

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Tamara D. Antonić Krejović

**MARKERI SINTEZE I APSORPCIJE HOLESTEROLA I
SFINGOLIPIDNI PROFIL U PREEKLAMPSIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2025.

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Tamara D. Antonić Krejović

**MARKERI SINTEZE I APSORPCIJE HOLESTEROLA I
SFINGOLIPIDNI PROFIL U PREEKLAMPSIJI**

doktorska disertacija

Beograd, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Tamara D. Antonić Krejović

**MARKERS OF CHOLESTEROL SYNTHESIS AND
ABSORPTION AND SPHINGOLIPID PROFILE IN
PREECLAMPSIA**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025.

Mentor doktorske disertacije:

Dr sc. Aleksandra Stefanović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Katedra za medicinsku biohemiju

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

Dr sc. Aleksandra Zeljković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Katedra za medicinsku biohemiju

Dr sc. Željko Miković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet

Katedra za ginekologiju i akušerstvo

Dr sc Daniela Ardalić, naučni saradnik

Ginekološko-akušerska klinika „Narodni front“, Beograd

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Aleksandre Stefanović. Disertacija predstavlja dio veće naučnoistraživačke inicijative „High-density lipoprotein MetabolOMe research to improve pregnancy outcome – HI-MOM,“ čiji je rukovodilac prof. dr Aleksandra Stefanović. Uzorci su sakupljeni na Ginekološko-akušerskoj klinici „Narodni front“ u Beogradu.

Iskreno zahvaljujem svom mentoru, prof. dr Aleksandri Stefanović, na neizmjerljivoj podršci, povjerenju i znanju koje mi je pružila tokom mog dosadašnjeg profesionalnog usavršavanja i izrade i pisanja ove doktorske disertacije. Njena stručnost, konstruktivni savjeti, kao i spremnost da se posveti svakom pitanju i nedoumici su me inspirisale da se stalno usavršavam i unapređujem svoje znanje. Vaše stručno vođenje i naša saradnja imali su neprocjenljiv značaj u realizaciji ove disertacije.

Zahvaljujem se prof. dr Aleksandri Zeljković, na saradnji i korisnim savjetima koji su značajno doprinijeli kvalitetu ove disertacije i unaprijedili moje razumjevanje istraživačkog procesa.

Zahvaljujem se prof. dr Željku Mikoviću i dr Danieli Ardalić iz GAK „Narodni front“ na ostvarenoj saradnji i velikom zalaganju u prikupljanju uzoraka, kao i na stručnim savjetima tokom izrade ove doktorske disertacije. Zahvalnost iskazujem i kolegici Gorici Banjac iz GAK „Narodni front“ na pomoći prilikom prikupljanja uzoraka.

Zahvaljujem se svim zaposlenima na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu na podršci i razumjevanju, a posebno kolegicama iz asistentske sobice, koje su mi svojim nesebičnim prijateljstvom i podrškom pomogle da savladam sve prepreke tokom rada na ovoj disertaciji. Veliku zahvalnost dugujem kolegici Sandri Vladimirov, uz koju sam naučila osnove rada na LC-MS, na neizmernoj pomoći u laboratoriji, stručnim savjetima i podršci kada eksperimenti nisu uspjevali.

Zahvaljujem se svom ACRA timu na nesebičnoj podršci, inspirativnom timskom duhu i neizmjerljivoj motivaciji koju su mi pružili, čineći da lakše savladam svaki izazov i svaku prepreku tokom mog rada na ovoj doktorskoj disertaciji.

Želim da izrazim duboku i iskrenu zahvalnost svojoj porodici - mojim roditeljima Dragoljubu i Nadeždi, bratu Luki i svom suprugu Milovanu, koji su mi kroz sve ove godine bili ne samo oslonac, već i najveći izvor motivacije. Njihova ljubav, strpljenje i podrška, kako u najtežim, tako i u onim radosnim trenucima, dali su mi snagu da nastavim i ne odustanem. Bez njihove neizmjerne vjere u mene, njihove nesebične žrtve i bezgranične podrške, bilo bi nemoguće ostvariti ovaj uspjeh. Moji roditelji su me naučili važnosti truda i istrajnosti i uvijek bili tu da me podstaknu, a moj suprug, uz svoju nesebičnu ljubav i razumjevanje, bio je moj najbolji prijatelj i najveća podrška u svemu. Ovaj rad je, u svakom smislu, i njihov poduhvat, jer su oni bili uz mene na svakom koraku ovog puta.

Markeri sinteze i apsorpcije holesterola i sfingolipidni profil u preeklampsiji

SAŽETAK

Uprkos napretku u razjašnjavanju patofizioloških mehanizama uključenih u razvoj preeklampsije, jedina efikasna terapija je porođaj, a rizik za razvoj preeklampsije se najčešće procjenjuje na osnovu demografskih karakteristika i faktora rizika prisutnih kod majke, koji imaju niske pozitivne prediktivne vrijednosti. Kako kardiovaskularne bolesti i preeklampsija dijele niz zajedničkih faktora rizika, a poremećaji u metabolizmu lipida i lipoproteina se smatraju ključnim faktorima u patogenezi ateroskleroze i razvoju kardiovaskularnih bolesti, nameće se potreba za detaljnijim ispitivanjem promjena u metabolizmu lipida i njihovog značaja u predikciji rizika za razvoj preeklampsije. Cilj ovog istraživanja bio je longitudinalno praćenje specifičnih komponenti lipidoma kod žena sa visokorizičnom trudnoćom, analiza razlika u specifičnim elementima lipidoma između trudnica sa i bez preeklampsije, i procjena dijagnostičke tačnosti ispitivanih parametara.

U studiju je uključeno 90 trudnica sa visokim rizikom sa razvoj preeklampsije, a koje su se javile radi praćenja trudnoće u Ginekološko-akušersku kliniku „Narodni Front“ u Beogradu. Na osnovu primarnog ishoda trudnoće, ispitanice su klasifikovane u grupu trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG), koja nije razvila preeklampsiju, i grupu trudnica sa preeklampsijom (PG). U prvoj fazi istraživanja određeni su osnovni klinički i biohemijski parametri i osnovni parametri lipidnog profila tokom prvog, drugog, trećeg trimestra i pred porođaj. Koncentracije neholesterolskih sterola (NHS) u serumu i lipoproteinskim česticama visoke gustine (HDL) su određene metodama tečne hromatografije sa tandem masenom detekcijom (HPLC-MS/MS), prethodno implementiranim i validiranim u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju, a izabrani sfingolipidi HPLC-MS/MS metodom razvijenom za potrebe ove studije, takođe, u četiri tačke tokom gestacije. Masena koncentracija apolipoproteina M (apoM) je određivana tehnikom enzimskog imunoeseja. Aktivnosti lecitin-holesterol aciltransferaze (LCAT) i holesterol-estar transfernog proteina (CETP) su procijenjene na osnovu brzine stvaranja i prenosa holesterol estara. Aktivnost paraoksonaze 1 (PON1) mjerena je kinetički korišćenjem paraoksona kao supstrata.

U okviru studije uspješno je optimizovana i validirana HPLC-MS/MS metoda za kvantifikaciju sfingozina, sfinganina, sfingozin-1-fosfata (S1P), sfinganin-1-fosfata, ceramida C16:0 (Cer C16:0) i C24:0 (Cer C24:0), i sfingomijelina C16:0 (SM C16:0). Zbog izraženog efekta matriksa, prilikom konstrukcije kalibracionih krivih kao matriks je korišten *pool* humane plazme. Varijacije unutar serija su bile 3,8-18,8%, a između serija 4,1-19,4%. Tačnost se kretala u opsegu od $\pm 15\%$ od nominalne vrijednosti. Koncentracije triglicerida su bile značajno više u PG u odnosu na RG ($p < 0,05$ u svim ispitivanim tačkama), dok je koncentracija HDL holesterola bila značajno niža u PG u 2. trimestru u poređenju sa RG ($p < 0,05$). Povećanje koncentracije holesterola u RG je bilo praćeno značajnim povećanjem koncentracija holesterolskih prekursora dezmosterola ($p < 0,001$), 7-dehidroholesterola ($p < 0,05$) i latosterola ($p < 0,001$). S druge strane, u PG uprkos povećanju koncentracije ukupnog holesterola, nisu uočene značajne promjene u koncentracijama dezmosterola ($p = 0,427$) i 7-dehidroholesterola ($p = 0,368$), već samo u koncentraciji latosterola ($p < 0,05$). Porast koncentracije holesterolskih prekursora krajem trudnoće u RG bio je praćen značajnim padom koncentracija markera apsorpcije kampesterola ($p < 0,05$) i β -sitosterola ($p < 0,05$), dok u PG uprkos porastu koncentracije latosterola nije bilo značajnih promjena u koncentracijama biljnih sterola ($p = 0,364$ za kampesterol i $p = 0,426$ za β -sitosterol), što upućuje na djelimično izmjenjenu homeostazu holesterola u PG. Uočeni su različiti obrasci u sfingolipidnim profilima između ispitivanih grupa. Koncentracije S1P u RG su se povećavale od 1. trimestra do porođaja ($p < 0,001$). U PG nisu primijećene značajne promjene u koncentraciji S1P tokom trudnoće ($p = 0,472$), ali su, u poređenju sa RG, koncentracije S1P bile niže

od 2. trimestra do porođaja ($p < 0,05$ u svim tačkama), čime se S1P izdvojio kao potencijalni biomarker za procjenu rizika za razvoj preeklampsije. U RG je tokom trudnoće uočen značajan porast u koncentracijama Cer C16:0 i Cer C24:0 ($p < 0,001$, oba). Koncentracije SM C16:0 su se značajno povećale tokom trudnoće u obje ispitivane grupe ($p < 0,001$ u RG i $p < 0,05$ u PG), bez značajnih razlika između ispitivanih kohorti. Visoke koncentracije sfingomijelina u obje grupe mogle bi poslužiti kao pokazatelj kardiovaskularnog rizika u trudnoćama s visokim rizikom za razvoj preeklampsije. Kako je razvoju preeklampsije prethodio pad koncentracije HDL holesterola, u našoj studiji su ispitivane i promjene u metabolizmu HDL čestica u RG i PG. Koncentracija dezmosterola_{HDL} u 1. trimestru je bila niža u PG u poređenju sa RG ($p < 0,05$). Koncentracije kampesterola_{HDL} i β -sitosterola_{HDL} u PG su u 2. trimestru bile značajno niže u poređenju sa RG ($p < 0,05$, oba), čime je po prvi put u našoj studiji potvrđeno da je snižena koncentracija HDL holesterola u 2. trimestru praćena nižim koncentracijama markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji. Dobijeni rezultati ukazuju da LCAT i CETP nisu značajno uticali na remodelovanje HDL čestica kod naših ispitanica. Uočeni su različiti obrasci promjena u koncentraciji apoM i aktivnosti PON1 između ispitivanih grupa, pri čemu su u PG zabilježene više aktivnosti PON1 ($p < 0,05$ u 1. i 3. trimestru, i pred porođaj), što uz specifičan porast apoM u 2. trimestru u ovoj kohorti ($p < 0,05$), sugerise na moguće adaptivne mehanizme koji uključuju očuvanje anti-aterosklerotskih svojstava HDL-S1P kompleksa i reverznog transporta holesterola. Latosterol, dezmosterol_{HDL}, apoM i PON1 u 1. trimestru, te glukoza, trigliceridi, HDL holesterol, β -sitosterol, S1P, kampesterol_{HDL} i apoM u 2. trimestru, su se izdvojili kao parametri koji bi se mogli koristiti u procjeni rizika za razvoj preeklampsije, pri čemu su dezmosterol_{HDL} i apoM imali značajan prediktivni potencijal. Uključivanje specifičnih lipidnih parametara u tradicionalne modele za procjenu rizika za razvoj preeklampsije značajno je poboljšalo njihovu dijagnostičku tačnost, a kao najefikasniji pristup se izdvojio model koji integriše kliničke, biohemijske i lipidne parametre.

Sveukupno posmatrano, određivanje osnovnih, ali i specifičnih lipidnih parametara, značajno poboljšava stepen predikcije preeklampsije, nudeći komplementarni alat tradicionalnim kliničkim markerima za bolje identifikovanje rizičnih trudnoća. Ovaj pristup fokusiran na lipide otvara i mogućnost za efikasnije, personalizovane terapijske pristupe, kao i intervencije usmjerene ka očuvanju budućeg kardiometaboličkog zdravlja majke i djeteta.

Ključne riječi: preeklampsija, lipidni status, neholesterolski steroli, prekursori holesterola, fitosteroli, HDL, sfingolipidi, sfingozin-1-fosfat, ceramidi, sfingomijelin

Naučna oblast: Medicinske nauke – Farmacija

Uža naučna oblast: Medicinska biohemija

Markers of cholesterol synthesis and absorption and sphingolipid profile in preeclampsia

ABSTRACT

Despite advancements in elucidating the pathophysiological mechanisms involved in the development of preeclampsia, delivery remains the only effective therapy. The risk of developing preeclampsia is most commonly assessed based on demographic characteristics and maternal risk factors, which have low positive predictive values. Since cardiovascular diseases and preeclampsia share numerous risk factors, and lipid and lipoprotein metabolism disorders are considered key factors in the pathogenesis of atherosclerosis and the development of cardiovascular diseases, there is a need for a more detailed investigation of lipid metabolism changes and their significance in predicting the risk of preeclampsia. The aim of this study was to longitudinally monitor specific components of the lipidome in women with high-risk pregnancies, analyze differences in specific lipidome elements between women with and without preeclampsia, and evaluate the diagnostic accuracy of the examined parameters.

The study included 90 pregnant women at high risk for developing preeclampsia, who were monitored at the Gynecology and Obstetrics Clinic "Narodni Front" in Belgrade. Based on the primary pregnancy outcome, participants were classified into a high-risk pregnancy group (RG) that did not develop preeclampsia and a preeclampsia group (PG). In the first phase of the study, basic clinical and biochemical parameters, as well as lipid profile parameters, were determined during the first, second, and third trimesters, and before delivery. Concentrations of non-cholesterol sterols (NCS) in serum and high-density lipoprotein particles (HDL) fraction were measured using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) methods previously implemented and validated in the laboratory of the Department of Medical Biochemistry. Selected sphingolipids were measured using an HPLC-MS/MS method developed specifically for this study, also at four gestational points. The mass concentration of apolipoprotein M (apoM) was determined using an enzyme immunoassay technique. The activities of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) and cholesterol ester transfer protein (CETP) were assessed based on the rates of cholesterol ester formation and transfer. Paraoxonase 1 (PON1) activity was measured kinetically using paraoxon as a substrate.

In this study, an HPLC-MS/MS method was successfully optimized and validated for quantifying sphingosine, sphinganine, sphingosine-1-phosphate (S1P), sphinganine-1-phosphate, ceramide C16:0 (Cer C16:0), ceramide C24:0 (Cer C24:0), and sphingomyelin C16:0 (SM C16:0). Due to a pronounced matrix effect, a pool of human plasma was used as the matrix for constructing calibration curves. Intra-assay variations ranged from 3.8% to 18.8%, while inter-assay variations were between 4.1% and 19.4%, with accuracy within $\pm 15\%$ of the nominal values. Triglyceride concentrations were significantly higher in the PG compared to the RG ($p < 0.05$ at all points), while HDL cholesterol levels were significantly lower in PG during the 2nd trimester compared to RG ($p < 0.05$). In RG, an increase in cholesterol concentrations was accompanied by significant increases in cholesterol precursors desmosterol ($p < 0.001$), 7-dehydrocholesterol ($p < 0.05$), and lathosterol ($p < 0.001$). In PG, despite rising total cholesterol levels, no significant changes were observed for desmosterol ($p = 0.427$) or 7-dehydrocholesterol ($p = 0.368$), with only lathosterol showing a significant increase ($p < 0.05$). Late pregnancy increases in cholesterol precursors in RG were associated with significant decreases in absorption markers campesterol ($p < 0.05$) and β -sitosterol ($p < 0.05$). In contrast, PG showed no significant changes in phytosterols' concentrations despite lathosterol increases ($p = 0.364$ for campesterol and $p = 0.426$ for β -sitosterol), indicating altered cholesterol homeostasis in PG. Distinct sphingolipid profiles were observed between the groups. S1P concentrations in RG increased from the 1st trimester to delivery ($p < 0.001$). In PG, no significant S1P changes were observed throughout pregnancy ($p = 0.472$), but S1P concentrations were consistently lower compared to RG from the 2nd

trimester to delivery ($p < 0.05$ at all points), identifying S1P as a potential biomarker for preeclampsia risk assessment. Significant increases in Cer C16:0 and Cer C24:0 were observed in RG during pregnancy ($p < 0.001$ for both). SM C16:0 concentrations increased significantly in both groups ($p < 0.001$ in RG and $p < 0.05$ in PG), with no differences between the cohorts. Elevated sphingomyelin levels in both groups may serve as cardiovascular risk indicators in high-risk pregnancies. As preeclampsia development was preceded by a decline in HDL cholesterol, the study also examined HDL particle metabolism in RG and PG. Desmosterol_{HDL} concentrations in the 1st trimester were lower in PG compared to RG ($p < 0.05$). In the 2nd trimester, campesterol_{HDL} and β -sitosterol_{HDL} concentrations were significantly lower in PG compared to RG ($p < 0.05$ for both). This study was the first to confirm that reduced HDL cholesterol levels in the 2nd trimester were accompanied by lower cholesterol absorption marker concentrations in the HDL fraction. Results suggest that LCAT and CETP did not significantly influence HDL remodeling in the study participants. Distinct patterns in apoM concentrations and PON1 activity were observed between the groups, with higher PON1 activity in PG ($p < 0.05$ in the 1st and 3rd trimesters, and before delivery), which together with the specific increase in apoM during the 2nd trimester in PG ($p < 0.05$) suggests potential adaptive mechanisms to preserve the anti-atherosclerotic properties of the HDL-S1P complex and reverse cholesterol transport. Lathosterol, desmosterol_{HDL}, apoM, and PON1 in the 1st trimester, as well as glucose, triglycerides, HDL cholesterol, β -sitosterol, S1P, campesterol_{HDL}, and apoM in the 2nd trimester, were identified as parameters potentially useful for preeclampsia risk assessment, while desmosterol_{HDL} and apoM demonstrated significant predictive potential. Incorporating specific lipid parameters into traditional risk assessment models significantly improved their diagnostic accuracy, with the most effective approach being a combined model integrating clinical, biochemical, and lipid parameters.

Overall, the determination of both basic and specific lipid parameters significantly improves the prediction of preeclampsia, providing a complementary tool to traditional clinical markers for better identification of high-risk pregnancies. This lipid-focused approach also opens the possibility for more efficient, personalized therapeutic strategies and interventions aimed at preserving the future cardiometabolic health of both the mother and child.

Key words: preeclampsia, lipid profile, non-cholesterol sterols, cholesterol precursors, phytosterols, HDL, sphingolipids, sphingosine-1-phosphate, ceramides, sphingomyelin

Scientific field: Medical Sciences – Pharmacy

Specific scientific field: Medical Biochemistry

Lista skraćenica:

ABCA1	ATP vezujući kasetni transporter	engl. <i>ATP binding cassette subfamily A member 1</i>
ACOG	Američki koledž akušera i ginekologa	engl. <i>American College of Obstetricians and Gynecologists</i>
AIP	aterogeni indeks plazme	engl. <i>atherogenic index of plasma</i>
ALT	alanin aminotransferaza	engl. <i>alanine aminotransferase</i>
ANOVA	analiza varijanse	engl. <i>analysis of variance</i>
APCI	jonski izvor za hemijsku jonizaciju pod atmosferskim pritiskom	engl. <i>atmospheric pressure chemical ionization</i>
apoA-I	apolipoprotein A1	engl. <i>apolipoprotein A-I</i>
apoB	apolipoproteina B	engl. <i>apolipoprotein B</i>
apoM	apolipoprotein M	engl. <i>apolipoprotein M</i>
AST	aspartat aminotransferaza	engl. <i>aspartate aminotransferase</i>
AUC	površina ispod krive	engl. <i>area under the curve</i>
Cer C14:0	ceramid C14:0	engl. <i>ceramide C14:0</i>
Cer C16:0	ceramid C16:0	engl. <i>ceramide C16:0</i>
Cer C17:0	ceramid C17:0	engl. <i>ceramide C17:0</i>
Cer C24:0	ceramid C24:0	engl. <i>ceramide C24:0</i>
Cer C24:1	ceramid C24:1	engl. <i>ceramide C24:1</i>
CETP	holesterol-estar transferni protein	engl. <i>cholesterol ester transfer protein</i>
DKP	dijastolni krvni pritisak	engl. <i>diastolic blood pressure</i>
ELISA	„sendvič“ enzimski imunoesej	engl. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	Evropska agencija za lijekove	engl. <i>European Medicine Agency</i>
ESI	elektrosprej jonski izvor	engl. <i>electrospray ionization</i>
FDA	Uprava za hranu i lijekove	engl. <i>Food and Drug Administration</i>
FMF	Udruženje za fetalnu medicinu	engl. <i>Fetal Medicine Foundation</i>

HDL	lipoproteinske čestice visoke gustine	engl. <i>high-density lipoprotein</i>
HDL-S1P	S1P vezan za HDL	engl. <i>HDL bound S1P</i>
HPLC-MS/MS	tečni hromatograf visoke efikasnosti spregnut sa tandem masenim detektorom	engl. <i>high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry</i>
ICH	Međunarodni savjet za harmonizaciju	engl. <i>International Council for Harmonisation</i>
IGF	insulinu slični faktori rasta	engl. <i>insulin-like growth factors</i>
IS	interni standard	engl. <i>internal standard</i>
ITM	indeks tjelesne mase	engl. <i>body mass index</i>
IUGR	intrauterina restrikcija rasta ploda	engl. <i>intrauterine growth restriction</i>
KOH	kalijum hidroksid	engl. <i>potassium hydroxide</i>
KV	koeficijent varijacije	engl. <i>coefficient of variation</i>
KVIS	koeficijent varijacije između serija	engl. <i>coefficient of variation between series</i>
KVUS	koeficijent varijacije unutar serije	engl. <i>coefficient of variation in series</i>
LCAT	lecitin-holesterol aciltransferaza	engl. <i>lecithin:cholesterol acyltransferase</i>
LDL	lipoproteinske čestice niske gustine	engl. <i>low-density lipoprotein</i>
LOD	limit detekcije	engl. <i>limit of detection</i>
LOQ	limit kvantifikacije	engl. <i>limit of quantification</i>
MMI		engl. <i>multi mode ionization</i>
MPI-UtA	srednji pulsatilni indeks uterinih arterija	engl. <i>Mean Pulsatile Index of the Uterine Arteries</i>
MRM	praćenje višestrukih reakcija	engl. <i>multiple reaction monitoring</i>
NaCl	natrijum-hlorida	engl. <i>sodium chloride</i>
NHS	neholesterolski steroli	engl. <i>non-cholesterol sterols</i>
NHSHDL	neholesterolski steroli u HDL frakciji	engl. <i>non-cholesterol sterols in HDL fraction</i>

NICE	Engleski nacionalni institut za izuzetnost u zdravstvu i njezi	engl. <i>National Institute for Health and Care Excellenc</i>
NO	azot monoksid	engl. <i>nitrogen oxide</i>
PAPP-A	plazma protein – A povezan sa trudnoćom	engl. <i>pregnancy-associated plasma protein A</i>
PFTE	politetrafluoroetilen	engl. <i>polytetrafluoroethylene</i>
PG	grupa trudnica sa preeklampsijom	engl. <i>group of pregnant women with preeclampsia</i>
PIGF-1	placentalni faktor rasta	engl. <i>placental growth factor-1</i>
PON1	paraoksonaza 1	engl. <i>paraoxonase 1</i>
RG	grupa trudnica za visokorizičnom trudnoćom	engl. <i>group of pregnant women with high-risk pregnancy</i>
ROC		engl. <i>Receiver Operating Charactetistics</i>
S1P	sfingozin-1-fosfat	engl. <i>sphingosine-1-phoshpate</i>
S1P d17	sfingozin-1-fosfat d17	engl. <i>sphingosine-1-phosphate d17</i>
S1PRs	sfingozin-1-fosfat receptori	engl. <i>sphingosine-1-phosphate receptors</i>
SAP	srednji arterijski pritisak	engl. <i>mean arterial pressure</i>
SAPH	sfinganin	engl. <i>sphinganine</i>
SAPH1P	sfinganin-1-fosfat	engl. <i>sphinganine-1-phosphate</i>
Sd	standardna devijacija	engl. <i>standard deviation</i>
sFlt-1	solubilni anti-angiogeni faktori	engl. <i>soluble fms-like tyrosine kinase 1</i>
SKP	sistolni krvni pritisak	engl. <i>systolic blood pressure</i>
SM C16:0	sfingomijelin C16:0	engl. <i>sphingomyelin C16:0</i>
SM C17:0	sfingomijelin C17:0	engl. <i>sphingomyelin C17:0</i>
SM C18:0	sfingomijelin C18:0	engl. <i>sphingomyelin C18:0</i>
SNR	odnosa signala i šuma aparata	engl. <i>signal-to-noise ratio</i>
SPH	sfingozin	engl. <i>sphingosine</i>
SPH d17	sfingozin d17	engl. <i>sphingosine d17</i>

