

# Kongenitalne malformacije u trudnica dijabetičarki

---

Lončar, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:099990>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Matea Lončar**

**Kongenitalne malformacije  
u trudnica dijabetičarki**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2018.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Matea Lončar**

**Kongenitalne malformacije  
u trudnica dijabetičarki**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2018.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Odjelu za dijabetes i fetalni rast na Klinici za ženske bolesti i porode KBC-a Zagreb pod vodstvom doc.dr.sc. Vite Starčevića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2017/2018.

## KRATICE

3-DG 3-deoksiglukoza

4-HNE 4-hidroksinonenal

8-epi-PGF<sub>2α</sub> 8-epi-prostaglandin F<sub>2α</sub>

ACE angiotenzin konvertirajući enzim

Acetil-CoA acetil-koenzim A

ACTH adenokortikotropni hormon

AGEs krajnji produkti uznapredovale glikacije

AKT protein kinaza B

AMBRA1 engl. *Autophagy And Beclin-1 Regulator 1*

AMP adenzin monofosfat

AMPK adenzin monofosfat kinaza

AR aldoza reduktaza

ASD atrijski septalni defekt

ASK1 engl. *Apoptosis Signal-regulating Kinase 1*

ATF-2 engl. *Activating Transcription Factor 2*

ATP adenzin trifosfat

Bak engl. *Bcl-2 Antagonist/Killer*

BAX engl. *Bcl-2-Associated X*

Bcl-2 engl. *B-cell Lymphoma 2*

BiP engl. *Binding Immunoglobulin Protein*

Bmp4 engl. *Bone Morphogenetic Protein 4*

CHOP engl. *CCAAT/Enhancer Binding Protein Homologous Protein*

CO<sub>2</sub> ugljikov dioksid

COX2 ciklooksigenaza 2

DM dijabetes mellitus

DNA deoksiribonukleinska kiselina

eIF2 $\alpha$  engl. *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 $\alpha$*

Elk1 engl. *ETS Transcription Factor*

ER endoplazmatski retikulum

ER stres stres endoplazmatskog retikuluma

ETS engl. *E-26 Transformation Specific*

FGF-4 fibroblastni faktor rasta 4

FoxO3 $\alpha$  engl. *Forkhead Box O3 $\alpha$*

G1,2 engl. *Gap 1,2*

GAD dekarboksilaza glutaminske kiseline

GCK MODY engl. *Glucokinase Gene MODY*

GDM gestacijski dijabetes mellitus

GLUT1 glukozni transporter 1

H histoni

HAPO *Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome*

HbA1c glikozilirani hemoglobin

HDL lipoproteini visoke gustoće

HLA engl. *Human Leukocyte Antigen*

HLA DR engl. *Human Leukocyte Antigen – Antigen D Related*

HNF1A MODY engl. *Hepatocyte Nuclear-Factor-1-  $\alpha$  MODY*

IA-DPSG *International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group*

IDL lipoproteini srednje gustoće

IRE1 $\alpha$  engl. *Inositol-Requiring Enzyme 1 $\alpha$*

IUGR intrauterini zaostatak u rastu

JNK1/2 engl. *c-Jun N-terminal Kinase*

LDL lipoproteini niske gustoće

MAPK engl. *Mitogen Activated Protein Kinase*

MARCKS engl. *Myristoylated Alanine-Rich Kinase C Substrate*

MDA malondialdehid

MIDD engl. *Maternally Inherited Diabetes and Deafness*

MiRNA microRNA

MODY engl. *Maturity Onset Diabetes of the Young*

mRNA glasnička RNA

Msx1 engl. *Msh Homeobox 1*

NAD(P)H nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)

NCAM engl. *Neural Cell Adhesion Molecule*

NDDG *The National Diabetes Data Group*

Nf $\kappa$ B engl. *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B cells*

NOS-2 sintetaza dušikovog oksida 2

NRF1/2 engl. *Nuclear Respiratory Factor 1/2*

OGTT oralni test opterećenja glukozom

p53 protein 53

PAX engl. *Paired Box*

PERK engl. *Protein Kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase*

PGC engl. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator  $\alpha$*

PGE2 prostaglandini E2

PGG2 prostaglandini G2

PGH2 prostaglandini H2

PGP9.5 engl. *Protein Gene Product 9.5*

PKC protein kinaza C

Prkca engl. *Protein Kinase C  $\alpha$*

RAGE receptor krajnjih produkata uznapredovale glikacije

RNA ribonukleinska kiselina

ROS reaktivni radikali kisika

S sinteza

Smad engl. *Small Worm Phenotype and Mothers Against Decapentaplegic*

SOD superoksid dizmutaza

SŽS središnji živčani sustav

T3 trijodtironin

T4 tiroksin

T $\beta$ RII TGF $\beta$  receptor tip II

Tfam engl. *Transcription Factor A Mitochondrial*

TGF- $\beta$  transkripcijski faktor rasta  $\beta$

TNDM engl. *Transient Neonatal Diabetes*

TNF- $\alpha$  tumor nekrotizirajući čimbenik  $\alpha$

TRADD engl. *Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1-Associated DEATH Domain Protein*



TSH tiroidni stimulirajući hormon

UDP-GlcNAc uridin difosfat N-acetilglukozamin

UPR engl. *Unfolded Protein Response*

VLDL lipoproteini vrlo niske gustoće

VSD ventrikularni septalni defekt

WHO svjetska zdravstvena organizacija

Wnt engl. *Wingless-Related Integration Site*

# SADRŽAJ

<b>SADRŽAJ</b> .....	<b>IX</b>
1. SAŽETAK .....	X
2. SUMMARY .....	XI
3. UVOD .....	1
4. DIJABETES MELLITUS .....	1
4.1. Dijabetes mellitus tip 1 .....	2
4.2. Dijabetes mellitus tip 2 .....	2
4.3. Drugi specifični tipovi dijabetesa .....	3
4.4. Gestacijski dijabetes mellitus .....	5
4.5. Glikozilirani hemoglobin .....	7
5. METABOLIZAM .....	7
5.1. Metabolizam u trudnoći .....	9
6. EMBRIONALNI RAZVOJ I TERATOGENEZA .....	10
6.1. Kongenitalne malformacije .....	14
7. UTJECAJ DIJABETESA NA TRUDNOĆU .....	14
7.1. Predkonceptijska obrada trudnica s dijabetesom .....	15
8. KONGENITALNE MALFORMACIJE UZROKOVANE DIJABETESOM .....	15
8.1. Podjela malformacija .....	16
8.2. Sindromi povezani s dijabetesom .....	18
9. UTJECAJ DIJABETESA NA RAZVOJ KONGENITALNIH MALFORMACIJA .....	19
9.1. Utjecaj dijabetesa na ovulaciju .....	19
9.2. Predimplantacijska faza razvoja .....	20
9.3. Poslijeimplantacijska faza razvoja .....	21
9.3.1. Teratogeni u majčinoj cirkulaciji .....	21
9.3.2. Teratogeni u fetalnoj cirkulaciji .....	22
9.3.3. Teratogeni procesi uzrokovani hiperglikemijom .....	24
9.3.4. Utjecaj genoma i epigenetike .....	31
10. ZAKLJUČAK .....	34
11. ZAHVALE .....	35
12. LITERATURA .....	35
13. ŽIVOTOPIS .....	45

## 1. SAŽETAK

Kongenitalne malformacije u trudnica dijabetičarki

Matea Lončar

Dijabetes mellitus u trudnoći utječe na nastanak dijabetičke embriopatije i fetopatije. Dijabetička embriopatija obuhvaća kongenitalne malformacije nastale poremećajem organogeneze u prvih 8 tjedana razvoja. Kongenitalne malformacije su dva do četiri puta češće u trudnica s dijabetesom i mogu zahvatiti jedan ili više organskih sustava, a najčešće je zahvaćen srčani, mišićno-koštani i središnji živčani sustav. U trudnica dijabetičarki također je veća učestalost rijetkih sindroma. Dijabetes je karakteriziran hiperglikemijom te obuhvaća poremećaj metabolizma ugljikohidrata, masti i bjelančevina. Poremećaj odvijanja metaboličkih procesa uzrokuje promjene u intrauterinom miljeu u kojem se razvija fetus. Nastaju različiti metaboliti i aktiviraju se različiti procesi koji mogu djelovati teratogeno. Osim hiperglikemije, u majčinoj se cirkulaciji teratogeni utjecaj povezuje s povećanom razinom  $\beta$ -hidroksibutirata, aminokiselina razgranatih lanaca i masnih kiselina. U fetalnoj cirkulaciji mogući teratogeni utjecaj ima snižena razina inozitola, arahidonske kiseline, prostaglandina i folne kiseline te povećana razina sorbitola. Istraživanja pokazuju kako se teratogeni utjecaj različitih metabolita očituje putem povećanog odvijanja procesa oksidativne fosforilacije i nastanka slobodnih radikala. Oksidativni stres, uz direktni utjecaj hiperglikemije, uzrokuje ER stres, lipidnu peroksidaciju i nitrozativni stres. Promijenjeno djelovanje raznih kinaza, PKC, JNK1/2 i AMPK dovodi do povećane apoptoze. Epigenetske promjene uzrokuju promijenjenu ekspresiju gena NCAM, PGP9.5, Bmp4, Msx1, Pax3 koji utječu na poremećenu migraciju i proliferaciju stanica te gena Bax i Bcl-2 koji aktiviraju kaspaze i posljedično uzrokuju apoptozu. Brojni faktori utječu na normalan embrionalni razvoj i nastanak kongenitalnih malformacija. Učestalost kongenitalnih malformacija u trudnica s dijabetesom moguće je smanjiti dobrom predkonceptcijskom obradom i regulacijom glikemije tijekom trudnoće.

Ključne riječi: dijabetes mellitus, kongenitalne malformacije, teratogeni, hiperglikemija

## 2. SUMMARY

### Congenital malformations in diabetic pregnant women

Matea Lončar

Diabetes mellitus causes diabetic embryopathy and fetopathy in pregnancy. Diabetic embryopathy is a spectrum of congenital malformations caused by an interruption of organogenesis during the first 8 weeks of development. Diabetes is associated with a two-to fourfold increase in the rate of congenital malformations. Diabetes-induced malformations may affect one or more organ systems. The most commonly affected organ systems are the cardiac, musculoskeletal, and central nervous systems. Also, the fetuses of diabetic pregnant women have higher rates of rare syndromes .

Diabetes is characterized by hyperglycemia, which affects metabolism of carbohydrates, fats, and proteins. Maternal metabolic dysregulation causes alterations in the intrauterine milieu. Formation of many metabolites and activation of different processes may have a teratogenic effect. Besides hyperglycemia, increased levels of beta-hydroxybutyrate, acetoacetate, branched-chain amino acids, triglycerides, and fats in the maternal circulation might act as teratogens. In the fetal circulation, decreased levels of inositol, arachidonic acid, prostaglandins, and folic acid, as well as an increased level of sorbitol may have a possible teratogenic effect. Studies showed teratogenic effect on embryonal development through increased oxidative phosphorylation, which leads to increased levels of reactive oxygen species. The synergistic effect of oxidative stress and hyperglycemia result in ER stress, lipid peroxidation, and nitrosamine stress. There is also alteration in the activity of many different kinases like PKC, JNK1/2, and AMPK, which lead to increased apoptosis. Epigenetic modifications change the expression of several genes, NCAM, PGP9.5, Bmp4, Msx1, and Pax3, which affect normal migration and proliferation of the cells. Also, a changed expression of Bax and Bcl-2 causes increased activation of caspase and, consequently, apoptosis. There are many different teratogenic factors which interrupt normal embryogenic development and cause congenital malformations. Good preconception care and adequate glycemia regulation during pregnancy diminish the incidence of congenital malformations in the fetuses of diabetic pregnant women.

Keywords: diabetes mellitus, congenital malformations, teratogens, hyperglycemia

### **3. UVOD**

Dijabetes mellitus (DM) tip 1, tip 2 i manifestni dijabetes koji se otkriva tek u trudnoći, povezuju se s povećanim rizikom za nastanak komplikacija, dijabetičke embriopatije, fetopatije, veće učestalosti spontanih pobačaja i perinatalne smrtnosti. Dijabetes utječe na poremećaj odvijanja metaboličkih procesa te posljedično utječe na promjene u intrauterinom miljeu u kojem se razvija fetus (1). Dijabetička embriopatija obuhvaća nastanak kongenitalnih malformacija zbog djelovanja teratogenog učinka dijabetesa na embrij. Teratogeni faktori i procesi koji nastaju djelovanjem hiperglikemije zbog dijabetesa majke i njihov utjecaj na embrionalni razvoj i nastanak kongenitalnih malformacije istražuju se na životinjama zbog etičkog ograničenja istraživanja na ljudskim embrijima. Stoga se rezultati istraživanja koji će biti navedeni u tekstu odnose na životinjske embrije. Također nije etički uskratiti ženama djelotvornu terapiju i pružanje pravilne skrbi pa je podatke o utjecaju dijabetesa na trudnoću i njegove štetne učinke na ljude moguće dobiti retrospektivnim putem. Retrospektivnim istraživanjima dobivaju se podaci o učestalosti kongenitalnih malformacija i riziku u odnosu na opću populaciju te učestalosti malformacije u žena s dobrom i lošom metaboličkom kontrolom. Genom oca i majke utječe na stvaranje genoma ploda koji uz epigenetske modifikacije DNA utječe na razvoj kongenitalnih malformacija. Teratogenim se smatra povećana razina glukoze, ketona, masnih kiselina, aminokiselina razgranatih lanaca, sorbitola te smanjena razina inozitola, arahidonske kiseline, PGE<sub>2</sub>, folne kiseline (2). Navedene promjene uzrokuju promjenu u metabolizmu i povećanje nastanka kisikovih radikala i smanjenje antioksidansa, a to dovodi do oksidativnog stresa te posljedično nastaje nitrozaminski stres, ER stres te promjene u djelovanju enzimatskih sustava i ekspresije gena (2). Međudjelovanje više različitih čimbenika dovodi do nastanka kongenitalnih malformacija u trudnica s dijabetesom.

### **4. DIJABETES MELLITUS**

Dijabetes mellitus je kronična bolest koja obuhvaća poremećaj metabolizma ugljikohidrata, bjelančevina i masti, a glavno obilježje je hiperglikemija. Hiperglikemija, povećana razina šećera u krvi, uzrokovana je inzulinskom deficijencijom, inzulinskom rezistencijom ili njihovom kombinacijom. Broj oboljelih od šećerne bolesti u svijetu u stalnom je porastu što se povezuje s porastom tjelesne

težine i načinom života. Također sve veća učestalost pretilosti u mladih snižava granicu pojavljivanja bolesti (3).

#### **4.1. Dijabetes mellitus tip 1**

Dijabetes mellitus tip 1 obuhvaća 5% oboljelih i najčešće se razvija u djetinjstvu i adolescenciji, iako se može javiti u bilo kojoj dobi. Uzrok je autoimuna destrukcija beta stanica Langerhansovih otočića u gušterači (4). Genetska osjetljivost za razvoj bolesti povezuje se s HLA genima na kromosomu 6 koji su odgovorni za modulaciju imunog sustava u tijelu. Više od 90% bolesnika ima HLA-DR3 ili HLA-DR4 alele. Iako najveći utjecaj imaju HLA geni, postoji više od 50 non-HLA gena poput gena za inzulin i gena za imuni odgovor, koji povećaju rizik za razvoj bolesti (3). U krvi bolesnika mogu se pronaći protutijela na enzim dekarboksilazu glutaminske kiseline (GAD), na tirozin fosfatazu i na sam insulin (4). Protutijela se mogu pojaviti u krvi puno prije manifestacije bolesti, već u prvim godinama života (3,4). Osim genetske podloge, na razvoj bolesti utječu i okolišni faktori s kojima dijete dolazi u doticaj već prenatalno poput Coxsackie B4 virusa, mumpsa, rubeole, citomegalovirusa, no njihova uloga nije još potvrđena. Zbog destrukcije beta stanica inzulin u krvi je znatno snižen te je potrebna terapija inzulinom. Klinička manifestacija bolesti u dječjoj dobi nastaje naglo i često je povezana s dijabetičkom ketoacidozom (4). Latentni autoimuni dijabetes u odraslih karakteriziran je sporijom progresijom destrukcije beta stanica te se deficijencija inzulina javlja u starijoj dobi i često se može zamijeniti tipom 2 (3).

