al. High CA repeat numbers in intron 13 of the endothelial nitric oxide synthase gene and increased risk of coronary artery disease. *Pharmacogenetics*. 2000; 10:133–40.

267. Zanchi A, Moczulski DK, Hanna LS, Wantman M, Warram JH, Krolewski AS. Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Kidney Int.* 2000; 57:405–13.
268. Morita T, Ito H, Suehiro T, Tahara K, Matsumori A, Chikazawa H, et al. Effect of a polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene in Japanese patients with IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 1999; 52: 203–209.
269. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, et al. T(-786) → C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with myocardial infarction, especially without coronary organic stenosis. *Am J Cardiol.* 2000; 86:628–34.
270. Tsujita Y, Baba S, Yamauchi R, Mannami T, Kinoshita M, Yamamoto R, et al. Association analyses between genetic polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension in Japanese: the Suita Study. *J Hypertens.* 2001; 19:1941–8.
271. Wattanapityakul SK, Mihm MJ, Young AP, Bauer JA. Therapeutic implications of human endothelial nitric oxide synthases gene polymorphism. *Trends Pharmacol Sci.* 2001; 22:361–8.
272. Jachymova M, Horky K, Bultas J, Kozich V, Jindra A, Peleska J, et al. Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 284:426–30.
273. Nassar BA, Bevin LD, Johnstone DE, O'Neill BJ, Bata IR, Kirkland SA, et al. Relationship of the Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and early-onset coronary artery disease. *Am Heart J.* 2001; 142:586–9.
274. Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, Shimasaki Y, Sumida H, Sugiyama S, et al. A missense Glu298Asp variant in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm in the Japanese. *Hum Genet.* 1998; 103:65–9.

275. Cai H, Wilcken DE, Wang XL. The Glu-298 → Asp (894G →T) mutation at exon 7 of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary artery disease. *J Mol Med.* 1999; 77:511–4.
276. Kato N, Sugiyama T, Morita H, Nabika T, Kurihara H, Yamori Y, et al. Lack of evidence for association between the endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension. *Hypertension.* 1999; 33:933–6.
277. Aggarwal PK, Jain V, Jha V. Endothelial nitric oxide synthase, angiotensin converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms in hypertensive disorders of pregnancy. *Hypertens Res.* 2010; 33:473–7.
278. Fatini C, Sticchi E, Gensini F, Genuardi M, Tondi F, Gensini GF, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene influences the risk of pre-eclampsia, the recurrence of negative pregnancy events, and the maternal-fetal flow. *J Hypertens.* 2006; 24:1823–9.
279. Sandrim VC, Palei AC, Metzger IF, Cavalli RC, Duarte G, Tanus-Santos JE. Interethnic differences in ADMA concentrations and negative association with nitric oxide formation in preeclampsia. *Clin Chim Acta.* 2010; 411:1457–60.
280. Sandrim VC, Palei AC, Sertorio JT, Cavalli RC, Duarte G, Tanus-Santos JE. Effects of eNOS polymorphisms on nitric oxide formation in healthy pregnancy and in pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod.* 2010; 16:506–10.
281. Tempfer CB, Jirecek S, Riener EK, Zeisler H, Denschlag D, Hefler L, et al. Polymorphisms of thrombophilic and vasoactive genes and severe preeclampsia: a pilot study. *J Soc Gynecol Investig.* 2004; 11:227–31.
282. Chen LK, Wang D, Zhou M, Chen X, Chen J. Polymorphisms in the endothelial nitric oxide synthase gene may be protective against preeclampsia in a Chinese population. *Reprod. Sci.* 2007; 14:175–81.
283. Hakli T, Romppanen EL, Hiltunen M, Helisalmi S, Punnonen K, Heinonen S. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism in preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 2003; 10:154–7.

284. Hillermann R, Carelse K, Gebhardt GS. The Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an increased risk for abruptio placentae in pre-eclampsia. *J Hum Genet.* 2005; 50(415–41):9.
285. Kobashi, G., Yamada, H., Ohta, K., Kato, E., Ebina, Y., Fujimoto, S., 2001. Endothelial nitric oxide synthase gene (NOS3) variant and hypertension in pregnancy. *Am. J. Med. Genet.* 103, 241–244.
286. Metzger IF, Souza-Costa DC, Marroni AS, Nagassaki S, Desta Z, Flockhart DA, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene haplotypes associated with circulating concentrations of nitric oxide products in healthy men. *Pharmacogenet. Genomics.* 2005; 15:565–70.
287. Nishizawa H, Pryor-Koishi K, Suzuki M, Kato T, Sekiya T, Tada S, et al. Analysis of nitric oxide metabolism as a placental or maternal factor underlying the etiology of pre-eclampsia. *Gynecol Obstet Invest.* 2009; 68:239–47.
288. Turan F, Ilhan N, Kaman D, Ates K, Kafkasli A. Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in Turkish pre-eclamptic women without fetal growth retardation. *J Obstet Gynaecol Res.* 2010; 36:495–501.
289. Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, Shimasaki Y, Nakayama M, Miyamoto Y, et al. Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with severe preeclampsia. *J Soc Gynecol Investig.* 2000; 7:238–41.
290. Serrano NC, Casas JP, Díaz LA, Páez C, Mesa CM, Cifuentes R, et al. Endothelial NO synthase genotype and risk of preeclampsia: a multicenter case–control study. *Hypertension.* 2004; 44:702–7.
291. Bashford MT, Hefler LA, Vertrees TW, Roa BB, Gregg AR. Angiotensinogen and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms among Hispanic patients with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 184:1345–50.
292. Kim YJ, Park BH, Park H, Jung SC, Pang MG, Ryu HM, et al. No association of the genetic polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase, dimethylarginine

- dimethylaminohydrolase, and vascular endothelial growth factor with preeclampsia in Korean populations. *Twin Res Hum Genet.* 2008; 11:77–83.
293. Qi HP, Fraser WD, Luo ZC, Julien P, Audibert F, Wei SQ. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of preeclampsia. *Am J Perinatol.* 2013; 30(10):795-804.
294. Zeng F, Zhu S, Wong MC, Yang Z, Tang J, Li K, et al. Associations between nitric oxide synthase 3 gene polymorphisms and preeclampsia risk: a meta-analysis. *Sci Rep.* 2016; 6:23407.
295. Devendran A, Nampoothiri S, Shewade DG, Chatterjee S, Jayaraman B, Chandrasekharan A. Allele, Genotype and Haplotype Structures of Functional Polymorphic Variants in Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS), Angiotensinogen (ACE) and Aldosterone Synthase (CYP11B2) Genes in Healthy Pregnant Women of Indian Ethnicity. *J Reprod Infertil.* 2015; 16(4):180-92.
296. NCBI: dbSNP Short Genetic Variations [Internet]. HapMap -786T>C [cited 2014 Sept 20]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2070744.
297. Kambur O. Catechol-O-methyltransferase and pain in rodents and humans. Academic dissertation, Faculty of Pharmacy, University of Helsinki, Helsinki 2013.
298. Mannisto PT, Kaakkola S. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol Rev.* 1999; 51:593–628.
299. Thomas MP, Potter BV. The structural biology of oestrogen metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013; 137:27-49.
300. Bækken PM, Skorpen F, Stordal E, Zwart JA, Hagen K. Depression and anxiety in relation to catechol-O-methyltransferase Val158Met genotype in the general population: The NordTrondelag health study (HUNT). *BMC Psychiatry.* 2008; 8:48.
301. Tenhunen J, Salminen M, Lundström K, Kiviluoto T, Savolainen R, Ulmanen I. Genomic organization of the human catechol-O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur J Biochem.* 1994; 223:1049–59.

302. Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melén K, Julkunen I, et al. Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol-O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry*. 1995; 34:4202–10.
303. Lachman HM, Morrow B, Shprintzen R, Veit S, Parsia SS, Faedda G, et al. Association of codon108/158 catechol-O-methyltransferase gene polymorphism with the psychiatric manifestations of velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet*. 1996; 67:468–72.
304. Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, et al. Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in post-mortem human brain. *Am J Hum Genet* 2004; 75:807–21.
305. Rutherford K, Bennion BJ, Parson WW, Daggett V. The V108M polymorphism of human catechol O-methyltransferase is prone to deformation at physiological temperatures. *Biochemistry* 2006; 45:2178–88.
306. Rutherford K, AlphanDéry E, McMillan A, Daggett V, Parson WW. The V108M mutation decreases the structural stability of catechol O-methyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008; 1784:1098–105.
307. Hosak L. Role of the COMT gene Val158Met polymorphism in mental disorders: a review. *Eur Psychiatry*. 2007; 22:276–81.
308. Dawling S, Roodi N, Mernaugh RL, Wang X, Parl FF. Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms. *Can Res*. 2001; 61:6716–22.
309. Yim D-S, Park SK, Yoo K-Y, Yoon K-S, Chung HH, Kang HJ, et al. Relationship between the Val158Met polymorphism of catechol O-methyltransferase and breast cancer. *Pharmacogenetics*. 2001; 11:279–86.
310. Zubieta J-K, Heitzeg MM, Smith YR, Bueller JA, Xu K, Xu Y, et al. COMT val158met genotype affects μ -opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. *Science*. 2003; 299:1240–3.