SZO	Svjetska zdravstvena organizacija	engl. <i>World Health Organization</i>
TAT	vrijeme obrta	engl. <i>turnaround time</i>
TRIS-HCl	tris-hidroksimetilaminometan hidrohlorid	engl. <i>tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride</i>
UN	Ujedinjene nacije	engl. <i>Unated Nations</i>
UtA-Pi	pulsatilni indeks <i>Aa. Uterinae</i>	engl. <i>pulsatility index Aa. Uterinae</i>
VEGF	vaskularni endotelni faktor rasta	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>
VLDL	lipoproteini veoma niske gustine	engl. <i>very-low-density lipoprotein</i>

Sadržaj

1	Uvod	1
1.1	Trudnoća i rizik od komplikacija	1
1.2	Klasifikacija hipertenzivnih poremećaja u toku trudnoće	2
1.2.1	Definicija preeklampsije	2
1.2.2	Definicija eklampsije	2
1.2.3	Definicija hronične hipertenzije	3
1.2.4	Definicija preeklampsije superponirane na hroničnu hipertenziju	3
1.2.5	Gestacijska hipertenzija	3
1.3	Incidenca preeklampsije	3
1.4	Patogeneza preeklampsije	5
1.4.1	Prvi stadijum – poremećaj placentacije	6
1.4.2	Drugi stadijum – maternalni sindrom	7
1.4.2.1	Molekularni mehanizmi patogeneze preeklampsije	8
1.4.3	Razlike između rane i kasne preeklampsije	9
1.5	Dijagnostikovanje i procjena rizika za razvoj preeklampsije	9
1.5.1	Dijagnostikovanje preeklampsije	9
1.5.2	Tradicionalni pristupi procjeni rizika za razvoj preeklampsije	10
1.5.3	Novi modeli za procjenu rizika za razvoj preeklampsije	11
1.6	Profilaksa i terapijski pristupi kod žena sa preeklampsijom	12
1.7	Dislipidemija – faktor rizika za razvoj preeklampsije	12
1.7.1	Hiperlipidemija u trudnoći bez komplikacija i trudnoći sa preeklampsijom	13
1.7.2	Markeri sinteze i apsorpcije holesterola u trudnoći bez komplikacija i trudnoći sa preeklampsijom	14
1.7.3	Sfingolipidi – potencijalni markeri preeklampsije	16
1.7.4	Struktura i funkcija HDL čestica u trudnoći bez komplikacija i preeklampsiji	17
2	Ciljevi istraživanja	21
3	Materijal i metode	23
3.1	Dizajn studije	23
3.2	Ispitivana populacija	23
3.3	Biološki materijal	25
3.4	Metode	25

3.4.1	Antropometrijska mjerenja i klinički parametri.....	25
3.4.2	Osnovni biokemijski parametri.....	25
3.4.3	ApoM.....	26
3.4.4	Neholesterolski steroli (NHS) u serumu i HDL frakciji (NHS _{HDL}).....	26
3.4.4.1	Reagensi, aparatura i priprema laboratorijskog posuđa.....	26
3.4.4.2	Priprema uzoraka za određivanje NHS i NHS _{HDL}	27
3.4.4.3	Instrumentalni uslovi metoda za određivanje NHS i NHS _{HDL}	27
3.4.4.4	Osjetljivost i linearnost metoda za određivanje NHS i NHS _{HDL}	28
3.4.4.5	Metabolički indeksi.....	29
3.4.5	Metoda za kvantitativnu analizu sfingolipida u plazmi.....	29
3.4.5.1	Reagensi, aparatura i priprema laboratorijskog posuđa.....	29
3.4.5.2	Priprema uzoraka za HPLC-MS/MS analizu sfingolipida u plazmi.....	30
3.4.5.3	Instrumentalni uslovi za kvantifikaciju sfingolipida upotrebom HPLC-MS/MS metode.	30
3.4.5.4	Validacija metode.....	31
	Linearnost.....	31
	Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ).....	38
	Preciznost unutar serije i između serija.....	39
	Tačnost metode (recovery studija).....	39
3.4.6	Određivanje aktivnosti enzima LCAT i CETP.....	40
3.4.7	Određivanje aktivnosti enzima PON1.....	40
3.5	Statistička analiza.....	41
4	Rezultati.....	43
4.1	Razvoj i optimizacija metode za određivanje sfingolipida u plazmi.....	43
4.2	Kliničke i laboratorijske karakteristike ispitivane populacije.....	49
4.3	Osnovni parametri lipidnog profila u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG).....	52
4.4	Neholesterolski steroli (NHS) u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG).....	55
4.5	Sfingolipidi u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG).....	59
4.6	Neholesterolski steroli u HDL frakciji (NHS _{HDL}) u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG).....	61

4.7	Aktivnost enzima uključenih u metabolizam HDL čestica u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG).....	63
4.8	Specifične proteinske komponente HDL čestica u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG).....	65
4.9	<i>Spearman</i> -ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola (NHS) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila	67
4.10	<i>Spearman</i> -ova korelaciona analiza između sfingolipida i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila.....	74
4.11	<i>Spearman</i> -ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola u HDL frakciji (NHS _{HDL}) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila.....	82
4.12	Ispitivanje značaja specifičnih biomarkera u procjeni rizika za razvoj preeklampsije u 1. trimestru trudnoće.....	90
4.13	Ispitivanje značaja specifičnih lipidnih komponenti u procjeni rizika za razvoj preeklampsije u 2. trimestru trudnoće.....	96
5	Diskusija	103
6	Zaključci	121
7	Literatura.....	124

1 Uvod

Trudnoća se medicinski definiše kao stanje u kom žena nosi embrion ili fetus u razvoju unutar svoje materice. Početak trudnoće je predstavljen implementacijom oplođene jajne ćelije u sluzokožu materice i završava se porođajem [1]. Međutim, trudnoća je više od samo biološkog procesa; ona nosi značajne društvene implikacije. Predstavlja kritičnu fazu u nastavku porodične loze, formiranju porodičnih veza, prenošenju kulturnih i porodičnih vrijednosti na sljedeću generaciju. Ovaj proces nije povezan samo sa fizičkim i medicinskim aspektima gestacije, već obuhvata i emocionalne, psihološke i društvene promjene. Rođenje djeteta bi trebalo da bude jedan od najljepših i najvrijednih događaja u životu jedne žene, a svi očekuju da trudnoća bude bezbjedna i da se novorođenčad rode zdrava [2]. S tim u vezi značajna pažnja se posvećuje kako smanjivanju smrtnosti novorođenčadi, tako i očuvanju i unapređenju zdravlja majke. Ujedinjene nacije (UN) su u septembru 2000. godine definisale milenijumske ciljeve razvoja, od kojih su dva bila posvećena smanjenju smrtnosti kod djece i poboljšanju zdravlja majke [3]. Iste godine u decembru Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) je donijela strategiju pod nazivom „*Making pregnancy safer*“, sa ciljem da pruži smjernice u načinu ažuriranja svojih politika i strategija za poboljšanje zdravlja majki i beba pojedinačnim zemljama u razvoju [4]. Uprkos značajnim naprecima koji su napravljeni u prethodnom periodu, prema podacima SZO, 830 žena i 7000 novorođenčadi i dalje svakodnevno umire usljed komplikacija vezanih za trudnoću i porođaj [3]. UN su se u Ciljevima održivog razvoja obavezale na brzo i značajno poboljšanje u prethodno navedenim statističkim podacima, a definisani su sljedeći ciljevi:

- smanjivanje globalne stope smrtnosti majki na manje od 70 na 100000 živorođenih do 2030. godine i
- eliminisanje smrtnosti novorođenčadi i djece mlađe od 5 godina koja se može spriječiti i smanjenje neonatalne smrtnosti na najviše 12 na 1000 živorođenih, a smrtnosti ispod 5 godina na najviše 25 na 1000 živih rođenja do 2030. godine [5].

1.1 Trudnoća i rizik od komplikacija

Većina trudnoća i porođaja prolazi bez razvoja bilo kakvih komplikacija. Međutim, svaka trudnoća predstavlja potencijalni rizik po zdravlje majke i ploda. Prema procjenama SZO, oko 15% žena tokom trudnoće razvija neku od komplikacija koje mogu da ugroze kako zdravlje majke, tako i zdravlje novorođenčeta [6]. Komplikacije mogu da se jave u toku ili poslije trudnoće, kao i tokom samog porođaja, a većina ih se može spriječiti ili tretirati adekvatnim medicinskim pristupom. U najčešće komplikacije u trudnoći ubrajaju se gestacijska hipertenzija, gestacijski dijabetes, infekcije, preeklampsija, prevremeni porođaj, depresija i anksioznost, pobačaji, mrtvorodenost, trudnička hiperemeza (lat. *hyperemesis gravidarum*) i anemija usljed nedostatka gvožđa [7].

Ova studija će se baviti razmatranjem jedne od najozbiljnijih hipertenzivnih komplikacija u trudnoći – preeklampsijom, njenom klasifikacijom, kao i kliničkom i laboratorijskom procjenom rizika i dijagnostikom, prevencijom i tretmanom.

1.2 Klasifikacija hipertenzivnih poremećaja u toku trudnoće

Prema Američkom koledžu akušera i ginekologa (engl. *American College of Obstetricians and Gynecologists*, ACOG) hipertenzivni poremećaji u trudnoći se najjednostavnije mogu podijeliti u sljedeće četiri kategorije:

- 1) preeklampsija-eklampsija
- 2) hronična hipertenzija (bilo kog uzroka)
- 3) hronična hipertenzija sa superponiranom preeklampsijom
- 4) gestacijska hipertenzija [8].

1.2.1 Definicija preeklampsije

Preeklampsija je hipertenzivni poremećaj specifičan za trudnoću, a karakteriše se efektima na nivou više sistema organa. Preeklampsija se uobičajeno definiše kao novonastala hipertenzija koja se prvi put dijagnostikuje poslije 20. nedelje gestacije, najčešće pred sam termin porođaja, a koja je udružena sa novonastalom proteinurijom ili oštećenjem nekog drugog organskog sistema [9]. Hipertenzija se definiše kao sistolni krvni pritisak (SKP) koji je jednak ili veći od 140 mmHg i/ili dijastolni krvni pritisak (DKP) jednak ili veći od 90 mmHg, koji su kod trudnice detektovani u najmanje dva navrata u razmaku od najmanje 4 sata. Proteinurija se definiše kao dnevna ekskrecija proteina urinom koja je jednaka ili veća od 300 mg/dan. Prema najnovijim preporukama ACOG, dijagnoza preeklampsije se može postaviti i u odsustvu proteinurije, ukoliko se dijagnostikuje hipertenzija udružena sa:

- trombocitopenijom (broj trombocita manji od $100 \times 10^9/L$),
- oštećenjem funkcije jetre (povišena aktivnost jetrenih aminotransferaza),
- razvojem bubrežne insuficijencije (koncentracija kreatinina viša od $97,2 \mu\text{mol/L}$),
- pulmonarnim edemom ili
- novonastalim cerebralnim ili vizuelnim smetnjama [9].

1.2.2 Definicija eklampsije

Eklampsija je najteža hipertenzivna komplikacija koja se uočava kod trudnica, a karakteriše se pojavom konvulzija koje nastaju u odgovoru na hipertenziju koja se javlja u toku gestacije. Definiše se kao pojava novih tonično-kloničnih, fokalnih ili multifokalnih napada u odsustvu drugih mogućih uzročnika (npr. prethodno prisutne epilepsije, ishemije cerebralne arterije, i sl) [9].

Napadi mogu dovesti do ozbiljne hipoksije majke, traume i aspiracijske pneumonije, a neke trudnice, iako rijetko, mogu imati i kratkotrajne ili dugotrajne neurološke posljedice, poput slabljenja kognitivnih funkcija [10]. U više od 2/3 slučajeva, eklampsiji prethode upozoravajući znaci poput intenzivnih i upornih glavobolja u okcipitalnom ili frontalnom području, zamagljen vid, ili promjena kognitivnih

funkcija [11]. Ipak, treba imati na umu da značajan dio žena ne pokazuje klasične znake preeklampsije (hipertenziju ili proteinuriju) prije pojave napada [12].

1.2.3 Definicija hronične hipertenzije

Hronična hipertenzija je hipertenzija koja je kod žene dijagnostikovana prije trudnoće. Definiše se kao SKP koji je jednak ili veći od 140 mmHg i/ili DKP koji je jednak ili veći od 90 mmHg, a koji je prisutan prije trudnoće ili dijagnostifikovan prije 20. nedelje gestacije i koji perzistira postpartalno [8]. Postavljanje dijagnoze hronične hipertenzije predstavlja poseban izazov za kliničare, a prilikom postavljanja dijagnoze hronične hipertenzije u trudnoći, potrebno je utvrditi da se ne radi o preeklampsiji, a nakon toga i da je krvni pritisak zaista povišen (tj. da nije riječ o hipertenziji bijelog mantila). Takođe, potrebno je razmotriti mogućnost da se radi o sekundarnoj hipertenziji, kao i utvrditi da li postoje i neka druga oštećenja organa [8].

1.2.4 Definicija preeklampsije superponirane na hroničnu hipertenziju

Postavljanje dijagnoze preeklampsije superponirane na hroničnu hipertenziju vjerovatno predstavlja i najveći izazov u ovoj oblasti. Ukoliko žena ima dijagnozu hronične hipertenzije, a u trudnoći razvije kliničke znake i simptome preeklampsije, ova komplikacija trudnoće se klasifikuje kao preeklampsija superponirana na hroničnu hipertenziju [8].

1.2.5 Gestacijska hipertenzija

Gestacijska hipertenzija se definiše kao SKP koji je jednak ili veći od 140 mmHg i/ili DKP koji je jednak ili veći od 90 mmHg, dijagnostikovano u dva navrata u razmaku od najmanje 4 sata poslije 20. nedelje gestacije, a kod trudnica sa prethodno normalnim krvnim pritiskom [9]. Dijagnoza se postavlja kod trudnica sa visokim krvnim pritiskom koji je prvi put uočen nakon 20. nedelje trudnoće, ali isključivo ako nisu prisutni znaci proteinurije ili oštećenja nekog od ciljnih organa, i ako se vrijednosti krvnog pritiska vraćaju u normalan opseg u periodu nakon porođaja [9].

Iako se gestacijska hipertenzija i preeklampsija definišu kao medicinski različiti pojmovi, bitno je napomenuti da je u realnim uslovima nekada teško napraviti razliku između ove dvije komplikacije, uzimajući u obzir činjenicu da će i do 50% trudnica sa gestacijskom hipertenzijom u nekom trenutku do kraja trudnoće razviti proteinuriju ili će se javiti znakovi oštećenja nekog drugog ciljnog organa. Vjerovatnoća za ovakav ishod se značajno povećava ako se dijagnoza gestacijske hipertenzije postavi prije 32. nedelje gestacije [13]. Trudnice sa gestacijskom hipertenzijom i lakšim oblicima preeklampsije se najčešće medicinski tretiraju na isti način, a teško je napraviti i razliku između ovih komplikacija u pogledu procjene rizika za razvoj kardiometaboličkih bolesti nakon trudnoće [14].

1.3 Incidenca preeklampsije

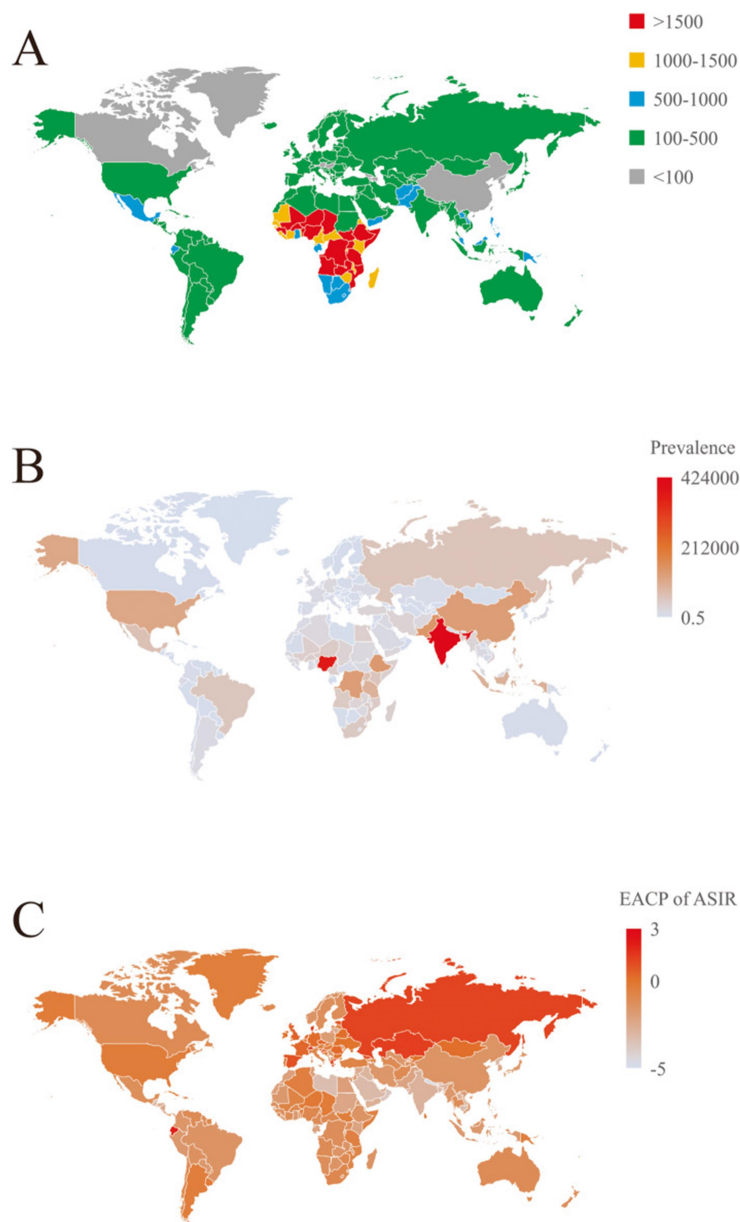
Hipertenzivne komplikacije trudnoće i dalje predstavljaju jedan od vodećih globalnih uzročnika morbiditeta i mortaliteta majke i fetusa, pa je poznavanje epidemiologije ovih komplikacija značajno za zdravstvenu zaštitu trudnica [15]. Skorašnje studije ukazuju na porast incidence hipertenzivnih

komplikacija u trudnoći, a globalna incidenca ovih poremećaja se kreće u opsegu od 4 do 25% [16]. Incidenca preeklampsije, takođe, značajno varira između različitih regiona i zemalja, pa se u razvijenim zemljama bilježi smanjenje incidence preeklampsije, dok su incidenca i stopa smrtnosti i dalje visoke u zemljama u razvoju [17]. Prema rezultatima meta-analize iz 2013. godine [17], globalna incidenca preeklampsije je bila 4,6%, pri čemu se taj procenat značajno razlikovao između pojedinih regiona – od 1,0% u regionu istočnog Mediterana do 5,6% u Africi.

Prema rezultatima studije iz 2019. godine [18], incidenca hipertenzivnih poremećaja u trudnoći je na globalnom nivou porasla sa 16,3 miliona do 18,08 miliona, što je ukupni porast od 10,92% od 1990. do 2019. godine. S druge strane, broj smrtnih slučajeva majke usljed preeklampsije je bio oko 27,83 hiljade u 2019, što je pad za 30,05% u odnosu na 1990. godinu. Stopa incidence standardizovana za godine je opala sa 579 na populaciju od 100000 trudnica u 1990. godini, na 463 u populaciji od 100000 trudnica u 2019, što odgovara padu od 0,68% na godišnjem nivou (Slika 1) [18]. Iako je uočen porast incidence hipertenzivnih komplikacija, potrebno je napomenuti da je taj porast vjerovatno rezultat rasta svjetske populacije, kao i posljedica većeg broja blizanačkih trudnoća usljed primjene tehnika asistirane reprodukcije. S druge strane, stopa incidence standardizovana za godine ukazuje na blagi trend pada učestalosti ovih poremećaja, što se pripisuje napretku u medicinskim intervencijama, kao i sve većoj pažnji koju ljekari posvećuju pravovremenoj procjeni rizika i prevenciji [18]. Međutim, pad stope incidence od 0,68% u periodu od 1990. do 2019. godine se i dalje smatra nedovoljnim.

Incidenca preeklampsije, kao i ostalih hipertenzivnih komplikacija trudnoće, značajno varira između različitih regiona i država, a varijacije se u najvećoj mjeri povezuju sa različitim socioekonomskim statusom i sociodemografskim indeksom. Posmatrano prema prihodima, najviše stope incidence preeklampsije se bilježe u zemljama sa srednje niskim prihodima [17]. Takođe, na nacionalnom nivou incidenca hipertenzivnih komplikacija u trudnoći je pokazala opadajući trend kako je rastao sociodemografski indeks [18], što ukazuje na važnu ulogu ekonomske podrške u zdravstvenoj njezi trudnica. U studiji *Wang i sar.* [18], najviša incidenca hipertenzivnih komplikacija trudnoće je zabilježena u Južnoj Aziji, zapadnoj i istočnoj sub-Saharskoj Africi. Nasuprot tome, u Australiji, Novom Zelandu, Okeaniji i Centralnoj Evropi zabilježene su najniže incidence [18].

Rizik za razvoj hipertenzivnih komplikacija, a samim tim i incidenca pomenutih poremećaja, koreliraju i sa godinama starosti trudnice, pa se tako najniža incidenca bilježi kod trudnica starosti između 25 i 29 godina. Smatra se da je učestalost hipertenzivnih komplikacija veća kod starijih trudnica zbog veće učestalosti tradicionalnih faktora rizika kao što su gojaznost, metabolički sindrom i hipertenzija [19]. S druge strane, trudnoća kod djevojaka mlađih od 20 godina se, takođe, povezuje sa većom učestalošću niza neželjenih ishoda trudnoće, poput prevremenog porođaja, preeklampsije i male mase bebe na rođenju [20], što se pripisuje lošem socio-ekonomskom statusu ovih mladih žena, neadekvatnoj ishrani, lošem zdravstvenom statusu prije trudnoće, ili niskom stepenu obrazovanja [21].



Slika 1 **A** Prevalencija hipertenzivnih poremećaja trudnoće u 2019. godini. **B** Stopa incidence hipertenzivnih poremećaja trudnoće standardizovana za godine u 2019. godini. **C** Procijenjena godišnja promjena u stopi incidence hipertenzivnih poremećaja trudnoće standardizovane za godine od 1990. do 2019. godine. (Preuzeto iz: Wang W, Xie X, Yuan T, Wang Y, Zhao F, Zhou Z, Zhang H. Epidemiological trends of maternal hypertensive disorders of pregnancy at the global, regional, and national levels: a population-based study. BMC pregnancy and childbirth. 2021; 21(1):364)

1.4 Patogeneza preeklampsije

Preeklampsija je multisistemska bolest još uvijek nepotpuno razjašnjene etiologije i patogeneze, što je čini velikim izazovom, kako u kliničkom, tako i u naučno-istraživačkom smislu. Najnoviji pristup proučavanju preeklampsije podrazumijeva da se ova komplikacija trudnoće može javiti u dva oblika:

- preeklampsija sa ranim početkom i
- preeklampsija sa kasnim početkom [22].