#### **4.2. Dijabetes mellitus tip 2**

Dijabetes mellitus tip 2 obuhvaća otprilike 90% oboljelih i najčešće se razvija poslije 30. godine života. Uzrok je rezistencija perifernih tkiva na inzulin i relativna inzulinska deficijencija (4). Zbog periferne inzulinske rezistencije smanjuje se prijenos glukoze u mišiće te dolazi do iscrpljenja beta stanica gušterače i posljedičnog smanjenog izlučivanja inzulina, također nastanku bolesti pridonosi smanjen učinak inkretina, porast lipolize u masnom tkivu, povećana resorpcija glukoze u bubrezima, poremećena funkcija neurotransmitera u mozgu, porast glukoneogeneze u jetri te porast izlučivanja glukagona (5). Rizik za razvoj bolesti raste s godinama, povećanom tjelesnom težinom, nepravilnom i nezdravom prehranom i smanjenom

tjelesnom aktivnosti. Također postoji i genetska predispozicija za razvoj bolesti, no odgovorni geni nisu još utvrđeni. Razvoj bolesti povezuje se i s niskom porođajnom masom te slabom i siromašnom prehranom u djetinjstvu što utječe na smanjenje funkcije i razvoja beta stanica (3). Također žene koje su u trudnoći imale gestacijski dijabetes češće poslije razviju dijabetes. Bolest je na početku često asimptomatska i traje nekoliko godina prije pojave prepoznatljivih kliničkih simptoma i postavljanja dijagnoze. U početku hiperglikemija uzrokuje pojačano izlučivanje inzulina što se očituje hiperinzulinemijom, no nakon dugotrajne hiperglikemije i iscrpljivanja beta stanica dolazi do inzulinske deficijencije i pada razine inzulina u krvi (4). U odnosu na tip 1 ketoacidoza se javlja rijetko. Liječenje uključuje promjenu načina života, edukaciju o bolesti, uzimanje oralnih hipoglikemika te uvođenje inzulinske terapije.

#### **4.3. Drugi specifični tipovi dijabetesa**

Drugi specifični oblici dijabetesa, iako vrlo rijetki, etiološki čine raznoliku i široku skupinu. Dijabetes povezan s monogenским poremećajima funkcije beta stanica gušterače karakteriziran je blagom hiperglikemijom koja se očituje u ranom djetinjstvu ili adolescenciji te s obzirom na početak i oblik bolesti obuhvaća razne kliničke oblike. MODY (engl. *Maturity Onset Diabetes of Young*) obuhvaća vrlo heterogenu skupinu poremećaja te se nasljeđuje autosomno dominantno i manifestira se prije 25. godine. Genetskim testiranjem omogućena je identifikacija pojedinih gena povezanih s MODY-jem i bolje razumijevanje heterogene kliničke slike, dijagnoze, liječenja i prognoze bolesti. Najčešći je HNF1A MODY koji obilježava progresivna hiperglikemija s visokim rizikom nastanka mikrovaskularnih i makrovaskularnih komplikacija. Primjer blagog oblika dijabetesa koji ne zahtjeva liječenje je GCK MODY (5).

Dijabetes dijagnosticiran u novorođenčadi češće je uzrokovan monogenским poremećajem nego autoimunim dijabetesom tip 1 te 50% novorođenčadi ima TNDM (engl. *Transient Neonatal Diabetes*). Osim toga, razni multisistemni klinički sindromi povezani su s neonatalnim dijabetesom, kao što je Wolframov sindrom. Točkasta mutacija mitohondrijske DNA povezana s dijabetesom i gluhoćom naziva se dijabetes i gluhoća naslijeđeni od majke (engl. *Maternally Inherited Diabetes and Deafness*, MIDD). Genetički poremećaji koji onemogućuju konverziju proinzulina u inzulin uzrokuju blagu intoleranciju glukoze te su dijagnosticirani u nekoliko obitelji i najčešće

se nasljeđuju autosomno dominantno. Mutacije inzulinskih receptora uzrokuju inzulinsku rezistenciju te ovisno o funkciji beta stanica gušterače uzrokuju različite kliničke slike karakterizirane blagom do vrlo teškom hiperglikemijom. Osim navedenih primjera, postoji još mnogo gena koji oštećuju funkciju beta stanica gušterače ili uzrokuju poremećaj djelovanja inzulina (5).

Dijabetes može biti uzrokovan i bolestima egzokrinog dijela gušterače poput pankreatitisa, infekcije, fibrokalkuloze, hemokromatoze, cistične fibroze i mnogih drugih. Navedena stanja moraju zahvatiti veliki dio tkiva gušterače kako bi se razvio dijabetes. Suprotno tome, adenokarcinom koji zahvaća samo mali dio gušterače može uzrokovati dijabetes. Dijabetes može biti uzrokovan i redukcijom beta stanica koje su nastale traumom ili pankreatektomijom (5).

Endokrinopatije koje obilježava povećano izlučivanje hormona, a koji su antagonisti djelovanja inzulina, još su jedan od uzroka dijabetesa. U hormone s antagonističkim djelovanjem ubrajamo hormon rasta, kortizol, glukagon i adrenalin, a bolesti povezane s prekomjernim izlučivanjem navedenih hormona su akromegalija, Cushingov sindrom, glukagonom i feokromocitom. Hipokalijemija uzrokovana somatostatinomom i aldosteronomom uzrokuje dijabetes putem inhibicije izlučivanja inzulina. Uklanjanje navedenih tumora i normalizacija vrijednosti hormona dovodi do euglikemije.

Različiti lijekovi, hormoni i toksini mogu uzrokovati dijabetes oštećenjem izlučivanja inzulina toksičnim djelovanjem na beta stanice gušterače ili povećavajući inzulinsku rezistenciju. Imunosupresivni lijekovi, glukokortikoidi, tireoidni hormoni, nikotinska kiselina,  $\alpha$  i  $\beta$  adrenergički agonisti, tiazidi, interferon alfa, statini, antipsihotični lijekovi i antiviralni lijekovi djeluju putem prije navedenih mehanizama na razvoj dijabetesa. Pojedine autoimune bolesti povezane su s razvojem dijabetesa tip 1. Primjer takvog autoimunog poremećaja je Stiffman sindrom koji zahvaća središnji živčani sustav i karakteriziran je rigidnim mišićima i bolnim spazmima te antitijelima na dekarboksilazu glutamske kiseline (anti-GAD) što dovodi do razvoja DM tip 1 u trećine oboljelih. Povećana incidencija dijabetesa uočena je u genetičkim sindromima poput Downovog, Klinefelterovog, Turnerovog i Prader-Willijevog sindroma te kod bolesnika s Friedreichovom ataksijom, Huntingtonovom bolesti, miotoničnom distrofijom, porfirijom i brojnim drugim bolestima (5).



#### 4.4. Gestacijski dijabetes mellitus

Gestacijski dijabetes je tip dijabetesa koji se prvi puta dijagnosticira u trudnoći, najčešće u drugom tromjesečju zbog razvoja inzulinske rezistencije. Zbog djelovanja kontrainzulinskih hormona trudnoća ima dijabetogeni utjecaj. Kada inzulinska rezistencija prevlada sekreciju inzulina, nastaje gestacijski dijabetes. S obzirom na dijabetogeni učinak trudnoće preporučuje se svim trudnicama izmjeriti vrijednost glukoze zbog mogućeg otkrivanja manifestnog ili gestacijskog dijabetesa (1).

Jedinstveni kriteriji za postavljanje dijagnoze gestacijskog dijabetesa još uvijek ne postoje. Temelj raznih istraživanja bili su O'Sullivanovi OGTT kriteriji za GDM. Dijagnoza gestacijskog dijabetesa prema O'Sullivanovim kriterijima na temelju opterećenja od 100 g glukoze za OGTT postavljala se ako je glukoza natašte > 5 mmol/L, nakon 60 min > 9.2 mmol/L, nakon 120 min > 8.1 mmol/L i nakon 180 min > 6.9 mmol/L. The National Diabetes Data Group (NDDG) povisila je O'Sullivanove kriterije 15% na temelju određivanja glukoze enzimatskom metodom. Carpenter-Coustan kriteriji temelje se također na opterećenju od 100 g glukoze za OGTT i uključuju niže vrijednosti glukoze u odnosu na vrijednosti NDDG i više u odnosu na vrijednosti uključene u O'Sullivanove kriterije. Dijagnoza GDM prema kriterijima svjetske zdravstvene organizacije na temelju opterećenja sa 75 g glukozeza OGTT postavlja se ako je glukoza nakon 120 min  $\geq 7,8$  mmol/L (1).

HAPO studija je velika, dvostruko slijepa, multinacionalna studija koja je provedena kako bi se utvrdila povezanost glikemije u krvi majke i nepovoljnog ishoda trudnoće. Glukoza u krvi mjerena je enzimatskom metodom u centralnim laboratorijima. Ako je glukoza natašte > 5,8 mmol/L, nakon dvosatnog OGTT testa > 11,1 mmol/L, slučajni nalaz glukoze > 8,9 mmol/L ili < 2,5 mmol/L, trudnicama su bili otkriveni podaci kako bi dobile odgovarajuću skrb te su isključene iz studije. Također je mjerena koncentracija glukoze i C-peptida u pupkovini odmah nakon poroda. C-peptid je korišten kao indikator funkcije fetalnih beta stanica. Porođajna težina iznad 90. percentile za gestacijsku dob, primarni carski rez, klinička neonatalna hipoglikemija i razina serumskog C-peptida u pupkovini iznad 90. percentile, odnosno fetalna hiperinzulinemija ubrajaju se u primarne neželjene ishode trudnoće. Prematuritet, distocija fetalnih ramena ili porođajna ozljeda, potreba intenzivne neonatalne skrbi, hiperbilirubinemija i preeklampsija ubrajaju se u sekundarne neželjene ishode trudnoće. Ozbiljni mogući ishodi su smrt fetusa i malformacije (6). U studiju je bilo uključeno 25 505 trudnica kojima je napravljen OGTT od 24. do 32. tjedna trudnoće,

najčešće u 28. tjednu. Rezultati su pokazali kako povećanjem koncentracije glukoze u krvi majke raste učestalost primarnih i sekundarnih ishoda trudnoće. Omjer šansi (engl. *odd ratio*) je najveći za porođajnu težinu iznad 90. percentile za gestacijsku dob i za koncentraciju C-peptida iznad 90. percentile u pupkovini. Navedeni rezultati ukazuju da hiperglikemija trudnice, koja ne ukazuje na manifestni dijabetes, utječe na kliničke nepovoljne ishode trudnoće (7).

Na temelju podataka HAPO studije International Association of Diabetes and Pregnancy Study Group (IA-DPSG) donio je preporuke za nove kriterije za dijagnozu i klasifikaciju GDM i manifestnog dijabetesa. Dijagnoza manifestnog dijabetesa postavlja se prema kriterijima ako je vrijednost glukoze na tašte  $\geq 7$  mmol/L, HbA1c  $\geq 6.5\%$  i slučajni nalaz glukoze  $\geq 11.1$  mmol/L. Dijagnoza GDM postavlja se na temelju opterećenja 75 g glukoze za OGTT ako je glukoza natašte  $> 5.1$  mmol/L i  $< 7$  mmol/L te glukoza nakon 60 min  $\geq 10$  mmol/L i nakon 120 min  $\geq 8.5$  mmol/L. Trudnice kojima je manifestni dijabetes dijagnosticiran tek u trudnoći imaju povećan rizik nastanka kongenitalnih malformacija i razvoja dijabetičkih komplikacija tijekom trudnoće. Tada je nužna dobra regulacija glikemije tijekom trudnoće i odgovarajuće praćenje trudnoće te liječenje dijabetesa nakon trudnoće. IA-DPSG je donio strategiju za detekciju i dijagnozu gestacijskog i manifestnog dijabetesa u trudnoći. Svakoj trudnici pri prvom posjetu potrebno je napraviti glukozu natašte, HbA1c ili slučajni nalaz glukoze. Ako je glukoza natašte  $> 7$  mmol/L, HbA1c  $\geq 6.5\%$  i slučajni nalaz glukoze  $\geq 11.1$  mmol/L, postavlja se dijagnoza manifestnog dijabetesa. Ako nalazi ne upućuju na manifestni dijabetes, ali je glukoza natašte  $> 5.1$  mmol/L i  $< 7$  mmol/L, postavlja se dijagnoza GDM, a ako je glukoza natašte  $< 5.1$  mmol/L, trudnica se upućuje na OGTT od 24. do 28. tjedna trudnoće. OGTT se provodi nakon cjelonoćnog gladovanja u trudnica kojima ranije nije dijagnosticiran GDM ili manifestni dijabetes. Nalazi se interpretiraju prema prije navedenim kriterijima IA-DPSG (8).

Iako nisu potpuno razjašnjeni, mehanizmi povezani s razvojem inzulinske rezistencije povezuju se s placentom i povećanom masom masnog tkiva. Napredovanjem trudnoće placenta uzrokuje povećanje koncentracije estrogena, progesterona, humanog placentalnog laktogena u krvi. Humani placentalni laktogen uzrokuje povećanu lipolizu i povećanu koncentraciju slobodnih masnih kiselina u plazmi. Povećani udio masnog tkiva uzrokuje povećanje TNF- $\alpha$  i smanjenje adiponektina. Estradiol uz sniženje adiponektina uzrokuje povećanu sintezu u jetri i otpuštanje triglicerida, koji povećavaju stanični metabolizam masnih kiselina povećavajući pritom

razinu NADH i ATP. Nastala unutarstanična zbivanja smanjuju aktivnost glukokinaze i fosforilacije glukoze što smanjuje unos glukoze u periferna tkiva. Na inzulinsku rezistenciju utječe povećanje glukoneogeneze u jetri zbog povećane koncentracije kortizola u krvi te povećana koncentracija TNF- $\alpha$  i progesterona. Na razvoj disfunkcije beta stanica može utjecati povećana razina progesterona i hiperlipidemija oštećujući beta stanice. Hiperplazija beta stanica, uzrokovana povećanim unosom hrane, i povećani stanični metabolizam mogu uzrokovati apoptozu stanica (9,10). Bitnu ulogu ima i genetička predispozicija za razvoj dijabetesa.

#### **4.5. Glikozilirani hemoglobin**

Glikozilirani hemoglobin, HbA1c, nastaje glikozilacijom, odnosno vezanjem glukoze na dušik aminokiseline valin beta lanca hemoglobina A. Glikozilacija Hb ovisi o koncentraciji glukoze i trajanju izloženosti visokim razinama glukoze, stoga HbA1c daje retrospektivan uvid na kontrolu glikemije u posljednjih 8 tjedana. Povišenje HbA1c upućuje na loše reguliranu glikemiju i povezano je s većim rizikom razvoja kongenitalnih malformacija (1).

### **5. METABOLIZAM**

Glukoza je jednostavan šećer, monosaharid, i smatra se najvažnijim izvorom energije za naš organizam. Hranom unosimo škrob i glikogen koji se razgrađuju u jednostavnije oblike kako bi se mogli apsorbirati. Ulaskom glukoze u stanice počinje glikoliza, razgradnja glukoze u piruvat, kojom nastaje ATP i elementi potrebni za biosintezu. Prva faza glikolize obuhvaća fosforilaciju glukoze, kako bi se zadržala u stanici i destabilizirala, izomerizaciju u fruktozu i ponovnu fosforilaciju. Tako nastaje fruktoza-1,2-bisfosfonat. U drugoj i trećoj fazi događaju se brojne reakcije u kojima se oslobađa energija, odnosno ATP. Kao krajnji produkt glikolize nastaje piruvat, koji dalje ulazi u razne reakcije ovisno o prisutnosti kisika. Dvije reakcije koje se događaju u anaerobnim uvjetima su fermentacija piruvata u etanol i laktat, a u aerobnim uvjetima iz piruvata nastaje acetyl-CoA koji ulazi u ciklus limunske kiseline. To je završni put oksidacije ugljikohidrata, masti i bjelančevina gdje iz acetyl-CoA i oksaloacetata nastaje citrat, koji nizom reakcija daje dvije molekule CO<sub>2</sub> i ponovno obnavlja oksaloacetat. Osim glikolize, u stanicama se odvija i put pentozna fosfata kojim nastaje NADPH i riboza-5-fosfat. On je usklađen s glikolizom te njihovo

međudjelovanje održava potrebne količine NADPH, ATP-a, riboze i piruvata u stanici (11).