311. Goldberg TE, Egan MF, Gscheidle T, Coppola R, Weickert T, Kolachana BS, et al. Executive subprocesses in working memory: relationship to catechol-O-methyltransferase Val158Met genotype and schizophrenia, *Arch Gen Psychiatry*. 2003; 60:889–96.
312. Happonen P, Voutilainen S, Tuomainen TP, Salonen JT. Catechol-O-methyltransferase gene polymorphism modifies the effect of coffee intake on incidence of acute coronary events. *PLoS ONE* 2006;1:e117.
313. Hagen K, Pettersen E, Stovner LJ, Skorpen F, Holmen J, Zwart JA. High systolic blood pressure is associated with Val/Val genotype in the catechol-O-methyltransferase gene. The Nord-Trøndelag Health Study (HUNT). *Am J Hypertens* 2007; 20:21–6.
314. Annerbrink K, Westberg L, Nilsson S, Rosmond R, Holm G, Eriksson E. Catechol O-methyltransferase val158-met polymorphism is associated with abdominal obesity and blood pressure in men. *Metabolism* 2008; 57:708–711.
315. Eriksson AL, Skrtic S, Niklason A, Hulten LM, Wiklund O, Hedner T, et al. Association between the low activity genotype of catechol-O-methyltransferase and myocardial infarction in a hypertensive population. *Eur Heart J*. 2004; 25:386–91.
316. Voutilainen S, Tuomainen TP, Korhonen M, Mursu J, Virtanen JK, Happonen P, et al. Functional COMT Val158Met polymorphism, risk of acute coronary events and serum homocysteine: the kuopio ischaemic heart disease risk factor study. *PLoS One*. 2007; 2:e181.
317. Kanasaki K, Palmsten K, Sugimoto H, Ahmad S, Hamano Y, Xie L, et al. Deficiency in catechol-O-methyltransferase and 2-methoxyoestradiol is associated with pre-eclampsia. *Nature*. 2008; 453(7198):1117-21.
318. Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM, Fisher SJ. Hypoxia alters early gestation human cytotrophoblast differentiation/invasion in vitro and models the placental defects that occur in preeclampsia. *J Clin Invest*. 1996; 97:540–50.
319. Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, Gassmann M, Lye SJ, Kuliszewski M, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFβ3. *J Clin Invest*. 2000; 105:577–87.

320. Takanashi K, Honma T, Kashiwagi T, Honjo H, Yoshizawa I. Detection and measurement of urinary 2-hydroxyestradiol 17-sulfate, a potential placental antioxidant during pregnancy. *Clin Chem*. 2000; 46:373–8.
321. Rosing U, Carlstrom K. Serum levels of unconjugated and total oestrogens and dehydroepiandrosterone, progesterone and urinary oestriol excretion in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest*. 1984; 18:199–205.
322. Sata F, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Yamada T, Minakami H, et al. Functional maternal catechol-O-methyltransferase polymorphism and fetal growth restriction. *Pharmacogenet. Genomics* 16, 775–781 (2006).
323. Liang S, Liu X, Fan P, Liu R, Zhang J, He G, Liu Y, Bai H. Association between Val158Met functional polymorphism in the COMT gene and risk of preeclampsia in a Chinese population. *Arch Med Res*. 2012; 43(2):154-8.
324. Lim JH, Kim SY, Kim DJ, et al. Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase and cytochrome P450c17 in preeclampsia. *Pharmacogenet Genomics* 2010;20:605e610.
325. Roten LT, Fenstad MH, Forsmo S, et al. A low COMT activity haplotype is associated with recurrent preeclampsia in a Norwegian population cohort (HUNT2). *Mol Hum Reprod* 2011;17:439e446.
326. Germain SJ, Sacks GP, Sooranna SR, Sargent IL, Redman CW. Systemic inflammatory priming in normal pregnancy and preeclampsia: the role of circulating syncytiotrophoblast microparticles. *J Immunol*. 2007; 178(9):5949-56.
327. Lala PK, Chakraborty C. Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury. *Placenta*. 2003; 24(6):575–87.
328. Wells M. The pathology of gestational trophoblastic disease: recent advances. *Pathology*. 2007; 39(1):88–96.
329. King A. Uterine leukocytes and decidualization. *Hum Reprod Update*. 2000; 6(1):28–36.
330. Trundley A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens*. 2004; 63(1):1–12.

331. Williams PJ, Searle RF, Robson SC, Innes BA, Bulmer JN. Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. *J Reprod Immunol.* 2009; 82(1):24–31.
332. Herberts C, Melgert B, van der Laan JW, Faas M. New adjuvanted vaccines in pregnancy: what is known about their safety? *Expert Rev Vaccines.* 2010; 9(12):1411–22.
333. Lash GE, Robson SC, Bulmer JN. Review: Functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. *Placenta.* 2010; 31(Suppl):S87–92.
334. Nagamatsu T, Schust DJ. The immunomodulatory roles of macrophages at the maternal-fetal interface. *Reprod Sci.* 2010; 17(3):209–18.
335. Silva LM, Coolman M, Steegers EA, Jaddoe VW, Moll HA, Hofman A, et al. Low socioeconomic status is a risk factor for preeclampsia: the Generation R Study. *Journal of hypertension.* 2008; 26(6):1200–8.
336. Miyazaki S, Tsuda H, Sakai M, Hori S, Sasaki Y, Futatani T, et al. Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *J Leukoc Biol.* 2003; 74(4):514–22.
337. Luppi P, Haluszczak C, Betters D, Richard CA, Trucco M, DeLoia JA. Monocytes are progressively activated in the circulation of pregnant women. *J Leukoc Biol.* 2002; 72(5):874–84.
338. Naccasha N, Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Berman S, Yoon BH, Maymon E, et al. Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in normal pregnancy and maternal infection. *American journal of obstetrics and gynecology.* 2001; 185(5):1118–23.
339. Shin S, Jang JY, Roh EY, Yoon JH, Kim JS, Han KS, et al. Differences in circulating dendritic cell subtypes in pregnant women, cord blood and healthy adult women. *J Korean Med Sci.* 2009; 24(5):853–9.
340. Ueda Y, Hagihara M, Okamoto A, Higuchi A, Tanabe A, Hirabayashi K, et al. Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio

- reduced in pregnant women: comparison with umbilical cord blood and normal healthy adults. *Hum Immunol*. 2003; 64(12):1144–51.
341. Veenstra van Nieuwenhoven AL, Heineman MJ, Faas MM. The immunology of successful pregnancy. *Hum Reprod Update*. 2003; 9(4):347–57.
342. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*. 1993; 14(7):353–6.
343. Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ. The effects of soluble products of activated lymphocytes and macrophages on blastocyst implantation events in vitro. *Biology of reproduction*. 1991; 44(1):69–75.
344. Saito S, Sakai M, Sasaki Y, Tanebe K, Tsuda H, Michimata T. Quantitative analysis of peripheral blood Th0, Th1, Th2 and the Th1:Th2 cell ratio during normal human pregnancy and preeclampsia. *Clinical and experimental immunology*. 1999; 117(3):550–5.
345. Saito S, Tsukaguchi N, Hasegawa T, Michimata T, Tsuda H, Narita N. Distribution of Th1, Th2, and Th0 and the Th1/Th2 cell ratios in human peripheral and endometrial T cells. *American journal of reproductive immunology*. 1999; 42(4):240–5.
346. Prins JR, Boelens HM, Heimweg J, Van der Heide S, Dubois AE, Van Oosterhout AJ, et al. Preeclampsia is associated with lower percentages of regulatory T cells in maternal blood. *Hypertension in pregnancy*. 2009; 28(3):300–11.
347. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*. 2004; 5(3):266–71.
348. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008; 133(5):775–87.
349. Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol hum reprod*. 2004; 10(5):347–53.
350. 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.

351. Cornelius DC, Lamarca B. TH17- and IL-17-mediated autoantibodies and placental oxidative stress play a role in the pathophysiology of pre-eclampsia. *Minerv ginecol.* 2014; 66(3):243–9.
352. Redman CW, Sargent IL. Immunology of pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2010; 63(6):534–43.
353. Freeman DJ, McManus F, Brown EA, Cherry L, Norrie J, Ramsay JE, et al. Short- and long-term changes in plasma inflammatory markers associated with preeclampsia. *Hypertension.* 2004; 44(5):708–14.
354. LaMarca B, Cornelius D, Wallace K. Elucidating immune mechanisms causing hypertension during pregnancy. *Physiology.* 2013; 28(4):225–33.
355. Cornelius DC, Hogg JP, Scott J, Wallace K, Herse F, Moseley J, et al. Administration of interleukin-17 soluble receptor C suppresses TH17 cells, oxidative stress, and hypertension in response to placental ischemia during pregnancy. *Hypertension.* 2013; 62(6):1068–73.
356. Irani RA, Zhang Y, Zhou CC, Blackwell SC, Hicks MJ, Ramin SM, et al. Autoantibody-mediated angiotensin receptor activation contributes to preeclampsia through tumor necrosis factor-alpha signaling. *Hypertension.* 2010; 55(5):1246–53.
357. Santner-Nanan B, Peek MJ, Khanam R, Richarts L, Zhu E, Fazekas de St Groth B, et al. Systemic increase in the ratio between Foxp3+ and IL-17-producing CD4+ T cells in healthy pregnancy but not in preeclampsia. *J Immunol.* 2009; 183(11):7023–30.
358. Wallace K, Richards S, Dhillon P, Weimer A, Edholm ES, Bengten E, et al. CD4+ T-helper cells stimulated in response to placental ischemia mediate hypertension during pregnancy. *Hypertension.* 2011; 57(5):949–55.
359. Raghupathy R. Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract.* 2013; 22(Suppl 1):8–19.
360. Zenclussen AC, Fest S, Joachim R, Klapp BF, Arck PC. Introducing a mouse model for pre-eclampsia: adoptive transfer of activated Th1 cells leads to pre-eclampsia-like symptoms exclusively in pregnant mice. *Eur J Immunol.* 2004; 34(2):377–87.