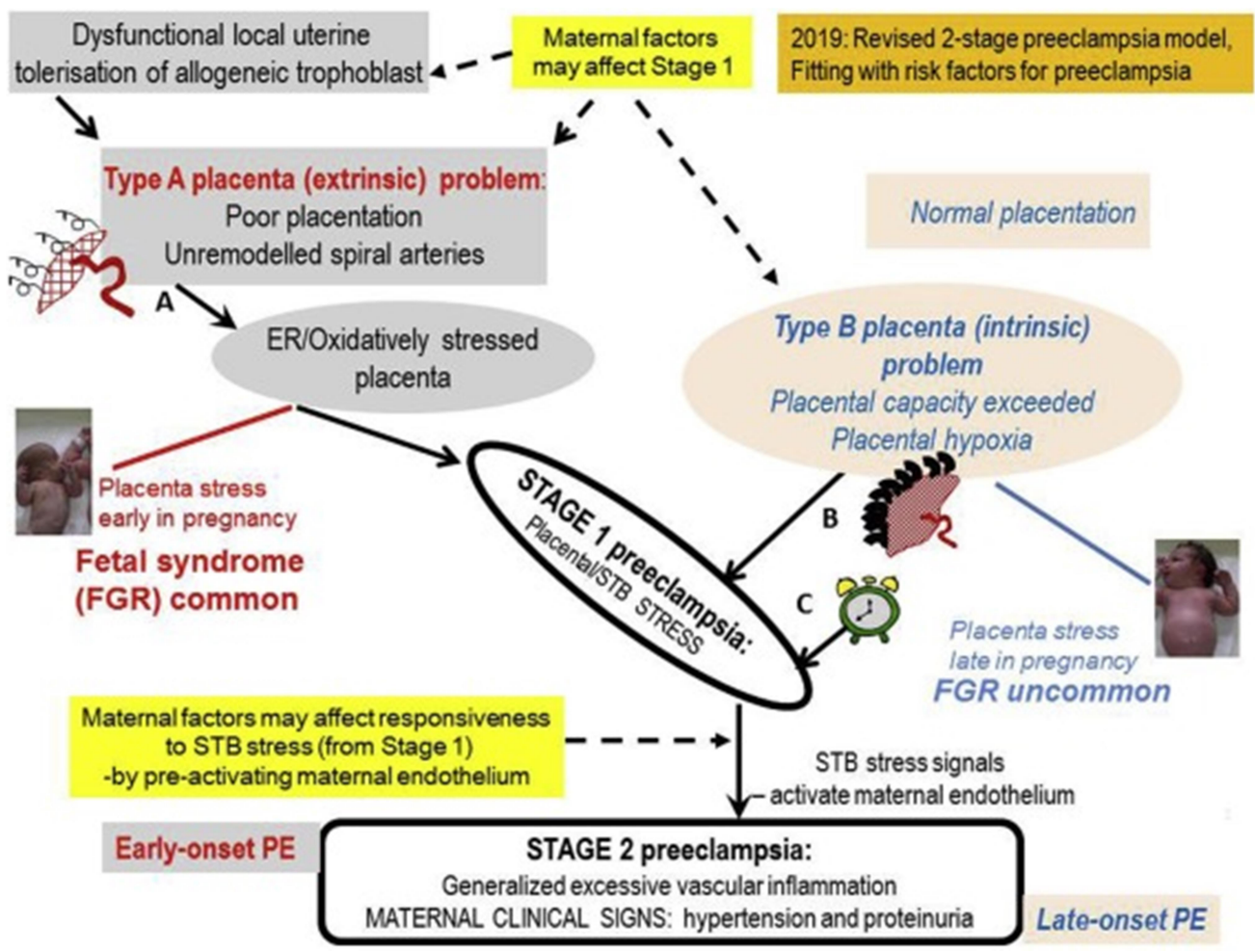
Rana preeklampsija se definiše kao preeklampsija koja se razvija prije 34. nedelje gestacije. Sa druge strane, preeklampsija sa kasnim početkom se razvija nakon 34. nedelje gestacije [22]. Danas se smatra da se oba oblika preeklampsije, rana i kasna, razvijaju u dvije faze. Prva faza u razvoju oboljenja podrazumijeva poremećaj placentacije [23], dok druga faza predstavlja sistemski odgovor majke na placentalni stres iz prve faze [24].

1.4.1 Prvi stadijum – poremećaj placentacije

Prvu fazu u razvoju preeklampsije predstavlja neadekvatno modelovanje spiralnih arterija, čija je uloga da snabdijevaju krvlju endometrijum materice [23]. Tokom trudnoće bez komplikacija, mononuklearni trofoblasti koji dolaze u kontakt sa matericom proliferišu i diferenciraju se u sinciotrofoblaste i citotrofoblaste. Razvoj placente zavisi od ravnoteže između proliferacije i diferencijacije trofoblasta [25]. Da bi se placenta razvila na odgovarajući način, mora doći do kompletnog remodelovanja spiralnih arterija. Ovaj proces rezultuje konverzijom krvnih sudova malog dijametra i visokog otpora u krvne sudove velikog kapaciteta i niskog otpora, čime se obezbjeđuje adekvatan dotok krvi do utero-placentalne jedinice [22].

Kod žena koje imaju sklonost ka razvoju preeklampsije, trofoblasti neće u dovoljnoj mjeri promijeniti svoj fenotip, spiralne arterije se neće adekvatno remodelovati, i ostaće sužene što dovodi do smanjenog protoka krvi kroz placentu [8]. Kao posljedica hemodinamičkih promjena dolazi do fibrinoidne nekroze krvnih sudova placente i formiranja pjenastih ćelija [26]. U drugoj fazi razvoja bolesti u odgovoru na placentalni stres se uočavaju sistemski inflamatorni odgovor i generalizovana endotelna disfunkcija u majke (Slika 2) [27].

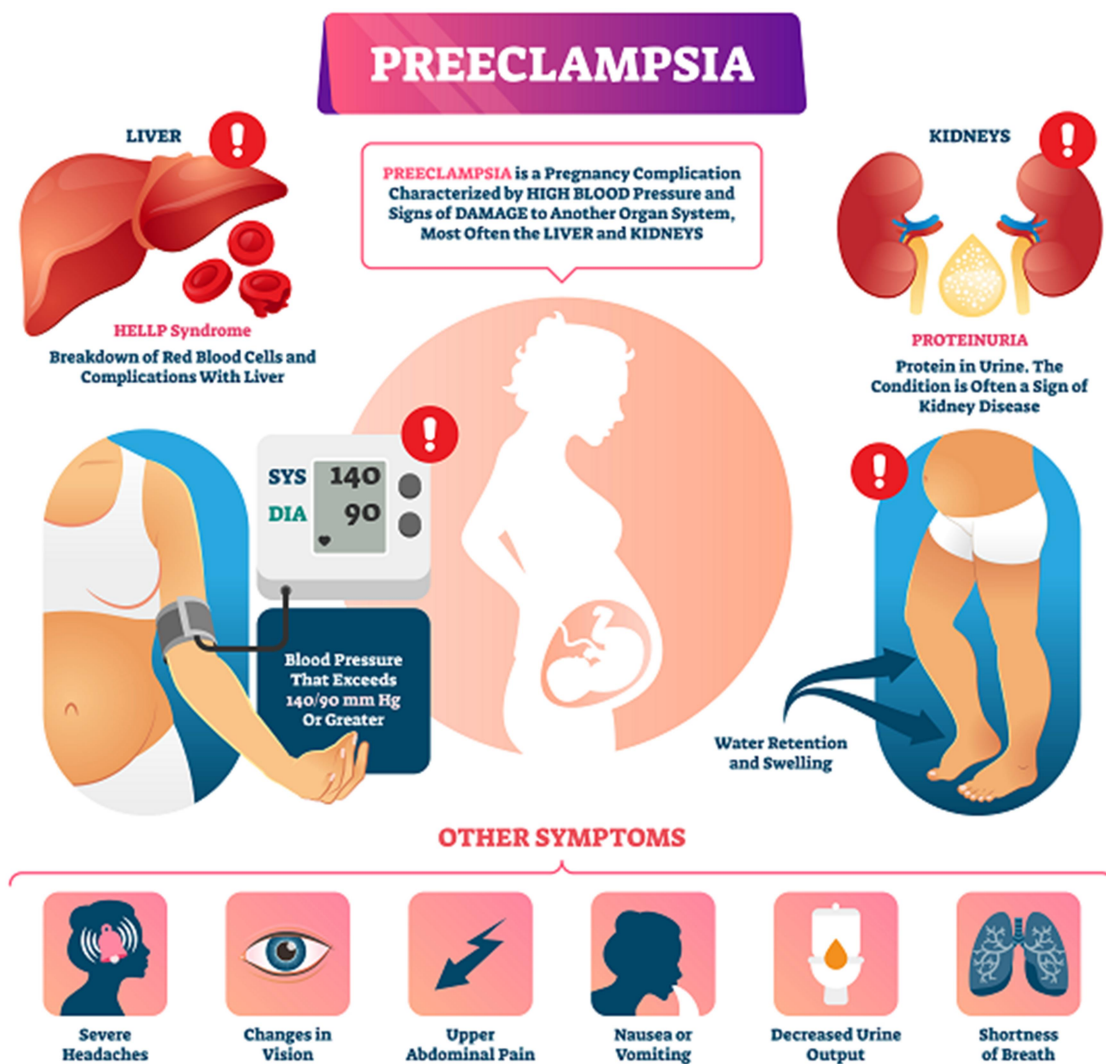
Dok se rana preeklampsija smatra fetalnim poremećajem koji je povezan sa disfunkcijom placente i prethodno opisanim mehanizmima, kasnu preeklampsiju karakterišu promjene koje nastaju usljed prisustva specifičnih faktora rizika kod majke, poput godina starosti, metaboličkog sindroma prije trudnoće, gojaznosti prije trudnoće, dijabetesa ili hronične hipertenzije [22,28]. Kod žena sa preeklampsijom sa kasnim početkom, posteljica koja sazrijeva prerasta kapacitet materice i drugih podržavajućih struktura. U ovom slučaju, posteljica postaje nedovoljno prokrvljena, sa ograničenom perfuzijom interviloznih resica, što uzrokuje stres posteljice u kasnijem gestacijskom dobu (Slika 2) [22,27]. Smatra se da je prekomjerni rast posteljice povezan sa gojaznošću majke [22]. Dakle, oba puta, neadekvatna placentacija i prekomjerni rast posteljice, uzrokuju hipoperfuziju i disfunkciju posteljice u prvoj fazi, što dovodi do klinički prepoznatog sindroma preeklampsije kod majke u drugoj fazi razvoja bolesti (Slika 3).



Slika 2 Dvostepeni model preeklampsije, koji integriše faktore rizika prisutne kod majke i dva glavna placentalna puta do razvoja kliničke preeklampsije. (Preuzeto iz: Staff AC. The two-stage placental model of preeclampsia: An update. J Reprod Immunol. 2019; 134-135:1-10)

1.4.2 Drugi stadijum – maternalni sindrom

U odgovoru na hipoksiju, placenta produkuje različite citokine koji se oslobađaju u cirkulaciju majke i odgovorni su za razvoj endotelne disfunkcije i druge kliničke manifestacije oboljenja u drugoj fazi razvoja bolesti [25].



Slika 3 Klinički znakovi preeklampsije. (Preuzeto sa: <https://www.naxlex.com/nursing/study-guides/maternal-newborn-gestational-hypertension-introduction>)

1.4.2.1 Molekularni mehanizmi patogeneze preeklampsije

Nedovoljno vaskularizovana placenta proizvodi niz različitih faktora, ali se smatra da su angiogeni, anti-angiogeni i inflamatorni citokini najznačajniji za razvoj endotelne disfunkcije [29,30]. U preeklampsiji je do sada najbolje proučen signalni put povezan sa sniženim koncentracijama vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) i placentalnog faktora rasta (engl. *placental growth factor-1*, PlGF-1). Ova dva faktora su uključena u proces angiogeneze, ali su značajni i u održavanju pravilne funkcije endotelnih ćelija. Snižene koncentracije slobodnog VEGF na nivou bubrega se povezuju sa oštećenjem glomerula i razvojem jednog od kliničkih znakova preeklampsije – proteinurijom [29,30]. VEGF i PlGF-1 svoju ulogu ostvaruju vezivanjem sa receptorom sličnim tirozin kinazi 1 (engl. *fms like tyrosin kinase 1*). Međutim, u cirkulaciji trudnica koje imaju sklonost ka razvoju preeklampsije nalaze se i fragmenti ovog receptora, solubilna fms-slična tirozin kinaza 1 (engl. *soluble fms-like tyrosine kinase 1*, sFlt-1), koji su označeni kao solubilni anti-angiogeni faktori. Kada je visoka koncentracija solubilnog dijela receptora, vezivanjem za VEGF i PlGF-1 blokira se njihov efekat na endotelne ćelije. Smatra se da solubilna

forma receptora ima antagonističko dejstvo, odnosno sprečava proces stimulacije angiogeneze. U prethodnim studijama je uočena povećana produkcija solubilnog dijela receptora u hipoksičnim uslovima. Naime, u istraživanjima na ćelijskim kulturama i tkivu placente uočeno je da se sFlt-1 oslobađa iz horionskih čupica i trofoblasta placente u odgovoru na smanjenu perfuziju kiseonikom [29,30].

1.4.3 Razlike između rane i kasne preeklampsije

Kao što je prethodno naglašeno, prema gestacijskom periodu kad se razvija, preeklampsija se može javiti u dva oblika – preeklampsija sa ranim početkom, koja se razvija prije 34. nedelje gestacije, i preeklampsija sa kasnim početkom, koja nastaje nakon 34. nedelje gestacije [28]. Rana preeklampsija je udružena sa slabom placentacijom i težom kliničkom slikom, dok je preeklampsija sa kasnim početkom poremećaj koji je predisponiran specifičnim faktorima rizika koji su prisutni kod majke, a koji uključuju godine starosti, gojaznost prije trudnoće i prisustvo hroničnih bolesti prije trudnoće. Rana preeklampsija je uobičajeno praćena intrauterinim zastojem u rastu ploda (engl. *intrauterine growth restriction*, IUGR), malom tjelesnom masom na rođenju i disfunkcijom više organa [31,32]. Sa druge strane, kasnu preeklampsiju karakterišu blaža klinička slika, normalan rast fetusa, normalna tjelesna masa bebe na rođenju i povoljniji ishodi i za majku i za novorođenče [31,33].

Najveći broj slučajeva preeklampsije (više od 80%) se javlja u vrijeme porođaja (poslije 37. nedelje gestacije) ili između 34. i 37. nedelje gestacije, tj. u formi preeklampsije sa kasnim početkom koju prati normalan rast fetusa [25]. Faktori rizika koji su prisutni kod majke, kao što su hronične vaskularne bolesti, gojaznost, autoimuna oboljenja, rezistencija na insulin i hronične bolesti bubrega ili jetre, mogu ne samo da uspore proces placentacije (faza 1), već i da pojačaju vaskularnu osjetljivost majke na faktore koje oslobađa placenta (faza 2). Smatra se da je u osnovi povećane osjetljivosti endotela majke na faktore koje otpušta placenta hronično stanje inflamacije niskog stepena koje je kod ovih žena prisutno i prije trudnoće [23]. Prema modelu koji su opisali *Redman* i sar. [27], kod žena sa kasnim razvojem preeklampsije, ograničen protok krvi između horionskih čupica tokom sazrijevanja placente može dovesti do placentalne hipoksije. Placentalna hipoksija je odgovorna za nastanak druge faze bolesti – pojavu kliničkih znakova oboljenja kod majke, pri čemu prethodno pomenuti faktori rizika prisutni kod žene pojačavaju vaskularni odgovor na stimuluse iz placente [22]. Prema tome, kliničke manifestacije preeklampsije se najprije mogu objasniti kroz sinergistički efekat različitih faktora, prije nego kao posljedica jednog specifičnog medijatora.

1.5 Dijagnostikovanje i procjena rizika za razvoj preeklampsije

1.5.1 Dijagnostikovanje preeklampsije

Dijagnoza preeklampsije se postavlja u skladu sa kliničkim kriterijumima koji su dati u definiciji u poglavlju 1.2.1, tj. preeklampsija se može dijagnostifikovati kada se kod prethodno normotenzivne trudnice, poslije 20. nedelje gestacije, razvije hipertenzija (SKP ≥ 140 mmHg i/ili DKP ≥ 90 mmHg), uz prisustvo najmanje jednog od sljedećih stanja:

- pojava proteinurije (izlučivanje proteina ≥ 300 mg/dan, ili odnos proteini/kreatinin $\geq 0,3$, ili 1+ na test traci, što se koristi samo ukoliko kvantitativna analiza nije dostupna),

- trombocitopenija (broj trombocita $< 100 \times 10^9/L$),
- bubrežna insuficijencija (koncentracija kreatinina u serumu $> 97,2 \mu\text{mol/L}$ ili dvostruko povećanje koncentracije u serumu u odsustvu druge bubrežne bolesti),
- oštećena funkcija jetre (povišena aktivnost transaminaza, dvostruko u odnosu na normalnu aktivnost),
- plućni edem,
- pojava neuroloških ili vizuelnih smetnji (poremećaji mentalnog statusa, gubitak vida, moždani udar, klonički grčevi, teške glavobolje i prisustvo skotoma) [9].

1.5.2. Tradicionalni pristupi procjeni rizika za razvoj preeklampsije

Uprkos napretku u razjašnjavanju patofizioloških mehanizama uključenih u razvoj preeklampsije, procjena rizika za razvoj ove komplikacije trudnoće, kao i njena terapija su limitirani. Porođaj je i danas jedini efikasan terapijski pristup, a najviše pažnje je usmjereno ka kontinuiranom monitoringu i pravovremenom otkrivanju trudnica koje imaju visok rizik da će razviti ovu komplikaciju. Međunarodna udruženja iz oblasti zdravstva daju različite preporuke, ali jedan od osnovnih ciljeva kako internacionalnih, tako i nacionalnih strategija u izučavanju preeklampsije je usmjeren ka što efikasnijoj procjeni rizika za razvoj ovog oboljenja. Danas se u kliničkoj praksi rizik za razvoj preeklampsije procjenjuje na osnovu tradicionalnih faktora rizika koji su vezani za demografske karakteristike i medicinsku istoriju majke. Najčešće se primjenjuju važeće preporuke koje su dale vodeća međunarodna udruženja u oblasti zdravstva, uključujući ACOG i Engleski nacionalni institut za izuzetnost u zdravstvu i njezi (engl. *National Institute for Health and Care Excellence*, NICE) [34-37].

U preporukama koje je dao ACOG, kao faktori rizika za razvoj preeklampsije navode se: preeklampsija u prethodnoj trudnoći, višepodne trudnoće, bolesti bubrega, autoimune bolesti, dijabetes tip 1 ili 2, hronična hipertenzija, starost trudnice preko 35 godina, indeks tjelesne mase (ITM) veći od ili jednak 35 kg/m^2 , period između dvije trudnoće preko 10 godina i trudnoća nastala primjenom tehnika asistirane reprodukcije [35,36]. Prema NICE kriterijumima trudnica mora da ima bar jedan faktor visokog rizika ili najmanje dva faktora umjerenog rizika da bi se takva trudnoća svrstala u kategoriju visokorizične za razvoj ove komplikacije. Faktori visokog rizika uključuju hroničnu hipertenziju, hipertenzivni poremećaj u prethodnoj trudnoći, hroničnu bubrežnu bolest, dijabetes ili prisustvo autoimunske bolesti, dok se u faktore umjerenog rizika ubrajaju starost majke veća od 40 godina, prva trudnoća, interval između dvije trudnoće veći od 10 godina, ITM veći od ili jednak 35 kg/m^2 prilikom prve posjete medicinskoj ustanovi i porodična istorija preeklampsije [37].

Sve trudnice čija se trudnoća kategoriše kao visokorizična se uključuju u sistem intenzivnog monitoringa u cilju što ranijeg otkrivanja prvih znakova i simptoma oboljenja. Osnovna ideja iza ranog otkrivanja znakova i simptoma preeklampsije sastoji se u pravovremenoj hospitalizaciji i održavanju trudnoće što je duže moguće. Pored toga, prema najnovijim preporukama, žene sa visokim rizikom za razvoj preeklampsije se tretiraju niskim dozama aspirina od 12. nedelje gestacije do porođaja, jer postoje dokazi da primjena aspirina može pozitivno uticati na smanjenje rizika za razvoj preeklampsije i drugih neželjenih ishoda trudnoće [8].

1.5.3 Novi modeli za procjenu rizika za razvoj preeklampsije

Niske pozitivne prediktivne vrijednosti parametara koji se koriste u procjeni rizika, kao i nedostatak adekvatnog tretmana, često rezultuju nepotrebnom izlaganju velikog broja trudnica profilaktičkoj terapiji od koje neće imati koristi, pa je tako npr. uočeno da je potrebno tretirati 54 žene niskim dozama aspirina kako bi se spriječio jedan slučaj preeklampsije [38]. Sa druge strane, ekonomske analize su pokazale da tretman preeklampsije predstavlja značajno finansijsko opterećenje za zdravstveni sistem. Naime, prosječni troškovi za tretman pacijentkinja sa preeklampsijom u Irskoj su, prema podacima studije iz 2017. godine [39], iznosili 5243 eura, dok se za nekomplikovanu trudnoću potroši u prosjeku 2452 eura po pacijentkinji. Žene sa preeklampsijom koriste veći broj zdravstvenih usluga, kao što su različite *imaging* tehnike prije porođaja, carski rez, produžen boravak u bolnici, kao i veći broj prijema, te duži boravak novorođenčadi u jedinicama intenzivne njege [39]. Prema tome, preeklampsija i hipertenzivni poremećaji u trudnoći predstavljaju ne samo socijalni i medicinski problem, već i finansijsko opterećenje za zdravstveni sistem. Upravo iz tih razloga, istraživanja su posljednjih decenija usmjerena ka identifikaciji demografskih faktora, biohemijskih markera i biofizičkih karakteristika, koji bi rano u toku trudnoće mogli ukazati na to da će kasnije doći do razvoja preeklampsije. Studije u ovoj oblasti i otkrivanje biomarkera koji se direktno povezuju sa razvojem preeklampsije otvaraju i mogućnosti za uvođenje potencijalno novih terapijskih pristupa.

Najveći dio istraživanja u ovoj oblasti bavio se izučavanjem značaja različitih angiogenih i anti-angiogenih faktora, kao i plazma proteina – A povezanog sa trudnoćom (engl. *pregnancy-associated plasma protein A*, PAPP-A) u preeklampsiji. Međutim, njihova pojedinačna primjena nije pokazala zadovoljavajuću dijagnostičku tačnost. U cilju postizanja veće osjetljivosti i specifičnosti, demografskim i kliničkim faktorima koji čine tradicionalne modele za identifikaciju trudnica sa visokim rizikom za razvoj preeklampsije, dodaju se prethodno navedeni biomarkeri [38,40]. Udruženje za fetalnu medicinu (engl. *Fetal Medicine Foundation*, FMF) predlaže korišćenje algoritma koji predstavlja kombinaciju faktora rizika prisutnih kod majke (starost, tjelesna visina, tjelesna masa, rasa, pušački status tokom trudnoće, istorija preeklampsije u porodici, način začeća, prisustvo hronične hipertenzije, dijabetesa tip 1 ili 2, sistemskog eritemskog lupusa i anti-fosfolipidnog sindroma, istorija prethodnih trudnoća, srednji arterijski pritisak (SAP)) sa ultrazvučnim parametrima (pulsatilni indeks *Aa. Uterinae*, UtA-Pi) i biohemijskim markerima (PIGF-1, PAPP-A) u prvom trimestru [40,41]. Isto udruženje preporučuje određivanje placentalnog sFlt-1 i PIGF-1 u serumu trudnica za skrining u drugom trimestru, pri čemu odnos sFlt-1/PIGF-1 ima bolju dijagnostičku tačnost nego pojedinačne vrijednosti ovih markera, sa osjetljivosti od 95% i specifičnosti od 84% [42].