Glukoneogeneza je proces u kojem se sintetizira glukoza iz neugljikohidratnih molekula. Proces nije obrnut glikolizi zbog nekoliko ireverzibilnih reakcija koje se događaju tijekom glikolize. Najčešći supstrati su laktat, aminokiseline i glicerol koji se uključuju u proces glukoneogeneza na različitim razinama. Laktat nastaje u anaerobnim uvjetima u mišićima, aminokiseline potječu iz hrane ili od razgrađenih proteina u mišiću, a glicerol nastaje u masnim stanicama hidrolizom triglicerida. Prvi korak glukoneogeneze je nastajanje piruvata koji se preko oksaloacetata pretvara u fosfoenolpiruvat. Reakcije pretvorbe fosfoenolpiruvata u fruktoza-1,6-bisfosfonat su obrnute glikolitičkim reakcijama. Glukoza-1-fosfat nastaje kao krajnji produkt glukoneogeneze jer služi za sintezu glikogena i zato što samo slobodna glukoza može izaći iz stanice (11).

Reakcije glikolize i glukoneogeneze su regulirane recipročno, a to znači da se nikad ne događaju istodobno. Koncentracija glukoze utječe na brzinu odvijanja glikolize, a koncentracija laktata i ostalih neugljikohidratnih preteča na brzinu odvijanja glukoneogeneze. Glikoliza će se odvijati ako postoji potreba za energijom, a glukoneogeneza ako postoji višak energije (11). Na koncentraciju glukoze u krvi utječu hormoni inzulin, koji potiče glikolizu, i glukagon, koji potiče glukoneogenezu. Osim njih utjecaj na koncentraciju glukoze u krvi imaju hormoni adenohipofize, hormon rasta i ACTH, i hormoni kore nadbubrežne žlijezde, glukokortikoidi, koji se smatraju antagonisti inzulina. Adrenalin, koji luči srž nadbubrežne žlijezde, potiče glikogenolizu u mišićima i jetri, a nastala glukoza otpušta se u krv ili kreće u proces glikolize (12–14).

Masti također služe kao metaboličko gorivo, a pohranjuju se u obliku triglicerida. Osim za dobivanje energije služe kao gradivni elementi staničnih membrana, u strukturi pojedinih hormona i unutarstaničnih glasnika. Trigliceride pohranjene u masnom tkivu razgrađuje lipaza na masne kiseline i monoacilglicerol. Lipaza je regulirana hormonima tako da je adrenalin i glukagon stimuliraju, a inzulin inhibira. Nastale masne kiseline ulaze u krvotok te se prenose vezane za albumin i postaju dostupne ostalim tkivima gdje se odvija beta oksidacija masnih kiselina i nastaje acetyl-CoA koji ulazi u ciklus limunske kiseline. Nastali glicerol prenosi se u jetrene

stanice u kojima ulazi u proces glikolize tvoreći piruvat ili glukoneogeneze tvoreći glukozu. Sinteza masnih kiselina odvija se u staničnoj citoplazmi iz acetyl-CoA uz NADPH. Iz acetyl-CoA u jetri nastaje kolesterol, derivati kojih su žučne kiseline, vitamin D te steroidni hormoni, progestageni, glukokortikoidi, mineralokortikoidi, androgeni i gestageni. U obliku VLDL-a iz jetre se prenosi višak lipida, a nakon predaje triglicerida perifernim tkivima iz VLDL-a nastaje IDL i LDL, koji se preko specifičnih LDL receptora prenosi u jetrene stanice. HDL prenosi kolesterol iz perifernih tkiva u jetru (15). Ako se ne odvija metabolizam ugljikohidrata, povećava se izlučivanje glukokortikoida i glukagona, a smanjuje izlučivanje inzulina te se povećava oslobađanje masnih kiselina iz masnog tkiva. Oslobođene masne kiseline se u jetri prevode u acetyl-CoA koji je ishodišna molekula za stvaranje ketonskih tijela. Zbog smanjenja oksaloacetata ne postoji mogućnost ulaska stvorenog acetyl-CoA u ciklus limunske kiseline te dolazi do nakupljanja ketonskih tijela i posljedične metaboličke acidoze (13–15).

Izvor aminokiselina u organizmu su stanični proteini, a oni koje treba razgraditi obilježavaju se ubikvitinom te ih potom razgrađuje proteasom. Osim toga, razgrađuju se i proteini koji se unose hranom, a bitni su zbog unosa esencijalnih masnih kiselina koje organizam ne može sam sintetizirati. Na njih prvo u želudcu djeluje pepsin, a potom proteolitički enzimi u crijevnom lumenu te se tek slobodne aminokiseline, dipeptidi i tripeptidi mogu preko crijevnih epitelnih stanica transportirati u krv. Isto kao i ugljikohidrati i lipidi, aminokiseline služe kao molekule za daljnju biosintezu ili se razgrađuju. Aminokiseline se razgrađuju u jetri, a reakcija počinje transaminacijom kada se oslobađa amonijev ion koji se potom pretvara u ureu. Ugljikovi atomi nastali razgradnjom aminokiselina pretvaraju se u piruvat, acetyl-CoA, acetoacetat te međuprodukte ciklusa limunske kiseline (16).

### **5.1. Metabolizam u trudnoći**

U trudnoći nastaju promjene u metabolizmu ugljikohidrata, masti i bjelančevina kako bi se omogućila dovoljna količina hranjivih tvari koja je fetusu potrebna za rast i razvoj. Primarni izvor energije za fetalna tkiva je glukozu. S obzirom na to da fetus sam ne sintetizira glukozu, ona se prenosi olakšanom difuzijom najviše putem GLUT1 transportera, a njezin prijenos ovisi o koncentracijskom gradijentu između

majčine i fetalne cirkulacije. U prvom su trimestru osjetljivost perifernih tkiva na inzulin i tolerancija glukoze uredni. Inzulinska rezistencija pojavljuje se u trećem trimestru zbog utjecaja hormona. Povećana je i glukoneogeneza, prije svega iz glicerola. Unatoč tome pojavljuje se hipoglikemija, a to se objašnjava povećanim placentalnim prijenosom glukoze u fetalnu cirkulaciju zbog povećanih zahtjeva fetusa krajem trudnoće (17).

Proteini su nužni za rast i razvoj fetusa te se prenose aktivnim transportom iz majčine cirkulacije. Na početku trudnoće proteini se ne odlažu u majčinih tkivima no napredovanjem trudnoće i sve većim zahtjevima fetusa za hranjivim tvarima povećana je retencija dušika i apsorpcija proteina iz hrane. Povećano odlaganje aminokiselina u tkiva i smanjena oksidacija uzrokuju smanjenu sintezu ureje koja uzrokuje smanjenu ekskreciju dušika i posljedično njegovu retenciju. Unatoč tome u majčinoj cirkulaciji prisutna je hipoaminoacidemija zbog povećanog prijenosa fetusu. Placentalni prijenos aminokiselina odvija se aktivnim transportom (17).

Obilježje normalne trudnoće je hiperlipidemija i nakupljanje lipida u majčinih tkivima. Kako su tkiva u prvom dijelu trudnoće vrlo osjetljiva na djelovanje inzulina, on uzrokuje povećanje lipogeneze te uz povećani unos hrane uzrokuje povećanje tjelesne mase trudnice u prvom i drugom trimestru. Lipidi, kao glukoza i aminokiseline, nužni su za razvoj fetusa, no njihov je prijenos putem placente otežan. Zbog toga se masne kiseline i glicerol, koji su nastali lipolizom triglicerida, prenose u jetru gdje se glicerol glukoneogenezom pretvara u glukozu, a masne kiseline beta oksidacijom se razgrađuju do acetil-CoA, iz kojeg se stvaraju ketonska tijela. Nastala glukoza i ketonska tijela prenose se placentom fetalnu cirkulaciju. Fetus ketone koristi kao izvor energije i za sintezu lipida u mozgu. Pretvorbom glicerola štede se aminokiseline potrebne fetusu, a prijenosom i iskorištavanjem ketona štedi se glukoza (17).

## **6. EMBRIONALNI RAZVOJ I TERATOGENEZA**

Embrionalno razdoblje traje prvih osam tjedana nakon oplodnje, u kojem nastaje osnova svih organa te se zato naziva i razdobljem organogeneze. Fetalno razdoblje nastavlja se nakon embrionalnog te traje do rođenja, a obuhvaća diferencijaciju organa i rast fetusa (18).

Tijekom razvoja mogu nastati razni poremećaji građe, funkcije, ponašanja i metabolizma. Najosjetljivije je embrionalno razdoblje u kojem nastaje osnova organa i tada je opasnost od nastanka velikih strukturnih poremećaja najveća. U fetalnom razdoblju mogu se dogoditi oštećenja organa, no rizik za razvoj velikih strukturnih poremećaja puno je manji (19).

Utjecaj genskih i okolišnih čimbenika može utjecati na organogenezu i uzrokovati nastanak malformacija. Malformacije obuhvaćaju nedostatak organa, koji može biti potpun ili djelomičan, te poremećenu strukturu organa. Abnormalni proces koji zahvaća normalno razvijene organe uzrokuje nastanak disrupcija. Disrupcije obilježava promijenjen oblik ili konfiguracija organa te gubitak ili fuzija pojedinih dijelova organa. Najčešće su uzrokovane okolišnim čimbenicima kao što su mehaničke sile koje uzrokuju kompresiju, krvarenje i poremećena krvna opskrba (20). Primjer disrupcije su atrezija i stenoza jednjaka. Mehanički pritisak na stražnju stijenku jednjaka uzrokuje atreziju jednjaka i nastanak ezofagotrahealne fistule, a poremećaj krvne opskrbe jednjaka može uzrokovati nastanak stenozu jednjaka (21). Deformacije obuhvaćaju poremećaj oblika, pozicije i simetrije već formiranih tkiva zbog dugotrajnog djelovanja mehaničkih sila. Često je zahvaćen mišićno-koštani sustav te reverzibilnost nastalih promjena ovisi o trajanju djelovanja sile (20).

U podlozi mnogih strukturnih malformacija postoje stanične i tkivne abnormalnosti. Aplazija je nedostatak stanične ili tkivne proliferacije te posljedično nedostatka organa i drugih tkiva. Nedovoljna proliferacija stanica uzrokuje smanjenu masu tkiva i organa te se opisuje kao hipoplazija. Hiperplazija opisuje povećanu staničnu proliferaciju te povećani broj stanica i prekomjernu akumulaciju tkiva uzrokujući izrazito povećanje organa. Displazijom se opisuju stanice promijenjene veličine, oblika i strukture te poremećen razmještaj i organizacija tkiva. Atrofija označava smanjenje veličine tkiva i organa zbog stanične degeneracije. Osim toga, atrofija uključuje akumulaciju različitih pigmenata u stanice te zamjenu parenhimalnih stanica vezivnim tkivom. Hipotrofija opisuje smanjenu veličinu stanica, a hipertrofija povećane stanice što posljedično utječe na veličinu tkiva i organa. Poremećaj rasta stanica zbog neispravne prehrane opisuje se kao distrofija (20).

Genski poremećaji uzrok su nastanka četvrtine malformacija i obuhvaćaju brojčane ili strukturne kromosomske aberacije te mutacije ili epigenetske modifikacije pojedinih ili



skupina gena. Okolišni uzroci zbog kojih nastaju poremećaji razvoja nazivaju se teratogenima. Organogeneza je razdoblje najosjetljivije na teratogeno djelovanje i tada nastaju kongenitalne malformacije. Iako je njihovo djelovanje najintenzivnije tijekom organogeneze, nakon embrionalnog razdoblja mogu uzrokovati deformacije i destrukcije tkiva i organa, a infekcije i kemijski čimbenici mogu utjecati na rast i razvoj fetusa. U teratogene ubrajamo lijekove, droge, cigarete, metale, radijacijsko zračenje, bolesti majke, intrauterine infekcije, različite medicinske procedure izvedene u trudnoći, deficijencije vitamina i minerala nužnih za razvoj, izloženost povećanoj razini hormona i raznim imunološkim čimbenicima te izloženost majke raznim štetnim fizikalnim utjecajima (20).

Osjetljivost embrija na teratogene ovisi o genotipu embrija i majke, o stadiju embrionalnog razvoja tijekom djelovanja teratogena, dozi i trajanju djelovanja. Teratogeni djeluju putem različitih patogenetskih mehanizama te mogu promijeniti biokemijske i molekularne procese u stanicama majke i fetusa. Također, mogu direktnim ili indirektnim mehanizmima uzrokovati apoptozu te poremećaje proliferacije, organizacije i sazrijevanja stanica što rezultira hipoplastičnim, aplastičnim i displastičnim stanicama (19). Navedenim mehanizmima dijabetes teratogeno djeluje na embrij uzrokujući nastanak različitih kongenitalnih malformacija. Istraživanja pokazuju da dijabetes oštećuje parakrinu komunikaciju oocite i granulosa stanica što utječe na sazrijevanje i razvoj oocita. Osim na ženske spolne stanice, dijabetes djeluje i na muške spolne stanice. Pretpostavlja se da dijabetes ima sličan učinak na spermatogenezu kao i na ovulaciju, no patogenetski mehanizmi se tek moraju utvrditi (22).

Oplodnjom nastaje zigota te se nizom mitotskih dioba povećava broj stanica, što se naziva brazdanje. Morula je 16-stanični stadij koji nastaje treći dan i sastoji se od unutarnjeg i vanjskog sloja stanica iz kojih će se razviti embrio i placenta. Četvrtog dana razvoja morula ulazi u materničnu šupljinu, a nakupljanjem tekućine u međustaničnom prostoru pojavljuje se velika šupljina, blastocel, i nastaje blastocista (23).

U stadiju zigote i morule teratogeni utjecaj dijabetesa može se očitovati putem usporenog ili čak potpunog prestanka razvoja. U stadiju blastociste hiperglikemija



uzrokuje povećanu apoptozu stanica embrioblasta što dovodi do usporenog i poremećenog rasta i razvoja (22).

Unutarnji sloj stanica blastociste čini embrioblast, a vanjski sloj stanica trofoblast. Šestog dana razvoja počinje implantacija blastociste u endometrij koji se tada nalazi u luteinskoj, odnosno sekrecijskoj fazi (23). Tijekom drugog tjedna razvoja trofoblast se diferencira u citotrofoblast i sinciotrofoblast, a stanice embrioblasta oblikuju zametni štitić koji se sastoji od hipoblasta i epiblasta, a između stanica epiblasta nastaje amnionska šupljina (24). Tijekom trećeg tjedna odvija se gastrulacija, razvoj tjelesnih osi i notokord, koji će utjecati na razvoj neuralne ploče i proces neurulacije. Gastrulacijom nastaju ektoderm, mezoderm i endoderm. Ovisno o smjeru migracije stanica, nastaje paraksijalni i intermedijarni mezoderm te mezoderm bočnih ploča (25). Od trećeg do osmog tjedna nastaje osnovna organa i tkiva iz stanica endoderma, ektoderma i mezoderma te se odvija proces neurulacije. Neurulacijom nastaje neuralni greben i žlijeb koji spajanjem čini neuralnu cijev, a ona je osnova za razvoj središnjeg živčanog sustava (26).

Tijekom gastrulacije razvijaju se skupine stanica i organi u embriju koji su vrlo osjetljivi na teratogeno djelovanje. Genetski poremećaji i toksični čimbenici mogu dovesti do poremećaja gastrulacije. Mozak je vrlo osjetljiv na teratogene, a teratogenim djelovanjem u razdoblju gastrulacije može nastati holoprosencefalija. To je malformacija koja se vrlo često povezuje s teratogenim djelovanjem alkohola, no ubraja se u rjeđe malformacije središnjeg živčanog sustava (SŽS) nastalih teratogenim djelovanjem dijabetesa. Djeca s tom malformacijom imaju mali prednji mozak, dvije lateralne moždane komore spojene su u jednu, a prisutan je hipotelorizam. Smanjeno stvaranje kaudalnog mezoderma uzrok je nastanka kaudalne regresije koja se povezuje s teratogenim učinkom dijabetesa na razvoj embrija. Malformacija zahvaća donje udove, urogenitalni sustav, lumbalne i sakralne kralješke zbog sudjelovanja mezoderma u njihovu razvoju (25). Teratogeni utjecaj dijabetesa tijekom neurulacije i migracije stanica neuralnog grebena rezultira nastankom defekta neuralne cijevi i poremećenim razvojem srčanih šupljina i velikih krvnih žila.

Od devetog tjedna do rođenja fetus raste u dužinu i dobiva na težini, s iznimkom usporenog rasta glave. U tom razdoblju sazrijevaju organi i organski sustavi. Razvoj molekularne biologije omogućio je bolje razumijevanje djelovanja signalnih molekula i

regulacije ekspresije pojedinih gena, transkripcije i translacije te njihovog utjecaja na normalni razvoj i na razvoj pojedinih malformacija (18).