361. Kleinewietfeld M, Hafler DA. Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunol Rev.* 2014; 259(1):231–44.
362. Quinn KH, Lacoursiere DY, Cui L, Bui J, Parast MM. The unique pathophysiology of early-onset severe preeclampsia: role of decidual T regulatory cells. *J Reprod Immunol.* 2011; 91(1–2):76–82.
363. Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, Park WR, Arima K, Bover L, et al. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity.* 2008; 28(6):870–80.
364. Sasaki Y, Darmochwal-Kolarz D, Suzuki D, Sakai M, Ito M, Shima T, et al. Proportion of peripheral blood and decidual CD4(+) CD25(bright) regulatory T cells in pre-eclampsia. *Clin Exp Immunol.* 2007; 149(1):139–45.
365. Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Naccasha N, Blackwell S, Yoon BH, Maymon E, et al. Phenotypic and metabolic characteristics of maternal monocytes and granulocytes in preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 185(5):1124–9.
366. Gervasi MT, Chaiworapongsa T, Naccasha N, Pacora P, Berman S, Maymon E, et al. Maternal intravascular inflammation in preterm premature rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2002; 11(3):171–5.
367. Sabatier F, Bretelle F, D'ercole C, Boubli L, Sampol J, Dignat-George F. Neutrophil activation in preeclampsia and isolated intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183(6):1558–63.
368. Ogge G, Romero R, Chaiworapongsa T, Gervasi MT, Pacora P, Erez O, et al. Leukocytes of pregnant women with small-for-gestational age neonates have a different phenotypic and metabolic activity from those of women with preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010; 23(6):476–87.
369. Borzychowski AM, Sargent IL, Redman CW. Inflammation and preeclampsia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006; 11(5):309–16.
370. Ramma W, Buhimschi IA, Zhao G, Dulay AT, Nayeri UA, Buhimschi CS, et al. The elevation in circulating anti-angiogenic factors is independent of markers of neutrophil activation in preeclampsia. *Angiogenesis.* 2012; 15(3):333–4.

371. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today*. 1993; 14(7):353–6.
372. Formby B. Immunologic response in pregnancy. Its role in endocrine disorders of pregnancy and influence on the course of maternal autoimmune diseases. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1995; 24(1):187–205.
373. Keiser SD, Veillon EW, Parrish MR, Bennett W, Cockrell K, Fournier L, et al. Effects of 17-hydroxyprogesterone on tumor necrosis factor-alpha-induced hypertension during pregnancy. *Am J Hyperten*. 2009; 22(10):1120–5.
374. LaMarca B, Speed J, Ray LF, Cockrell K, Wallukat G, Dechend R, et al. Hypertension in response to IL-6 during pregnancy: role of AT1-receptor activation. *Int J Inference Cytokine Mediator Res*. 2011; 2011(3):65–70.
375. Zhou CC, Irani RA, Dai Y, Blackwell SC, Hicks MJ, Ramin SM, et al. Autoantibody-mediated IL-6-dependent endothelin-1 elevation underlies pathogenesis in a mouse model of preeclampsia. *J Immunol*. 2011; 186(10):6024–34.
376. Llurba E, Crispi F, Verlohren S. Update on the pathophysiological implications and clinical role of angiogenic factors in pregnancy. *Fetal Diagn Ther*. 2015; 37:81–92.
377. Keiser SD, Arriaga-Pizano L, Jimenez-Zamudio L, Vadillo-Ortega F, Martinez-Flores A, Herrerias-Canedo T, et al. The predominant Th1 cytokine profile in maternal plasma of preeclamptic women is not reflected in the choriodecidual and fetal compartments. *J Soc Gynecol Invest*. 2005; 12(5):335–42.
378. Hennessy A, Pilmore HL, Simmons LA, Painter DM. A deficiency of placental IL-10 in preeclampsia. *J Immunol*. 1999; 163(6):3491–5.
379. Dechend R, Homuth V, Wallukat G, Muller DN, Krause M, Dudenhausen J, et al. Agonistic antibodies directed at the angiotensin II, AT1 receptor in preeclampsia. *J Soc Gynecol Invest*. 2006; 13(2):79–86.

380. Kharfi A, Giguere Y, Sapin V, Masse J, Dastugue B, Forest JC. Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines. *Clin Biochem.* 2003; 36(5):323–31.
381. Conrad KP, Benyo DF. Placental cytokines and the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 1997; 37(3):240–9.
382. Dhillion P, Wallace K, Herse F, Scott J, Wallukat G, Heath J, et al. IL-17-mediated oxidative stress is an important stimulator of AT1-AA and hypertension during pregnancy. *Am J Physiol Regul Integ Comp Physiol.* 2012; 303(4):R353–8.
383. Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JC Jr, Lee ME. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circulation research.* 1993; 73(1):205–9.
384. Hung TH, Charnock-Jones DS, Skepper JN, Burton GJ. Secretion of tumor necrosis factor-alpha from human placental tissues induced by hypoxia-reoxygenation causes endothelial cell activation in vitro: a potential mediator of the inflammatory response in preeclampsia. *Am J Pathol.* 2004; 164(3):1049–61.
385. Lockwood CJ, Yen CF, Basar M, Kayisli UA, Martel M, Buhimschi I, et al. Preeclampsia-related inflammatory cytokines regulate interleukin-6 expression in human decidual cells. *Am J Pathol.* 2008; 172(6):1571–9.
386. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of preeclampsia: linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction. *Microcirculation.* 2002; 9(3):147–60.
387. LaMarca BD, Alexander BT, Gilbert JS, Ryan MJ, Sedeek M, Murphy SR, et al. Pathophysiology of hypertension in response to placental ischemia during pregnancy: a central role for endothelin? *Gender medicine.* 2008; 5(Suppl A):S133–8.
388. Herse F, LaMarca B. Angiotensin II type 1 receptor autoantibody (AT1-AA)-mediated pregnancy hypertension. *Am J Reprod Immunol.* 2013; 69(4):413–8.
389. LaMarca B, Wallace K, Granger J. Role of angiotensin II type I receptor agonistic autoantibodies (AT1-AA) in preeclampsia. *Curr Opin Pharmacol.* 2011; 11(2):175–9.

390. Parrish MR, Ryan MJ, Glover P, Brewer J, Ray L, Dechend R, et al. Angiotensin II type 1 autoantibody induced hypertension during pregnancy is associated with renal endothelial dysfunction. *Gender medicine*. 2011; 8(3):184–8.
391. Wenzel K, Rajakumar A, Haase H, Geusens N, Hubner N, Schulz H, et al. Angiotensin II type 1 receptor antibodies and increased angiotensin II sensitivity in pregnant rats. *Hypertension*. 2011; 58(1):77–84. *Hypertension*. 2008; 51(4):1010–9.
392. Majetschak M, Obertacke U, Schade FU, Bardenheuer M, Voggenreiter G, Bloemeke B et al. Tumor necrosis factor gene polymorphisms, leukocyte function, and sepsis susceptibility in blunt trauma patients. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9:1205–11.
393. Brogin Moreli J, Cirino Ruocco AM, Vernini JM, Rudge MV, Calderon IM. Interleukin 10 and tumor necrosis factor alpha in pregnancy: aspects of interest in clinical obstetrics. *Obstet Gynecol*. 2012:230742.
394. Alijotas-Reig J, Llurba E, Gris JM. Potentiating maternal immune tolerance in pregnancy: a new challenging role for regulatory T cells. *Placenta*. 2014; 35:241–8.
395. Quenby S, Bates M, Doig T, Brewster J, Lewis-Jones DI, Johnson PM et al. Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod*. 1999; 14:2386–91.
396. Wedekind L, Belkacemi L. Altered cytokine network in gestational diabetes mellitus affects maternal insulin and placental-fetal development. *J Diabetes Complications*. 2016; 30(7):1393–400.
397. Coughlan MT, Oliva K, Georgion HM, Permezel JMH, Rice GE. Glucose-induced release of tumour necrosis factor-alpha from human placental and adipose tissues in gestational diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2001; 18:921–7.
398. Kirwan JP, Hauguel-De Mouzon S, Lepercq J, Challier JC, Huston-Presley L, Friedman JE. *Diabetes*. 2002; 51:2207–13.
399. Peraçoli JC, Rudge MVC, Perçoli MTS. Tumor necrosis factor-alpha in gestation and puerperium of women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol*. 2007; 57:177–85.