Uprkos tome što je u različitim studijama predloženo više algoritama koji bi se mogli koristiti u procjeni rizika za razvoj preeklampsije, nijedan od predloženih modela nije pokazao zadovoljavajuću dijagnostičku tačnost. Mali broj ovih modela je validiran, a njihovi klinički značaj i primjena su ograničeni [43,44]. Bitno je istaći i da većina ispitivanih biomarkera, poput PIGF-1, ima veći klinički značaj u predikciji preeklampsije sa ranim početkom, koja se razvija kao posljedica neadekvatnog remodelovanja spiralnih arterija, gdje bi faktori rasta uključeni u proces angiogeneze mogli biti od većeg značaja. Sa druge strane, nije dokazano da faktori rasta i nepotpuno remodelovanje spiralnih arterija imaju značaj u razvoju preeklampsije sa kasnim početkom [45]. Preeklampsiji sa kasnim početkom uglavnom prethodi normalno modelovanje spiralnih arterija, a za ovaj poremećaj se, kako je prethodno i objašnjeno, smatra da je u najvećoj mjeri posredovan faktorima rizika koji su prisutni kod majke i prije same trudnoće. Isti ti faktori bar djelimično učestvuju i u amplifikaciji vaskularnog odgovora na stimuluse koje otpušta placenta [27]. Zvanične preporuke internacionalnih autoriteta u

ovoj oblasti su da se generalni skrining na cijeloj populaciji trudnica ne preporučuje, i da se procjena rizika i dalje vrši na osnovu tradicionalnih modela za procjenu rizika [8].

1.6 Profilaksa i terapijski pristupi kod žena sa preeklampsijom

Kako se u osnovi patogeneze preeklampsije nalazi oksidativni stres, nekada se smatralo da bi primjena antioksidanasa, poput vitamina C i vitamina E mogla biti od koristi u profilaksi preeklampsije. Međutim, danas se zna da njihova primjena u cilju prevencije preeklampsije ili neželjenih ishoda preeklampsije nije efikasna [8]. Primjena kalcijuma kao suplementa, a u cilju profilakse preeklampsije ima značaja jedino u populaciji sa niskim unosom kalcijuma [8].

Smatra se da primjena niskih doza aspirina (60-80 mg) krajem prvog trimestra ima blagi pozitivan uticaj na smanjenje rizika od razvoja preeklampsije i neželjenih perinatalnih ishoda, ali samo u populaciji žena sa veoma visokim rizikom [8].

Jedini efikasan tretman preeklampsije i danas je prevremeni porođaj. Međutim, i kada je u pitanju prevremeni porođaj, u prethodnom periodu su uočene odgovarajuće promjene u terapijskom pristupu. Prema najnovijim smjernicama, smatra se da kod žena koje imaju blaži oblik preeklampsije nema potrebe za porođajem prije 37. nedelje gestacije [8]. Kod trudnica kod kojih se teži oblik preeklampsije razvije u ili poslije 34. nedelje gestacije, kao i kod trudnica gdje su majka ili plod u nestabilnom stanju bez obzira na gestacijsku starost, savjetuje se porođaj čim dođe do stabilizacije stanja majke [8].

Velika pažnja se posvećuje redovnom i kontinuiranom praćenju simptoma kod trudnice, kao i serijskom mjerenju krvnog pritiska, broja trombocita i aktivnosti jetrenih enzima [8].

Žene koje su imale preeklampsiju u prethodnoj trudnoći se upućuju na savjetovanje i procjenu rizika prije sljedeće trudnoće. Cilj savjetovanja i procjene je prikupljanje svih klinički relevantnih informacija, procjena rizika za razvoj komplikacija u trudnoći, kao i potencijalna promjena načina života koja, između ostalog, može da uključuje gubitak tjelesne mase kod gojaznih žena i povećanje fizičke aktivnosti. Savjetuje se i laboratorijska procjena, kao i skrining na prisustvo oboljenja poput hipertenzije ili dijabetesa. Potrebno je izvršiti provjeru i korekciju trenutne terapije ukoliko je žena na nekom vidu hronične terapije. Ženama koje su imale preeklampsiju u više od jedne trudnoće savjetuje se i primjena niskih doza aspirina od početka do kraja trudnoće [8].

1.7 Dislipidemija – faktor rizika za razvoj preeklampsije

Primijećeno je da kardiovaskularne bolesti i preeklampsija dijele niz zajedničkih faktora rizika uključujući endotelnu disfunkciju, hipertenziju, dijabetes i sistemski inflamatorni odgovor niskog stepena [28]. Poremećaji u metabolizmu lipida i lipoproteina se smatraju ključnim faktorima u patogenezi ateroskleroze i daljem razvoju kardiovaskularnih bolesti. Iz tog razloga, savremeni pristup u rasvjetljavanju patogeneze preeklampsije zahtjeva detaljnije ispitivanje promjena u metabolizmu lipida, kao i njihovog značaja u predikciji rizika za razvoj ove komplikacije trudnoće.

1.7.1 *Hiperlipidemija u trudnoći bez komplikacija i trudnoći sa preeklampsijom*

Tokom svake trudnoće, uključujući i onu bez komplikacija, dolazi do značajnih metaboličkih promjena kod majke kako bi se obezbijedili nutrijenti neophodni za rast i razvoj fetusa. Prva dva trimestra trudnoće metabolički predstavljaju anaboličku fazu trudnoće koju karakterišu hiperfagija, početak razvoja insulinske rezistencije i akumulacija lipida. Treći trimestar metabolički predstavlja kataboličku fazu trudnoće u kojoj dolazi do punog razvoja insulinske rezistencije kod majke [46]. U kasnoj trudnoći, razvoj insulinske rezistencije u majke i lipoliza perifernih naslaga masnog tkiva dovode do stimulacije glukoneogeneze kod trudnice, promjene u raspodjeli lipoproteinskih partikula i naročito povećanja sadržaja triglicerida u lipoproteinima. Ove promjene, zajedno sa tendencijom da periferna tkiva majke koriste ketonska tijela kao izvor energije, rezultuju čuvanjem glukoze koja predstavlja glavni energetski izvor za plod. Sve ove promjene su praćene povećanjem koncentracije slobodnih masnih kiselina, kao i triglicerida u lipoproteinskim česticama [46].

Promjene u koncentraciji tradicionalnih parametara lipidnog profila tokom trudnoće bez komplikacija su već dobro opisane u prethodnim studijama [47]. Fiziološka trudnoća, tj. trudnoća bez komplikacija je praćena razvojem hiperlipidemije, čije su glavne odlike povećanje koncentracije triglicerida, ukupnog holesterola i holesterola u lipoproteinskim česticama niske gustine (engl. *low-density lipoprotein*, LDL) (LDL holesterol) [47]. Međutim, ono što razlikuje hiperlipidemiju u trudnoći od hiperlipidemije u kardiometaboličkim bolestima je povećanje koncentracije holesterola u lipoproteinskim česticama visoke gustine (engl. *high-density lipoprotein*, HDL) (HDL holesterol) u odnosu na žene koje nisu trudne [47]. Povećanje koncentracije HDL holesterola u trudnoći dostiže pik tokom drugog trimestra i uobičajeno perzistira do kraja trudnoće. Ova specifičnost hiperlipidemije u trudnoći se dovodi u vezu sa zaštitom endotela majke [47]. Mehanizmi koji dovode do preraspodjele lipoproteinskih čestica uključuju povećanu aktivnost hepatične lipaze i smanjenu aktivnost lipoproteinske lipaze, koja je vezana za endotel krvnih sudova, tokom kasne gestacije. Rezultat promjena u aktivnosti ova dva enzima je povećano oslobađanje slobodnih masnih kiselina i njihova reesterifikacija do triglicerida i dalje oslobađanje triglicerida u cirkulaciju u sklopu lipoproteina veoma niske gustine (engl. *very-low-density lipoprotein*, VLDL) [46]. Visoke koncentracije triglicerida u VLDL česticama tokom trudnoće mogu dovesti i do povećanja koncentracije triglicerida u LDL i HDL česticama. Ovaj proces je olakšan povećanom aktivnošću holesterol-estar transfernog proteina (engl. *cholesterol ester transfer protein*, CETP), koji reguliše razmjenu triglicerida i holesterola između VLDL, LDL i HDL. Kao rezultat toga, i LDL i HDL postaju proporcionalno obogaćeni trigliceridima, posebno tokom sredine gestacije, kada se uočava najveći rast aktivnosti CETP [46,47].

Sa druge strane, u studijama koje su se bavile ispitivanjem promjena u koncentracijama parametara lipidnog profila u trudnoći sa preeklampsijom, uočeni su još intenzivniji porast koncentracije triglicerida, ukupnog i LDL holesterola u odnosu na trudnoću bez komplikacija, dok istovremeno izostaje očekivani porast koncentracije HDL holesterola [48]. Na osnovu ovih rezultata može se pretpostaviti da je preeklampsija povezana sa poremećajima u metabolizmu lipida. Lipidni profil kod trudnica sa preeklampsijom se najčešće opisuje kao aterogeni, a uz to je praćen i oksidativnim promjenama na lipidnim molekulima [49]. Kod pacijentkinja sa preeklampsijom se uočava nedovoljna ekspanzija masnog tkiva u poređenju sa zdravim ženama. Šta više, uočeno je da su adipociti rezistentniji na insulin, što dovodi do povećane lipolize [50]. Ovi procesi rezultuju u ektopičnoj akumulaciji masti u jetri i drugim tkivima [51].

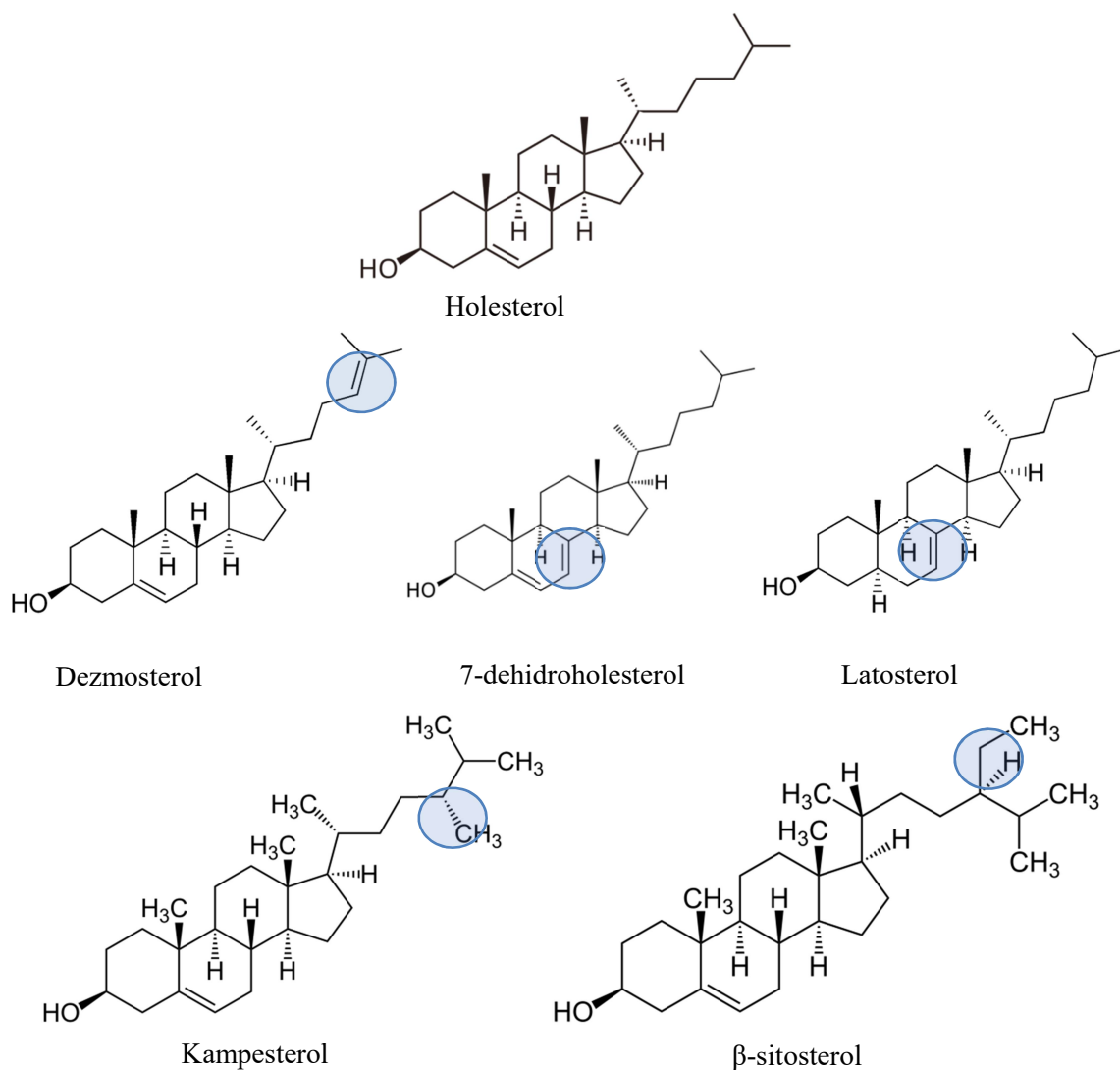
Iako su promjene u koncentraciji osnovnih parametara lipidnog profila tokom trudnoće sa i bez komplikacija dobro poznate, skoro da nema istraživanja koja su se bavila mehanizmima koji stoje iza

ovih promjena. Dodatno, analiza rezultata prethodnih studija nameće mišljenje da tradicionalni parametri lipidnog profila nisu dovoljno osjetljivi markeri promjena u metabolizmu holesterola koje prethode razvoju preeklampsije, pa se javlja potreba za analizom specifičnih lipidnih markera u cilju boljeg razumijevanja metabolizma holesterola u trudnoći sa preeklampsijom [48].

1.7.2 Markeri sinteze i apsorpcije holesterola u trudnoći bez komplikacija i trudnoći sa preeklampsijom

Primjena savremenih hromatografskih tehnika je omogućila analizu lipidoma, tj. identifikaciju i kvantifikaciju različitih specifičnih jedinjenja iz grupe lipida, a između ostalih i analizu neholesterolskih sterola (NHS) (Slika 4) [52,53]. U fiziološkim uslovima, koncentracija holesterola u različitim lipoproteinskim česticama je rezultat delikatne ravnoteže između sinteze, dijetarnog unosa i uklanjanja viška holesterola iz perifernih tkiva u procesu reverznog transporta holesterola [54]. Kao markeri za procjenu brzine i efikasnosti sinteze holesterola koriste se prekursori u sintezi ovog molekula – dezmosterol, 7-dehidroholesterol i latosterol [52]. Osim sinteze u jetri, apsorpcija u tankom crijevu značajno doprinosi ukupnoj količini holesterola u organizmu. Kako se biljni steroli, kampesterol i β -sitosterol, apsorbuju pomoću istih receptora kao egzogeni holesterol, biljni steroli, tj. fitosteroli, su predloženi kao surogat markeri efikasnosti apsorpcije holesterola [53].

Procesi sinteze i apsorpcije holesterola se nalaze u ravnoteži. U cilju održavanja homeostaze holesterola, povećanje intenziteta sinteze holesterola dovodi do smanjenja apsorpcije i obrnuto [55]. Međutim, utvrđeno je da različita fiziološka i patološka stanja mogu uzrokovati promjene u ovoj ravnoteži, pa razumijevanje procesa homeostaze holesterola i mehanizama njene regulacije postaje izuzetno važno. Procjena efikasnosti ovih procesa vodi ka boljoj identifikaciji individualnih razlika u metabolizmu holesterola, kao i efikasnijoj prevenciji i boljim protokolima liječenja [56]. NHS se navode kao osjetljiviji markeri poremećaja u homeostazi holesterola u poređenju sa tradicionalnim parametrima lipidnog profila [57]. Rezultati prethodnih studija su pokazali da su markeri sinteze i apsorpcije holesterola bolji prediktori kardiovaskularnih bolesti u poređenju sa osnovnim parametrima lipidnog profila koji se rutinski određuju u biohemijskim laboratorijama [58,59]. Kod gojaznih osoba, pacijenata sa dijabetesom tipa 2 i osoba sa metaboličkim sindromom uobičajeno se uočavaju smanjena apsorpcija i povećana sinteza holesterola [60]. Za razliku od pacijenata sa dijabetesom tipa 2, kod pacijenata sa dijabetesom tipa 1, obično je stepen apsorpcije holesterola viši, a intenzitet sinteze niži u poređenju sa zdravim ispitanicima [60]. Smatra se da je ovakav odnos sinteze i apsorpcije holesterola rezultat insulinske rezistencije koja je osnovna odlika dijabetesa tipa 2, dok je kod pacijenata sa tipom 1 dijabetesa osjetljivost perifernih tkiva na insulin najčešće očuvana [61]. Kod pacijenata sa kardiovaskularnim bolestima, istraživanja su pokazala i obrnut obrazac kog karakterišu visoka apsorpcija i niska sinteza holesterola [58,59], što ističe neophodnost za sprovođenje većeg broja studija na velikom broju pacijenata u cilju rasvjetljavanja poremećaja homeostaze holesterola u kardiometaboličkim bolestima, kao i razmatranje personalizovanog pristupa svakom pacijentu prilikom odabira terapijskog pristupa uvijek kada je to moguće [60].



Slika 4 Strukturne formule molekula holesterola i neholesterolskih sterola (NHS)

U studiji *Nikkila i sar.* [62] određivane su koncentracije holesterola, skvalena, demetilovanih sterola, tj. prekursora holesterola (Δ^8 -holestenol, dezmosterol i latosterol), fitosterola (kampesterol i β -sitosterol) i holestanola u serumu zdravih trudnica i kod zdravih negravidnih žena. Skvalen i drugi prekursori holesterola su izabrani kao markeri sinteze holesterola u jetri, dok su β -sitosterol, kampesterol i holestanol posmatrani kao markeri intestinalne apsorpcije holesterola. U navedenoj studiji, uočeno je trostruko povećanje koncentracije holesterolskih prekursora – skvalena, dezmosterola i latosterola, tokom trudnoće bez komplikacija, dok su odnosi neholesterolskih sterola prema holesterolu bili oko dva puta viši kod trudnica u poređenju sa negravidnim ženama [62]. Povećanje koncentracije prekursora holesterola bi se u ovom slučaju moglo objasniti povećanom sintezom holesterola [62].

Rezultati prethodnih studija su pokazali da se kod trudnica sa gestacijskim dijabetesom već u prvom trimestru uočavaju više koncentracije markera sinteze holesterola, dok je koncentracija skvalena povišena u drugom i trećem trimestru trudnoće, što ukazuje na povećanu sintezu holesterola [57].

Nasuprot tome, *Miettinen* i sar. [57] nisu uočili značajne razlike u koncentracijama ukupnog, LDL i HDL holesterola, triglicerida i fosfolipida između trudnica sa gestacijskim dijabetesom sa dobrom glikemijskom kontrolom i ispitanica koje su činile kontrolnu grupu. Na osnovu rezultata ove studije može se zaključiti da se NHS izdvajaju kao osjetljiviji markeri promjena u metabolizmu holesterola u gestacijskom dijabetesu u odnosu na osnovne parametre lipidnog profila [57].

Rezultati analize NHS kod trudnica sa kasnom preeklampsijom su, takođe, pokazali da i ovu komplikaciju trudnoće prati povećanje sinteze holesterola [63]. *Lee* i sar. [63] su uočili da su trudnice sa preeklampsijom imale više odnose holesterol/dezmosterol i holesterol/7-dehidroholesterol u odnosu na grupu trudnica sa prevremenim porođajem iz drugih medicinskih razloga. Uprkos dokazima koji ukazuju na promjene u parametrima koji su ključni za homeostazu holesterola u preeklampsiji, do sada nije praćena longitudinalna promjena ovih markera tokom trudnoće sa preeklampsijom. Bolje razumijevanje metabolizma holesterola u različitim komplikacijama trudnoće moglo bi biti od velike važnosti, jer se poremećaji u metabolizmu holesterola povezuju sa razvojem metaboličkih komplikacija trudnoće, gdje spada i preeklampsija.

1.7.3 Sfingolipidi – potencijalni markeri preeklampsije

Iako se inicijalno smatralo da jedinjenja iz grupe lipida imaju prvenstveno energetske (prilikom njihovog katabolizma oslobađa se velika količina energije) i gradivnu ulogu (npr. ulaze u sastav ćelijske membrane), danas se zna da lipidi utiču ne regulaciju cjelokupne ćelijske homeostaze [64]. Lipidi igraju važnu ulogu u kontroli proliferacije, apoptoze, migracije i metabolizma u ćelijama [64]. Posljednjih godina je pokazano da su ova jedinjenja značajni indikatori aktivacije različitih puteva ćelijske signalizacije [65]. Sfingolipidi, koji su tradicionalno posmatrani kao statičke komponente ćelijskih membrana, sada su priznati kao dinamički signalni molekuli koji utiču na različite bitne ćelijske funkcije. Ceramidi, sfingomijelini, glikosfingolipidi i sfingozin-1-fosfat (engl. *sphingosine-1-phosphate*, S1P), molekuli iz grupe sfingolipida, učestvuju u različitim ćelijskim procesima, uključujući međućelijsko prepoznavanje, ćelijsku signalizaciju i apoptozu [66]. Veliki broj studija je potvrdio ulogu pojedinih lipidnih komponenti u patogenezi različitih bolesti, a od nedavno su sfingolipidi i proteini koji su povezani sa metabolizmom sfingolipida izdvojeni kao potencijalni medijatori uključeni u patogenezu preeklampsije. Ova jedinjenja se navode i kao rani biomarkeri koji mogu ukazati na razvoj preeklampsije kasnije u toku trudnoće [66,67].

Uočeno je da su dvije vrste iz grupe sfingolipida – ceramidi i S1P, i njihovi metabolički putevi uključeni u proces diferencijacije i invazije trofoblasta *in vitro*, kao i u proces angiogeneze na nivou materice [68-70]. Od ranije je poznato da su upravo ovi fiziološki procesi ključni za nastanak preeklampsije [8,22,23]. Ceramidi i S1P su važni za adekvatnu funkciju vaskularnog endotela i često se navode kao okidači za inflamaciju i nastanak oksidativnog stresa. *Melland-Smith* i sar. [66] su klasifikovali preeklampsiju kao poremećaj skladištenja sfingolipida, nakon što su uočili povišene nivoe ceramida unutar trofoblastnih slojeva posteljice kod trudnica sa preeklampsijom. Smatra se da povećanje koncentracije ceramida stimuliše pojačanu autofagičnu aktivnost trofoblasta i apoptotsku smrt ćelija, što su sve karakteristična obilježja preeklampsije [66].

Kod trudnica sa preeklampsijom uočene su promjene u metabolizmu S1P, kao i disfunkcionalni signalni putevi povezani sa ovim molekulom [71]. S1P se prvenstveno sintetiše u crvenim krvnim zrnima i vaskularnom endotelu, nakon čega se brzo transportuje iz ćelija [71]. Nakon transporta iz ćelije S1P stimuliše svoje receptore (engl. *sphingosine-1-phosphate receptors*, S1PRs), podstičući proliferaciju i preživljavanje ćelija, i stimuliše aktivnost enzima azot monoksid (NO) sintaze u

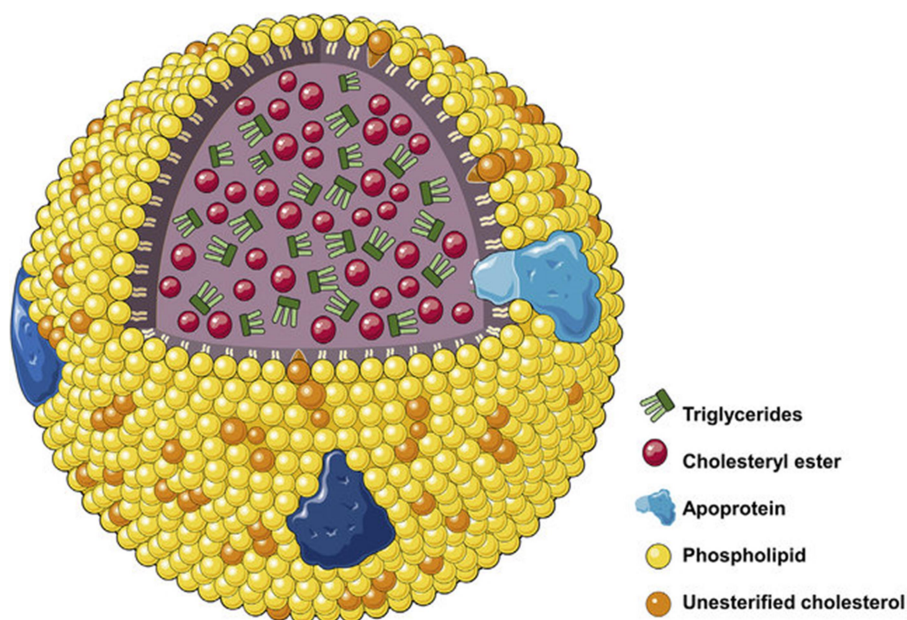
endotelnim ćelijama. Ovi efekti zajedno indukuju vazorelaksaciju i djeluju ateroprotektivno na vaskularni endotel [71-73]. Dakle, dok su ceramidi povezani sa inhibicijom ćelijskog ciklusa, apoptozom i izazivanjem ćelijskog stresa, S1P olakšava proliferaciju i preživljavanje ćelija, kao i anti-apoptotsku signalizaciju. Ove različite aktivnosti naglašavaju divergentne uloge ceramida i S1P u ćelijskim i molekularnim kontekstima.