### **6.1. Kongenitalne malformacije**

Malformacije su strukturalne abnormalnosti koje nastaju tijekom organogeneze zbog genetičkih ili vanjskih utjecaja. Kongenitalne malformacije možemo podijeliti na major i minor. Major malformacije oštećuju anatomske razvoj organa i zahtijevaju operacijsko ili bolničko liječenje te mogu uzrokovati znatan fizički i psihički hendikep ili ugroziti život te prouzročiti smrt (27). Minor malformacije su relativno česte strukturalne promjene i ne uzrokuju veća oštećenja zdravlja. Važne su zato što mogu ukazivati na neprepoznate major malformacije te pomažu kao kriteriji u dijagnostici specifičnih sindroma (20). Rezultati istraživanja pokazuju kako je udio major malformacija u malformacijama uzrokovanih dijabetesom 52% (28). Primjer major malformacija koje su javljaju u dijabetičkoj embriopatiji su anencefalija i spina bifida, a minor mikrotija i klinodaktilija.

## **7. UTJECAJ DIJABETESA NA TRUDNOĆU**

Dijabetes u trudnoći utječe na nastanak dijabetičke embriopatije i fetopatije. DM tip 1 i 2 smatraju se pregestacijskim dijabetesom. Dijabetička embriopatija obuhvaća kongenitalne malformacije uzrokovane poremećajem metabolizma prvih 8 tjedana razvoja zbog DM tip 1, tip 2 i GDM. U dijabetičku fetopatiju, koja poslije nastaje u trudnoći, ubrajamo makrosomiju fetusa i intrauterini zaostatak u rastu. Makrosomija nastaje zbog hiperinzulinemije uzrokovane hiperglikemijom, a IUGR se povezuje s promijenjenim krvnim žilama posteljice zbog hipertenzije, odnosno preeklampsije povezane s dijabetesom (1). Pregestacijski dijabetes i loša metabolička kontrola bolesti osim rizika za razvoj kongenitalnih malformacija, makrosomije i IUGR nosi veći rizik spontanih pobačaja i perinatalne smrtnosti. Spontani pobačaj u trudnica s dijabetesom najčešći je u prvom trimestru trudnoće, otprilike 90% (29). Kao mogući uzroci navode se kromosomske abnormalnosti, razvoj trofoblasta bez embrioblasta, slijepo jajašce (engl. *blighted ovum*), odsutna srčana akcija (30) te metaboličke promjene vezane uz oksidativni stres (31). U drugom trimestru spontani pobačaj uzrokuju ozbiljne malformacije fetusa poput složenih srčanih grešaka, insuficijencija placente, teške komplikacije majki poput ketoacidoze i fetalna hipoksija. Perinatalna

smrtnost je devet puta češća nego u normalnoj trudnoći te obuhvaća mrtvorođenost i neonatalnu smrtnost. Makrosomija, prematuritet, neonatalna asfiksija i respiratorni distres sindrom, nastali zbog metaboličkih promjena i promjena placente uzroci su neonatalne smrtnosti. Mrtvorođenost je uzrokovana letalnim malformacijama, otprilike 25%, i lošom metaboličkom kontrolom bolesti koja uzrokuje komplikacije u majke i insuficijenciju placente, otprilike 75% (29).

Dobra prijekoncepcijska obrada i održavanje euglikemije tijekom trudnoće smanjuje mogućnost komplikacija. Lošem ishodu trudnoće pridonosi i razvoj dijabetičkih komplikacija u trudnica poput dijabetičke ketoacidoze, hipoglikemije, dijabetičke nefropatije, neuropatije, retinopatije, kronične hipertenzije, preeklampsije i infekcije urogenitalnog i respiratornog sustava (1). Smanjenje navedenih komplikacija trudnice i ploda omogućava predkoncepcijska obrada.

### **7.1. Predkoncepcijska obrada trudnica s dijabetesom**

Obrada uključuje pregled kardiovaskularnog i renalnog sustava, pregled očne pozadine, mjerenje krvnog tlaka, mjerenje TSH, T3, T4, slobodnog T3 i T4, mjerenje proteina u 24-satnom urinu i određivanje klirensa kreatinina, određivanje profila glukoza, profila lipida i HbA1c, klinički i ultrazvučni ginekološki pregled, papa test, određivanje stupnja čistoće vaginalnog iscjetka, mikrobiološka obrada cervikalnog obriska, uzimanje folne kiseline i održavanje normalne tjelesne mase (1).

ACE inhibitori se najčešće koriste u liječenju hipertenzije u dijabetesu, no smatraju se toksičnima u trudnoći jer uzrokuju fetalnu hipotenziju i smanjuju protjecanje krvi kroz bubrege. Zato je potrebno prije trudnoće promijeniti terapiju. Danas se uvodi metildopa za liječenje hipertenzije. Statine, koji se koriste u liječenje hiperlipidemije, treba prestati uzimati prije početka trudnoće zbog njihova teratogenog utjecaja. Ženama s DM tip 2 potrebno je umjesto oralnih hipoglikemika uvesti terapiju inzulinom (1).

## **8. KONGENITALNE MALFORMACIJE UZROKOVANE DIJABETESOM**

U trudnica s dijabetesom uočena je povećana incidencija kongenitalnih malformacija fetusa te se smatra da hiperglikemija ima teratogeni utjecaj na rani razvoj embrija. Prema različitim dostupnim podacima učestalost kongenitalnim malformacija iznosi od 2 do 5%, a prema nekim istraživanjima čak i do 10% (28,32). Iako se u početku

smatralo da je rizik veći samo u trudnica oboljelih od dijabetesa tip 1, istraživanja su pokazala da jednak rizik postoji u trudnica oboljelih i od dijabetesa tip 2. Otvoreno je pitanje povezanosti kongenitalnih malformacija i gestacijskog dijabetesa koji se javlja u drugom i trećem trimestru trudnoće nakon razdoblja organogeneze. Gestacijski dijabetes obuhvaća trudnice koje su imale neprepoznati dijabetes prije trudnoće i one koji su ga razvile u trudnoći. Istraživanja pokazuju da je rizik kod trudnica kojima je u trudnoći dijagnosticiran manifestni dijabetes jednak onome kao u dijabetesu tip 1 i 2, a u trudnica s GDM jednak kao u općoj populaciji. Provedeno je prospektivno istraživanje učestalosti malformacija u žena s DM tip 1, tip 2 i GDM. Prema rezultatima navedenog istraživanja učestalost kongenitalnih malformacija u trudnica s DM tip 1 je bila 5.9%, u trudnica s DM tip 2 4.4%, u trudnica kojima je dijagnosticiran manifestni dijabetes u trudnoći učestalost je iznosila 4.6% (27). Rizik za razvoj malformacija povezuje se s ozbiljnošću i trajanjem dijabetesa te kontrolom dijabetesa što se očituje koncentracijom HbA1c u krvi, tako da veća koncentracija upućuje na veći rizik (33,34). Istraživanje povezanosti HbA1c i kongenitalnih malformacija pokazalo je da su kongenitalne malformacije zabilježene u 5.1% slučajeva trudnica kojima je HbA1c u krvi od 7% do 8.5%, u 22.9% kojima je HbA1c od 8.6% do 9.9%, te 21.7% kada je HbA1c bio veći od 10% u krvi (35). U dijabetesu tip 1 već se i malo povećanje razine HbA1c povezuje s povećanim rizikom razvoja malformacija (36).

### **8.1. Podjela malformacija**

Dijabetičku embriopatiju možemo podijeliti s obzirom na zahvaćenost organskih sustava na malformacije srca, skeleta, središnjeg živčanog sustava, urogenitalnog i gastrointestinalnog sustava, malformacije lica i multiple malformacije. Dvije trećine malformacija zahvaća kardiovaskularni i središnji živčani sustav. Rezultati istraživanja o zahvaćenosti pojedinih organskih sustava malformacijama uzrokovanih dijabetesom pokazuju da je učestalost kardiovaskularnih malformacija 44% (28). Malformacije srca vezane su za rani razvoj srčanih osnova i kardiomiopatiju, koja dovodi do intrauterinog zatajenja srca. Među najčešće ubrajamo korigiranu transpoziciju velikih krvnih žila, ventrikularni septalni defekt, koarktaciju aorte, atrijski septalni defekt, perzistentni trunkus arteriosus. Rezultati istraživanja pokazali su da je učestalost ranih kardiovaskularnih malformacija u trudnica s

predkonceptijskim dijabetesom 3% (37). U rane kardiovaskularne malformacije ubrajaju se atriventrikularni i ventrikularni septalni defekti, korigirana transpozicija velikih krvnih žila i konotrunkalni defekti. Opstruktivnih i defekti sa shuntom su hipoplastično lijevo srce, aortalna stenoza, koarktacija aorte, bikuspidna aortalna valvula, pulmoalna stenoza, pulmonalna atrezija, atrezija trikuspidalnog ušća i Ebsteinova anomalija te je njihova učestalost u navedenom istraživanju 1.4% (37). U češće malformacije SŽS ubrajamo defekte neuralne cijevi, mikrocefaliju i hidrocefalus, a u rjeđe holoprosencefaliju, eksencefaliju i septo-optičku displaziju (35). Zatvaranjem neuralnog žlijeba nastaje neuralna cijev koja čini osnovu središnjeg živčanog sustava, odnosno mozak i kralježničnu moždinu, a njezin kranijalni i kaudalni dio čini prednji i stražnji neuroporus koji se zatvaraju 25. odnosno 27. dan (26). Spina bifida i anencefalija su najčešći poremećaji zatvaranja neuralne cijevi. Anencefalija počinje poremećenim razvojem kosti lubanje, akranije te dolazi do protruzije mozga, eksencefalije, koji se uništava djelovanjem amnijske tekućine (38). Češće skeletne malformacije su sakralna ageneza, anomalije rebra i kralježnice te defekti udova, a rjeđe su polidaktilija, sindaktilija i klinodaktilija (35).

U česte urogenitalne anomalije ubrajamo hidronefrozu, agenezu bubrega, duplikaciju mokraćovoda, multicističnu displaziju bubrega i hipospadiju, a u gastrointestinalne atreziju duodenuma, anorektuma i jednjaka (35). Istraživanje utjecaja pregestacijskog dijabetesa na razvoj anomalija urinarnog sustava pokazalo je da je omjer šansi za nastanak renalne ageneze ili disgeneze 14.8, a opstruktivnih malformacija urinarnog sustava 4.3 (39).

Anomalije lica obuhvaćaju rascjep nepca i usne, atreziju usnog kanala, mikrotiju, anotiju, gubitak sluha, kataraktu, kolobom oka i hipoplaziju očnog živca. Multiple malformacije, odnosno malformacije pojedinih organskih sustava koje se javljaju zajedno, a ne opisuju kao sindrom, najčešće zahvaćaju srce, atreziju pojedinih dijelova gastrointestinalnog sustava, rascjep nepca i usne, hipospadiju i defekte udova (35).

Iako se smatra da malformacije uzrokovane dijabetesom nastaju u razdoblju organogeneze od trećeg do osmog tjedna embrionalnog razvoja (40), postoje istraživanja koja ukazuju da sumalformacije uzrokovane dijabetesom majke blastogenog podrijetla te se povezuju s utjecajem dijabetesa na razvojna područja

(41). Razvojno područje (engl. *developmental field*) dio je embrija u kojem se tijekom embrionalnog razvoja procesi odvijaju vremenski i prostorno kontrolirano i koordinirano (42). Poremećaji razvoja tih područja vode promijenjenoj diferencijaciji i razvoju kongenitalnih malformacija (40). Malformacije povezane s dijabetesom majke koje se svrstavaju u skupinu malformacija blastogenog podrijetla su defekti neuralne cijevi, srčane malformacije kaudalna disgeneza, anorektalna atrezija ili stenoza, holoprosencefalija, defekti udova, mikrotija, anotija, hemifacijalna mikrosomija (29,41). U neblastogene malformacije ubrajaju se rascjep nepca i usne te hipertrofična kongenitalna kardiomiopatija (29). Nastanak malformacija ovisi o trenutku embrionalnog razvoja kada je koncentracija glukoze maksimalna i osjetljivosti, odnosno pragu za teratogeni učinak pojedinog organa ili tkiva (29,41).

## **8.2. Sindromi povezani s dijabetesom**

Postoje rijetki sindromi koji se češće pojavljuju u trudnoćama majki s dijabetesom u odnosu na opću populaciju. S obzirom na njihovu rijetku pojavu, ne postoje velika kohortna istraživanja o njima već samo klinički prikazi slučajeva. Kaudalna regresija je rijedak sindrom koji se pojavljuje otprilike 200 puta češće u djece trudnica s dijabetesom (43). Kaudalna regresija je složena malformacija koja obuhvaća nedostatak ili malformiranu sakralnu i trtičnu kost uz hipoplaziju femura, dislociranih kukova, defekta tibije i fibule. Uz kaudalnu regresiju često se javljaju bubrežne malformacije poput hidronefroze, duplikacije mokraćovoda i ageneza bubrega (35). Sirenomelija je teška malformacija u kojoj su zdjelice kosti oštećene, a donji udovi čine spojenu strukturu u sredini tijela. Prisutna je ageneza kolona s imperforiranim anusom te vrlo često hipoplazija pluća nastala zbog oligohidramniona. Ostale prateće malformacije najčešće su renalna ageneza ili displazija, odsutnost ili hipoplazija uretera i mokraćnog mjehura, neformirane vanjske genitalije, VSD, anomalije gornjeg probavnog sustava, a rjeđe redukcija kosti gornjih udova i defekti neuralne cijevi. Većina djece sa sirenomelijom rađa se mrtвороđena ili umire u ranom neonatalnom razdoblju (20).

Goldenhar sindrom ili okulo-aurikulo-vertebralni sindrom obuhvaća strukture koje se razvijaju iz prvog i drugog škržnog luka. U odnosu na opću populaciju, u trudnica s dijabetesom postoji veća incidencija ovog sindroma. Osim dijabetesa, kao mogući

uzroci navode se poremećaji krvne opskrbe, poremećena migracija stanica tijekom embrionalnog razdoblja te kemijski uzročnici. Okularne promjene su mikroftalmija, kolobom, epibulbarni dermoidi i lipodermoidi. U sklopu vertebralnih promjena nalazi se skolioza, hemivertebra, fuzija cervikalnih kralješka. Ostale vidljive malformacije su preaurikularni privjesci i jamice, malformacije uha, rascjep nepca i usne, hipoplazija facijalnih mišića, hipoplazija mandibule i maksile te paraliza facijalnog živca. Ponekad se javljaju holoprosencefalija i drugi poremećaji središnjeg živčanog sustava te srčane greške, najčešće VSD, ASD, konotrunkalni defekt (44).

Još jedan rijedak sindrom koji se češće pojavljuje u trudnica s dijabetesom je femoro-facijalni sindrom. Obilježja novorođenčadi s tim sindromom su nisko smještene i slabo oblikovane uške, kratki nos, dugačak filtrum, mikrognatija, bilateralna aplazija ili hipoplazija femura, humeroradijalna sinostoza, što ograničava pokrete u laktu te postojanje drugih sistemnih malformacija poput malformacija kardiovaskularnog, središnjeg živčanog i genitourinarnog sustava. Postoji sličnost s kaudalnom regresijom, koja je također češća u novorođenčadi trudnica s dijabetesom, te upravo dismorfije na licu omogućuju lakše razlikovanje tih dvaju navedenih sindroma. Također, postoje različite kliničke slike pa tako dismorfije lica mogu ili ne moraju biti izražene te postoji varijabilna zahvaćenost kosti što uključuje minimalno oštećenja do rijetke potpune nerazvijenosti femura (45).

## **9. UTJECAJ DIJABETESA NA RAZVOJ KONGENITALNIH MALFORMACIJA**

### **9.1. Utjecaj dijabetesa na ovulaciju**

Granuloza stanice koje okružuju oocitu omogućavaju njezin rast i razvoj parakrinom signalizacijom i putem zjapnih veza između stanica (engl. *gap junction*) (22). Osim utjecaja na embrio, istražuje se utjecaj majčinog dijabetesa na razvoj oocite u životinja s dijabetesom. Rezultati istraživanja pokazuju usporeno sazrijevanje preovulatorne oocite i apoptozu granuloza stanica te povećanje ekspresije proapoptotičkih proteina i smanjenu ekspresiju zjapnih proteina, koneksina-43 koji je nužan za interakciju oocite i granuloza stanica (46). Također, udio zrelih oocita je manji, a atretičnih i postmaturnih oocita je povećan u skupini životinja s dijabetesom u odnosu na zdravu kontrolu te je in vitro fertilizacija smanjena u životinja s



dijabetesom (47). Iz istraživanja o ženama koje su obavile postupak in vitro fertilizaciju poznato je da je povećana apoptoza u granulosa stanicama povezana s lošom kvalitetom oocite, lošim ishodom trudnoće i ranim pobačajem. Stoga postoji pretpostavka o povezanosti loše regulacije dijabetesa tijekom ovulacije i fertilizacije s ranim pobačajem i kongenitalnim malformacijama zbog aktivacije apoptotičkih signala (46). Osim toga, navedene promjene utječu na smanjenu fertilitet žene s dijabetesom (22).