400. Paulesu L, Romagnoli R, Bigliardi E. Materno-fetal immunotolerance: is interleukin-1 a fundamental mediator in placental viviparity? *Dev Comp Immunol*. 2005; 29:409–15.
401. Bensi G, Raugei G, Palla E, Carinci V, Tornese Buonamassa D, Melli M. Human interleukin-1 beta gene. *Gene*. 1987; 52(1):95–101.
402. Rusterholz C, Hahn S, Holzgreve W. Role of placental produced inflammatory and regulatory cytokines in pregnancy and the etiology of preeclampsia. *Semin Immunopathol*. 2007; 29:151–62.
403. Greer IA, Lyall F, Perera T, Boswell F, Macara LM. Increased concentrations of cytokines interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in plasma of women with preeclampsia: a mechanism for endothelial dysfunction? *Obstet. Gynecol*. 1994; 84:937–40.
404. Opsjøn SL, Austgulen R, Waage A. Interleukin-1, interleukin-6 and tumor necrosis factor at delivery in preeclamptic disorders. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1995; 74:19–26.
405. Stallmach T, Hebisch G, Joller H, Kolditz P, Engelmann M. Expression pattern of cytokines in the different compartments of the feto-maternal unit under various conditions. *Reprod Fertil Dev*. 1995; 7:1573–80.
406. Heyl W, Handt S, Reister F, Gehlen J, Schroder W, Mittermayer C, et al. Elevated soluble adhesion molecules in women with pre-eclampsia. Do cytokines like tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1beta cause endothelial activation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999; 86:35–41.
407. Paulesu L, Romagnoli R, Bigliardi E. Materno-fetal immunotolerance: is interleukin-1 a fundamental mediator in placental viviparity? *Dev Comp Immunol*. 2005; 29:409–15.
408. Szarka A, Rigo J Jr., Lazar L, Beko G, Molvarec A. Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol*. 2010; 11:59.
409. Kalinderis M, Papanikolaou A, Kalinderi K, Ioannidou E, Giannoulis C, Karagiannis V, et al. Elevated serum levels of interleukin-6, interleukin-1b and

- human chorionic gonadotropin in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2011; 66:468-75.
410. Holcberg G, Amash A, Sapir O, Sheiner E, Levy S, Myatt L, et al. Perfusion with lipopolysaccharide differently affects the secretion of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist by term and preterm human placentae. *Placenta.* 2008; 29:593–601.
411. Amash A, Holcberg G, Sapir O, Huleihel M. Placental secretion of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in preeclampsia: effect of magnesium sulfate. *J Interferon Cytokine Res.* 2012; 32(9):432-41.
412. Rusterholz C, Gupta AK, Huppertz B, Holzgreve W, Hahn S. Soluble factors released by placental villous tissue: interleukin-1 is a potential mediator of endothelial dysfunction. *Am J Obstet Gynecol.* 2005; 192:618–24.
413. Luppi P, Deloia JA. Monocytes of preeclamptic women spontaneously synthesize pro-inflammatory cytokines. *Clin. Immunol.* 2006; 118:268–75.
414. Nelson KB, Dambrosia JM, Grether JK, Phillips TM. Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy. *Ann Neurol.* 1998; 44:665–75.
415. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today.* 1990; 11:443–9.
416. Ishihara, K., Hirano, T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002; 13:357–68.
417. De M, Sanford TH, Wood GW. Detection of interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in the uterus during the second half of pregnancy in the mouse. *Endocrinology.* 1992; 131:14–20.
418. Motro B, Itin A, Sachs L, Keshet E. Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1990; 87:3092–6.
419. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 1996; 271:736–41.

420. Opsjln SL, Wathen NC, Tingulstad S, Wiedswang G, Sundan A, Waage A, et al. Tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 in normal human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1993; 169:397–404.
421. Austgulen R, Lien E, Liabakk NB, Jacobsen G, Arntzen KJ. Increased levels of cytokines and cytokine activity modifiers in normal pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 1994; 57:149–55.
422. Keelan JA, Blumenstein M, Helliwell RJ, Sato TA, Marvin KW, Mitchell MD. Cytokines, prostaglandins and parturition—a review. *Placenta.* 2003; 24(Suppl. A):S33–S46.
423. Vince GS, Starkey PM, Austgulen R, Kwiatkowski D, Redman CW. Interleukin-6, tumour necrosis factor and soluble tumour necrosis factor receptors in women with pre-eclampsia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1995; 102:20–5.
424. Kupfermanc MJ, Peaceman AM, Aderka D, Wallac D, Socol ML. Soluble tumor necrosis factor receptors and interleukin-6 levels in patients with severe preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* 1996; 88:420–7.
425. Al-Othman S, Omu AE, Diejomaoh FM, Al-Yatama M, Al-Qattan F. Differential levels of interleukin 6 in maternal and cord sera and placenta in women with pre-eclampsia. *Gynecol. Obstet. Invest.* 2001; 52:60–5.
426. Borekci B, Aksoy H, Al RA, Demircan B, Kadanali S. Maternal serum interleukin-10, interleukin-2 and interleukin-6 in pre-eclampsia and eclampsia. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2007; 58:56–64.
427. Prins JR, Faas MM, Melgert BN, Huitema S, Timmer A, Hylkema MN, et al. Altered expression of immune-associated genes in first-trimester human decidua of pregnancies later complicated with hypertension or foetal growth restriction. *Placenta.* 2012; 33:453–5.
428. Chen Q, Stone P, Ching LM, Chamley L. A role for interleukin-6 in spreading endothelial cell activation after phagocytosis of necrotic trophoblastic material: implications for the pathogenesis of preeclampsia. *J. Pathol.* 2009; 217:122–30.

429. Kasraeian M, Asadi N, Vafaei H, Zamanpour T, Shahraki HR, Bazrafshan K. Evaluation of serum biomarkers for detection of preeclampsia severity in pregnant women. *Pak J Med Sci.* 2018; 34(4):869-73.
430. Moran P, Baylis PH, Lindheimer MD, Davison JM. Glomerular ultrafiltration in normal and preeclamptic pregnancy. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14(3):648–52.
431. Ekun OA, Olawumi OM, Makwe CC, Ogidi NO. Biochemical Assessment of Renal and Liver Function among Preeclamptics in Lagos Metropolis. *Int J Reprod Med.* 2018; 2018:1594182.
432. Dacaj R, Izetbegovic S, Stojkanovic G, Dresha S. Elevated Liver Enzymes in Cases of Preeclampsia and Intrauterine Growth Restriction. *Med Arch.* 2016; 70(1):44–7.
433. Thangaratinam S, Ismail KM, Sharp S, Coomarasamy A, Khan KS. Tests in Prediction of Pre-eclampsia Severity review g. Accuracy of serum uric acid in predicting complications of pre-eclampsia: a systematic review. *BJOG.*2006; 113:369-78.
434. Martin JN Jr, May WL, Magann EF, Terrone DA, Rinehart BK, Blake PG. Early risk assessment of severe preeclampsia: admission battery of symptoms and laboratory tests to predict likelihood of subsequent significant maternal morbidity. *Am J Obstet Gynecol.* 1999; 180:1407-14.
435. Kozic JR, Benton SJ, Hutcheon JA, Payne BA, Magee LA, von Dadelszen P, et al. Abnormal liver function tests as predictors of adverse maternal outcomes in women with preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Can.* 2011; 33:995-1004.
436. Ding L, Bai C, Liu Y. Interleukin-6 contributes to myocardial damage in pregnant rats with reduced uterine perfusion pressure. *Braz J Med Biol Res.* 2018; 51(8):e6921.
437. Heilmann L, Rath W, Pollow K. Hemostatic abnormalities inpatients with severe preeclampsia. *Clin Appl Thromb Hemost.*2007;13:285–91.
438. Wickstrom K, Edelstam G, Lowbeer CH, Hansson LO, Siegbahn A. Reference intervals for plasma levels offibronec-tin, von Willebrand factor, free

- protein S and antithrombin during third-trimester pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest.* 2004; 64:31–40.
439. Williams VK, Griffiths AB, Carbone S, Hague WM. Fibrinogen concentration and factor VIII activity in women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2007; 26:415–21.
440. Mello G, Parretti E, Cioni R, Lagozio C, Mealli F, Pratesi M. Individual longitudinal patterns in biochemical and hematological markers for the early prediction of pre-eclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2002;11(2):93–9.
441. Phaloprakarn C, Tangjitgamol S. Impact of high maternal hemoglobin at first antenatal visit on pregnancy outcomes: a cohort study. *J Perinat Med.* 2008;36(2):115–9.
442. von Tempelhoff GF, Heilmann L, Rudig L, Pollow K, Hommel G, Koscielny J. Mean maternal second-trimester hemoglobin concentration and outcome of pregnancy: a population-based study. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2008;14(1):19–28.
443. Jasovic-Siveska E, Jasovic V. Prediction of mild and severe preeclampsia with blood pressure measurements in first and second trimester of pregnancy. *Ginekol Pol.* 2011; 82(11):845–50.
444. Amburgey OA, Ing E, Badger GJ, Bernstein IM. Maternal hemoglobin concentration and its association with birth weight in newborns of mothers with preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2009; 22(9):740–4.
445. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011; 25:287-299.
446. Chaiworapongsa T, Chaemsaihong P, Yeo L, Romero R. Pre-eclampsia part 1: Current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol* 2014; 10:466-480.
447. Sanchez-Aranguren LC, Prada CE, Riano-Medina CE, Lopez M. Endothelial dysfunction and preeclampsia: Role of oxidative stress. *Front Physiol* 2014; 5:372.
448. Myatt L. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta* 2010; 31 Suppl:S66-69.