Dodatno, angiogeni S1P je lipidni medijator koji je u cirkulaciji dominantno povezan sa HDL česticama (65-80%) i albuminom. Apolipoprotein putem kog S1P ostvaruje interakciju sa HDL česticama je apolipoprotein M (engl. *apolipoprotein M*, apoM) [74]. Upravo je S1P vezan za HDL (HDL-S1P) dobro poznat po svojim ateroprotektivnim ulogama. HDL-S1P ima ulogu u održavanju vaskularne barijere [74,75], stimuliše preživljavanje, proliferaciju i migraciju endotelnih i vaskularnih glatko-mišićnih ćelija, i učestvuje u regulaciji vaskularnog tonusa aktivirajući NO sintazu i sintezu prostaglandina I₂ [76,77]. S1P se izdvojio kao potencijalni marker koji bi mogao imati značaja u patogenezi preeklampsije, a naročito mjerenje nivoa S1P vezanog za različite nosače u zdravim i rizičnim trudnoćama može poslužiti kao bolji prediktor nastanka različitih komplikacija u trudnoći, uključujući preeklampsiju [78]. S druge strane, sfingomijelini i ceramidi su uglavnom povezani sa LDL česticama, što ukazuje na aterogena svojstva ovih sfingolipida [79]. Rezultati prethodnih studija su pokazali da su neki od molekula iz grupe sfingomijelina i ceramida (ceramid C14:0 (engl. *ceramide C14:0*, Cer C14:0), ceramid C16:0 (engl. *ceramide C16:0*, Cer C16:0), ceramid C24:1 (engl. *ceramide C24:1*, Cer C24:1), sfingomijelin C16:0 (engl. *sphingomyelin C16:0*, SM C16:0) i sfingomijelin C18:0 (engl. *sphingomyelin C18:0*, SM C18:0)) bili povišeni kod žena sa preeklampsijom u poređenju sa ženama sa fiziološkom trudnoćom, pa su izdvojeni kao potencijalni biomarkeri ove komplikacije trudnoće [80,81]. Međutim, i dalje ne postoji dovoljno literaturnih podataka o longitudinalnim promjenama sfingolipida tokom trudnoća u kojima se razvija preeklampsija, a uz to ni uloga sfingolipida u patogenezi preeklampsije nije u potpunosti razjašnjena.

1.7.4 Struktura i funkcija HDL čestica u trudnoći bez komplikacija i preeklampsiji

Kao što je prethodno i navedeno, povećanje koncentracije HDL holesterola je jedna od specifičnosti hiperlipidemije u trudnoći [47]. Nasuprot tome, rezultati prethodnih studija su pokazali da u preeklampsiji ne dolazi do očekivanog porasta u koncentraciji HDL holesterola početkom 2. trimestra trudnoće [48], ali mehanizmi iza ovih promjena kod trudnica sa preeklampsijom nisu dovoljno ispitani.

HDL (Slika 5) obuhvata heterogenu grupu čestica koji se razlikuju po veličini, gustini, elektroforetskoj pokretljivosti i sadržaju apolipoproteina [82]. Masenom spektrometrijom je otkriveno da u sastav HDL čestice ulazi više od 100 različitih proteina, a analizom lipidoma ove čestice identifikovano je više od 200 različitih lipidnih vrsta [83,84]. HDL čestice imaju ključnu ulogu u metabolizmu holesterola, odnosno u reverznom transportu holesterola od perifernih tkiva ka jetri, što je i osnov njihovog antiaterogenog dejstva [85]. Međutim, poznato je da ove lipoproteinske čestice posjeduju i niz drugih ateroprotektivnih svojstava, uključujući antioksidativne, anti-inflamatorne, vazodilatatorne, antitrombotske i citoprotektivne funkcije [86-89]. HDL sprečava *in vivo* oksidaciju LDL čestica [86], inhibira ekspresiju adhezivnih molekula na endotelnim ćelijama i sprečava migraciju monocita u arterijski zid [87], stimuliše sintezu NO [87], aktivaciju prostaciklin sintaze [88] i sprečava apoptozu endotelnih ćelija [89].



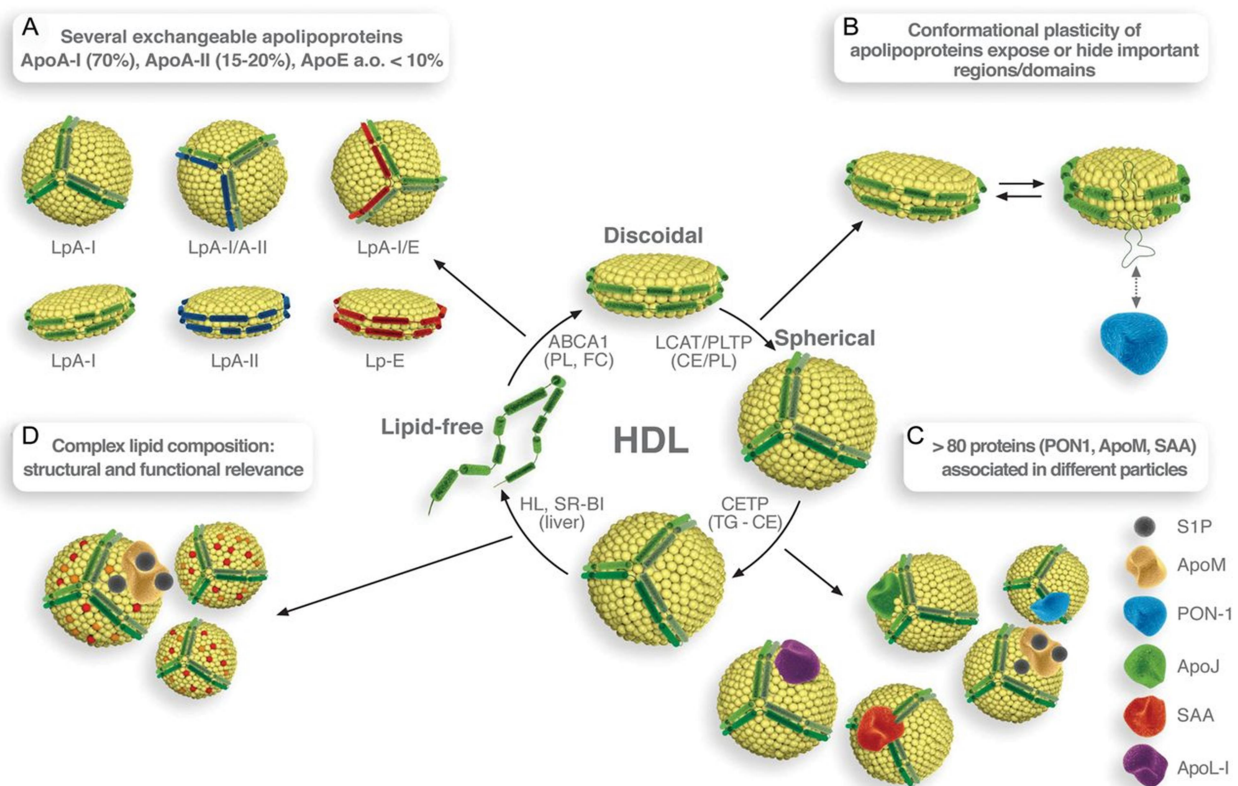
Slika 5 Uopšteni prikaz strukture HDL čestice. (Preuzeto iz: Nazir S, Jankowski V, Bender G, Zewinger S, Rye KA, van der Vorst EP. Interaction between high-density lipoproteins and inflammation: Function matters more than concentration!. Adv Drug Deliv Rev. 2020; 159:94-119)

Ultracentrifugiranjem se mogu izdvojiti dvije subpopulacije HDL čestica – HDL2 i HDL3, a drugim separacionim metodama, poput elektroforeze na poliakrilamidnom gradijentu, te dvije subpopulacije se mogu podijeliti dalje na subfrakcije - HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b i HDL3c. HDL2 subpopulaciju čine veće HDL čestice, manje gustine (relativna gustina 1,063 – 1,125 g/mL), koje su bogate holesterolom. Sa druge strane, HDL3 čestice su male čestice velike gustine (relativna gustina 1,125 – 1,21 g/mL) diskoidalnog i sferičnog oblika, koje imaju manji procenat lipida, a veći procenat proteina u poređenju sa HDL2 subfrakcijama [90]. Dugo se smatralo da veće HDL2 čestice imaju veći ateroprotektivni potencijal u poređenju sa manjim HDL3 česticama [91]. Danas se zna da su i male HDL čestice kod zdravih ljudi vrlo efikasne, tj. učinkovito promoviraju efluks holesterola i imaju očuvane druge protektivne funkcije [91]. U stanjima hipertrigliceridemije HDL čestice bivaju obogaćene trigliceridima, čime njihov dijametar postaje manji, ali funkcionalnost slabija [90]. Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da sam podatak o veličini čestice nije dovoljan da bi se u potpunosti definisala njena ateroprotektivnost, odnosno funkcionalnost. Dodatno, modifikacija proteinskih komponenti HDL-a pod uticajem oksidativnog stresa, kao npr. kod hronične inflamacije, može dovesti do transformacije HDL-a u inflamatornu česticu [91]. *Einbinder* i sar. [88] su uočili da se HDL izolovan kod žena sa preeklampsijom razlikuje u sastavu i funkciji, kao i da ga karakteriše gubitak vazoprotektivnih karakteristika u poređenju sa HDL česticama žena sa trudnoćom bez komplikacija. HDL čestice kod trudnica sa preeklampsijom su bile većeg dijametara, sadržale su više apolipoproteina A1 (engl. *apolipoprotein A-I*, apoA-I), a aktivnost enzima paraoksonaze 1 (engl. *paraoxonase 1*, PON1) je bila snižena [88]. Imajući u vidu složenost interakcija između strukture i funkcije HDL čestica, teško je procijeniti funkcionalnost HDL-a određivanjem koncentracije HDL holesterola, već je potrebno ispitati promjene u koncentraciji specifičnih lipidnih komponenti HDL-a, kao i koncentraciju proteinskih komponenti koje zajedno sa lipidima determinišu funkcionalnost ovog lipoproteina.

Sazrijevanje HDL čestica je složen proces koji se sastoji od preuzimanja, esterifikacije i razmjene holesterola sa drugim lipoproteinskim česticama, a varijacije u sadržaju holesterola u HDL čestici su

odraz njene metaboličke transformacije. Prekursori holesterola i fitosteroli su široko prihvaćeni kao plazmatski markeri ukupnog metabolizma holesterola [52,53], a NHS izmjereni u izolovanoj HDL frakciji su nedavno predloženi kao značajni indikatori metabolizma HDL čestica. NHS u HDL frakciji (NHS_{HDL}) odražavaju udio endogenog, tj. sintetisanog, i egzogenog, tj. apsorbovanog, holesterola, koji se prenosi u sklopu HDL čestica [92]. Shodno tome, određivanje NHS_{HDL} bi moglo biti korisno za bolje razumijevanje metabolizma HDL čestica tokom trudnoće sa ili bez komplikacija. Do sada još uvijek nisu rađene studije koje su se bavile proučavanjem sadržaja NHS_{HDL} kod trudnica sa preklampsijom.

Lecitin-holesterol aciltransferaza (engl. *lecithin:cholesterol acyltransferase*, LCAT) i CETP su ključni enzimi u procesu sazrijevanja HDL čestica. Esterifikovanjem slobodnog holesterola koji se nalazi na površini HDL-a, LCAT omogućava prenos novonastalih estera holesterola u jezgro čestice i formiranje zrelih sferičnih HDL čestica [93]. CETP katalizuje reakciju u kojoj se estri holesterola razmjenjuju za trigliceride između VLDL partikula bogatih trigliceridima i HDL i LDL čestica [94]. Kako trudnoću prati značajno povećanje koncentracije triglicerida, u trudnoćama bez komplikacija se obično uočava i porast aktivnosti CETP [47]. Iako su promjene u aktivnosti CETP detaljno opisane u fiziološkoj trudnoći [47] i nekim komplikacijama kod majke i fetusa [95], nedostaju istraživanja vezana za ispitivanje aktivnosti ovog enzima ključnog za remodelovanje HDL čestica kod žena sa preklampsijom.



Slika 6 Složenost i heterogenost HDL čestice i njen metabolizam. (Preuzeto iz: Kratzer A, Giral H, Landmesser U. High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Res.* 2014; 103(3): 350-61)

Kao jedna od najznačajnijih komponenti proteoma HDL čestice izdvaja se apoA-I. ApoA-I je neophodan za normalno sazrijevanje i metabolizam HDL-a [91]. Interakcijom sa različitim receptorima i

transporterima, ovaj apolipoprotein dovodi do stimulacije reverznog transporta holesterola, a djeluje i kao kofaktor za LCAT, čime dodatno stimulira efluks holesterola iz perifernih tkiva [96].

Druga značajna komponenta proteoma HDL-a je PON1. PON1 je HDL esteraza koja je odgovorna za najveći dio antioksidativnih svojstava HDL čestice. Vezana je za HDL kroz interakciju sa apoA-I, koji promovira stabilnost samog enzima [97]. S druge strane, nedavno je pokazano da bi PON1 mogao uticati na homeostazu holesterola putem efekta na povećanje kapaciteta HDL-a da posreduje u efluksu holesterola [98,99]. Snižena aktivnost PON1, uočena kod trudnica sa preeklampsijom [88], se povezuje sa povećanim rizikom od razvoja kardiovaskularnih oboljenja.

2 Ciljevi istraživanja

Uprkos napretku u razjašnjavanju patofizioloških mehanizama uključenih u razvoj preeklampsije, procjena rizika za razvoj ove komplikacije trudnoće, kao i njena terapija još uvijek predstavljaju veliki izazov u kliničkoj praksi. Porođaj je i danas jedina efikasna terapija, a kliničari najveću pažnju pridaju pravovremenom otkrivanju trudnica koje imaju visok rizik da će razviti ovu komplikaciju u cilju njihovog intenzivnijeg laboratorijskog i kliničkog praćenja i odlaganja manifestacije bolesti. U kliničkoj praksi rizik za razvoj preeklampsije se i dalje najčešće procjenjuje na osnovu tradicionalnih faktora rizika koji uključuju demografske karakteristike i faktore rizika prisutne kod majke. Međutim, pomenuti markeri imaju niske pozitivne prediktivne vrijednosti, pa su danas istraživanja usmjerena ka identifikaciji demografskih faktora, biohemijskih markera i biofizičkih karakteristika, koji bi rano u toku trudnoće mogli ukazati na kasniji razvoj preeklampsije.

Kako kardiovaskularne bolesti i preeklampsija dijele niz zajedničkih faktora rizika (endotelna disfunkcija, hipertenzija, dijabetes i sistemski inflamatorni odgovor niskog stepena), a poremećaji u metabolizmu lipida i lipoproteina se smatraju ključnim faktorima u patogenezi ateroskleroze i daljem razvoju kardiovaskularnih bolesti, savremeni pristup u rasvjetljavanju patogeneze preeklampsije zahtjeva detaljnije ispitivanje promjena u metabolizmu lipida, kao i njihovog značaja u predikciji rizika za razvoj ove komplikacije trudnoće. Promjene u koncentraciji osnovnih parametara lipidnog profila tokom trudnoće sa i bez komplikacija su dobro poznate, ali skoro da nema istraživanja koja su se bavila mehanizmima koji stoje iza ovih promjena. Dodatno, analiza rezultata prethodnih studija je ukazala na to da tradicionalni parametri lipidnog profila nisu dovoljno osjetljivi markeri promjena u metabolizmu holesterola koje prethode razvoju preeklampsije, te postoji naučna potreba za detaljnijom analizom specifičnih jedinjenja iz grupe lipida.

Cilj ovog istraživanja je bilo longitudinalno praćenje specifičnih komponenti lipidoma kod žena sa visokorizičnom trudnoćom. Ispitivane su razlike u specifičnim elementima lipidoma između ispitanica kod kojih je došlo do razvoja preeklampsije i onih ispitanica koje uprkos postojanju rizika nisu razvile ovo stanje i analiziran je dijagnostički značaj ispitivanih parametara.

Specifični ciljevi su bili sljedeći:

- Razvoj i validacija metode na tačnom hromatografu visoke efikasnosti spregnutom sa tandem masenim detektorom (engl. *high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry*, HPLC-MS/MS) za određivanje izdvojenih predstavnika iz grupe sfingolipida u plazmi;
- Longitudinalno praćenje koncentracije osnovnih parametara lipidnog profila (ukupnog holesterola, triglicerida, HDL i LDL holesterola), koncentracije markera sinteze i apsorpcije holesterola, tj. NHS u serumu i koncentracije izdvojenih sfingolipida u plazmi u četiri tačke tokom trudnoće (sredina prvog trimestra, sredina drugog trimestra, sredina trećeg trimestra i neposredno pred porođaj) kod trudnica sa visokorizičnom trudnoćom koje nisu razvile preeklampsiju i trudnica koje su razvile preeklampsiju sa kasnim početkom;
- Ispitivanje postojanja razlike u koncentraciji osnovnih parametara lipidnog profila između trudnica sa visokorizičnom trudnoćom koje nisu razvile preeklampsiju i trudnica koje su razvile kasnu preeklampsiju u sve četiri tačke ispitivanja;

- Utvrđivanje postojanja različitih obrazaca sinteze i apsorpcije holesterola kod žena sa visokorizičnom trudnoćom koje nisu razvile preeklampsiju i trudnica koje su razvile preeklampsiju sa kasnim početkom;
- Karakterizacija metaboličkog profila tri grupe sfingolipida (SIP, ceramida i sfingomijelina) kod žena sa visokorizičnom trudnoćom koje nisu razvile preeklampsiju i trudnica koje su razvile preeklampsiju sa kasnim početkom;
- Ispitivanje metabolizma HDL čestica kroz analizu zastupljenosti NHS u serumskoj HDL frakciji, aktivnosti glavnih modulatora sadržaja holesterola u HDL česticama (LCAT, CETP) i ključnih HDL funkcionalnih proteina (apoA-I, apoM) u četiri tačke tokom trudnoće kod trudnica sa visokorizičnom trudnoćom koje nisu razvile preeklampsiju i trudnica koje su razvile preeklampsiju sa kasnim početkom;
- Utvrđivanje obrasca promjena u sastavu HDL čestica, čime bi se izdvojili potencijalni novi biomarkeri koji se povezuju sa razvojem preeklampsije sa kasnim početkom;
- Formiranje modela za procjenu rizika za razvoj preeklampsije i ispitivanje njihove dijagnostičke tačnosti.

3 Materijal i metode

3.1 Dizajn studije

Studija je dio većeg projekta koji finansira Fond za nauku Republike Srbije, a pod nazivom „*High-density lipoprotein metabolome research to improve pregnancy outcome – HI-MOM*“ (grant br. #7741659). Studija je sprovedena kao retrospektivna kohortna studija, a uzorkovanje je vršeno u četiri tačke tokom longitudinalnog praćenja. Sistematski smo pratili 90 žena tokom njihovih trudnoća. Sve ispitanice su uključene u studiju kada su se javile radi praćenja trudnoće u Ginekološko-akušersku kliniku „Narodni Front“ u Beogradu. Etička saglasnost za studiju je dobijena od strane Etičkog odbora Ginekološko-akušerske klinike „Narodni Front“, pod referentnim brojem 05006-2020-10738, Etičke komisije Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod brojem 1322/VII-27 i Etičkog odbora za biomedicinska istraživanja Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod referentnim brojevima 1156/2 i 1385/2. Sve ispitanice su potpisale informisani pristanak za učešće u studiji. Ova studija se strogo pridržavala propisanih smjernica za istraživanje koje uključuje ljudske subjekte i sprovedena je u skladu sa etičkim principima utvrđenim od strane Svjetske medicinske asocijacije u Helsinškoj deklaraciji. Uzorkovanje krvi, kao i sve eksperimentalne procedure, su sprovedene u skladu sa odgovarajućom nacionalnom regulativom, politikom institucije i etičkim smjericama propisanim Helsinškom deklaracijom.

3.2 Ispitivana populacija

Učesnice u studiji koje su identifikovane kao trudnice sa potencijalno visokorizičnom trudnoćom su podvrgnute ranom skriningu za preeklampsiju između 11. nedelje (+0 dana) i 13. nedelje (+6 dana) gestacije. Ovaj period gestacije je ciljano izabran prema procedurama Ginekološko-akušerske klinike „Narodni Front“, kako bi se obezbjedilo pravovremeno kliničko praćenje, uz intenzivan nadzor i blagovremeno pristupilo liječenju.

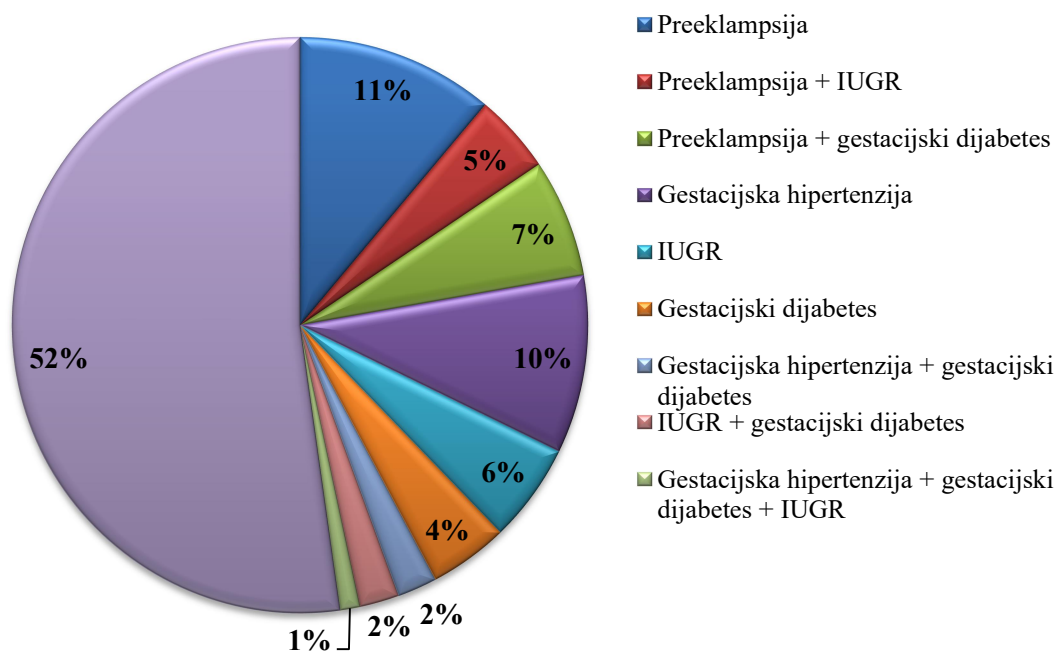
Žene sa visokorizičnom trudnoćom su identifikovane na osnovu nedovoljnog protoka krvi kroz arterije materice ili postojećeg, *a priori* rizika za razvoj preeklampsije u trudnoći, koji je procijenjen na osnovu NICE smjernica [37]. Trudnica je morala imati jedan ili više faktora visokog rizika ili najmanje dva faktora umjerenog rizika da bi se svrstala u kategoriju ispitanica sa visokorizičnom trudnoćom. Prema NICE smjericama, faktori visokog rizika su: hronična hipertenzija, prethodni hipertenzivni poremećaji u trudnoći, hronična bolest bubrega, dijabetes tip 1 i tip 2 i prisustvo autoimune bolesti. Faktori umjerenog rizika uključivali su starost majke preko 40 godina, prvrotke, interval između trudnoća duži od deset godina, ITM jednak ili veći od 30 kg/m² prilikom prve posjete klinici i porodičnu istoriju preeklampsije. Kriterijumi za isključivanje iz studije bili su: višeploidne trudnoće, istorija spontanih pobačaja ili abortusa, infektivne bolesti, pogoršanje postojećih autoimunih stanja tokom trudnoće i pozitivna istorija malignih oboljenja.