## 9.2. Predimplantacijska faza razvoja

Provedene studije na životinjskim embrijima pokazuju da hiperglikemija ima utjecaj na embrionalni razvoj već u prvim danima. Usporava razvoj i rast zigote što može utjecati na kasniji razvoj embrija te može zaustaviti staničnu diobu već u jednostaničnom ili dvostaničnom stadiju (48). Također istraživanja pokazuju kako u osmostaničnom stadiju zigota počinje iskorištavati glukozu za sintetske procese te je stadij morule i rane blastociste visoko osjetljiv na visoke koncentracije glukoze što može uzrokovati apoptozu i smanjenje broja stanica embrioblasta blastociste te uzrokovati smrt embrija i rani spontani pobačaj (22). Hiperglikemija na blastocistu djeluje tako da uzrokuje promjene u razvoju trofoblasta i embrioblasta. Stanice embrioblasta blastociste sintetiziraju FGF-4 koji stimulira normalnu diferencijaciju trofoblasta. Istraživanja su pokazala smanjenu sintezu FGF-4 u kulturi s visokom koncentracijom glukoze te posljedično nepravilnu diferencijaciju trofoblasta, a dodatak FGF-4 u kulturu rezultirao je normalnim rastom trofoblasta (40). Smanjenje broja stanica embrioblasta nastaje zbog hiperglikemijom inducirane apoptoze. Istraživanja na mišjim blastocistama pokazuju da hiperglikemija uzrokuje smanjenu ekspresiju glukoznih transportera (engl. *downregulation*) i zbog toga smanjen transport glukoze prema embriju i posljedično smanjenu koncentraciju slobodne glukoze (22). Navedena zbivanja potiču aktivaciju proteina p53 i povećanje ekspresije proapoptotičkog proteina BAX, dolazi do promjenjene ekspresije Bcl-2 i aktivacije kaspaza koje uzrokuju apoptozu (33,49). Oksidativni stres nastao zbog hiperglikemije dovodi do oštećenja stanica, povećane apoptoze i poremećenog embrionalnog razvoja (50). Istraživanja životinjskih embrija u kulturi seruma žene s dijabetesom pokazuju smanjenu razinu niskomolekularnih antioksidansa poput glutationa i vitamina C i E te povećanu razinu slobodnih radikala (51). Slobodni radikali reguliraju



ekspresiju citokinskih receptora na placenti, stanicama citotrofoblasta, endotelnih stanica krvnih žila i glatkih mišićnih stanica što utječe na funkciju placente (22). U fazi implantacije embrija važnu ulogu imaju citokini i faktori rasta čije djelovanje se također mijenja pod utjecaj hiperglikemije. Tijekom implantacije TNF- $\alpha$  prisutan je u stanicama maternice, a njegovi receptori nalaze se na blastocisti (40). Istraživanja in vitro pokazuju da hiperglikemija uzrokuje povećanu sintezu TNF- $\alpha$  (52), a istraživanja na životinjama povećanu sintezu TNF- $\alpha$  u stanicama maternice oplođenih mišica s dijabetesom (22). Povezanost TNF- $\alpha$  i dijabetičke embriopatije pokazala su istraživanja u kojima je interakcija TNF- $\alpha$  i receptora na blastocisti smanjila rast stanica embrioblasta blastociste (53). Također, smatra se da epigenetske modifikacije DNA postoje već u predimplantacijskom razvoju, a to može utjecati na razvoj malformacija (22).

### **9.3. Poslijeimplantacijska faza razvoja**

Interakcija genetičke predispozicije i intrauterinih uvjeta utječe na razvoj kongenitalnih malformacija. Iako nije još potpuno razjašnjeno, smatra se da postoje razni teratogeni faktori u majčinoj i fetalnoj cirkulaciji, poremećaji enzimatskih sustava i novonastali teratogeni procesi uzrokovani dijabetesom (2).

#### **9.3.1. Teratogeni u majčinoj cirkulaciji**

U majčinoj cirkulaciji teratogenima smatra se hiperglikemija, hiperketonemija te promjene masnih kiselina i aminokiselina. Hiperglikemija uzrokuje povećanje broja glukoznih transportera (engl. *upregulation*) što povećava priljev glukoze u fetalnu cirkulaciju te posljedično povećanje glikolize, ciklusa limunske kiseline i oksidativne fosforilacije što pridonosi razvoju oksidativnog stresa (54,55). Zbog navedenih zbivanja dolazi do povećanja heksoza monofosfatnog puta, nastanka reaktivnih radikala kisika (engl. *reactive oxygen species, ROS*) koji inhibiraju gliceralaldehid-3-fosfat dehidrogenazu, povećanja reaktivnih alfaoksoaldehida, sinteze sorbitola, krajnjih produkata uznapredovale glikacije (engl. *advanced glycation end products, AGEs*) te smanjenja inozitola i arahidonske kiseline i posljedično prostaglandina (2). Sve navedene promjene smatraju su mogućim teratogenim čimbenicima u razvoju dijabetičke embriopatije.

Ketonska tijela nastaju zbog povećanja količine acetyl-CoA koji se nakuplja zbog promjena u metabolizmu uzrokovanih dijabetesom. U ketonska tijela ubrajamo acetoctenu kiselinu,  $\beta$ -hidroksibutirat i aceton. Acetoctena kiselina i  $\beta$ -hidroksibutirat prelaze putem posteljice u fetalnu cirkulaciju i ulaze u mitohondrije te s produktima glikolize utječu na razvoj hipoksije, odnosno oksidativnog stresa. Studije in vitro pokazuju kako direktna izloženost povećanoj koncentraciji ketonskih tijela ometa razvoj embrija glodavaca i djeluje teratogeno (56).

Teratogeni utjecaj hipertrigliceridemije i masnih kiselina također pokazuju mnoga istraživanja in vitro (57) te se pretpostavlja da je mehanizam nastanka povezan s povećanom beta oksidacijom masnih kiselina, povećanog ulaska nastalih produkata u ciklus limunske kiseline te posljedičnog oksidativnog stresa (2).

Istraživanja na životinjama pokazuju kako se u serumu nalazi povećana koncentracija aminokiselina razgranatih lanaca (58) koje ulaze u metaboličke procese preko ciklusa limunske kiseline i pokazuju teratogeni učinak na embrionalni razvoj (2).

### **9.3.2. Teratogeni u fetalnoj cirkulaciji**

Ekperimentalne studije pokazuju kako povećanje odnosno sniženje određenih metabolita u fetalnoj cirkulaciji može imati teratogeni utjecaj na razvoj.

Smatra se da hiperglikemija uzrokuje smanjenu koncentraciju inozitola te posljedično fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfata i njegovih produkata diacilglicerola i inozitol-3-fosfata koji su stimulatori protein kinaze C. Smanjena aktivnost protein kinaze C (PKC) uzrokuje smanjenu aktivnost fosfolipaze A2 smanjujući dostupnost slobodne arahidonske kiseline te njenog metabolizma i produkata, uključujući prostaglandine (2). Istraživanja na životinjskim embrijima u kulturi seruma sa smanjenom koncentracijom inozitola pokazala su da deficijencija inozitola uzrokuje nastanak defekta neuralne cijevi (59). Također istraživanja u kojima je takvoj kulturi dodan inozitol ili mioinozitol pokazala su smanjenje broja defekta neuralne cijevi (60).

Iz glukoze uz prisustvo aldoza reduktaze (AR) nastaje sorbitol koji se dalje pretvara u fruktozu uz djelovanje sorbitol dehidrogenaze. Upravo zbog navedenih reakcija, hiperglikemija i nedovoljno povećanje aktivnosti sorbitol dehidrogenaze s obzirom na povećanu razinu glukoze, uzrokuju povećanje razine sorbitola. Sorbitol se povezuje

uz nastajanje dijabetičkih komplikacija u trudnice poput retinopatije, neuropatije i nefropatije te se smatra da ima ulogu u nastanku dijabetičke embriopatije. Studije na životinjama pokazuju da dodatak inhibitora aldoza reduktaze smanjuje razinu sorbitola, no bez utjecaja na učestalost malformacija (2).

Istraživanja mišjih embrija izloženih hiperglikemiji pokazuju povećanu razinu aldoza reduktaze i sorbitola te povećanu ekspresiju mRNA za AR u stanicama neuralnog grebena. Dodatak inhibitora aldoza reduktaze u hiperglikemični medij smanjio je razinu reaktivnih radikala kisika u stanicama neuralnog grebena za 47.4.% što ukazuje na utjecaj AR na oksidativni stres. Mjerena je vijabilnosti, proliferacija i apoptoza u stanicama neuralnog grebena izloženih normoglikemiji, hiperglikemiji i hiperglikemiji uz dodatak inhibitora AR. Stanice izložene hiperglikemiji pokazuju smanjenu vijabilnost i proliferaciju te povećanu apoptozu u odnosu na stanice izložene normoglikemiji. AR inhibitor dodan hiperglikemičnom povećava vijabilnost i proliferaciju stanica te smanjuje apoptozu i ekspresiju GLUT1 transportera na neuroepitelnim stanicama. Rezultati navedenog istraživanja pokazuju utjecaj hiperglikemije na oksidativni stres putem povećane aktivnosti limitirajućeg enzima koji reducira glukozu u sorbitol. Nastali oksidativni stres dovodi do smanjene vijabilnosti i proliferacije te povećane apoptoze stanica neuralnog grebena što dovodi do nastanka kongenitalnih malformacija (61).

Djelovanjem enzima ciklooksigenaza 2 iz arahidonske kiseline nastaje prostaglandin G2 koji je prekursor prostaglandina H2 i E2. Narušen metabolizam arahidonske kiseline i poremećena sinteza prostaglandina sudjeluju u razvoju dijabetičke embriopatije. Istraživanja životinjskih embrija u kulturi s visokom koncentracijom glukoze pokazuju da dodatak arahidonske kiseline smanjuje učestalost nastanka defekta neuralne cijevi (62). Također izmjerena koncentracija PGE2 tijekom zatvaranje neuralne cijevi u takvim je istraživanjima snižena (63). Hiperglikemija i dijabetes inhibiraju ekspresiju COX2 što smanjuje razinu PGE2. Oksidativni stres inhibira pretvorbu PGG2 u PGH2 i PGE2 i smanjuje razinu arahidonske kiseline. S obzirom na utjecaj oksidativnog stresa na razinu PGE2, dodatak antioksidansa, N-acetilcisteina i superoksid dizmutaze (SOD), povećava razinu PGE2 (63), no ne utječe na ekspresiju COX2 (2).

Folna kiselina sudjeluje u sintezi DNA te ima važnu ulogu u zatvaranju neuralne cijevi. Stoga se danas preporučuje uzimanje folne kiseline nekoliko mjeseci prije početka trudnoće te u prvim mjesecima razvoja. Smanjena razina folne kiseline može uzrokovati defekte neuralne cijevi, najčešće spinu bifidu. Osim toga, smatra se da poremećaj metabolizma folata, iz kojeg se sintetizira folna kiselina, ima utjecaj na razvoj dijabetičke embriopatije jer je upravo veća incidencija defekta neuralne cijevi u djece čije majke imaju dijabetes (2). Istraživanja in vitro i in vivo pokazuju da dodatak folne kiseline smanjuje razvoj malformacija. Također studije pokazuju da je zabilježen manji nastanak defekta neuralne cijevi te općenito malformacija ako su žene koje boluju od dijabetesa u predkonceptijskom razdoblju uzimale folnu kiselinu (64).

### **9.3.3. Teratogeni procesi uzrokovani hiperglikemijom**

Osim povećanja i smanjenja raznih metabolita koji sudjeluju u patogenezi nastanka malformacija, hiperglikemija utječe na razne signalne putove koji mijenjaju unutarstanične uvijete.

Oksidativni stres nastaje kada se poremeti ravnoteža između razine slobodnih kisikovih radikala i razine antioksidansa. Nastala neravnoteža uzrokuje oštećenje stanica, proteina, lipida i DNA. Superoksidni radikal nastaje nekompletnom redukcijom elektrona u mitohondrijima. Istraživanjima je uočena povišena razina markera lipidne peroksidacije poput 8-epi-PGF<sub>2α</sub> (63), nakupljanje radikala te smanjena razina vitamina E (65). Utjecaj oksidativnog stresa, uzrokovanog dijabetesom, na razvoj dijabetičke embriopatije pokazala su mnoga istraživanja (66). Istraživanja in vitro i in vivo pokazala su kako dodatak antioksidansa smanjuje broj malformacija induciranih hiperglikemijom te da smanjuje razinu 8-epi-PGF<sub>2α</sub> i nakupljanje radikala, a povećava razinu PGE<sub>2</sub> (67–69). Osim navedenih promjena, oksidativni stres induciran hipoglikemijom očituje se oštećenjem DNA, edematoznim mitohondrijima i povećanom apoptozom (70). Također dodatak SOD-e u kulturu embrija glodavaca smanjio je teratogeni učinak β-hidroksibutirata i aminokiselina razgranatih lanaca (71).

Hiperglikemija utječe na neenzimsku glikozilaciju odnosno glikaciju proteina u kojoj nastaju krajnji produkti uznapredovale glikacije, AGE. AGE povećavaju oštećenje stanica i utječu na razvoj dijabetičkih komplikacija poput retinopatije, katarakte, ateroskleroze, nefropatije i neuropatije (72). Aktivacija transmembranskog receptora

za AGE, RAGE, uzrokuje signalnu kaskadu koja rezultira aktivacijom NF $\kappa$ B i NADPH oksidaze, što povećava oksidativni stres (2). Njihovom interakcijom potiče se proliferacija glatkog mišića te povezivanje i odlaganje izvanstaničnog matriksa (4). Interakcija RAGE i AGE uočena je u patogenezi dijabetičke embriopatije. Istraživanja embrija glodavaca u kulturama s visokom razinom glukoze pokazuju povećanu razinu prekursora AGE-a, 3-deoksiglukoze (3-DG) (73). Povezanost AGE-a i oksidativnog stresa pokazuju posljednja istraživanja na životinjama u kojima je ustanovljena povećana razina 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  i aktiviranog NF $\kappa$ B u embrija izloženih dijabetesu u usporedbi s normalnom razinom 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  i NF $\kappa$ B u embrija izloženih dijabetesu, ali s homozigotnom mutacijom receptora za AGE (RAGE $^{-/-}$ ) (2).

U ranom embrionalnom razvoju fetalna tkiva izložena su smanjenoj koncentraciji kisika u fetalnoj cirkulaciji što upućuje na njihov normalan razvoj u hipoksičnim uvjetima. Hiperglikemija povećava potrošnju kisika zbog povećane glikolize i procesa koji se dalje odvijaju u mitohondrijima te povećava postojeću hipoksiju i proizvodnju slobodnih radikala. U hipoksičnim uvjetima povećava se omjer AMP/ATP, što uz oksidativni stres povećava aktivnost enzima AMPK (74). Oksidativni stres smanjuje ekspresiju PAX3 gena čime se gubi kontrola nad p53 proteinom što dovodi do nastanka apoptoze i posljedičnih malformacija (74,75). AMPK u staničnoj jezgri fosforilira proteine te djelovanje AMPK direktno utječe na nastanak malformacija (75), no točan mehanizam nastanka malformacija SŽS-a i kardiovaskularnog sustava još nije utvrđen.

Dijabetes i oksidativni stres povećavaju ekspresiju inducibilne sintetaze dušikovog oksida povećavajući razinu dušikovog monoksida. Dušikov monoksid reagira sa superoksidnim radikalom tvoreći peroksinitrit. Daljnjim reakcijama peroksinitrita nastaju dušikovi reaktivni spojevi koji uzrokuju nastanak nitrozativnog stresa te oštećenje stanica i apoptozu. Nitrozativni stres povećava i ER stres. Istraživanja embrija s povećanom ekspresijom gena za SOD pokazuju smanjenje markera oksidativnog stresa, nitrozativnog stresa te smanjene razine kaspaze 3 i kaspaze 8 koje su markeri apoptoze (76). Dijabetes povećava razinu sintetaze dušikovog oksida 2 (NOS-2), stoga je provedeno istraživanje utjecaja inhibicije NOS-2 na razvoj malformacija. Istraživanje oplođenih mišića koje su jednom dnevno u hrani dobile inhibitor sintetaze dušikovog oksida pokazalo je smanjenu učestalost nastanka defekta neuralne cijevi te smanjenja nitrozativnog stresa, ER stresa i apoptoze.