449. Yang Y, Parsons KK, Chi L, Malakauskas SM, Le TH. Glutathione s-transferase-micro1 regulates vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and oxidative stress. *Hypertension* 2009; 54:1360-1368.
450. Zusterzeel PL, Visser W, Peters WH, Merkus HW, Nelen WL, Steegers EA. Polymorphism in the glutathione S-transferase P1 gene and risk for preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2000; 96:50–4.
451. Savić-Radojević A, Mažibrada I, Djukić T, Stanković ZB, Plješa-Ercegovac M, Sedlecky K, Bjekić-Macut J, Simić T, Mastorakos G, Macut D. Glutathione S-transferase (GST) polymorphism could be an early marker in the development of polycystic ovary syndrome (PCOS) - an insight from non-obese and non-insulin resistant adolescents. *Endokrynol Pol.* 2018; 69(4):366-374.
452. Barseem N, Elsamalehy M. Gene Polymorphisms of Glutathione S-Transferase T1/M1 in Egyptian Children and Adolescents with Type 1 Diabetes Mellitus. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2017; 9(2):138-143.
453. Grubisa I, Otasevic P, Vucinic N, Milicic B, Jozic T, Krstic S, Milasin J. Combined GSTM1 and GSTT1 null genotypes are strong risk factors for atherogenesis in a Serbian population. *Genet Mol Biol.* 2018;41(1):35-40.
454. Tang JJ, Wang MW, Jia EZ, Yan JJ, Wang QM, Zhu J, Yang ZJ, Lu X, Wang LS. The common variant in the GSTM1 and GSTT1 genes is related to markers of oxidative stress and inflammation in patients with coronary artery disease: a case-only study. *Mol Biol Rep.* 2010; 37(1):405-410.
455. Abbas S, Raza ST, Chandra A, Rizvi S, Ahmed F, Eba A, Mahdi F. Association of ACE, FABP2 and GST genes polymorphism with essential hypertension risk among a North Indian population. *Ann Hum Biol.* 2015; 42(5):461-469.
456. Eaton DL. Biotransformation enzyme polymorphism and pesticide susceptibility. *Neurotoxicology* 2000; 21:101–111.
457. Norppa H. Genetic susceptibility, biomarker responses, and cancer. *Mutat Res* 2003; 544:339–348.

458. Rebbeck TR. Biomarkers of inherited susceptibility and cancer. *IARC Sci Publ* 2004; 157:91–103.
459. Kumtepe Y, Börekçi B, Aksoy H, Altinkaynak K, Ingeç M, Ozdiller O. Measurement of plasma glutathione S-transferase in hepatocellular damage in preeclampsia. *J Int Med Res* 2002; 30:483–487.
460. Lachmeijer AM, Dekker GA, Pals G, Aarnoudse JG, ten Kate LP, Arngrimsson R. Searching for preeclampsia genes: the current position. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 105:94–113.
461. Cockell AP, Poston L. Flow-mediated vasodilatation is enhanced in normal pregnancy but reduced in preeclampsia. *Hypertension*. 1997;30(2 Pt 1):247-51.
462. Dorup I, Skajaa K, Sorensen KE. Normal pregnancy is associated with enhanced endothelium dependent flow-mediated vasodilation. *Am J Physiol*. 1999;276(3 Pt 2):H821-5.
463. Senthil D, Raveendran M, Shen YH, Utama B, Dudley D, Wang J, et al. Genotype dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells. *DNA Cell Biol*. 2005; 24(4):218–24.
464. Fairchild TA, Fulton D, Fontana JT, Gratton JP, McCabe TJ, Sessa WC. Acidic hydrolysis as a mechanism for the cleavage of the Glu (298) → Asp variant of human endothelial nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem*. 2001; 276(28):26674–9.
465. Tesouro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2000; 14(97(6)):2832–5.
466. Gannoun BAM, Zitouni H, Raguema N, Maleh W, Gris JC, Almawi W, et al. Association of common eNOS/NOS3 polymorphisms with preeclampsia in Tunisian Arabs. *Gene*. 2015; 569(2):303-7.

467. Seremak-Mrozikiewicz, Drews K, Barlik M, Sieroszewski E, Grześkowiak P. Mrozikiewicz, The significance of -786T>C polymorphism of endothelial NO synthase (eNOS) gene in severe preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011; 24:432–6.
468. Groten T, Schleussner E, Lehmann T, Reister F, Holzer B, Danso KA, et al. eNOS14 and EPHX1 polymorphisms affect maternal susceptibility to preeclampsia: analysis of five polymorphisms predisposing to cardiovascular disease in 279 Caucasian and 241 African women. *Arch Gynecol Obstet.* 2014; 289(3):581-93.
469. Deng J, You FZ, Cheng GM, Xue YJ, Yang, Q, et al. Correlation between gene polymorphisms of ACE, AT_1R, eNOS and severe preeclampsia. *Matern. Child Health Care China.* 2010; 5277–9.
470. Zdoukopoulos N, Doxani C, Messinis IE, Stefanidis I, Zintzaras E. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene in preeclampsia: a candidate-gene association study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2011; 11–89.
471. Sharma D, Hussain SA, Akhter N, Singh A, Trivedi SS, Bhattacharjee J. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene Glu298Asp polymorphism and expression in North Indian preeclamptic women. *Pregnancy Hypertens.* 2014; 4(1):65-9.
472. Sandrim VC, de Syllos RW, Lisboa HR, Tres GS, Tanus-Santos JE. Influence of eNOS haplotypes on the plasma nitric oxide products concentrations in hypertensive and type 2 diabetes mellitus patients. *Nitric Oxide.* 2007; 16(3):348-55.
473. Yu CK, Casas JP, Savvidou MD, Sahemey MK, Nicolaidis KH, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (Glu298Asp) and development of pre-eclampsia: a case-control study and a meta-analysis. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2006; 6:7.
474. Yoshimura T, Chowdhury FA, Yoshimura M, Okamura H. Genetic and environmental contributions to severe preeclampsia: lack of association with the endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp variant in a developing country. *Gynecol Obstet Invest.* 2003; 56:10–3.

475. Landau R, Xie H-G, Dishy V, Wood AJJ, Stein CM, Smiley RM. No association of the Asp298 variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with preeclampsia. *Am J Hypertens*. 2004; 17:391–4.
476. Rahimi Z, Aghaei A, Rahimi Z, Vaisi-Raygani A. Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) 4a/b and G894T Polymorphisms and Susceptibility to Preeclampsia. *J Reprod Infertil*. 2013; 14(4):184-9.
477. Alpoim PN, Gomes KB, Pinheiro Mde B, Godoi LC, Jardim LL, Muniz LG, et al. Polymorphisms in endothelial nitric oxide synthase gene in early and late severe preeclampsia. *Nitric Oxide*. 2014; 42:19-23.
478. Chen Y, Wang D, Zhou M, Chen X, Chen J. Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in preeclampsia in a Han Chinese population. *Gynecol Obstet Invest*. 2014; 77(3):150-5.
479. Ozturk E, Balat O, Pehlivan S, Ugur MG, Sever T. Genetic variation of myeloperoxidase gene contributes to preeclampsia: a preliminary association study in Turkish population. *Hypertens Pregnancy*. 2011; 30:377–83.
480. Perlik M, Seremak-Mrozikiewicz A, Barlik M, Kurzawińska G, Kraśnik W, Drews K. Genetic variants of endothelial nitric synthase in gestational hypertension and preeclampsia. *Ginekol Pol*. 2012; 83(9):652–9.
481. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, et al. T-786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation*. 1999; 99(22):2864-70.
482. Nakayama M, Yoshimura M, Sakamoto T, Abe K, Yamamuro M, Shono M, et al. A -786T>C polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene reduces serum nitrite/nitrate levels from the heart due to an intracoronary injection of acetylcholine. *Pharmacogenet Genomics*. 2006; 16:339–45.
483. Sandrim VC, de Syllos RW, Lisboa HR, Tres GS, Tanus-Santos JE. Influence of eNOS haplotypes on the plasma nitric oxide products concentrations in hypertensive and type 2 diabetes mellitus patients. *Nitric Oxide*. 2007; 16:348–55.
484. Leonardo DP, Albuquerque DM, Lanaro C, Baptista LC, Cecatti JG, Surita FG, et al. Association of Nitric Oxide Synthase and Matrix Metalloprotease Single

- Nucleotide Polymorphisms with Preeclampsia and Its Complications. *PLoS One*. 2015; 10(8):e0136693.
485. Akhter MS, Arijit B, Renu S. Role of endothelial nitric oxide synthase gene in vascular diseases. *East J Med*. 2009; 14(2):46-50.
486. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 245(1):190-3.
487. Tempfer CB, Dorman K, Deter RL, O'Brien WE, Gregg AR. An endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2001; 20:107–18.
488. Coral-Vázquez RM, Romero Arauz JF, Canizales-Quinteros S, Coronel A, Valencia Villalvazo EY, Hernández Rivera J, et al. Analysis of polymorphisms and haplotypes in genes associated with vascular tone, hypertension and oxidative stress in Mexican-Mestizo women with severe preeclampsia. *Clin Biochem*. 2013; 46(7-8):627-32.
489. Sandrim VC, Palei AC, Cavalli RC, Araújo FM, Ramos ES, Duarte G, et al. eNOS haplotypes associated with gestational hypertension or preeclampsia. *Pharmacogenet Genomics*. 2008; 9(10):1467–73.
490. Díaz-Olguín L, Coral-Vázquez RM, Canto-Cetina T, Canizales-Quinteros S, Ramírez Regalado B, Fernández G, et al., Endothelial nitric oxide synthase haplotypes are associated with preeclampsia in Maya mestizo women. *Dis Markers*. 2011; 31:83–9.
491. Zhu BT, Wu KY, Wang P, Cai MX, Conney AH. O-methylation of catechol estrogens by human placental catechol- o-methyltransferase: interindividual differences in sensitivity to heat inactivation and to inhibition by dietary polyphenols. *Drug Metab Dispos*. 2010; 38:1892–9.
492. Zhu BT. Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated methylation metabolism of endogenous bioactive catechols and modulation by endobiotics and xenobiotics: importance in pathophysiology and pathogenesis. *Curr Drug Metab*. 2002; 3:321–49.