Iako je primarni fokus bio na dijagnostikovanju preeklampsije, studija je takođe obuhvatila pažljivo praćenje pojave drugih komplikacija trudnoće, uključujući hipertenzivne poremećaje u trudnoći (gestacijska hipertenzija, hipertenzija sa superponiranom preeklampsijom), IUGR i gestacijski dijabetes.

U studiju je prvobitno uključeno 114 žena za koje je procijenjeno da imaju visokorizičnu trudnoću, ali 90 trudnica je ispraćeno tokom cijele trudnoće. Iz studije su isključene 24 žene: 16 trudnica je odustalo od studije, četiri trudnice su isključene zbog pobačaja, a četiri usljed razvoja fetalnih anomalija.

Od 90 žena koliko je ispraćeno kroz četiri tačke, njih 20 (22,2%) je ispoljilo kliničke znakove preeklampsije do kraja gestacije. Deset trudnica je razvilo preeklampsiju kao jedinu komplikaciju, dok je preostalih deset pored preeklampsije imalo i sekundarne komplikacije – četiri su razvile IUGR, a njih šest je imalo i gestacijski dijabetes pored preeklampsije. Svim ispitanicama je dijagnostikovana preeklampsija sa kasnim početkom, pri čemu se 16 trudnica porodilo između 34. i 37. nedelje gestacije, a četiri poslije 37. nedelje. Iako 70 žena (77,8%) nije razvilo preeklampsiju uprkos postojećem riziku, neke od njih su razvile druge komplikacije trudnoće. Od tih 70 žena, devet je imalo samo gestacijsku hipertenziju, pet ih je razvilo IUGR, četiri su imale gestacijski dijabetes, dvije žene su imale gestacijsku hipertenziju i gestacijski dijabetes, a dvije su razvile IUGR i gestacijski dijabetes u toku trudnoće, dok je jedna žena imala tri komplikacije trudnoće – gestacijsku hipertenziju, gestacijski dijabetes i IUGR. Pored toga, jedna žena je imala dijabetes tip 1, a tri žene su imale dijabetes tip 2 prije trudnoće. Četrdeset sedam žena je završilo trudnoću bez razvoja komplikacija (Slika 7).

Relativna zastupljenost komplikacija trudnoće u ispitivanoj populaciji



Slika 7 Relativna zastupljenost komplikacija trudnoće u ispitivanoj populaciji

Za potrebe studije, žene su klasifikovane u dvije grupe na osnovu primarnog ishoda koji je praćen, i to u grupu trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG), koja nije razvila preeklampsiju, i grupu trudnica sa preeklampsijom (PG).

3.3 Biološki materijal

Sve ispitanice su bile sistematski praćene u četiri različite tačke tokom gestacije: početna procjena je obavljena u prvom trimestru (između 11. i 14. nedelje gestacije), druga u drugom trimestru (između 22. i 25. nedelje gestacije), treća u trećem trimestru (između 28. i 32. nedelje gestacije), a posljednja procjena je sprovedena prije porođaja (između 35. i 38. nedelje gestacije). Uzorci venske krvi su uzimani na tašte, nakon noćnog gladovanja u trajanju od najmanje 12 sati, i pažljivo su prikupljeni u označene epruvete za izdvajanje seruma (epruveta bez antikoagulansa) i plazme (sa EDTA kao antikoagulansom) (*Beckton, Dickinson and Company*, Nju Džersi, SAD). Nakon prikupljanja uzorci krvi su centrifugirani na 1500 x g u trajanju od 10 minuta kako bi se odvojili serum ili plazma. Serum i plazma su zatim alikvotirani i čuvani na temperaturi od -80 °C do dalje analize.

3.4 Metode

3.4.1 Antropometrijska mjerenja i klinički parametri

Kao mjera protoka krvi kroz arterije materice korišten je srednji pulsatilni indeks uterinih arterija (engl. *Mean Pulsatile Index of the Uterine Arteries*, MPI-UtA). Upotrebom pulsog kolor doplera mjereni su pulsatilni indeksi lijeve i desne uterine arterije, a potom je izračunavana srednja vrijednost kako bi se dobio MPI-UtA. U svim tačkama ispitivanja mjerene su visina i tjelesna masa trudnica i izračunavan je ITM prema sljedećoj formuli [100]:

$$ITM = \frac{\text{tjelesna masa (kg)}}{\text{visina}^2 (\text{m}^2)}$$

Protokol studije je uključivao i mjerenje krvnog pritiska (SKP i DKP) na standardizovan način. Nakon toga, SAP je izračunat upotrebom formule [101]:

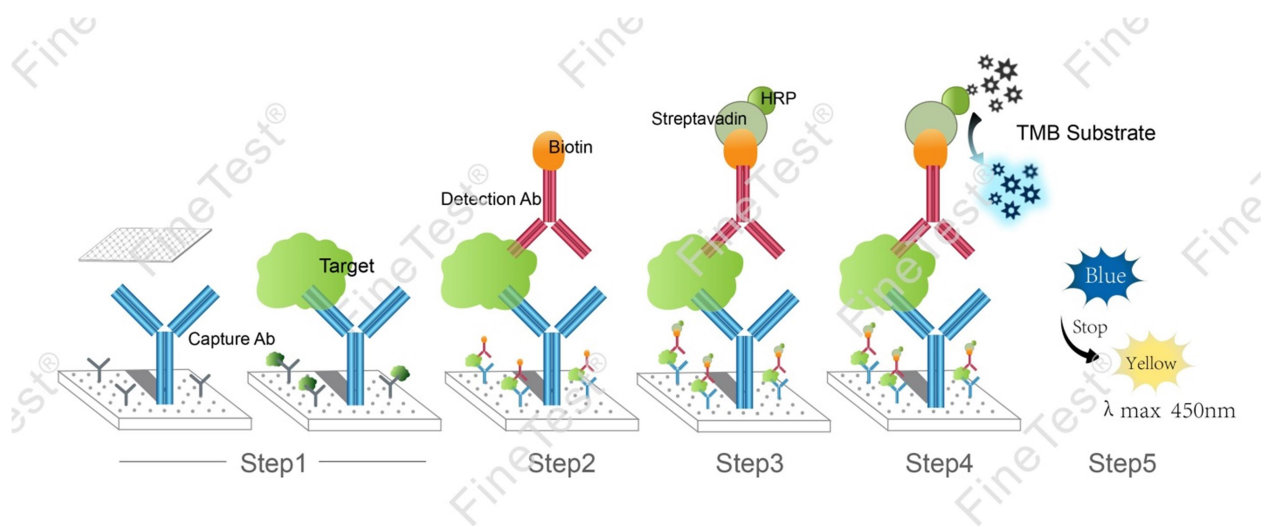
$$SAP = \frac{SKP + 2 \times DKP}{3}$$

3.4.2 Osnovni biohemijski parametri

Koncentracije rutinskih biohemijskih parametara (glukoze, ukupnih proteina, uree, kreatinina, ukupnog holesterola, triglicerida i HDL holesterola), kao i aktivnost enzima aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT) određivani su komercijalnim testovima (*Beckman Coulter*, Kalifornija, SAD) na automatskom biohemijskom analizatoru AU480 (*Beckman Coulter*, Kalifornija, SAD). Koncentracija LDL holesterola je izračunavana primjenom Friedwald-ove formule [102]. Kod žena kod kojih nije bilo moguće upotrebiti Friedwald-ovu formulu zbog visoke koncentracije triglicerida, koncentracija LDL holesterola je određena komercijalnim testovima istog proizvođača (*Beckman Coulter*, Kalifornija, SAD). Masena koncentracija apoA-I je mjerena komercijalnim testom (*Beckman Coulter*, Kalifornija, SAD). PAPP-A, PlGF-1 i sFlt-1 su određeni komercijalnim testovima na imunohemijskom analizatoru *Kryptor Compact Plus* (*ThermoFisher Scientific BRAHMS GmbH*, Henigsdorf, Njemačka).

3.4.3 ApoM

Masena koncentracija apoM u serumu trudnica je određivana tehnikom „sendvič“ enzimskog imunoeseja (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) upotrebom komercijalnog kita *FineTest® Human APOM (Apolipoprotein M) ELISA kit* (*FineTest*, Vuhan, Hubei, Kina). Ploča iz komercijalnog kita je obložena anti apoM antitijelima. Nakon inkubacije standarda i uzoraka sa endogenim apoM, dodaje se detekciono antitijelo obilježeno biotinom i na taj način se formira „sendvič“. Višak antitijela se uklanja ispiranjem i dodaje se kompleks peroksidaza – streptavidin. Po dodatku supstrata za enzim peroksidazu dolazi do razvoja boje, čiji je intenzitet srazmjeran koncentraciji apoM u uzorku (Slika 8). Limit detekcije (engl. *limit of detection*, LOD) ovog testa je 0,75 ng/mL, a opseg linearnosti je od 1,25 do 80 ng/mL. Koeficijent varijacije (KV) za metodu je, prema deklaraciji proizvođača, manji od 20%.



Slika 8 Shematski prikaz postupka izvođenja FineTest® Human APOM (Apolipoprotein M) ELISA testa

3.4.4 Neholesterolski steroli (NHS) u serumu i HDL frakciji (NHS_{HDL})

3.4.4.1 Reagensi, aparatura i priprema laboratorijskog posuđa

Prekursori holesterola (dezmosterol, 7-dehidroholesterol i latosterol) i markeri apsorpcije holesterola (kampesterol i β -sitosterol) u serumu i HDL frakciji kvantifikovani su HPLC-MS/MS metodama koje su prethodno implementirane i validirane u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju [103]. Za identifikaciju pikova dezmosterola, 7-dehidroholesterola, latosterola, kampesterola i β -sitosterola korišteni su analitički standardi HPLC čistoće (*Supelco*, Belfont, Pensilvanija, SAD), a kao interni standard je korišten d6-holesterol (HPLC čistoće) proizvođača *Sigma Aldrich* (*St. Louis*, Misuri, SAD). Korišteni su kalijum hidroksid (KOH) proizvođača *POCH* (*Centre Valley*, Pensilvanija, SAD), a etanol, metanol, n-heksan i acetontril (svi HPLC čistoće) proizvođača *Fisher* (*Pittsburg*, Pensilvanija, SAD).

Za razdvajanje NHS korištena je Poroshell 120 EC kolona (2,5 μ m, 4,6 x 150 mm) (*Agilent Technologies*, Santa Klara, Kalifornija, SAD). Za izdvajanje seruma bez apolipoproteina B (engl.

apolipoprotein B, apoB) frakcije korišten je komercijalni reagens za precipitaciju apoB (*Biosystems*, Barselona, Španija), koji sadrži fosfovolframat (0,4 mmol/L) i magnezijum-hlorid (20 mmol/L).

3.4.4.2 Priprema uzoraka za određivanje NHS i NHS_{HDL}

U staklene konusne epruvete, prethodno obložene internim standardom, dodaje se po 100 µL seruma. Nakon kratkog miješanja na vorteks mješalici, u epruvete se dodaje po 1 mL 2% KOH u etanolu i smješa se vorteksira 15 sekundi kako bi se omogućila precipitacija proteina. U narednom koraku smješa se inkubira 30 minuta na 45 °C, pri čemu dolazi do alkalne hidrolize sterolskih estara. Nakon hlađenja do sobne temperature, svakom uzorku se dodaje po 500 µL dejonizovane vode HPLC čistoće, a potom i 2 mL n-heksana i smješa se energično vorteksira 30 sekundi. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 1500 x g izdvajaju se dva sloja, a gornji sloj se pažljivo prenosi u čistu staklenu epruvetu. Proces ekstrakcije heksanom se ponavlja tri puta, a svi organski slojevi se sakupljaju u istu epruvetu. Višak KOH iz izdvojenog organskog ekstrakta se ispira dodavanjem 4 mL dejonizovane vode HPLC čistoće i dodatnim centrifugiranjem 5 minuta na 1500 x g. Ekstrakt se potom pažljivo prenosi u novu čistu staklenu epruvetu (prethodno ispranu heksanom) i suši u struji azota do suva. Suvi ostatak se rekonstituiše u 20 µL metanola HPLC čistoće. U posljednjem koraku, 10 µL metanolnog ekstrakta se injektuje u kolonu. Nakon analize koncentracije NHS se izračunavaju iz odgovarajućih kalibracionih krivih i koriguju u odnosu na faktor ukoncentrisavanja.

Ukoliko se odeduju NHS_{HDL} protokol za pripremu uzorka uključuje i korak izdvajanja seruma bez apoB. Da bi se izdvojio serum bez apoB čestica, 200 µL seruma se dodaje u 500 µL komercijalnog taložnog reagensa (*BioSystems*, Barselona, Španija). Nakon temeljnog miješanja na vorteks mješalici, smješa se inkubira 10 minuta na sobnoj temperaturi, a potom centrifugira na 6000 x g 10 minuta. U sljedećem koraku, 650 µL supernatanta, koji sadrži HDL frakciju seruma, se izdvaja i prenosi u staklenu konusnu epruvetu prethodno obloženu internim standardom. Nakon toga slijedi prethodno opisana procedura za pripremu uzoraka koja podrazumijeva korake precipitacije proteina, saponifikacije sterolskih estara, ekstrakcije, desalinizacije, sušenja i rekonstituisanja ekstrakta. Koncentracije se kao i za ukupne NHS u serumu izračunavaju iz odgovarajućih kalibracionih krivih i koriguju za faktor razblaživanja uzorka reagensom za precipitaciju (faktor 3,5) i ukoncentrisavanje uzorka uparavanjem (faktor 10).

3.4.4.3 Instrumentalni uslovi metoda za određivanje NHS i NHS_{HDL}

Razdvajanje NHS se vrši na C18 analitičkoj koloni Poroshell 120 EC (2,5 µm, 4,6 x 150 mm) (*Agilent Technologies*, Santa Klara, SAD). Hromatografski uslovi su podrazumijevali izokratsko eluiranje sa konstantnim protokom mobilne faze od 0,6 mL/min i temperaturom kolone od 30 °C u trajanju od 45 minuta. Mobilnu fazu je činila smješa acetonitril: metanol: voda sa 0,1% mravlje kiseline u odnosu 80: 18: 2 (v/v). Separacija je izvršena na tečnom hromatografu Agilent 1290 (*Agilent Technologies*, Santa Klara, Kalifornija, SAD), a kvantifikacija praćenjem višestrukih reakcija (engl. *multiple reaction monitoring*, MRM) na tandem masenom spektrometru model Agilent 6420 (*Agilent Technologies*, Santa Klara, Kalifornija, SAD) opremljenom MMI (engl. *multiple-mode*) jonskim izvorom, tj. integrisanim jonskim izvorom za hemijsku jonizaciju pod atmosferskim pritiskom (engl. *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) i elektrosprej jonskim izvorom (engl. *electrospray ionization*, ESI). Za potrebe ove metode korišten je APCI mode MMI jonskog izvora. U tabeli 1 su prikazane m/z tranzicije i kolizije energije za svaki od ispitivanih analita. Uslovi na masenom spektrometru su bili sljedeći: temperatura gasa 325 °C, temperatura isparavanja 250 °C, protok gasa od

5 L/min, pritisak raspršivača od 30 psi, pozitivni kapilarni napon 2000 V, pozitivna struja korone 4 μ A i pozitivno punjenje od 2000 V.

Tabela 1 Retenciona vremena i instrumentalni uslovi na MS/MS za interni standard i NHS

Analit	Retenciono vrijeme (min)	MRM tranzicije (m/z)	Koliziona energija (eV)
d6-holesterol (IS)	30,437	375,3→105,2/95,2/81,3	50/35/52
Dezmosterol	20,329	367,2→95,3/81,2	52/52
7-dehidroholesterol	23,668	367,3→131,3/105,3/81,2	40/50/50
Latosterol	29,495	369,4→107/95/81,4	40/40/47
Kampesterol	36,444	383,2→161/135,3/81,3	20/20/40
β -sitosterol	43,469	397,3→95,69,4/107	40/40/40

IS – interni standard

3.4.4.4 Osjetljivost i linearnost metoda za određivanje NHS i NHS_{HDL}

Opseg linearnosti za dezmosterol je od 5,00 do 72,34 μ mol/L, a LOD za nivo dezmosterola u serumu je 0,06 μ mol/L, a u HDL frakciji 0,009 μ mol/L. Limit kvantifikacije (engl. *limit of quantification*, LOQ) za ukupni dezmosterol u serumu je 0,20 μ mol/L, a u HDL frakciji 0,031 μ mol/L. Opseg linearnosti za 7-dehidroholesterol je od 5,56 do 37,96 μ mol/L. LOD za 7-dehidroholesterol u serumu je bio 0,07 μ mol/L, a u HDL frakciji 0,011 μ mol/L, a LOQ za koncentraciju u serumu je 0,22 μ mol/L, a u HDL frakciji 0,034 μ mol/L. Latosterol je linearan u opsegu od 3,56 do 530,19 μ mol/L, dok LOD za koncentraciju u serumu iznosi 0,40 μ mol/L, a za HDL frakciju 0,061 μ mol/L. Dobijeni LOQ za latosterol je 1,40 μ mol/L u ukupnom serumu i 0,215 μ mol/L u HDL frakciji. Linearnost za kampesterol se kreće u opsegu od 3,06 μ mol/L do 62,39 μ mol/L. Ispitivani LOD za kampesterol je 0,20 μ mol/L u serumu i 0,031 μ mol/L u HDL frakciji, dok je LOQ 1,20 μ mol/L u serumu i 0,185 μ mol/L u HDL frakciji. Opseg linearnosti za β -sitosterol je od 8,41 μ mol/L do 62,69 μ mol/L. LOD za β -sitosterol u serumu je 0,10 μ mol/L, u HDL frakciji 0,015 μ mol/L, dok je LOQ za serum 0,33 μ mol/L, a za HDL frakciju 0,051 μ mol/L.

Recovery za NHS u serumu je u opsegu od 89,8% do 113,1%, a za NHS_{HDL} od 85,3% do 95,8%. KV unutar serije za NHS u serumu su u opsegu od 4,7% do 10,3% za niske koncentracije i od 6,3% do 10,3% za visoke koncentracije, dok se KV između serija za NHS kreće u opsegu od 4,6% do 9,5% za niske koncentracije i 4,8% do 9,2% za visoke koncentracije. KV unutar serije za NHS_{HDL} su u opsegu od 3,6% do 8,8% za niske koncentracije i u opsegu od 8,4% do 13,6% za visoke koncentracije. Varijabilnost metode za NHS_{HDL} između serije je u opsegu od 3,5% do 5,1% za niske koncentracije i 2,5% do 9,8% za visoke koncentracije.

3.4.4.5 *Metabolički indeksi*

Metabolički indeksi su izračunavani dijeljenjem koncentracije supstrata sa koncentracijom njegovog metabolita, a predstavljaju indikatore aktivnosti enzima uključenih u proces biosinteze holesterola [63]. Odnos ukupni holesterol/ dezmosterol predstavlja surogat marker aktivnosti enzima 24-reduktaze (sterol: NADP^+ Δ 24-oksidoreduktaza), a odnos ukupni holesterol/ 7-dehidroholesterol je indikator aktivnosti enzima 7-reduktaze (holesterol: NADP^+ Δ 7-oksidoreduktaza). Odnos 7-dehidroholesterol/ latosterol je izračunavan kao indikator aktivnosti enzima latosterol oksidaze (Δ 7-sterol 5(6)- desaturaza) [63]. Dodatno, izračunavani su i odnosi koncentracije ukupnog holesterola i markera aporpcije holesterola.

3.4.5 *Metoda za kvantitativnu analizu sfingolipida u plazmi*

U okviru ovog istraživanja planiran je razvoj, optimizacija i validacija metode za određivanje izabranih molekula iz grupe sfingolipida. Za potrebe ove studije razvijena je HPLC-MS/MS metoda za određivanje sfingozina (engl. *sphingosine*, SPH), sfinganina (engl. *sphinganine*, SAPH), S1P, sfinganin-1-fosfata (engl. *sphinganine-1-phosphate*, SAPH1P), Cer C16:0, ceramida C24:0 (engl. *ceramide C24:0*, Cer C24:0) i SM C16:0.

3.4.5.1 *Reagensi, aparatura i priprema laboratorijskog posuđa*

Za identifikaciju pikova SPH, SAPH, S1P, Cer C16:0 i Cer C24:0 korišteni su analitički standardi HPLC čistoće proizvođača *Avanti Polar Lipids* (Birmingham, Alabama, SAD), dok su za SAPH1P i SM C16:0 korišteni standardi proizvođača *Cayman Chemical* (En Arbor, Mičigen, SAD). Kao interni standardi korišteni su sfingozin d17 (engl. *sphingosine d17*, SPH d17), sfingozin-1-fosfat d17 (engl. *sphingosine-1-phosphate d17*, S1P d17) i ceramid C17:0 (engl. *ceramide C17:0*, Cer C17:0) nabavljeni od proizvođača *Avanti Polar Lipids* (Birmingham, Alabama, SAD), dok je sfingomijelin C17:0 (engl. *sphingomyelin C17:0*, SM C17:0) nabavljen od proizvođača *Cayman Chemical* (En Arbor, Mičigen, SAD). SPH d17 je korišten kao interni standard za određivanje SPH i SAPH, S1P d17 za određivanje S1P i SAPH1P, Cer C17:0 je bio interni standard za određivanje Cer C16:0 i Cer C24:0, a prilikom određivanja SM C16:0 kao interni standard je služio SM C17:0. Korišten je metanol HPLC čistoće nabavljen od proizvođača *Fisher* (Pitsburg, Pensilvanija, SAD), a hloroform i amonijum formijat su kupljeni od proizvođača *Sigma Aldrich* (St. Louis, Misuri, SAD). Za potrebe istraživanja trifluorosirćetna i mravlja kiselina su nabavljeni od *Thermo Fisher Scientific* (Voltam, Masačusets, SAD).

Za hromatografsko razdvajanje sfingolipida korištena je Zorbax Eclipse Plus C8 analitička kolona (5 μm , 4,6 x 150 mm) proizvođača *Agilent Technologies* (Santa Klara, Kalifornija, SAD).

Sav laboratorijski materijal koji se koristio u preanalitičkoj i analitičkoj fazi procesa određivanja sfingolipida u plazmi je proizveden isključivo od borosilikatnog stakla ili, u slučaju materijala od plastike (npr. nastavci za pipete) od plastike visoke gustine. Procedura za pranje staklenog laboratorijskog posuđa je podrazumijevala upotrebu anjonskog deterdženta, ispiranje običnom, a potom i destilovanom vodom. Nakon toga uslijedilo bi potapanje posuđa u rastvor hrom-sumporne kiseline preko noći, ponovno ispiranje destilovanom vodom i sušenje. Cilj svih koraka u pranju laboratorijskog posuđa je bio smanjivanje uticaja od potencijalnih interferenata plastike [104] i eliminacija *carry-over*-a zbog nedovoljno opranog posuđa prilikom kvantifikacije sfingolipida. U radu su korištene staklene

konusne epruvete sa zapušačima od politetrafluoroetilena (engl. *polytetrafluoroethylene*, PFTE), koje su uoči samog početka rada ispirane hloroformom.