Rezultati su pokazali da je učestalost nastanka defekta neuralne cijevi u skupini embrija miševa s dijabetesom 19.5%, a u skupini miševa s dijabetesom kojima je dodan inhibitor NOS-2 učestalost je smanjena na 3.8% (77). Navedeni rezultati ukazuju na ulogu NOS-2 u nastanku nitrozativnog stresa i posljedično dijabetičke embriopatije.

Endoplazmatski retikulum je stanična organela u kojoj se odvija sinteza proteina i njihovo oblikovanje u terciarni oblik uz pomoć šaperona, poput Hsp70 (BiP). Akumulacija agregiranih i krivo zamotanih proteina oštećuje funkciju ER i rezultira ER stresom koji aktivira odgovor nesavjenih proteina (engl. *unfolded protein response*, *UPR*) i posljedično povećanu ekspresiju ER šaperona i aktivaciju proapoptičkog JNK1/2 puta (engl. *c-Jun N-terminal kinase*) (78). Kao markeri ER stresa i UPR koriste se BiP, CHOP, IRE1 $\alpha$ , PERK, eIF2 $\alpha$  (2). ER stres i aktivacija JNK1/2 sudjeluju u patogenezi dijabetičke embriopatije inducirajući apoptozu. Apoptoza stanica neuralne cijevi uzrokuje defekte neuralne cijevi (78). Uočen je utjecaj ER stresa na migraciju endokardijalnih stanica i posljedični atrioventrikularni septalni defekt (79).

Istraživanje provedeno na životinjskim embrijima ukazuje na povezanosti ER stresa i aktivacije JNK1/2 uzrokovanih hiperglikemijom, što se očitovalo povećanom razinom markera ER stresa, CHOP, PERK, BiP u fazi neurulacije embrija. Embriji s delecijom JNK1/2 (JNK1<sup>-/-</sup>, JNK2<sup>-/-</sup>) izloženi hiperglikemiji imaju niže markere ER stresa i manju ekspresiju gena za šaperone nego oni bez delecije. Rezultati navedenog istraživanja pokazuju da je učestalost defekta neuralne cijevi u kulturi embrija izloženih koncentraciji glukoze 20 mmol/L 66.7%, u kulturi izloženih koncentraciji glukoze 5 mmol/L je 8%, a u kulturi kojoj je dodan 4-fenilbutirata učestalost iznosi 10% (78). Dodatak 4-fenilbutirata u kulturu embrija inhibira nastanak ER stresa induciranog glukozom, aktivaciju JNK1/2 signalnog puta, apoptozu u neuroepitelnim stanicama i smanjuje učestalost nastanka defekta neuralne cijevi te obnavlja migraciju endokardijalnih stanica i smanjuje nastanak srčanih grešaka (78,80).

Oksidativni stres i ER stres uzrokovani hiperglikemijom uzrokuju aktivaciju c-Jun NH<sub>2</sub>- terminalne kinaze (JNK1/2) koja aktivira transkripcijske faktore i uzrokuje kaskadu kaspaza. JNK1/2 fosforilira transkripcijske faktore koji su nužni za aktivaciju apoptotičkih gena te defosforilira FoxO3 $\alpha$  što ukazuje na njegovu transkripcijsku

aktivnost u defosforiliranom obliku (81). Istraživanja embrija s deficijencijom gena JNK1/2 (JNK1<sup>-/-</sup>, JNK2<sup>-/-</sup>) izloženih hiperglikemiji ukazuju na smanjenje učestalosti defekta neuralne cijevi, smanjenje fosforiliranih transkripcijskih faktora c-Jun, ATF-2 i Elk1, povećanje fosforiliranog FoxO3α te inhibiranje kaskadne aktivacije kaspaza (82). Pax3 gen, TGF-β, Wnt signalni put, koji se povezuju s mehanizmom nastanka dijabetičke embriopatije, pokazuju interakciju s JNK1/2. Ekspresija Pax3 regulirana je Hox genima, koji ujedno suprimiraju JNK1/2 (81), a u dijabetičkoj embriopatiji postoji deficijencija Pax3 i aktivacija JNK1/2. Promijenjena aktivnost Wnt signalnog puta i djelovanja TGF-β u dijabetičkoj embriopatiji može se povezati s JNK1/2 (83), koji inhibira Wnt put, a inhibicija JNK1/2 povećava aktivnost TGF-β (84).

MAP (engl. *Mitogen Activated Protein*) kinaze sudjeluju u raznim staničnim procesima putem različitih signalnih puteva koji se aktiviraju na različite izvanstanične stimulanse. MAP signalni putevi sudjeluju u regulaciji mitoze, apoptoze i ekspresije gena putem fosforilacije serina ili treonina na ciljnim proteinima. MAPK signalni put sastoji se od tri komponente koje obuhvaćaju MAPK, MAPKK i MAP3K te s obzirom na to da MAP3K započinje kaskadnu reakciju aktivacije fosforilacijom MAPK preko MAPKK jako je važna aktivacija početne MAP3K. ASK1 (engl. *Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1*) ubraja se u skupinu MAP3K i sudjeluje u aktivaciji JNK signalnog puta. Oksidativni stres uzrokovan hiperglikemijom aktivira ASK1 koji posljedično dovodi do aktivacije JNK i povećane apoptoze prisutne u dijabetičkoj embriopatiji. ASK1 aktivacija inducira UPR u endoplazmatskom retikulumu dovodeći do ER stresa (85).

Transkripcijski faktor FoxO3a aktiviran je u dijabetičkoj embriopatiji i uzrokuje povećanu ekspresiju apoptotičkog gena TRADD. FoxO3a reguliran je ASK1-JNK1/2 i PI3K/AKT signalnim putevima te u normalnim uvjetima AKT inhibira aktivaciju FoxO3a. Stoga je aktivacija FoxO3a u dijabetičkoj embriopatiji posljedica inhibicije AKT funkcije i aktivacije ASK1-JNK1/2. Istraživanja embrija s delecijom gena FoxO3a (FoxO3a<sup>-/-</sup>) izloženih hiperglikemiji ukazuju na smanjenje učestalosti defekta neuralne cijevi i apoptoze uzrokovanih dijabetesom. U embrijima s FoxO3a delecijom (FoxO3a<sup>-/-</sup>) izloženih hiperglikemiji učestalost defekata neuralne cijevi iznosila je 3.1%, a u embrijima s divljim tipom gena učestalost je bila 25.6%. Osim toga, delecija FoxO3a gena (FoxO3a<sup>-/-</sup>) uzrokuje smanjenu ekspresiju TRADD što se očituje smanjenom razinom proapoptotičkih kaspaza 3 i 8 te upućuje na nastanak defekta



neuralne cijevi uzrokovanog dijabetesom putem povećane apoptoze zbog aktivacije FoxO3a i TRADD gena (86).

Obitelj protein kinaze C obuhvaća 12 izoformi enzima koje su uključene u različite funkcije poput stanične proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Aktivacija PKC povezuje se s razvojem dijabetičke embriopatije, odnosno nastankom defekta neuralne cijevi (87). Hiperglikemija aktivira PKC $\alpha/\beta$ II i PKC $\delta$ , koji fosforiliraju MARCKS što dovodi do apoptoze. PKC uzrokuje lipidnu peroksidaciju koja uzrokuje promjenu metabolizma arahidonske kiseline, a umjesto PGE2 nastaju izoprostani te lipidna peroksidacija povećava proizvodnju slobodnih radikala što pogoduje povećanju oksidativnog stresa već induciranog hiperglikemijom. Istraživanja pokazuju kako prekomjerna ekspresija SOD (engl. *SOD overexpression*) u miševa izloženih hiperglikemiji blokira aktivaciju PKC izoformi, fosforilaciju MARCKS-a koji je supstrat PKC i smanjuje razinu markera lipidne peroksidacije (88).

Autofagocitoza je katabolički proces u stanicama kojim se razgrađuju nepotrebne stanične komponente i nužan je za proliferaciju, diferencijaciju i održavanje homeostaze. Istraživanje utjecaja autofagocitoze tijekom neurulacije na razvoj neuroepitela pokazalo je da je proces autofagocitoze nužan tijekom neurulacije. U navedenom istraživanju deficijencija AMBRA1 (engl. *Autophagy/Beclin-1 Regulator 1*) uzrokovala je masivnu apoptozu neuroepitelnih stanica što je uzrokovalo nastanak defekta neuralne cijevi (89). Apoptoza neuroepitelnih stanica i posljedične malformacije zbog supresije autofagocitoze uočena je u dijabetičkoj embriopatiji, iako još nije utvrđen mehanizam supresije. Provedeno je istraživanje na mišjim embrijima u stadiju neurulacije prije zatvaranja neuralne cijevi kako bi se utvrdila povezanost supresije autofagocitoze, povećane apoptoze neuroepitelnih stanica i defekta neuralne cijevi uzrokovanih dijabetesom. Rezultati su pokazali opsežnu apoptozu u srednjem i prednjem mozgu u embrijima s eksencefalijom izloženih dijabetesu, apoptozu, manje opsežnu apoptozu u mozgu embrijima izloženih dijabetesu bez malformacije te najmanju apoptozu i blago smanjenu autofagocitozu u normalnim embrijima koji nisu bili izloženi dijabetesu. Navedeni rezultati ukazuju na utjecaj smanjene autofagocitoze i povećane apoptoze u nastanku defekta neuralne cijevi uzrokovanih dijabetesom (90).



S obzirom na to da dijabetesom uzrokovani oksidativni stres dovodi do aktivacije PKC s proapoptotičkim djelovanjem, istražen je utjecaj PKC na autofagocitozu. Rezultati istraživanja in vivo i in vitro pokazuju da je izoforma PKC $\alpha$  negativni regulator autofagocitoze te da sudjeluje u supresiji autofagocitoze uočene u dijabetičkoj embriopatiji. U mišjim embrijima s delecijom gena za PKC (Prkca<sup>-/-</sup>), izloženih hiperglikemiji uočena je inhibicija supresije autofagocitoze inducirane dijabetesom u neuroepitelnim stanicama. Isto tako, delecija Prkca (Prkca<sup>-/-</sup>), smanjuje apoptozu putem smanjenja broja oštećenih mitohondrija i pojave ER stresa u neuroepitelnim stanicama zbog održane autofagocitoze i mogućnosti održavanja homeostaze stanice. Hiperglikemijom inducirana translokacija proapoptotičkih proteina Bcl-2 obitelji, Bak, Bax i Bim u mitohondrijima je inhibirana delecijom Prkca gena te su markeri oštećenja funkcije mitohondrija sniženi. Kaspaze 3 i 8, koje su odgovorne za apoptozu, i markeri ER stresa CHOP, IRE1a, PERK sniženi su u embrijima s delecijom Prkca izloženih hiperglikemiji (90).

Biogeneza mitohondrija je proces rasta i dijeljenja mitohondrija kojim se povećava broj, veličina i masa mitohondrija u stanici. Glavni regulator navedenog procesa je PGC-1 $\alpha$  (engl. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator-1 alfa*) koji pripada skupini transkripcijskih koaktivatora. PGC-1 $\alpha$  aktivira brojne transkripcijske faktore, a u najvažnije se ubrajaju jezgrini respiracijski faktori 1 i 2 (NRF1/2) koji povećavaju ekspresiju mitohondrijskog transkripcijskog faktora A (Tfam) i aktiviraju enzime koji interakcijom s Tfam dovode do replikacije i transkripcije mitohondrijske DNA (91). PGC-1 $\alpha$  ima važnu ulogu u funkcioniranju mitohondrija i brojnim metaboličkim procesima. Osim toga, pozitivan je regulator autofagocitoze, a dijabetes smanjujući ekspresiju PGC-1 $\alpha$ , smanjuje njegovo djelovanje te tako putem smanjene autofagocitoze uzrokuje povećanu apoptozu što dovodi do nastanka kongenitalnih malformacija. Istraživanja su pokazala da PKC djeluje na ekspresiju PGC-1 $\alpha$  putem miRNA (92) te je uočeno izrazito djelovanje miRNA u fazi neurulacije (93). MicroRNA su male nekodirajuće molekule RNA koje su odgovorne za regulaciju genske ekspresije poslije transkripcije. Negativna regulacija ekspresije PGC-1 $\alpha$  uzrokovana je djelovanjem miR-129-2, koja se zbog toga smatra jednim od čimbenika u nastanku dijabetičke embriopatije (90).

Istraživanje utjecaja hiperglikemije na ekspresiju PGC-1 $\alpha$  djelovanjem miR-129-2 pokazalo je smanjenu ekspresiju PGC-1 $\alpha$  u stanicama izloženih hiperglikemiji,

dodatkom inhibitora miR-129-2 uočeno je blago povećanje ekspresije PGC-1 $\alpha$ , a u stanicama izloženih euglikemiji uočena je normalna ekspresija, odnosno postizanje platoa PGC-1 $\alpha$ . Također, delecije Prkca gena, u stanicama izloženih hiperglikemiji, blokira povećanu ekspresiju miR-129-2 što ukazuje na povezanost dijabetesom uzrokovane povećane aktivacije PKC koja dovodi do povećane ekspresije miR-129-2 i posljedično smanjene ekspresije PGC-1 $\alpha$ . Rezultati navedenog istraživanja pokazali su da je učestalost defekta neuralne cijevi 2.2% u embrijima s povećanom ekspresijom PGC-1 $\alpha$  izloženih hiperglikemiji, a u embrijima s genom divljeg tipa izloženih hiperglikemiji je 22.7%. Navedeni rezultati ukazuju da povećana ekspresija PGC-1 $\alpha$  smanjuje rizik za razvoj malformacija tijekom neurulacije u uvjetima hiperglikemije putem smanjenog broja oštećenih mitohondrija, smanjenog ER stresa i smanjene apoptoze (90).

Istraživanje na embrijima oplođenih mišica s dijabetesom pokazalo je da je učestalost defekta neuralne cijevi 27.7%, a dodatkom 2% trehaloze smanjena je na 9.8%. Trehaloza smanjuje incidenciju defekta neuralne cijevi uzrokovane dijabetesom putem aktivacije autofagocitoze u neuroepitelnim stanicama, inhibicije ER stresa, JNK aktivacije, oštećenja mitohondrija i posljedično smanjene apoptoze (80).

Hiperglikemija uzrokuje povećanje aktivnosti heksozaminskog puta te povećanu razinu UDP-GlcNAc koji sudjeluje u procesu glikozilacije. Također sudjeluje u beta-O-vezanoj glikozilaciji (engl. *beta-O-linked glycosylation*), a promjena navedene reakcije uočena je u različitim bolestima poput raka te se povezuje s destrukcijom beta stanica u gušterači (71). Heksozaminski stres dovodi do smanjenja antioksidansa, povećane razine slobodnih radikala kisika i nastanka oksidativnog stresa što sve uzrokuje apoptozu i nastanak malformacija (2). Istraživanja pokazuju da dodatak glukozamina ili glukoze u kulturu poslijeimplantacijskih embrija uzrokuje apoptozu i oštećenje embrionalnog razvoja (94).

Direktan utjecaj na apoptozu imaju JNK aktivacija, AGE produkti, nitrozaminski stres i oksidativni stres dok mnogi prije nabrojani teratogeni faktori i procesi povećavajući oksidativni stres utječu na nastanak apoptoze i posljedično kongenitalnih malformacija (2). Hiperglikemijom inducirana apoptoza uključuje kaskadnu aktivaciju kaspaza. U kaspaze ubrajamo kaspaze koje djeluju kao okidači apoptoze poput kaspaze 8 te kaspaze koje izvršavaju apoptozu i služe kao indikatori apoptoze poput

kaspaze 3 (81). Istraživanja na poslijeimplantacijskim embrijima glodavaca s dijabetesom pokazuju smanjenu ekspresiju Bcl-2 te povezuju aktivaciju citokroma c i kaspaze 3, reguliranih Bax proteinom, s povećanom apoptozom. Isto tako, uočena je povećana apoptoza i povećan aktivacijski put citokroma c i kaspaze 3 u primitivnom mozgu te povećana otpornost na apoptozu u primitivnom srcu i prednjem crijevu gdje je pronađena i povećana ekspresija Bcl-2 (49).