493. Barnea ER, MacLusky NJ, DeCherney AH, Naftolin F. Catechol-O-methyltransferase activity in the human term placenta. *Am J Perinatol.* 1988; 5:121–7.
494. Shield AJ, Thomae BA, Eckloff BW, Wieben ED, Weinshilboum RM. Human catechol O-methyltransferase genetic variation: gene resequencing and functional characterization of variant allozymes. *Mol Psychiatry.* 2004; 9:151–60.
495. Kamide K, Kokubo Y, Yang J, Matayoshi T, Inamoto N, Takiuchi S, et al. Association of genetic polymorphisms of ACADSB and COMT with human hypertension. *J Hypertens.* 2007; 25:103-10.
496. Krnjeta T, Mirkovic Lj, Ignjatovic S, Tomasevic D, Lukic J, Topalov D, et al. Protective role of maternal p.val158met catechol-omethyltransferase polymorphism against early-onset preeclampsia and its complications. *J Med Biochem.* 2016; 35:312–8.
497. Taravati A, Tohidi F, Moniri M, Kamali K. Catechol-O-methyltransferase Gene Polymorphism (Val158Met) and Development of Pre-eclampsia. *Arch Med Res.* 2017; 48(2):180-6.
498. Caughey AB, Stotland NE, Washington AE, Escobar GJ. Maternal ethnicity, paternal ethnicity, and parental ethnic discordance: predictors of preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2005; 106:156–61.
499. Pertegal M, Fenoy FJ, Hernández M, Mendiola J, Delgado JL, Bonacasa B, et al. Fetal Val108/158Met catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphism and placental COMT activity are associated with the development of preeclampsia. *Fertil Steril.* 2016; 105(1):134-43.
500. Glatt SJ, Faraone SV, Tsuang MT. Association between a functional catechol O-methyltransferase gene polymorphism and schizophrenia: metaanalysis of case-control and family-based studies. *Am J Psychiatry.* 2003; 160:469–76.
501. Glaser B, Debbane M, Hinard C, Morris MA, Dahoun SP, Antonarakis SE, et al. No evidence for an effect of COMT Val158Met genotype on executive function in patients with 22q11 deletion syndrome. *Am J Psychiatry.* 2006; 163:537–9.

502. Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, et al. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition. *Hum Mol Genet.* 2005; 14:135–43.
503. Nackley AG, Shabalina SA, Tchivileva IE, Satterfield K, Korchynskiy O, Makarov SS, et al. Human catechol-O-methyl transferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science.* 2006; 314:1930–3.
504. Hill LD, York TP, Kusanovic JP, et al. Epistasis between COMT and MTHFR in maternal-fetal dyads increases risk for preeclampsia. *PLoS One* 2011;6. pp. e16681.
505. Ribeiro VR, Romao-Veiga M, Romagnoli GG, Matias ML, Nunes PR, Borges VTM, et al. Association between cytokine profile and transcription factors produced by T-cell subsets in early- and late-onset pre-eclampsia. *Immunology.* 2017; 152(1):163-73.
506. Gharesi-Fard B, Mobasher-Nejad F, Nasri F. The expression of T-helper associated transcription factors and cytokine genes in pre-eclampsia. *Iran J Immunol.* 2016; 13:296–308.
507. Peracoli JC, Bannwart-Castro CF, Romao M, Weel IC, Ribeiro VR, Borges VT, et al. High levels of heat shock protein 70 are associated with pro-inflammatory cytokines and may differentiate early- from late-onset preeclampsia. *J Reprod Immunol.* 2013; 100:129–34.
508. Zhang Z, Liu H, Shi Y, Xu N, Wang Y, Li A et al. Increased circulating Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with severe preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2016; 11:1–8.
509. Weaver CT, Hatton RD. Interplay between the TH17 and Treg cell lineages: a (co)evolutionary perspective. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9:883–9.
510. Afzali B, Mitchell P, Lechler RI, John S, Lombardi G. Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clin Exp Immunol.* 2010; 159:120–30.

511. Rahimzadeh M, Norouzian M, Arabpour F, Naderi N. Regulatory T-cells and preeclampsia: an overview of literature. *Expert Rev Clin Immunol*. 2016; 12:209–27.
512. Vitoratos N, Economou E, Iavazzo C, Panoulis K, Creatsas G. Maternal serum levels of TNF-alpha and IL-6 long after delivery in preeclamptic and normotensive pregnant women. *Mediators Inflamm*. 2010; 2010:908649.
513. Sibai B, Romero R, Klebanoff MA, Rice MM, Caritis S, Lindheimer MD, et al. Maternal plasma concentrations of the soluble tumor necrosis factor receptor 2 are increased prior to the diagnosis of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2009; 200:630.
514. Lau SY, Guild SJ, Barrett CJ, Chen Q, McCowan L, Jordan V, Chamley LW. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-10 levels are altered in preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Reprod Immunol*. 2013; 70(5):412-27.
515. Mihiu D, Razvan C, Malutan A, Mihaela C. Evaluation of maternal systemic inflammatory response in preeclampsia. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2015; 54(2):160-6.
516. Giorgi VS, Witkin SS, Bannwart-Castro CF, Sartori MS, Romão-Veiga M, Borges VT, et al. Elevated circulating adenosine deaminase activity in women with preeclampsia: association with pro-inflammatory cytokine production and uric acid levels. *Pregnancy Hypertens*. 2016; 6(4):400-5.
517. Dong W, Yin L. Expression of lipoxin A4, TNF α and IL-1 β in maternal peripheral blood, umbilical cord blood and placenta, and their significance in preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2014; 33(4):449-56.
518. Udenze I, Amadi C, Awolola N, Makwe CC. The role of cytokines as inflammatory mediators in preeclampsia. *Pan Afr Med J*. 2015; 20:219.
519. Nunez-Gonzales JR, Sanabria-Vera CJ, Romero-Adrian T. Serum measurements of TNF-a and TNF-a soluble receptors in normal pregnancies and preeclampsia. *Invest Clin*. 2001; 42:171-82.

520. Roudsari FV, Ayati S, Ayatollahi H, Esmaeily H, Hasanzadeh M, Shahabian M, et al. Comparison of maternal serum Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) in severe and mild preeclampsia versus normal pregnancy. *Iran J Reprod Med.* 2009; 7:153-6.
521. Mundim GJ, Paschoini MC, Araujo Júnior E, Da Silva Costa F, Rodrigues Júnior V. Assessment of angiogenesis modulators in pregnant women with preeclampsia: a case-control study. *Arch Gynecol Obstet.* 2016; 293(2):369-75.
522. Siljee JE, Wortelboer EJ, Koster MP, Imholz S, Rodenburg W, Visser GH, et al. Identification of interleukin-1 beta, but no other inflammatory proteins, as an early onset pre-eclampsia biomarker in first trimester serum by bead-based multiplexed immunoassays. *Prenat Diagn.* 2013; 33(12):1183-8.
523. Campos-Cañas J, Romo-Palafox I, Albani-Campanario M, Hernández-Guerrero C. An imbalance in the production of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines is observed in whole blood cultures of preeclamptic women in comparison with healthy pregnant women. *Hypertens Pregnancy.* 2014; 33(2):236-49.
524. Alanbay I, Coksuer H, Ercan CM, Ustun Y, Pala G, Karasahin KE, et al. Chitotriosidase, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha levels in mild preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 2012; 285(6):1505-11.
525. Montagnana M, Lippi G, Albiero A, Salvagno GL, Tranchi M, Guidi GC. Serum pro-inflammatory cytokines in physiological and pre-eclamptic pregnancies. *Gynecol Endocrinol.* 2008; 24:113-6.
526. Serin IS, Ozcelik B, Basbug M, Kilic H, Okur D, Erez R. Predictive value of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2002; 100:143-5.
527. Guven MA, Coskun A, Ertas IE, Aral M, Zencirci B, Oksuz H. Association of maternal serum CRP, IL-6, TNF-a, homocysteine, folic acid and vitamin b12 levels with the severity of preeclampsia and fetal birth weight. *Hypertens Pregnancy.* 2009;28:190-200.