3.4.5.2 Priprema uzoraka za HPLC-MS/MS analizu sfingolipida u plazmi

U staklene konusne epruvete pripremljene detaljnim protokolom pranja i isprane hloroformom dodato je po 100 μ L smješe internih standarda, koju su činili SPH d17, S1P d17, Cer C17:0 i SM C17:0, a potom i upareno do suva u vakuum koncentratoru RVC 2-18 CD Plus (*Martin Christ*, Osterode, Njemačka). U epruvete koje su obložene smješom internih standarda, kako je prethodno opisano, dodaje se alikvot od 50 μ L plazme. Nakon kratkog miješanja, u konusne epruvete se dodaje po 2 mL prethodno pripremljene smješe za ekstrakciju. Smješom za ekstrakciju u ovom slučaju su činili metanol: hloroform u odnosu 2: 1 (v/v) sa 0,1% trifluorosirćetnom kiselinom. Svaka epruveta se potom snažno promiješa na vorteks mješalici u trajanju od 30 sekundi. U sljedećem koraku, u smješom se dodaje po 0,67 mL hloroforma, a sadržaj u epruvetama se nakon toga još jednom dobro promiješa na vorteks mješalici u trajanju od 30 sekundi. Dalje je potrebno u svaku epruvetu dodati po 1,15 mL dejonizovane vode HPLC čistoće kako bi se uspostavio odnos metanol: hloroform: voda 1: 1: 0,9 (v/v). Epruvete se još jednom snažno promiješaju u trajanju od 30 sekundi, a nakon toga se sve smješe podvrgnu centrifugiranju na 2000 x g na sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta. Nakon koraka centrifugiranja može doći do izdvajanja sloja proteina u međusloju između vodene i organske faze. Ekstrakt, tj. donji organski sloj, se zatim pažljivo sakuplja staklenom pipetom i prebacuje u čistu staklenu epruvetu prethodno ispranu hloroformom. Izdvojeni hloroformski ekstrakt se uparava do suva u vakuum koncentratoru. U posljednjem koraku, suvi ostatak se rekonstituiše u 30 μ L metanola HPLC čistoće. Ukoncentrisan uzorak se podvrgava dodatnom miješanju na vorteks mješalici u trajanju od 30 sekundi, a zatim i centrifugiranju na 1500 x g u trajanju od 10 minuta prije injektovanja na kolonu. U kolonu se injektuje 15 μ L uzorka. Nakon analize, koncentracije se izračunavaju iz odgovarajućih kalibracionih krivih.

3.4.5.3 Instrumentalni uslovi za kvantifikaciju sfingolipida upotrebom HPLC-MS/MS metode

Analiza svih uzoraka se izvodi pod istim hromatografskim i MS-MS uslovima. Za hromatografsko razdvajanje sfingolipida korištena je Zorbax Eclipse Plus C8 analitička kolona (5 μ m, 4,6 x 150 mm) (*Agilent Technologies*, Santa Klara, Kalifornija, SAD). Hromatografski uslovi su podrazumijevali gradijent eluiranje sa stalnim protokom mobilne faze od 0,5 mL/min. Mobilnu fazu su činile dvije komponente – komponenta A (1 mM amonijum formijat u metanolu HPLC čistoće sa 0,2% mravljom kiselinom) i komponenta B (2 mM amonijum formijat u dejonizovanoj vodi HPLC čistoće sa 0,2 % mravljom kiselinom). Početni uslovi su bili podešeni tako da je odnos komponenata mobilne faze bio 80 % komponente A i 20% komponente B. Nakon početnog, linearnog gradijenta do 90% komponente A od 0 do 10,6 minuta, komponenta A je održavana na 90 % u idućih 6 minuta. Nakon toga, primjenjen je linearni gradijent do 99% A do 66 minuta, nakon čega je uslijedio drugi linearni gradijent nazad do 80% A u periodu od 66 do 68 minuta. Konačno stanje, 80% komponente A i 20% komponente B održavano je još 7 minuta do kraja elucije. Zapremina injektovanja uzorka je 15 μ L, i svi sfingolipidi su eluirani u toku 60 minuta.

Kvantifikacija je izvršena praćenjem MRM na tandem masenom spektrometru Agilent 6420 (*Agilent Technologies*, Santa Klara, Kalifornija, SAD) opremljenom ESI jonskim izvorom. Vrijednosti m/z tranzicije za svaki od ispitivanih analita su date u tabeli 2.

Tabela 2 Retenciona vremena i instrumentalni uslovi na MS/MS za interne standarde i ispitivane sfingolipide

Analit	Retenciono vrijeme (min)	MRM tranzicije (m/z)	Kolizijska energija (eV)
SPH d17 (IS)	6,410	286,3→268,3	56
SPH	7,297	300,3→282,3	4
SAPH	7,965	302,3→284,3	8
S1P d17 (IS)	8,132	366,2→250,3	18
S1P	9,265	380,2→264,3	118
SAPH1P	9,284	382,2→284,3	125
Cer C24:0	59,977	632,61→264,2	75
Cer C17:0 (IS)	39,261	552,5→264,2	170
Cer C16:0	36,114	520,31→264,2	145
SM C16:0	33,017	703,5→184,0	24
SM C17:0 (IS)	35,933	717,6→184,0	24

IS – interni standard; SPH d17 – sfingozin d17; SPH – sfingozin; SAPH – sfinganin; S1P d17 – sfingozin-1-fosfat d17; S1P – sfingozin-1-fosfat; SAPH1P – sfinganin-1-fosfat; Cer C24:0 – ceramid C24:0, Cer C17:0 – ceramid C17:0; Cer C16:0 – ceramid C16:0; SM C16:0 – sfingomijelin C16:0; SM C17:0 – sfingomijelin C17:0

3.4.5.4 Validacija metode

Nakon što su uspostavljeni optimalni preanalitički i analitički uslovi za kvantifikaciju svih ispitivanih analita iz grupe sfingolipida, metoda je validirana prema smjernicama iz odgovarajućeg vodiča za bioanalitičke metode koji je dao Međunarodni savjet za harmonizaciju (engl. *International Council for Harmonisation*, ICH) američke Uprave za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) [105]. U okviru validacije ispitivane su sljedeće karakteristike metode: linearnost, LOD i LOQ, preciznost i tačnost.

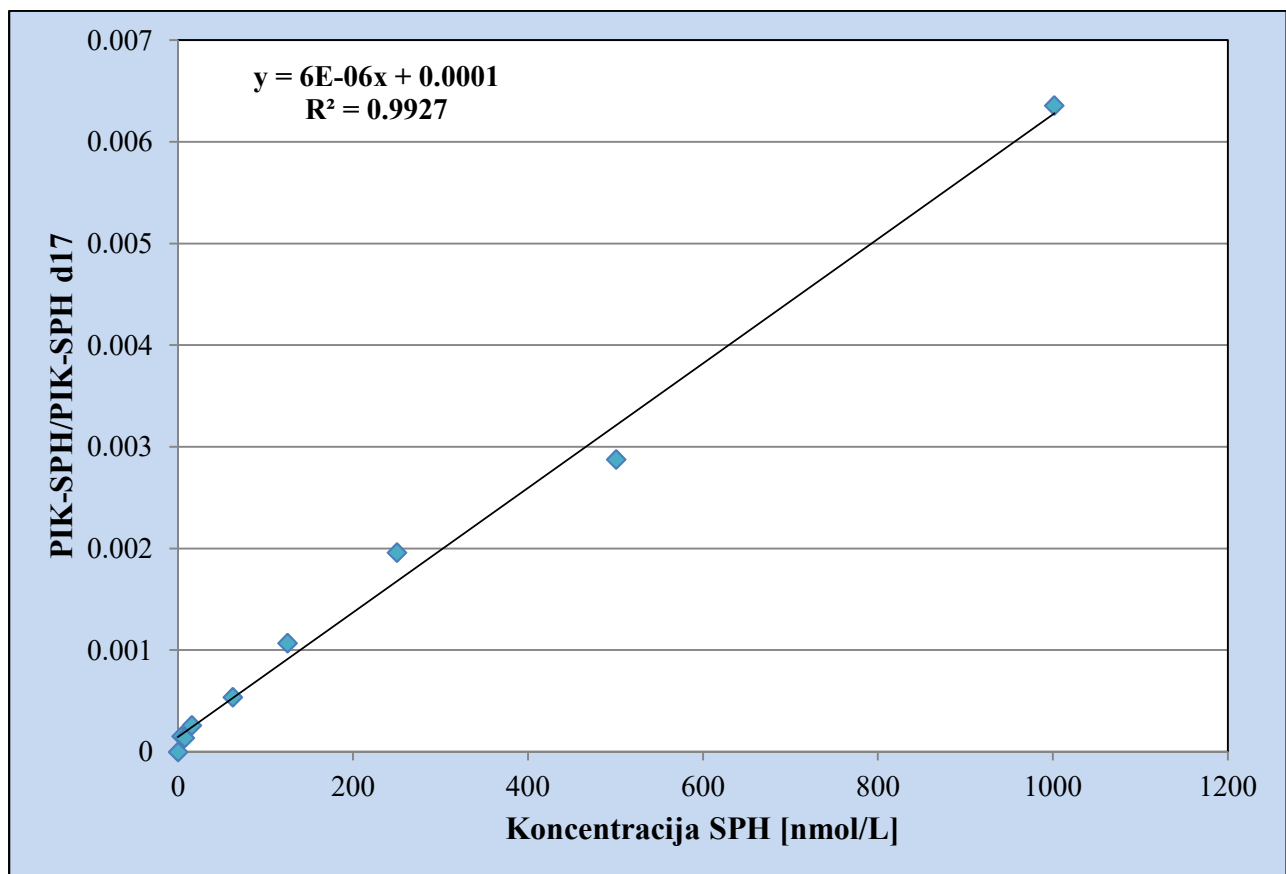
Linearnost

Nakon optimizacije kvantitativne metode, sljedeći korak procesa validacije metode podrazumijevao je ispitivanje linearnosti za sve ispitivane sfingolipide. Konstruisane su odgovarajuće kalibracione krive za svaki od ispitivanih sfingolipida. Na x-osi su prikazane dodatke koncentracije sfingolipida, a na y-osi kalibracione krive nalazi se odnos između izmjerene površine pika za svaki od sfingolipida i površine

pika za odgovarajući interni standard, dobijenih u svakom kalibracionom nivou. Pripremljeni su i analizirani svježi kalibracioni standardi u najmanje pet različitih nivoa koncentracije.

Pristupi koji su podrazumijevali kvantifikaciju sfingolipida upotrebom kalibracionih krivih kreiranih u matriksu bez supstance nisu imali zadovoljavajuću tačnost. Naime, standardne krive kreirane u rastvaračima koji nisu sadržali ispitivane analite i kalibracione krive napravljene metodom standardnog dodatka u plazmi su pokazivale postojanje proporcionalnih grešaka, a zaključak prethodnih analiza je bio da metoda standardnog dodatka, tj. kreiranje kalibracionih krivih u kompleksnom matriksu kao što je plazma daje zadovoljavajuće rezultate validacije [106]. Upotreba kalibratora sa matriksom koji odgovara matriksu bioloških uzoraka koji se ispituju je od naročitog značaja za metode koje uključuju masenu spektrometriju, s obzirom na to da matriks može uticati na proces jonizacije u jonskom izvoru i kao rezultat dati lažno negativne ili lažno pozitivne rezultate [107-109]. Slijedeći preporuke drugih autora [106-109] i smjernice iz FDA vodiča za bioanalitičke metode [105], za kvantifikaciju svih ispitivanih sfingolipida (SPH, SAPH, S1P, SAPH1P, Cer C16:0, Cer C24:0 i SM C16:0) korištena je metoda standardnog dodatka prilikom kreiranja kalibracionih krivih, tj. kao matriks za pripremu standardnih krivih upotrebljen je *pool* humane plazme zdravih dobrovoljaca.

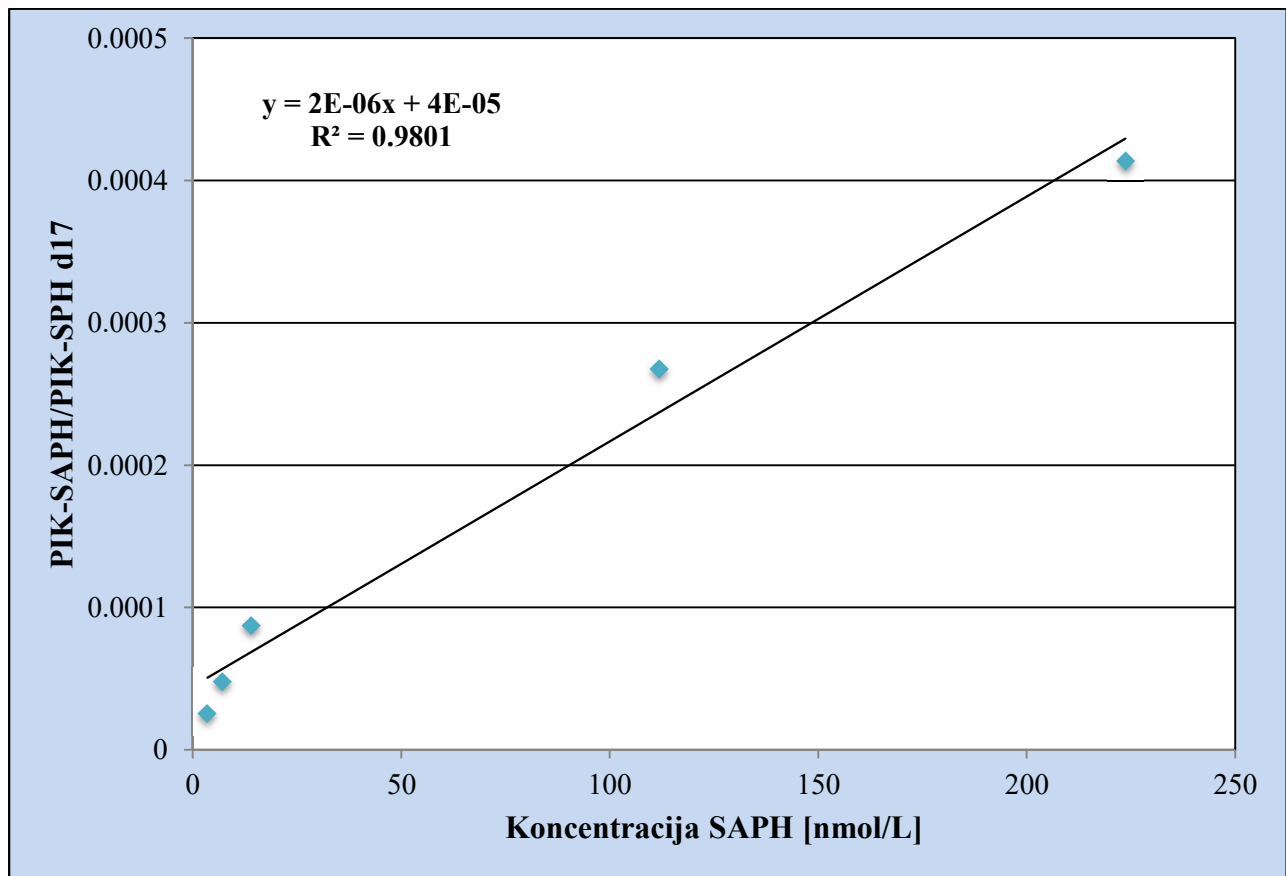
Kalibraciona kriva koja je korištena za kvantifikaciju SPH u plazmi, kao i jednačina prave sa koeficijentom determinacije su predstavljeni na slici 9.



Slika 9 Kalibraciona kriva za određivanje koncentracije sfingozina (SPH)

Prikazana kalibraciona kriva je izrađena u *pool*-u humane plazme kao matriksu i obuhvata raspon koncentracija od 3,91 – 1001,7 nmol/L. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,9963.

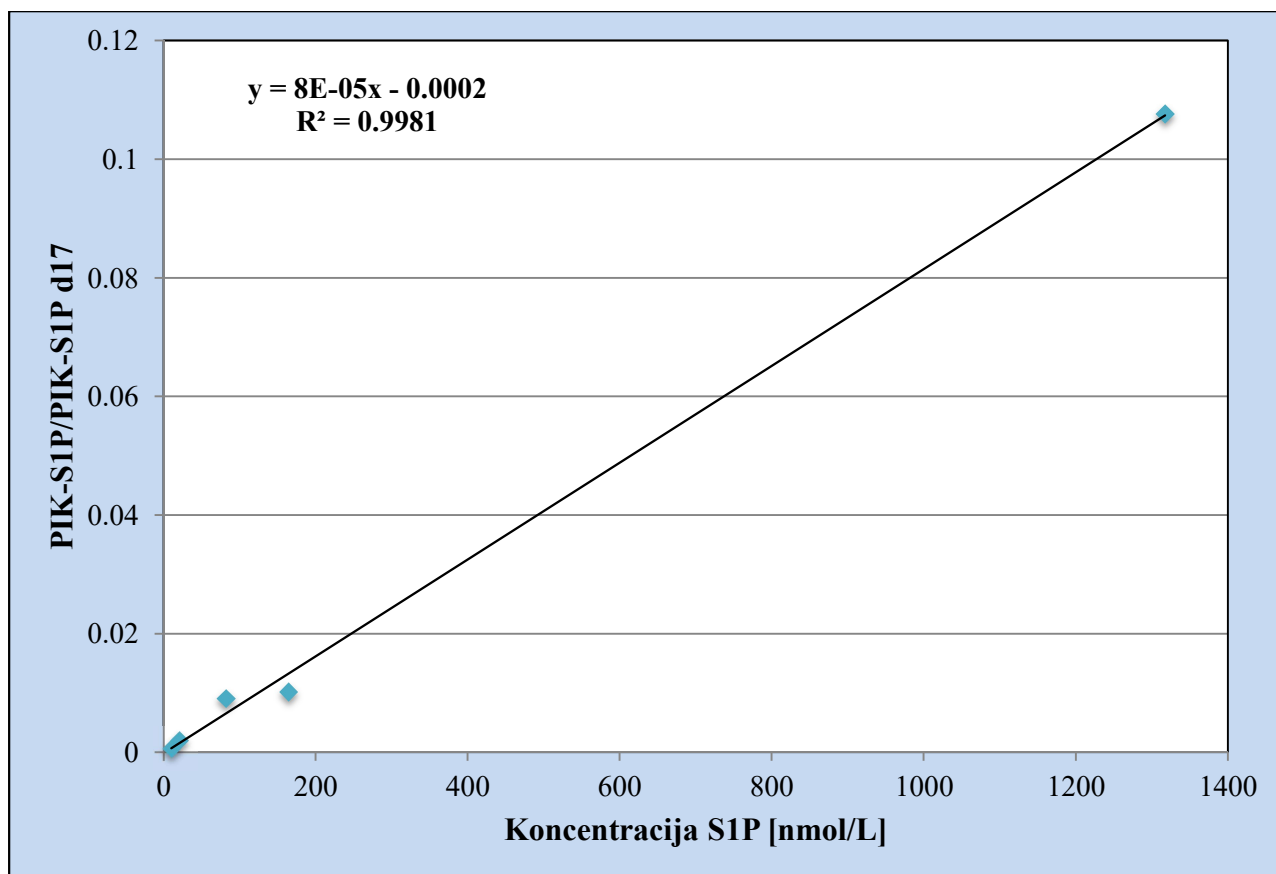
Kalibraciona kriva koja je korištena za kvantifikaciju SAPH u plazmi, kao i jednačina sa izračunatim koeficijentom determinacije prikazana je na slici 10.



Slika 10 Kalibraciona kriva za određivanje sfinganina (SAPH) u plazmi

Prikazana kalibraciona kriva je izrađena u *pool*-u humane plazme kao matriksu i obuhvata raspon koncentracija od 3,50 – 223,7 nmol/L. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,9900.

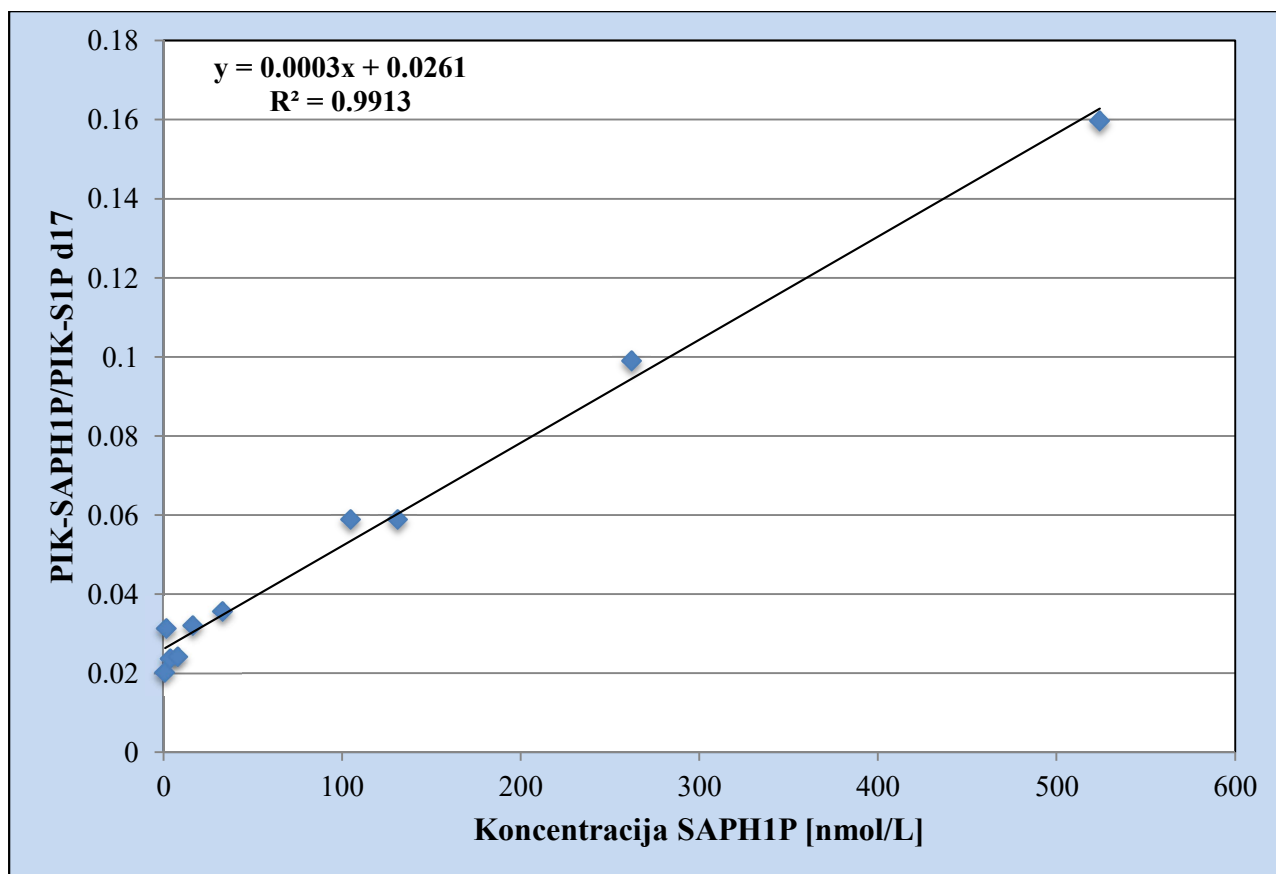
Kalibraciona kriva koja je korištena za kvantifikaciju S1P u plazmi, kao i jednačina sa izračunatim koeficijentom determinacije, prikazana je na slici 11.



Slika 11 Kalibraciona kriva za određivanje sfingozin-1-fosfata (S1P)

Prikazana kalibraciona kriva je izrađena u *pool*-u humane plazme kao matriksu i obuhvata raspon koncentracija od 10,29 – 1317,6 nmol/L. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,9990.