#### **9.3.4. Utjecaj genoma i epigenetike**

Utjecaj dijabetesa, hiperglikemije i ostalih teratoloških procesa i faktora ima različit utjecaj na embrionalni razvoj što ukazuje na ulogu genetičke predispozicije te genske ekspresije i epigenetičkih procesa uzrokovanih dijabetesom. Genetička predispozicija za razvoj dijabetesa postoji u djece čiji roditelji boluju od dijabetesa te je rizik za razvoj bolesti veći ako je otac bolestan. Unatoč tome, potomstvo muškarca oboljelog od dijabetesa nema povećan rizik za razvoj kongenitalnih malformacija što ukazuje da gen za razvoj bolesti nema utjecaj na razvoj malformacija (71). Trudnice oboljele od dijabetesa se povezuju s povećanim rizikom za nastanak Downovog sindroma i predispozicije za nastanak hipoplazije optičkog živca (2). Istraživanja pokazuju važnost interakcije fetalnog genoma i dijabetičkog intrauterinog miljea za razvoj malformacija. Fetalni genom određuje prag osjetljivost na teratogene faktore, a poremećaj intrauterinog miljea utječe na razvoj teratogenih faktora (71).

U razvoju dijabetičke embriopatije ulogu ima i promijenjena ekspresija gena uzrokovana hiperglikemijom. Studije na embrijima dijabetičkih miševa pokazuju smanjenu ekspresiju Pax3 gena i povećanu aktivnost p53 te posljedično smanjenu migraciju i povećanu apoptozu u stanicama neuralnog grebena što rezultira nastankom defekta neuralne cijevi (95,96). Tretman antioksidansima normalizira ekspresiju Pax3 u embrijima što ukazuje na povezanost oksidativnog stresa i promijenjene ekspresije gena (97). Inhibicija p53 u embrijima s deficijencijom Pax3 smanjuje poremećenu migraciju i apoptozu u stanicama neuralnog grebena što, osim na normalno zatvaranje neuralne cijevi, utječe na normalnu pregradnju srca (96). Stanice neuralnog grebena migriraju i sudjeluju u stvaranju endokardijalnih jastučića, srčanog konusa i trunkus arteriosusa, stoga poremećaj njihove funkcije utječe na razvoj malformacija srca (98). Istraživanja srčanih malformacija induciranih dijabetesom ukazuju na smanjenu signalizaciju putem TGF- $\beta$  (99) i promjene u Wnt signalnom putu (71). U normalnom embrionalnom razvoju srca, stanice endoderma

proizvode inhibitore Wnt proteina jer oni inhibiraju razvoj srca (98). Zato promjene u djelovanju Wnt proteina zbog dijabetesa dovode do razvoja srčanih malformacija.

Oksidativni stres inhibira TGF $\beta$  signalni put koji sudjeluje u ranom embrionalnom srčanom razvoju i utječe na proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu stanica srca. Međudjelovanje TGF $\beta$  liganda i TGF $\beta$  tip II receptora (T $\beta$ RII) uzrokuje aktivaciju T $\beta$ RI putem fosforilacije što dovodi do fosforilacije i migracije Smad2 i Smad3 proteina koji reguliraju transkripciju TGF $\beta$  ciljnih gena. Inhibicija TGF $\beta$  kaskade može uzrokovati nastanak srčanih malformacija. Istraživanja pokazuju utjecaj dijabetesa na nastanak oksidativnog stresa i posljedične lipidne peroksidacije u srčanim stanicama embrija putem povišenih vrijednosti markera lipidne peroksidacije, 4-hidroksinonenal (4-HNE) i malondialdehida (MDA) i smanjenu razinu TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 3, T $\beta$ RII, Smad2 i Smad 3 proteina u srčanim stanicama mišjih embrija izloženih dijabetesu. Isto tako, pokazuju kako prekomjerna ekspresija SOD u miševa izloženih dijabetesu blokira oksidativni stres i dovodi do normalne TGF $\beta$  ekspresije u srčanim stanicama embrija što pokazuju normalne razine markera lipidne peroksidacije, T $\beta$ RII, Smad2 i Smad 3 proteina (100).

S obzirom na visoku učestalost srčanih malformacija u trudnica s dijabetesom provedena su istraživanja o utjecaju glukoze na stanice srca, utjecaju na ekspresiju gena i stanični ciklus. Istraživanje na embrijima pilića izloženih hiperglikemiji pokazuje smanjenje transportera za glukozu (engl. *downregulation*) GLUT1 na stanicama konotrunkusnog područja što smanjuje unutarstaničnu koncentraciju glukoze i uzrokuje zaostajanje u razvoju i nastanak malformacija (101).

Konotrunkalno područje je dio srca iz kojeg se razvijaju izlazni dijelovi lijeve i desne klijetke i velike krvne žile, a endokardijalni jastučići u tom dijelu srca potječu djelomično od stanica neuralnog grebena. Osim navedenog, endokardijalni jastučići imaju bitnu ulogu u razvoju atrioventrikularnih ušća te interatrijske i interventrikularne pregrade (98). Također, u uvjetima hiperglikemije uočena je smanjena proliferacija stanica neuralnog grebena i endotelnih stanica srca što utječe na nastanak defekta konotrunkalnog područja (101).

Stanični ciklus sastoji se od faza G1, S, G2 te mitoze koja slijedi nakon G2 faze. Prijelaz iz faze G1 staničnog ciklusa u fazu S ovisi o ciklinu D, koji je reguliran proteinom p21. Protein p21 je inhibitorna kinaza ovisna o ciklinu i ključan je u

spriječavanju rasta inhibicijom mitoze, DNA replikacije i popravka. Istraživanje pilećih embrija u uvjetima hiperglikemije pokazalo je povećanu ekspresiju proteina p21 i supresiju ciklina D što je uzrokovalo zaustavljanje stanica u fazi G1 staničnog ciklusa i posljedičnu smanjenu proliferaciju endokardijalnih i miokardijalnih stanica. Hiperglikemija uzrokuje hiperosmolarnost, koja također dovodi do smanjene proliferacije endokardijalnih i miokardijalnih stanica, putem proteina p38 koji uzrokuje smanjenu aktivaciju kinaze 2 ovisne o ciklinu te zaustavlja stanični ciklus u fazi G2. Navedeni rezultati istraživanja pokazuju kako hiperglikemijom uzrokovana promjena djelovanja p21 i ciklina D dovodi do smanjene proliferacije i nastanka defekata konotrunkalnog područja (101).

Migracija stanica neuralnog grebena prema srcu regulirana je genima i ključna je za razvoj srčanih ganglija i pojedinih dijelova srca. Smatra se da hiperglikemija uzrokovana dijabetesom majke ima utjecaj na promijenjenu ekspresiju gena odgovornih za migraciju stanica. NCAM i PGP9.5 eksprimiraju se rano, nestaju tijekom migracije te se ponovno eksprimiraju na kraju migracije stanica prema srcu u trenutku formiranja kardijalnih ganglija iz stanica neuralnog grebena. Provedeno je istraživanje na životinjskim embrijima u uvjetima hiperglikemije te je pokazana smanjena ekspresija NCAM i PGP9.5 na stanicama srca embrija u odnosu na zdravu kontrolu (102).

U embrijima dijabetičkih miševa uočena je smanjena ekspresija Bmp4 u stanicama konotrunkalnog područja i kardiomiocita u blizini endokardijalnih jastučića, Msx1 u endokardijalnim stanicama atrioventrikularnog kanala te smanjena ekspresija Pax3 u stanicama konotrunkalnog područja, endokardijalnih jastučića i atrijskog epikarda, a povećan je i broj apoptotičkih stanica. Osim promjene ekspresije gena, uočene su ultrastrukturalne promjene poput edematoznih mitohondrija, nepravilno organiziranih miofilamenata i slabih pričvrstnih spojeva (engl. *abnormal adherence junction*). Navedene promjene povezuju se s nastankom malformacija atrioventrikularnog kanala i konotrunkalnog područja zbog utjecaja dijabetesa (102).

Epigenetički procesi poput metilacije DNA i acetilacije histona utječu na ekspresiju pojedinih gena tako da metilacija citozina stvarajući metilcitozin smanjuje njihovu ekspresiju, a acetilacija koja rezultira smanjenom interakcijom DNA i histona povećava ekspresiju. Hiperglikemijom uzrokovana promjena tih procesa utječe na

razvoj dijabetičke embriopatije. Istraživanje utjecaja promjene epigenetičkih procesa zbog hiperglikemije na ekspresiju pojedinih gena u embrijima dijabetičkih miševa pokazalo je kako je smanjena ekspresija Pax3 gena, koji je odgovoran za zatvaranje neuralne cijevi. Smanjena ekspresija Pax3 gena tijekom neurulacije posljedica je povećane aktivnosti DNA metiltransferaze 3b zbog oksidativnog stresa uzrokovanog hiperglikemijom (103). Osim utjecaja na Pax3 gen, istraživanja embrija dijabetičkih miševa ukazuju na promjene u acetilaciji histona, H3 i H4, tijekom neurulacije (104).

## 10. ZAKLJUČAK

Dijabetes utječe na razvoj brojnih komplikacija u trudnoći poput kongenitalnih malformacija, makrosomije, IUGR, spontanih pobačaja i povećane perinatalne smrtnosti. Predkonceptijska obrada žena oboljelih od dijabetesa tipa 1 i tipa 2 važna je upravo zbog smanjenja navedenih komplikacija. Bitnu ulogu ima metabolička kontrola tijekom trudnoće, održavanje euglikemije i normalne razine HbA1c u krvi. Gestacijski dijabetes povezuje se također s povećanim rizikom razvoja komplikacija. Rizik za razvoj kongenitalnih anomalija isti je kao u općoj populaciji, osim u skupini žena s neprepoznatim ranijim dijabetesom koji je otkriven tek u trudnoći. Malformacije zahvaćaju jedan ili više organskih sustava. Također, češća je pojava rijetkih sindroma poput kaudalne regresije.

Nastanak kongenitalnih malformacija uzorkovanih dijabetesom majke je multifaktorijalne prirode. Djelovanjem hiperglikemije na inače usklađene metaboličke procese dolazi do stvaranja različitih metabolita s mogućim teratogenim učinkom. Mnoga istraživanja pokazala su kako povećana glikoliza utječe na povećanje odvijanja oksidativne fosforilacije u mitohondrijima i povećano nastajanje slobodnih radikala kisika. Teratogeni utjecaj  $\beta$ -hidroksibutirata, aminokiselina razgranatih lanaca i masnih kiselina također se očituje putem uključivanja u proces oksidativne fosforilacije i povećanja razine slobodnih radikala. Osim povećanja razine slobodnih radikala, smanjena je razina antioksidansa što zajedno vodi do oksidativnog stresa. Povećana razina sorbitola, inozitola, folne kiseline te smanjeno odvijanje metabolizma arahidonske kiseline i posljedično smanjenje razine PGE2 djeluje teratogeno na fetalni razvoj.

Oksidativni stres i hiperglikemija utječu na razvoj lipidne peroksidacije, ER stresa i nitrozativnog stresa. Nastaju promjene u djelovanju kinaza, PKC, JNK1/2 i AMPK

koje dovode do povećane apoptoze. Promjene ekspresije gena, NCAM, PGP9.5, Bmp4, Msx1, Pax3 utječu na migraciju i proliferaciju stanica neuralnog grebena, endokardijalnih i miokardijalnih stanica što utječe na nastanak malformacija središnjeg živčanog i kardiovaskularnog sustava. Hiperglikemija djeluje na stanični ciklus te ga putem pojačanog djelovanja p21 i posljedične inhibicije ciklina D zaustavlja u fazi G1, a to utječe na smanjenu proliferaciju stanica srca. Epigenetske promjene, metilacija DNA i acetilacija histona također utječu na promijenjenu ekspresiju gena. Sve navedene promjene uzrokuju povećanu apoptozu putem povećane ekspresije Bax i proteina p53 te smanjenu ekspresiju Bcl-2 što utječe na kaskadnu reakciju kaspaza i apoptozu koja dovodi do poremećaja embrionalnog razvoja, a to rezultira kongenitalnim malformacijama.

Danas, s predkonceptijskom obradom, dobrom regulacijom glikemije i intenziviranim kliničkim nadzorom trudnica koje imaju dijabetes možemo smanjiti učestalost kongenitalnih malformacija ispod učestalosti pojave malformacija u općoj populaciji trudnica.

## **11. ZAHVALE**

Zahvaljujem svom mentor doc.dr.sc. Viti Starčeviću na stručnom vodstvu i savjetovanju tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na strpljenju, podršci i pomoći tijekom mog cjelokupnog školovanja.

## **12. LITERATURA**

1. Đelmiš J. Dijabetes i trudnoća. U: Đelmiš J, Orešković S, urednici. Fetalna medicina i opstetricija. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 401–16.
2. Eriksson UJ, Wentzel P. Postimplantation diabetic embryopathy. U: Hod M, Jovanovic LG, Di Renzo GC, De Leiva A, Langer O, urednici. Textbook of Diabetes and Pregnancy. CRC Press; 2016. str. 329–50.
3. Gale E, Anderson J. Diabetes mellitus and other disorders of metabolism. U: Kumar P, Clark ML, urednici. Kumar and Clark's Clinical Medicine. 8. izd. Edinburgh: Elsevier Ltd; 2012. str. 1001–45.



4. Kovač D, Aralica G, Fučkar Čupić D. Bolesti gušterače. U: Damjanov I, Seiwerth S, Jukić S, Nola M, urednici. Patologija. 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 511–27.
5. Magliano DJ, Zimmet P, Shaw EJ. Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. U: DeFronzo RA, Ferrannini E, Zimmet P, Alberti KGMM, urednici. International Textbook of Diabetes Mellitus. 4. izd. John Wiley & Sons, Ltd; 2015. str. 3–16.
6. Group THSCR. The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *Int J Gynecol Obstet.* 2002.;78(1):69–77.
7. Group THSCR. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes. *N Engl J Med.* 2008.;358(19):1991–2002.
8. Panel IA of D and PSGC. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care.* 2010.;33(3):676–82.
9. Bartolomé B, Bonet-Alavés M, Sánchez-Vera I. Intermediary metabolism in pregnancies complicated by gestational diabetes. U: Hod M, Jovanovic LG, Di Renzo GC, De Leiva A, Langer O, urednici. Textbook of Diabetes and Pregnancy. CRC Press; 2016. str. 28–33.
10. Yogev Y. Pathogenesis of gestational diabetes mellitus. U: Hod M, Jovanovic LG, Di Renzo GC, De Leiva A, Langer O, urednici. Textbook of Diabetes and Pregnancy. CRC Press; 2016. str. 49–56.
11. Berg JM, Tymoczko J, Stryer L. Biokemija. 6. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2013. 433-474 str.
12. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. 12. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2012. 809-817 str.
13. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. 12. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2012. 939-954 str.
14. Bender DA. Glukoneogeneza i kontrola koncentracije glukoze u krvi. U: Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennely PJ, Rodwell VW, Weeil PA, urednici.



- Harperova ilustrirana biokemija. 28. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 165–73.
15. Berg JM, Tymoczko J, Stryer L. Biokemija. 6. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2013. 617-648 str.
  16. Berg JM, Tymoczko J, Stryer L. Biokemija. 6. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2013. 649-678 str.
  17. Herrera E, Ortega-Senovilla H. Metabolism in normal pregnancy. U: Hod M, Jovanovic LG, Di Renzo GC, De Leiva A, Langer O, urednici. Textbook of Diabetes and Pregnancy. CRC Press; 2016. str. 17–27.
  18. Sadler TW. Langmanova medicinska embriologija. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2008. 3-11 str.
  19. Sadler TW. Langmanova medicinska embriologija. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2008. 113-124 str.
  20. Stevenson RE, Hall JG. Introduction. U: Stevenson RE, Hall JG, Everman DB, Solomon BD, urednici. Human Malformations and Related Anomalies. 3. izd. Oxford etc: Oxford University Press; 2016. str. 1–35.
  21. Sadler TW. Langmanova medicinska embriologija. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2008. 205-229 str.
  22. Ornoy A, Bischitz N. Diabetic embryopathy in the preimplantation embryo. U: Hod M, Jovanovic LG, Di Renzo GC, De Leiva A, Langer O, urednici. Textbook of Diabetes and Pregnancy. CRC Press; 2016. str. 321–8.
  23. Sadler TW. Langmanova medicinska embriologija. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2008. 33-45 str.
  24. Sadler TW. Langmanova medicinska embriologija. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2008. 47-55 str.
  25. Sadler TW. Langmanova medicinska embriologija. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2008. 57-68 str.
  26. Sadler TW. Langmanova medicinska embriologija. 10. izd. Zagreb: Školska

knjiga; 2008. 69-89 str.