528. Cackovic M, Buhimschi CS, Zhao G. Fractional excretion of tumor necrosis factor- α in women with severe preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2008;112:93–100.
529. Tosun M, Celik H, Avci B, Yavuz E, Alper T, Malatyalioglu E. Maternal and umbilical serum levels of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor- α in normal pregnancies and in pregnancies complicated by preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010; 23(8):880–6.
530. Hayashi M, Ueda Y, Ohkura T, Inaba N. IL-6 concentrations in the placenta and blood in normal pregnancies and preeclampsia. *Horm Metab Res.* 2005; 37(7):419–24.
531. Artunc-Ulkumen B, Guvenc Y, Goker A, Gozukara C. Maternal Serum S100-B, PAPP-A and IL-6 levels in severe preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 2015; 292(1):97-102.
532. Silver RM, Schwinzer B, McGregor JA. Interleukin-6 levels in amniotic fluid in normal and abnormal pregnancies: preeclampsia, small-for-gestational-age fetus, and premature labor. *Am J Obstet Gynecol.* 1993; 169(5):1101-5.
533. Kauma SW, Wang Y, Walsh SW. Preeclampsia is associated with decreased placental interleukin-6 production. *J Soc Gynecol Investig.* 1995; 2(4):614-7.
534. Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP. Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86(6):2505-12.
535. Zhao S, Gu Y, Dong Q, Fan R, Wang Y. Altered interleukin-6 receptor, IL-6R and gp130, production and expression and decreased SOCS-3 expression in placentas from women with pre-eclampsia. *Placenta.* 2008; 29(12):1024-8.
536. LaMarca B. Progress toward identifying potential markers for pre-eclampsia: role of agonistic autoantibodies to the angiotensin II type I receptor. *Hypertension.* 2010; 55:236–7.
537. Gadonski G, LaMarca BB, Sullivan E, Bennett W, Chandler D, Granger JP. Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of interleukin 6. *Hypertension.* 2006; 48:711–16.

538. Roberts JM, Redman CWG. Pre-eclampsia: more than pregnancy induced hypertension. *Lancet* 1993; 341:1447–1451.
539. Cannon JG, Van Der Meer JWM, Kwiatkowski D, Endres S, Lonnemann G, Burke JF, et al. Interleukin-1b in human plasma: optimization of blood collection, plasma extraction, and radioimmunoassay methods. *Lymphokine Res.* 1988; 7:457–67.
540. Flower L, Ahuja RH, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Effects of sample handling on the stability of interleukin 6, tumour necrosis factor- α and leptin. *Cytokine.* 2000; 12:1712–6.
541. Grimble RF, Tappia PS. Modulation of pro-inflammatory cytokine biology by unsaturated fatty acids. *Z Ernährungswiss.* 1998; 37:57–65.
542. Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest.* 1995; 95:2111–9.
543. Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, et al. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor- α , in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:4196–200.
544. Petrovsky N, McNair P, Harrison LC. Diurnal rhythms of proinflammatory cytokines: regulation by plasma cortisol and therapeutic implications. *Cytokine* 1998; 10:307–312.
545. Payette C, Blackburn P, Lamarche B, Tremblay A, Bergeron J, Lemieux I, Despres J-P, Couillard C. Sex differences in postprandial plasma tumor necrosis factor- α , interleukin-6, and C-reactive protein concentrations. *Metabolism* 2009; 58:1593–1601.
546. Zhou X, Fragala MS, McElhaney JE, Kuchel GA. Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13:541–547.
547. Hamai Y, Fujii T, Yamashita T, Nishina H, Kozuma S, Mikami Y, et al. Evidence for an elevation in serum interleukin-2 and tumor necrosis factor- α

- levels before the clinical manifestations of preeclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 1997; 38:89–93.
548. Tangeras LH, Austdal M, Skrastad RB, Salvesen KA, Austgulen R, Bathen TF, et al. Distinct First Trimester Cytokine Profiles for Gestational Hypertension and Preeclampsia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35(11):2478-85.
549. Ferguson KK, Meeker JD, McElrath TF, Mukherjee B, Cantonwine DE. Repeated measures of inflammation and oxidative stress biomarkers in preeclamptic and normotensive pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 2017; 216(5):527-9.
550. Coronel A, Villalvazo EYV, Rivera JH, Regalado BR, Mejía DR, Canto P. Analysis of polymorphisms and haplotypes in genes associated with vascular tone, hypertension and oxidative stress in Mexican-Mestizo women with severe preeclampsia. *Clin Biochem.* 2013; 46:627–32.
551. Kima YJ, Park HS, Parka MH, Suh SH, Pange MG. Oxidative stress-related gene polymorphism and the risk of preeclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005; 119:42–6.
552. Peters WH, Burton GJ, Visser W, Roelofs HM, Steegers EA. Susceptibility to pre-eclampsia is associated with multiple genetic polymorphisms in maternal biotransformation enzymes. *Gynecol Obstet Invest.* 2007; 63:209–13.
553. Rutherford K, Bennion BJ, Parson WW, Daggett V. The 108M polymorph of human catechol O-methyltransferase is prone to deformation at physiological temperatures. *Biochemistry.* 2006; 45:2178–88.
554. Schwahn B, Rozen R. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences. *Am J Pharmacogenomics.* 2001; 1: 189–201.
555. Krnjeta T, Mirkovic Lj, Ignjatović S, Tomašević D, Lukić J, Topalov D, et al. Association between Val158Met COMT, TNF- α -857 C>T, TNFR1 36 A>G, IL-1 α 4845 G>T and IL-10 -1082 A>G Polymorphisms and Risk of Early-Onset Preeclampsia and Its Complications. *Vojnosanit Pregl.* 2017; 74(12):1155–61.
556. Hallemeesch MM, Janssen BJ, De Jonge WJ, Soeters PB, Lamers WH, Deutz NE. Increased iNOS-mediated and decreased eNOS-mediated NO production reflect

- blood pressure changes in LPSchallenged mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003; 285:871-5.
557. Michel T. Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Braz J Med Biol Res.* 1999; 32:1361–6.
558. Singh A, Sharma D, Raghunandan C, Bhattacharjee J. Role of Inflammatory Cytokines and eNOS Gene Polymorphism in Pathophysiology of Pre-Eclampsia. *Am J Reprod Immunol.* 2010; 63(3):244-51.
559. Orshal JM, Khalil RA. Reduced endothelial NO-cGMP mediated vascular relaxation and hypertension in IL-6 infused in pregnant rats. *Hypertension.* 2004; 43:434–44.
560. Walsh SW. Obesity: a risk factor for preeclampsia. *Trends Endocrinol Metab.* 2007; 18:365–70.
561. Almoshabek HA, Mustafa M, Al-Asmari MM, Alajmi TK, Al-Asmari AK. Association of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 deletion polymorphisms with obesity and their relationship with body mass index, lipoprotein and hypertension among young age Saudis. *JRSM Cardiovasc Dis.* 2016; 5:2048004016669645.
562. Nasr HB, Dimassi S, M'hadhbi R, Debbabi H, Kortas M, Tabka Z, et al. Functional G894T (rs1799983) polymorphism and intron-4 VNTR variant of nitric oxide synthase (NOS3) gene are susceptibility biomarkers of obesity among Tunisians. *Obes Res Clin Pract.* 2016; 10(4):465-75.
563. Large V, Arner P. Regulation of lipolysis in humans. Pathophysiological modulation in obesity, diabetes, and hyperlipidaemia. *Diabetes Metab.* 1998; 24:409-18.
564. Tworoger SS, Chubak J, Aiello EJ, Yasui Y, Ulrich CM, Farin FM, et al. The effect of CYP19 and COMT polymorphisms on exercise-induced fat loss in postmenopausal women. *Obes Res.* 2004; 12:972-81.
565. Annerbrink K, Westberg L, Nilsson S, Rosmond R, Holm G, Eriksson E. Catechol O-methyltransferase val158-met polymorphism is associated with abdominal obesity and blood pressure in men. *Metabolism.* 2008; 57:708–11.

566. Challier JC, Basu S, Bintein T, Minium J, Hotmire K, Catalano PM, et al. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta*. 2008; 29:274–81.
567. Zusterzeel PL, Nelen WL, Roelofs HM, Peters WH, Blom HJ, Steegers EA. Polymorphisms in biotransformation enzymes and the risk for recurrent early pregnancy loss. *Mol Hum Reprod*. 2000; 6(5):474-8.
568. Polimanti R, Graziano ME1, Lazzarin N2, Vaquero E3, Manfellotto D2, Fuciarelli M4. GSTO1 uncommon genetic variants are associated with recurrent miscarriage risk. *Fertil Steril*. 2014; 101(3):735-9.
569. Sata F, Yamada H, Kondo T, Gong Y, Tozaki S, Kobashi G, et al. Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol Hum Reprod*. 2003; 9(3):165-9.
570. Azani A, Hosseinzadeh A, Azadkhah R, Zonouzi AAP, Zonouzi AP, Aftabi Y, et al. Association of endothelial nitric oxide synthase gene variants (-786 T>C, intron 4 b/a VNTR and 894 G>T) with idiopathic recurrent pregnancy loss: A case-control study with haplotype and in silico analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017; 215:93-100.
571. Zammiti W, Mtiraoui N, Mahjoub T. Lack of consistent association between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms, homocysteine levels and recurrent pregnancy loss in Tunisian women. *Am J Reprod Immunol*. 2008; 59:139–45.
572. Oztürk E, Balat O, Pehlivan S, Uğur MG, Ozkan Y, Sever T, et al. Nitric oxide levels and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Turkish women with idiopathic recurrent miscarriage. *J Turkish German Gynecol Assoc*. 2011; 12:234.
573. Zhao X, Li Q, Yu F, Lin L, Yin W, Li J, et al.. Gene polymorphism associated with endothelial nitric oxide synthase (4VNTR, G894T, C786T) and unexplained recurrent spontaneous abortion risk: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2019; 98(4):e14175.