27. Farrell T, Neale L, Cundy T. Congenital anomalies in the offspring of women with Type 1, Type 2 and gestational diabetes. *Diabet Med.* 2002.;19(4):322–6.
28. Jensen DM, Damm P, Mølsted-Pedersen L, Ovesen P, Westergaard JG, Moeller M, i ostali. Outcomes in type 1 diabetic pregnancies. *Diabetes Care.* 2004.;27(12):2819–23.
29. Castori M. Diabetic embryopathy: A developmental perspective from fertilization to adulthood. *Mol Syndromol.* 2013.;4(1–2):74–86.
30. Greene MF, Hare JW, Cloherty JP, Benacerraf BR, Soeldner JS. First-trimester hemoglobin A1 and risk for major malformation and spontaneous abortion in diabetic pregnancy. *Teratology.* 1989.;39(3):225–31.
31. Damasceno DC, Volpato GT, Paranhos Calderon I de M, Cunha Rudge MV. Oxidative stress and diabetes in pregnant rats. *Anim Reprod Sci.* 2002.;72(3–4):235–44.
32. Callec R, Perdriolle-Galet E, Sery G-A, Morel O. Type 2 diabetes in pregnancy: Rates of fetal malformations and level of preconception care. *J Obstet Gynaecol (Lahore).* 2014.;34(7):648–9.
33. Correa A, Gilboa SM, Besser LM, Botto LD, Moore CA, Hobbs CA, i ostali. Diabetes mellitus and birth defects. *Am J Obstet Gynecol.* 2008.;199(3):237.e1-237.e9.
34. Starikov R, Bohrer J, Goh W, Kuwahara M, Chien EK, Lopes V, i ostali. Hemoglobin A1c in pregestational diabetic gravidas and the risk of congenital heart disease in the fetus. *Pediatr Cardiol.* 2013.;34(7):1716–22.
35. Merlob P. Congenital malformations in diabetic pregnancy: Prevalence and types. U: Hod M, Jovanovic LG, Di Renzo GC, De Leiva A, Langer O, urednici. *Textbook of Diabetes and Pregnancy.* CRC Press; 2016. str. 315–20.
36. Suhonen L, Hiilesmaa V, Teramo K. Glycaemic control during early pregnancy and fetal malformations in women with Type I diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2000.;43(1):79–82.

37. Loffredo, C.A.; Wilson, P.D.; Ferencz C. Maternal diabetes: An independent risk factor for major cardiovascular malformations with increased mortality of affected infants. *Teratology*. 2001.;64(2):98–106.
38. Wataganara T. Fetal malformations detected with magnetic resonance imaging in the diabetic mother. U: Hod M, Jovanovic LG, Di Renzo GC, De Leiva A, Langer O, urednici. *Textbook of Diabetes and Pregnancy*. 3. izd. CRC Press; 2016. str. 351–61.
39. Nielsen GL, Nørgard B, Puho E, Rothman KJ, Sørensen HT, Czeizel AE. Risk of specific congenital abnormalities in offspring of women with diabetes. *Diabet Med*. 2005.;22(6):693–6.
40. De Hertogh R. *Maternal Diabetes and Embryonic Development*. U: Djelmiš J, Desoye G, Ivanšević M, urednici. *Diabetology of Pregnancy*. Basel: Karger; 2005. str. 58–71.
41. Opitz JM, Zanni G, Reynolds JF, Gilbert-Barness E. Defects of blastogenesis. *Am J Med Genet*. 2002.;115(4):269–86.
42. Opitz JM. The developmental field concept. *Am J Med Genet*. 1985.;21(1):1–11.
43. Fayyaz, A.; Ilyas, M.; Iqbal O. Pre-natal diagnosis of caudal regression syndrome. *J Coll Physicians Surg Pakistan*. 2007.;17(7):425–6.
44. Gharehbaghi MM, Ghaemi MR. Goldenhar Syndrome in an Infant of Diabetic Mother. *Iran J Pediatr*. 2010.;20(1):131–4.
45. Ahmed S, Alsaedi SA, Al-Wassia H, Al-Aama JY. Femoral-facial syndrome in an infant of a diabetic mother. 2015.
46. Chang AS, Dale AN, Moley KH. Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*. 2005.;146(5):2445–53.
47. Aktuğ H, Bozok Çetintaş V, Uysal A, Oltulu F, Yavaşoğlu A, Akarca SÖ, i ostali. Evaluation of the effects of STZ-induced diabetes on in vitro fertilization and early embryogenesis processes. *J Diabetes Res*. 2013.;2013:1–9.

48. Diamond MP, Moley KH, Pellicer A, Vaughn WK, DeCherney AH. Effects of streptozotocin- and alloxan-induced diabetes mellitus on mouse follicular and early embryo development. *Journals Reprod Fertility*. 1989.;86(1):1–10.
49. Sun F, Kawasaki E, Akazawa S, Hishikawa Y, Sugahara K, Kamihira S, et al. Apoptosis and its pathway in early post-implantation embryos of diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005.;67(2):110–8.
50. Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2006.;18(3):325–32.
51. Leunda-Casi A, Genicot G, Donnay I, Pampfer S, De Hertogh R. Increased cell death in mouse blastocysts exposed to high D-glucose in vitro: implications of an oxidative stress and alterations in glucose metabolism. *Diabetologia*. 2002.;45(4):571–9.
52. Pampfer S, Vanderheyden I, Hertogh R De. Increased synthesis of tumor necrosis factor- $\alpha$  in uterine explants from pregnant diabetic rats and in primary cultures of uterine cells in high glucose. *Diabetes*. 1997.;46(7):1214–24.
53. Pampfer S, Vanderheyden I, Wu YD, Baufays L, Maillet O, De Hertogh R. Possible role for TNF- $\alpha$  in early embryopathy associated with maternal diabetes in the rat. *Diabetes*. 1995.;44(5):531–6.
54. Li R, Thorens B, Loeken MR. Expression of the gene encoding the high-Km glucose transporter 2 by the early postimplantation mouse embryo is essential for neural tube defects associated with diabetic embryopathy. *Diabetologia*. 2007.;50(3):682–9.
55. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001.;414(6865):813–20.
56. Yang X, Håkan Borg LA, Eriksson UJ. Metabolic alterations in neural tissue of rat embryos exposed to  $\beta$ -hydroxybutyrate during organogenesis. *Life Sci*. 1997.;62(4):293–300.
57. Eriksson RSM, Thunberg L, Eriksson UJ. Effects of interrupted insulin treatment on fetal outcome of pregnant diabetic rats. *Diabetes*.

- 1989.;38(6):764–72.
58. Ejdesjö A, Wentzel P, Eriksson UJ. Genetic and environmental influence on diabetic rat embryopathy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011.;300(3):E454–67.
  59. Cockroft DL, Brook FA, Copp AJ. Inositol deficiency increases the susceptibility to neural tube defects of genetically predisposed (curly tail) mouse embryos in vitro. *Teratology.* 1992.;45(2):223–32.
  60. Wentzel P, Wentzel CR, Greskog MB, Eriksson UJ. Induction of embryonic dysmorphogenesis by high glucose concentration, disturbed inositol metabolism, and inhibited protein kinase C activity. *Teratology.* 2001.;63(5):193–201.
  61. Fu J, Tay SSW, Ling EA, Dheen ST. Aldose reductase is implicated in high glucose-induced oxidative stress in mouse embryonic neural stem cells. *J Neurochem.* 2007.;103(4):1654–65.
  62. Goldman AS, Baker L, Piddington R, Marx B, Herold R, Egler J. Hyperglycemia-induced teratogenesis is mediated by a functional deficiency of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985.;82(23):8227–31.
  63. Wentzel P, Welsh N, Eriksson UJ. Developmental damage, increased lipid peroxidation, diminished cyclooxygenase-2 gene expression, and lowered prostaglandin E2 levels in rat embryos exposed to a diabetic environment. *Diabetes.* 1999.;48(4):813–20.
  64. Correa A et al. Lack of periconceptional vitamins or supplements that contain folic acid and diabetes mellitus–associated birth defects. *Am J Obs Gynecol.* 2012.;206(3):218.e1-13.
  65. Siman CM, Eriksson UJ. Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes.* 1997.;46(6):1054–61.
  66. Ornoy A. Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy. *Reprod Toxicol.* 2007.;24(1):31–41.
  67. Zaken V, Kohen R, Ornoy A. Vitamins C and E improve rat embryonic

- antioxidant defense mechanism in diabetic culture medium. *Teratology*. 2001.;64(1):33–44.
68. Cederberg J, Simán CM, Eriksson UJ. Combined treatment with vitamin E and vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. *Pediatr Res*. 2001.;49(6):755–62.
  69. Cederberg J, Eriksson UJ. Antioxidative treatment of pregnant diabetic rats diminishes embryonic dysmorphogenesis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2005.;73(7):498–505.
  70. Gäreskog M, Cederberg J, Eriksson UJ, Wentzel P. Maternal diabetes in vivo and high glucose concentration in vitro increases apoptosis in rat embryos. *Reprod Toxicol*. 2007.;23(1):63–74.
  71. Eriksson UJ, Wentzel P. The status of diabetic embryopathy. *Ups J Med Sci*. 2016.;121(2):96–112.
  72. Goh S-Y, Cooper ME. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008.;93(4):1143–52.
  73. Eriksson UJ, Wentzel P, Minhas HS, Thornalley PJ. Teratogenicity of 3-deoxyglucosone and diabetic embryopathy. *Diabetes*. 1998.;47(12):1960–6.
  74. Wu Y, Viana M, Thirumangalathu S, Loeken MR. AMP-activated protein kinase mediates effects of oxidative stress on embryo gene expression in a mouse model of diabetic embryopathy. *Diabetologia*. 2012.;55(1):245–54.
  75. Clapés S, Fernández T, Suárez G. Oxidative stress and birth defects in infants of women with pregestational diabetes. *MEDICC Rev*. 2013.;15(1):37–40.
  76. Weng H, Li X, Reece EA, Yang P. SOD1 suppresses maternal hyperglycemia-increased iNOS expression and consequent nitrosative stress in diabetic embryopathy. *Am J Obstet Gynecol*. 2012.;206(5):448.e1-7.
  77. Zhao Z, Eckert RL, Reece EA. Reduction in embryonic malformations and alleviation of endoplasmic reticulum stress by nitric oxide synthase inhibition in diabetic embryopathy. *Reprod Sci*. 2012.;19(8):823–31.

78. Li X, Xu C, Yang P. C-Jun NH2-terminal kinase 1/2 and endoplasmic reticulum stress as interdependent and reciprocal causation in diabetic embryopathy. *Diabetes*. 2013.;62(2):599–608.
79. Zhao Z. Endoplasmic reticulum stress in maternal diabetes-induced cardiac malformations during critical cardiogenesis period. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2012.;95(1):1–6.
80. Xu C, Li X, Wang F, Weng H, Yang P. Trehalose prevents neural tube defects by correcting maternal diabetes-suppressed autophagy and neurogenesis. *AJP Endocrinol Metab*. 2013.;305(5):E667–78.
81. Li X, Weng H, Xu C, Reece EA, Yang P. Oxidative stress-induced JNK1/2 activation triggers proapoptotic signaling and apoptosis that leads to diabetic embryopathy. *Diabetes*. 2012.;61(8):2084–92.
82. Yang P, Zhao Z, Reece EA. Involvement of c-Jun N-terminal kinases activation in diabetic embryopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007.;357(3):749–54.
83. Pavlinkova G, Salbaum M, Kappen C. Wnt signaling in caudal dysgenesis and diabetic embryopathy. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2010.;82(10):710–9.
84. Wu S, Kasisomayajula K, Peng J, Bancalari E. Inhibition of JNK enhances TGF-beta1-activated Smad2 signaling in mouse embryonic lung. *Pediatr Res*. 2009.;65(4):381–6.
85. Yang P, Reece EA, Wang F, Gabbay-Benziv R. Decoding the oxidative stress hypothesis in diabetic embryopathy through proapoptotic kinase signaling. *Am J Obs Gynecol*. 2015.;212(5):596–579.
86. Wang F, Reece EA, Yang P. Advances in revealing the molecular targets downstream of oxidative stress-induced proapoptotic kinase signaling in diabetic embryopathy. *Am J Obs Gynecol*. 2015.;213(2):125–34.
87. Hiramatsu Y, Sekiguchi N, Hayashi M, Isshiki K, Yokota T, King GL, i ostali. Diacylglycerol production and protein kinase C activity are increased in a

- mouse model of diabetic embryopathy. *Diabetes*. 2002.;51(9):2804–10.
88. Li X, Weng H, Reece EA, Yang P. SOD1 overexpression in vivo blocks hyperglycemia-induced specific PKC isoforms: Substrate activation and consequent lipid peroxidation in diabetic embryopathy. *Am J Obstet Gynecol*. 2011.;205(1):84.e1-6.
  89. Maria Fimia G, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, et al. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*. 2007.;447(7148):1121–5.
  90. Wang F, Xu C, Reece EA, Li X, Wu Y, Harman C, et al. Protein kinase C- $\alpha$  suppresses autophagy and induces neural tube defects via miR-129-2 in diabetic pregnancy. *Nat Commun*. 2017.;8(15182):1–14.
  91. Jornayvaz FR, Shulman GIG. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem*. 2010.;47:69–84.
  92. Chiang C-W, Huang Y, Leong K-W, Chen L-C, Chen H-C, Chen S-J, et al. PKC $\alpha$  mediated induction of miR-101 in human hepatoma HepG2 cells. *J Biomed Sci*. 2010.;17(35):1–9.
  93. Gu H, Li H, Zhang L, Luan H, Huang T, Wang L, et al. Diagnostic role of microRNA expression profile in the serum of pregnant women with fetuses with neural tube defects. *J Neurochem*. 2012.;122(3):641–9.
  94. Pantaleon M, Tan HY, Kafer GR, Kaye PL. Toxic effects of hyperglycemia are mediated by the hexosamine signaling pathway and O-Linked glycosylation in early mouse embryos. *Biol Reprod*. 2010.;82(4):751–8.
  95. Phelan SA, Ito M, Loeken MR. Neural tube defects in embryos of diabetic mice: Role of the Pax-3 gene and apoptosis. *Diabetes*. 1997.;46(7):1189–97.
  96. Morgan SC, Lee H, Relaix F, Sandell LL, Levorse JM, Loeken MR, et al. Cardiac outflow tract septation failure in Pax3-deficient embryos is due to p53-dependent regulation of migrating cardiac neural crest. *Mech Dev*. 2009.;125(9–10):757–67.
  97. Li R, Chase M, Jung S-K, Smith PJS, Loeken MR. Hypoxic stress in diabetic



- pregnancy contributes to impaired embryo gene expression and defective development by inducing oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005.;289(4):E591-9.
98. Sadler TW. *Langmanova medicinska embriologija*. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2008. 161-196 str.
  99. Zhao Z. Cardiac malformations and alteration of TGFbeta signaling system in diabetic embryopathy. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2010.;89(2):97–105.
  100. Wang F, Reece EA, Yang P. Oxidative stress is responsible for maternal diabetes-impaired transforming growth factor beta signaling in the developing mouse heart. *Am J Obstet Gynecol.* 2015.;212(5):650.e1-650.e11.
  101. Scott-Drechsel DE, Rugonyi S, Marks DL, Thornburg KL, Hinds MT. Hyperglycemia slows embryonic growth and suppresses cell cycle via cyclin D1 and p21. *Diabetes.* 2013.;62(1):234–42.
  102. Kumar SD, Dheen ST, Tay SSW. Maternal diabetes induces congenital heart defects in mice by altering the expression of genes involved in cardiovascular development. *Cardiovasc Diabetol.* 2007.;6:34.
  103. Wei D, Loeken MR. Increased DNA methyltransferase 3b (Dnmt3b)-mediated CpG island methylation stimulated by oxidative stress inhibits expression of a gene required for neural tube and neural crest development in diabetic pregnancy. *Diabetes.* 2014.;63(10):3512–22.
  104. Salbaum JM, Kappen C. Responses of the embryonic epigenome to maternal diabetes. *Birth Defects Res Part A - Clin Mol Teratol.* 2012.;94(10):770–81.

### **13. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 5. studenog 1993. u Zagrebu. Osnovnu školu bana Josipa Jelačića završila sam 2008. godine, a 2012. XV. gimnaziju u Zagrebu. Iste godine upisala sam Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. U slobodno vrijeme se bavim plesom i član sam plesne skupine Plesnih punktova Zagreb od 2000. godine.