574. Perez N, Peterlin B, Volk M, Kapović M, Ostojić S. A critical update on endothelial nitric oxide synthase gene variations in women with idiopathic recurrent spontaneous abortion: genetic association study, systematic review and meta-analyses. *Mol Hum Reprod*. 2015; 21(5):466–78.
575. Su MT, Lin SH, Chen YC. Genetic association studies of angiogenesis and vasoconstriction-related genes in women with recurrent pregnancy loss: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2011; 17(6):803–12.
576. Cao Y, Zhang Z, Xu J, Wang J, Yuan W, Shen Y, et al. Genetic association studies of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in women with unexplained recurrent pregnancy loss: a systematic and meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2014; 41(6):3981–9.
577. Turan F, Ilhan N, Kaman D, Ateş K, Kafkasli A. Glu298Asp polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene and plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in Turkish pre-eclamptic women without fetal growth retardation. *J Obstet Gynaecol Res*. 2010; 36(3):495-501.
578. Fatini C, Sticchi E, Gensini F, Genuardi M, Tondi F, Gensini GF, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene influences the risk of pre-eclampsia, the recurrence of negative pregnancy events, and the maternal-fetal flow. *J Hypertens*. 2006; 24(9):1823-9.
579. Wang X, Zuckerman B, Pearson C, Kaufman G, Chen C, Wang G, et al. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA* 2002; 287: 195–202.
580. Vaessen N, Janssen JA, Heutink P, Hofman A, Lamberts SW, Oostra BA, et al. Association between genetic variation in the gene for insulin-like growth factor-I and low birth weight. *Lancet* 2002; 359: 1036–7.
581. Yager JD, Liehr JG. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36: 203–32.
582. Malins DC, Holmes EH, Polissar NL, Gunselman SJ. The etiology of breast cancer: characteristic alterations in hydroxyl radical-induced DNA base lesions

- during oncogenesis with potential for evaluating incidence risk. *Cancer*. 1993; 71: 3036–43.
583. Malins DC, Polissar NL, Gunselman SJ. Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to hydroxyl radical-induced DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 2557–63.
584. Scholl TO, Stein TP. Oxidant damage to DNA and pregnancy outcome. *J Matern Fetal Med* 2001; 10: 182–5.
585. Danileviciute A, Grazuleviciene R, Paulauskas A, Nadisauskiene R, Nieuwenhuijsen MJ. Low level maternal smoking and infant birthweight reduction: genetic contributions of GSTT1 and GSTM1 polymorphisms. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2012; 12:161.
586. Aagaard-Tillery K, Spong CY, Thom E, Sibai B, Wendel Jr G, Wenstrom K, et al. Pharmacogenomics of Maternal Tobacco Use: Metabolic Gene Polymorphisms and Risk of Adverse Pregnancy Outcomes. *Obstet Gynecol*. 2010; 115(3):568–77.
587. Pastrakuljic A, Derewlany LO, Koren G. Maternal cocaine use and cigarette smoking in pregnancy in relation to amino acid transport and fetal growth. *Placenta*. 1999; 20:499–512.
588. Castro LC, Allen R, Ogunyerni D, Roll K, Platt LD. Cigarette smoking during pregnancy: acute effects on uterine flow velocity waveforms. *Obstet Gynecol*. 1993; 81:551–5.
589. Lambers DS, Clark K. Maternal and fetal physiologic effects of nicotine. *Semin Perinatol*. 1996; 20:115–26.
590. Perera F, Jedrychowski W, Rauh V, Whyatt RM. Molecular epidemiologic research on the effects of environmental pollutants on the fetus. *Environ Health Perspect*. 1999; 107 Supp 3:451–60.
591. Gladen BC, Zadorozhnaja TD, Chislovska N, Hryhorczuk DO, Kennicutt MC 2nd, Little RE. Polycyclic aromatic hydrocarbons in placenta. *Hum Experiment Toxicol*. 2000; 19:597–603.

592. Daube H, Scherer G, Riedel K, Ruppert T, Tricker AR, Rosenbaum P, et al. DNA adducts in human placenta in relation to tobacco smoke exposure and plasma antioxidant status. *J Canc Res Clin Oncol*. 1997; 123:141–51.
593. Conde-Agudelo A, Althabe F, Belizán JM, Kafury-Goeta AC. Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: A systematic review. *Am J Obstet Gynecol*. 1999; 181:1026–35.
594. Sidle EH, Casselman R, Smith GN. Effect of cigarette smoke on placental antioxidant enzyme expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007; 293:R754–R758.
595. Mehendale R, Hibbard J, Fazleabas A, Leach R. Placental angiogenesis markers sFlt-1 and PlGF: Response to cigarette smoke. *Am J Obstet Gynecol*. 2007; 197:363-5.

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Tamara Šljivančanin Jakovljević je rođena u Beogradu, 1985. godine. Osnovno i srednje obrazovanje je završila u Beogradu sa odličnim uspehom, kao nosilac Vukove diplome. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala školske 2004/2005. godine, a diplomirala je u julu 2010. godine sa prosečnom ocenom 9.27. Školske 2010/2011. godine upisala je Specijalističke akademske studije, smer Humana reprodukcija, na Medicinskom fakultetu u Beogradu, koje je završila oktobra 2012. godine, odbranom završnog akademskog specijalističkog rada pod nazivom „Perinatalni ishodi trudnoća začetih postupkom vantelesnog oplođenja“, mentor Prof. dr Olivera Kontić-Vučinić. Školske 2012/2013. godine uspisala je Doktorske studije na Medicinskom fakultetu u Beogradu, smer Humana reprodukcija, perinatologija i neonatologija i položila sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija. Nakon završenih osnovnih studija, obavezni lekarski staž je obavila na klinikama Vojnomedicinske akademije, a u martu 2011. godine položila je stručni ispit za doktora medicine. Od aprila 2011. godine zaposlena je na Ginekološko-akušerskoj klinici „Narodni Front“, na odeljenju neonatologije. U oktobru 2013. godine upisala je specijalizaciju iz pedijatrije. Kao autor ili koautor bila je učesnik brojnih kongresa sa nacionalnim i internacionalnim učešćem iz oblasti pedijatrije, neonatologije i perinatologije. U toku osnovnih studija kao autor i koautor učestvovala je na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima. Tokom osnovnih studija, kao demonstrator bila je uključena u izvođenje praktične nastave na predmetima Medicinska i klinička biohemija i Patološka fiziologija. Bila je član i potpredsednik Centra za stručni i naučno-istraživački rad studenata Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Prvi je autor 2 rada objavljena u časopisima M22 i M23 kategorije, koautor na radu objavljenom u časopisu M22 kategorije, na dva rada objavljena u časopisu M23 kategorije i jednom radu objavljenom u časopisu koji nije na SCI listi. Od novembra 2012. godine je spoljni saradnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, pod brojem 175064, rukovodioca Akademika Prof. dr Nebojše Radunovića: „Izučavanje patofizioloških procesa kod embriona i fetusa u trudnoćama nastalim asistiranom reprodukcijom i usavršavanje postupaka za njihovo pravovremeno otkrivanje“.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Tamara M. Šljivančanin Jakovljević

broj upisa HPN 05/12

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

**„ULOGA POLIMORFIZAMA GENA ZA ENDOTELNU AZOT OKSID SINTETAZU,
KATEHOL O-METILTRANSFERAZU, GLUTATION S-TRANSFERAZU M1 I T1 I
EKSPRESIJA PROINFLAMATORNIH CITOKINA U POJAVI PREEKLAMPSIJE“**

rezultat sopstvenog istraživačkog rada,

- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 17.05.2019.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Tamara M. Šljivančanin Jakovljević

Broj upisa HPN 05/12

Studijski program Humana reprodukcija, perinatologija i neonatologija

Naslov rada „**ULOGA POLIMORFIZAMA GENA ZA ENDOTELNU AZOT OKSID
SINTETAZU, KATEHOL O-METILTRANSFERAZU, GLUTATION S-TRANSFERAZU
M1 I T1 I EKSPRESIJA PROINFLAMATORNIH CITOKINA U POJAVI
PREEKLAMPSIJE**“

Mentor Prof. dr Olivera Kontić-Vučinić

Komentor Prof. dr Jelena Milašin

Potpisani Tamara M. Šljivančanin Jakovljević

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 17.05.2019.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„ULOGA POLIMORFIZAMA GENA ZA ENDOTELNU AZOT OKSID SINTETAZU, KATEHOL O-METILTRANSFERAZU, GLUTATION S-TRANSFERAZU M1 I T1 I EKSPRESIJA PROINFLAMATORNIH CITOKINA U POJAVI PREEKLAMPSIJE“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

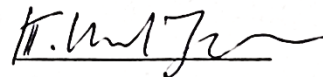
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 17.05.2019.



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.