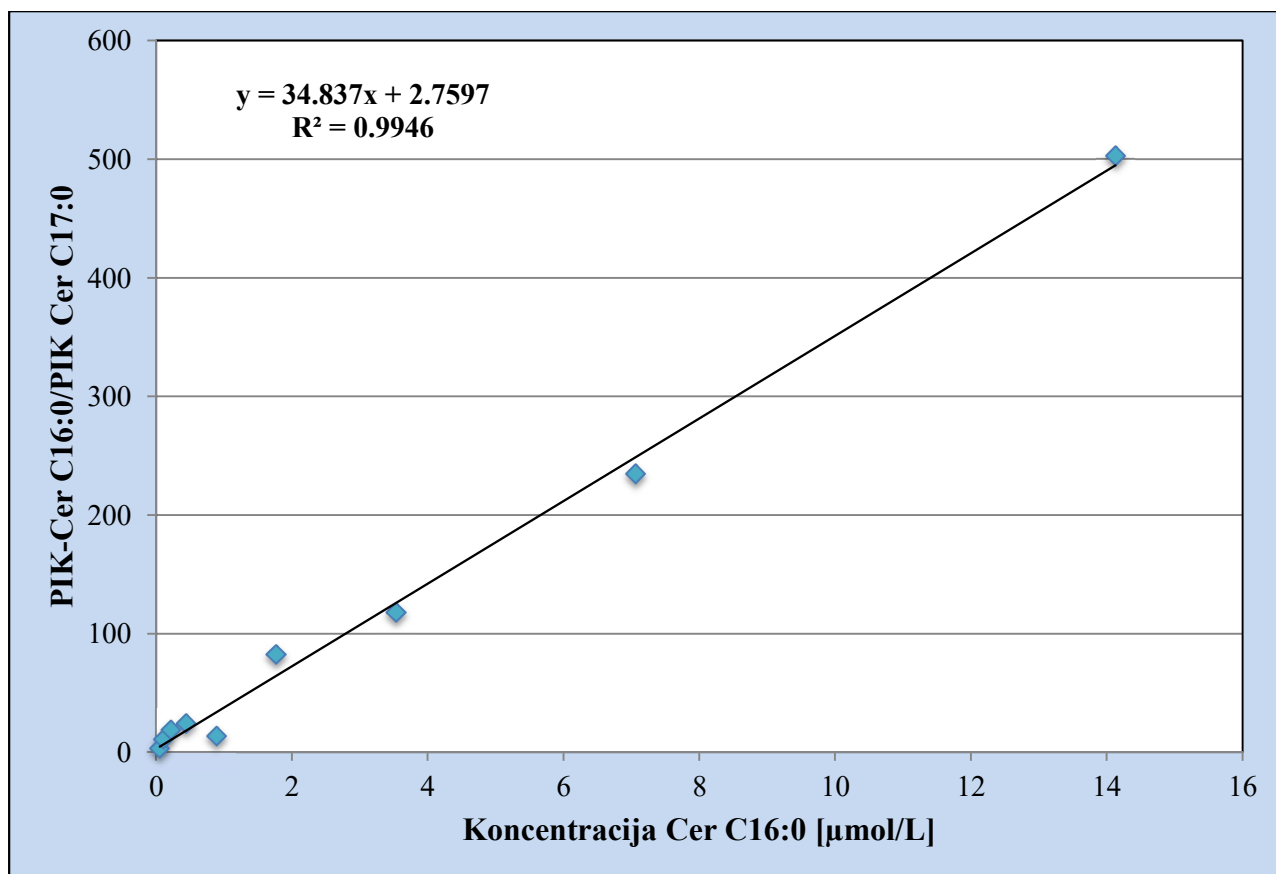
Kalibraciona kriva koja je korištena za kvantifikaciju SAPH1P u plazmi, kao i jednačina sa izračunatim koeficijentom determinacije prikazana je na slici 12.



Slika 12 Kalibraciona kriva za određivanje sfinganin-1-fosfata (SAPH1P)

Prikazana kalibraciona kriva je izrađena u *pool*-u humane plazme kao matriksu i obuhvata raspon koncentracija od 1,02 – 524,2 nmol/L. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,9956.

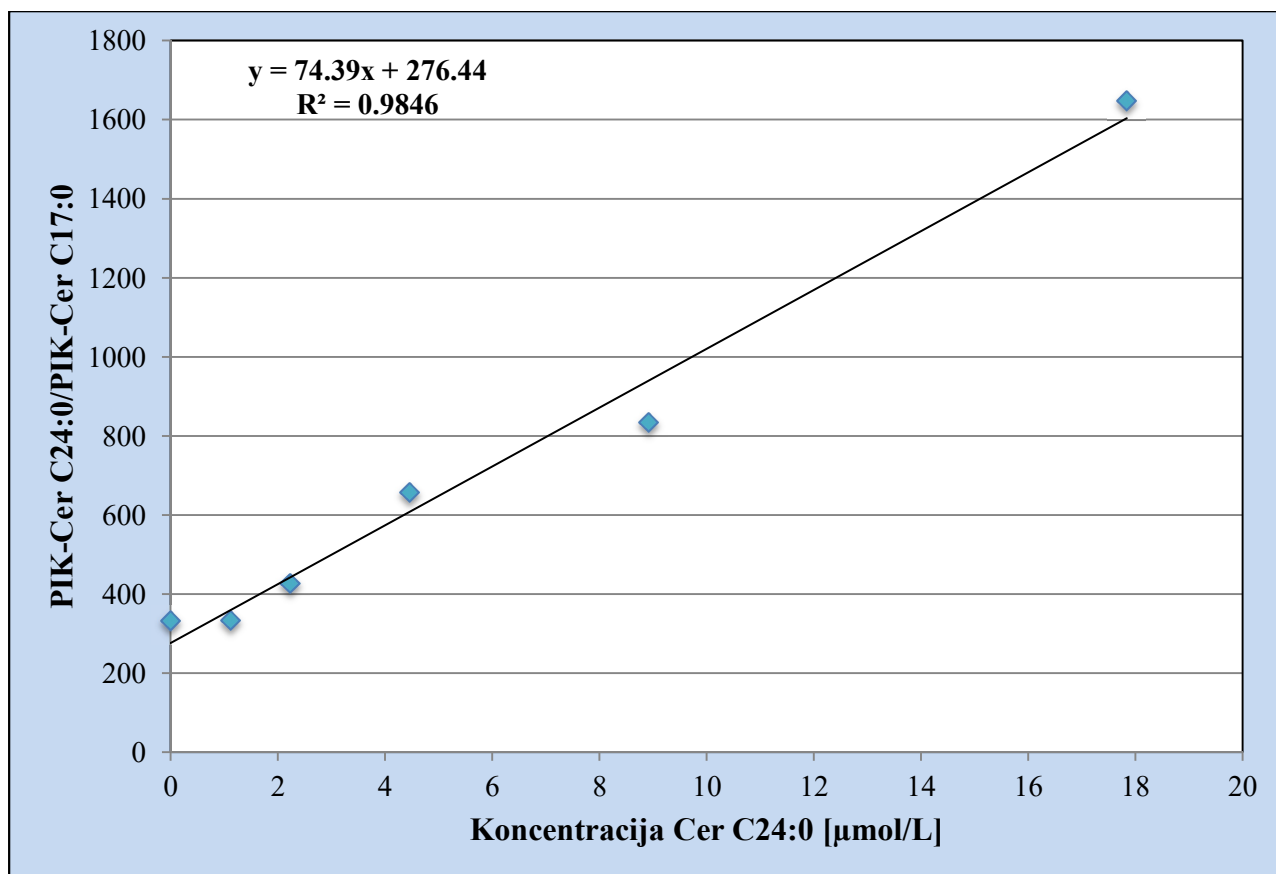
Kalibraciona kriva koja je korištena za kvantifikaciju Cer C16:0 u plazmi, kao i jednačina sa izračunatim koeficijentom determinacije prikazana je na slici 13.



Slika 13 Kalibraciona kriva za određivanje ceramida C16:0 (Cer C16:0)

Prikazana kalibraciona kriva je izrađena u *pool*-u humane plazme kao matriksu i obuhvata raspon koncentracija od 0,055 – 14,1 μmol/L. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,9973.

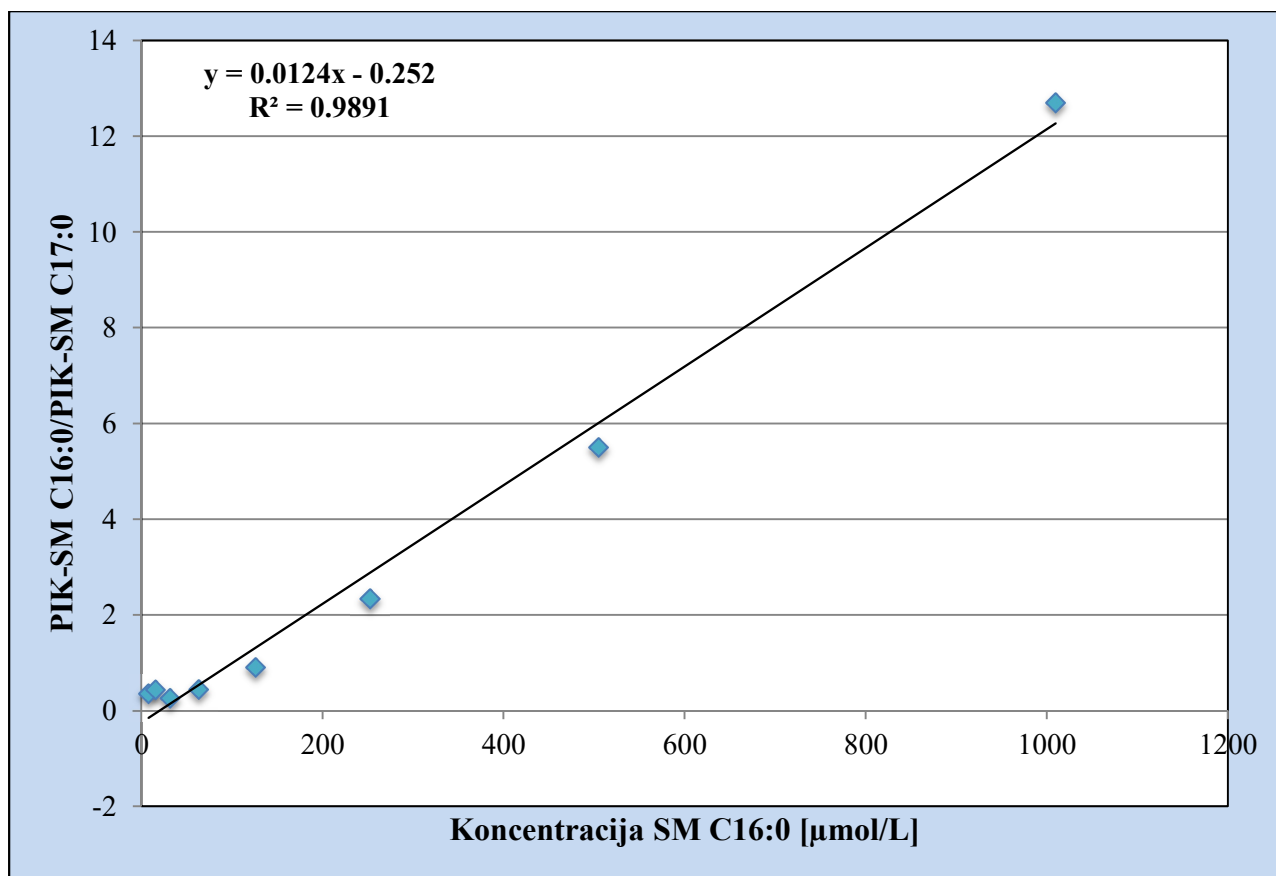
Kalibraciona kriva koja je korištena za kvantifikaciju Cer C24:0 u plazmi, kao i jednačina sa izračunatim koeficijentom determinacije prikazana je na slici 14.



Slika 14 Kalibraciona kriva za određivanje ceramida C24:0 (Cer C24:0)

Prikazana kalibraciona kriva je izrađena u *pool*-u humane plazme kao matriksu i obuhvata raspon koncentracija od 1,12 – 17,8 μmol/L. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,9923.

Kalibraciona kriva koja je korištena za kvantifikaciju SM C16:0 u plazmi, kao i jednačina sa izračunatim koeficijentom determinacije prikazana je na slici 15.



Slika 15 Kalibraciona kriva za određivanje sfingomijelina C16:0 (SM C16:0)

Prikazana kalibraciona kriva je izrađena u *pool*-u humane plazme kao matriksu i obuhvata raspon koncentracija od 7,89 – 1010,0 μmol/L. Koeficijent korelacije (r) iznosi 0,9945.

Limit detekcije (LOD) i limit kvantifikacije (LOQ)

U smjernicama za validaciju bioanalitičkih metoda, koje su dale Evropska agencija za lijekove (engl. *European Medicine Agency*, EMA) i FDA, LOQ se definiše kao najniža koncentracija analita koja se može pouzdano mjeriti, sa prihvatljivom tačnošću i preciznošću [105,110]. Kao prihvatljiva tačnost uzima se odstupanje do 20% od nominalne vrijednosti, a zadovoljavajuća preciznost podrazumijeva varijabilnost od maksimalnih 20%. Prema istim smjernicama, kao LOQ se najčešće uzima najniža koncentracija obuhvaćena kalibracionom krivom koja je konstruisana u odgovarajućem matriksu. Određivanje LOQ za endogene analite najčešće zahtijeva alternativni pristup. Tsikas [111] je definisao LOQ kao najnižu dodatnu koncentraciju analita koja se nakon dodavanja biološkom uzorku može eksperimentalno mjeriti sa prihvatljivom tačnošću (maksimalno odstupanje od 20% od nominalne vrijednosti) i preciznošću (maksimalna vrijednost KV 20%). Međutim, prema nekim autorima, procjena preciznosti i tačnosti za LOQ najčešće nema klinički značaj, s obzirom na to da su ove koncentracije uglavnom daleko izvan fiziološki relevantnog opsega [112]. Drugi pristup za određivanje LOQ podrazumijeva eksperimentalno određivanje ove koncentracije iz odnosa signala i šuma aparata (engl. *signal-to-noise ratio*, SNR) i to tako da je navedeni odnos 10 za datu koncentraciju analita [113].

LOD se definiše kao najniža detektabilna koncentracija analita. LOD se izračunava eksperimentalno iz SNR, tako da je navedeni odnos 3 za datu koncentraciju.

U ovom istraživanju, LOD i LOQ su određeni eksperimentalnom metodom iz biološkog materijala. Sa tim ciljem, izabrani su uzorci niskih koncentracija koji su razblaženi tako da koncentracije ispitivanih analita odgovaraju SNR 3 za LOD vrijednost, odnosno 10 za LOQ vrijednost.

Preciznost unutar serije i između serija

Da bi se u potpunosti razumjeli uticaji preanalitičkog i analitičkog postupka na varijabilnost izmjerenih koncentracija ispitivanog analita, neophodno je ispitati preciznost unutar serije i između serija. Za ispitivanje preciznosti novouspostavljene metode za određivanje izabranih sfingolipida pripremljen je *pool* plazme dobijen od 20 zdravih dobrovoljaca. *Pool* je temeljno izmiješan kako bi se obezbjedila njegova homogenost. Izdvojeno je pet alikvota iz *pool*-a, i svi su pripremani i analizirani, kako je opisano u poglavljima 3.4.5.2 i 3.4.5.3, u triplicatu istog dana. Dobijene vrijednosti su iskorištene za ispitivanje preciznosti unutar serije. Za ispitivanje preciznosti između serija, svakog dana, tokom pet uzastopnih dana, pripreman je i analiziran po jedan alikvot *pool*-a plazme, pet puta. Preciznost je izražena u procentima kao vrijednost KV unutar serije (KV_{US}) i između serija (KV_{IS}).

Tačnost metode (recovery studija)

Određivanjem tačnosti metode utvrđuje se stepen slaganja između stvarne koncentracije analita i koncentracije dobijene primjenom ispitivane metode. Uobičajeno se procjena tačnosti sprovodi upotrebom kontrolnih uzoraka, tj. uzoraka u kojima je poznata koncentracija ispitivanog analita (nominalna koncentracija), a tačnost se izražava kao odnos dobijene naspram nominalne koncentracije. Dozvoljeno odstupanje od nominalne vrijednosti je $\pm 20\%$ za LOQ i $\pm 15\%$ za više koncentracije [114]. Međutim, za procjenu tačnosti bioanalitičkih metoda kojima se određuje neki od endogenih analita, zbog prisustva analita u ispitivanom matriksu, najčešće nije moguće primjeniti standardni metod ispitivanja tačnosti, već se sprovodi *recovery* studija, odnosno procjena prinosa analita [105]. U *recovery* studiji je neophodno odrediti bazalnu koncentraciju analita prisutnu u uzorku, zatim opteretiti uzorak različitim poznatim koncentracijama rastvora standarda i, u posljednjem koraku, utvrditi da li postoji slaganje između dodatih i dobijenih vrijednosti.

Za potrebe *recovery* studije u ovom istraživanju prvo su u metanolu pripremljene smješe rastvora standarda ispitivanih sfingolipida odgovarajućih koncentracija (Tabela 3), a zatim je alikvotirano po 50 μL svakog od pripremljenih rastvora u epruvete koje su prethodno sadržale uparenu smještu svih internih standarda. Ova smješa je ponovo uparena do suva, nakon čega je dodato po 50 μL *pool*-a plazme i sproveden postupak za pripremu uzorka opisan u poglavlju 3.4.5.2. Bazalna koncentracija analita u *pool*-u plazme, odnosno nulta tačka je određena tako što je 50 μL upareno u pet epruveta sa smješom internih standarda prije dodavanja 50 μL plazme. Dalji tok pripreme i određivanja je sproveden kao što je prethodno opisano u poglavljima 3.4.5.2 i 3.4.5.3. Tačnost je izračunavana prema sljedećoj formuli:

$$\text{tačnost (\%)} = \frac{c_m - c_0}{c_s} \times 100\%$$

gdje je c_m – koncentracija određena nakon opterećivanja *pool*-a plazme, c_0 – određena bazalna koncentracija u *pool*-u plazme i c_s – koncentracija standarda kojom je opterećen *pool* plazme [110].

3.4.6 **Određivanje aktivnosti enzima LCAT i CETP**

Aktivnosti enzima LCAT i CETP određivane su prema modifikovanoj metodi koju su opisali Asztalos i sar. [115]. Aktivnost LCAT je određivana mjerenjem brzine esterifikacije holesterola u plazmi kao razlike u koncentraciji slobodnog holesterola prije i poslije *in vitro* inkubacije plazme tokom 2 sata na 37 °C, uzevši u obzir da smanjenje koncentracije slobodnog holesterola u plazmi odgovara povećanju koncentracije holesterol estara. Za potrebe određivanja LCAT aktivnosti izmjerena je koncentracija slobodnog i ukupnog holesterola u plazmi upotrebom reagenasa proizvođača *Bioanalytica* (Beograd, Srbija) na automatskom biohemijском analizatoru Mindray BS200E (*Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd.*, Šenžen, Guandong, Kina), a aktivnost LCAT je izračunata pomoću sljedeće formule:

$$\text{aktivnost LCAT } (\mu\text{mol/L/h}) = \frac{(\text{slobodni holesterol}_{\text{prije inkubacije}} - \text{slobodni holesterol}_{\text{poslije inkubacije}}) \times 1000}{2}$$

Aktivnost CETP je procijenjena kao CETP-posredovani bidirekcionni prenos estara holesterola između HDL-a i lipoproteinskih čestica bogatih trigliceridima, prije i nakon inkubacije uzoraka na 37 °C tokom 2 h. Za te potrebe, praćen je pad u koncentraciji slobodnog holesterola u plazmi, kao i promjene u koncentraciji estara holesterola u HDL frakciji. Promjene u koncentraciji holesterol estara dobijene su oduzimanjem koncentracije slobodnog od ukupnog holesterola u HDL frakciji prije i poslije inkubacije. Za potrebe izračunavanja aktivnosti CETP dodatno je izmjerena koncentracija ukupnog i slobodnog holesterola u HDL frakciji prije i poslije *in vitro* inkubacije plazme tokom 2 h na 37 °C. Kao što je prethodno napomenuto, određivanje je vršeno na biohemijском analizatoru Mindray BS200E (*Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd.*, Šenžen, Guandong, Kina) i korištenjem reagenasa proizvođača *Bioanalytica* (Beograd, Srbija). Za izdvajanje HDL frakcije nabavljen je komercijalni reagens za precipitaciju apoB čestica proizvođača *BioSystems* (Barselona, Španija), a precipitacija je izvršena prema protokolu koji je dao sam proizvođač i koja je prethodno opisana u poglavlju 3.4.4.2. Aktivnost enzima CETP je izračunata primjenom sljedeće formule:

$$\text{aktivnost CETP } (\mu\text{mol/L/h}) = \frac{[\text{slobodni holesterol}_{\text{prije inkubacije}} - \text{slobodni holesterol}_{\text{poslije inkubacije}}] - [(\text{HDL holesterol}_{\text{poslije inkubacije}} - \text{slobodni holesterol u HDL}_{\text{poslije inkubacije}}) - (\text{HDL holesterol}_{\text{prije inkubacije}} - \text{slobodni holesterol u HDL}_{\text{prije inkubacije}})] \times 1000}{2}$$

3.4.7 **Određivanje aktivnosti enzima PON1**

Aktivnost serumske PON1 mjerena je kinetički korišćenjem paraoksona (*Chem Service*, Pensilvanija, SAD) kao supstrata prema ranije adaptiranoj metodi koju su originalno opisali Richter i Furlong [116], a koja je modifikovana i validirana na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu [117]. Određivanje aktivnosti PON1 se zasniva na djelovanju enzima iz seruma ne supstrat paraokson, pri čemu dolazi do konverzije paraoksona u *p*-nitrofenol. Brzina konverzije se prati kinetički na 405 nm, što je karakterističan apsorpcioni maksimum za *p*-nitrofenol. Aktivnost PON1 je određena na 25 °C i pH 8,5 korišćenjem 50 mmol/L tris-hidroksimetilaminometan hidrohlorid (TRIS-HCl) pufera i u prisustvu natrijum-hlorida (NaCl) [116]. Mjerenje je vršeno na

biohemijskom analizatoru Ilab 300+ (*Instrumentation Laboratory*, Milano, Italija). KV_{US} za datu metodu je 5,4%, dok je KV_{IS} 7,7%, kao što je prethodno opisano [118].

3.5 Statistička analiza

Prilikom kreiranja kalibracionih krivih korištene su korelaciona i regresiona analiza. Za ispitivanje jačine linearne zavisnosti između koncentracije analita i signala aparata korištena je *Pearson*-ova korelaciona analiza, a jačina zavisnosti je izražena kroz koeficijent korelacije (r), a uslov da kriva može da se koristi za izračunavanje koncentracije nepoznatog uzorka bio je da je $r \geq 0,99$. Za izračunavanje jednačina kalibracionih krivih korištena je regresiona analiza, i to metoda najmanjih kvadrata. Varijacija metode unutar serije i između serija izražena je kao KV , koji se izračunava prema sljedećoj formuli:

$$KV (\%) = \frac{Sd}{X_{SR}} \times 100$$

gdje je Sd oznaka za standardnu devijaciju, a X_{SR} aritmetička srednja vrijednost.

Raspodjela vrijednosti promjenljivih je provjeravana upotrebom *Kolmogorov-Smirnov* i *Shapiro-Wilk* testa. Ukoliko su podaci slijedili normalnu raspodjelu prikazani su kao aritmetička srednja vrijednost i standardna devijacija. Za varijable koje nisu slijedile normalnu raspodjelu u svim ispitivanim tačkama i svim ispitivanim grupama, podaci su transformisani logaritamski, a potom je provjeravana raspodjela logaritmovanih vrijednosti. Ukoliko su podaci slijedili log-normalnu raspodjelu prikazani su kao geometrijske srednje vrijednosti i 95% interval pouzdanosti. Podaci koji ni nakon logaritamske transformacije nisu slijedili normalnu raspodjelu su prikazani kao medijane i interkvartilni raspon.

Srednje vrijednosti između više zavisnih grupa, tj. srednje vrijednosti u funkciji vremena, su poređene analizom varijanse (engl. *analysis of variance*, ANOVA) za ponovljena mjerenja, uz *post hoc Bonferroni* korekciju intervala pouzdanosti. *Mauchly*-ijev test sferičnosti podataka je korišten kako bi se provjerilo da li podaci ispunjavaju pretpostavku sferičnosti. U slučajevima, kada pretpostavka sferičnosti nije bila ispunjena, primjenjena je *Greenhouse-Geisser* korekcija da bi se odredila statistička značajnost uočenih razlika u ispitivanim podacima. Studentov T-test za nezavisne populacije je korišten za poređenje srednjih vrijednosti ili geometrijskih sredina dvije ispitivane studijske grupe – grupe trudnica sa visokorizičnom trudnoćom i grupe trudnica sa preeklampsijom. Kategorički podaci su analizirani *Pearson*-ovim χ^2 testom.

Međuzavisnost ispitivanih parametara je analizirana primjenom *Spearman*-ove korelacione analize. Univarijantna binarna logistička regresiona analiza je korištena da bi se procijenila povezanost parametara od interesa sa preeklampsijom. Za potrebe binarne logističke regresije grupa trudnica sa visokorizičnom trudnoćom je kodirana sa 0, a grupa trudnica sa preeklampsijom sa 1. Svi podaci koji su pokazali statističku značajnost u univarijantnoj binarnoj logističkoj analizi su testirani multivarijantnom binarnom logističkom regresionom analizom kako bi se identifikovali nezavisni faktori uticaja na pojavu preeklampsije u trudnoći. Dijagnostička tačnost modela za procjenu rizika za razvoj preeklampsije ispitivana je analizom *Receiver Operating Characteristics* (ROC) krivih. Površina ispod krive (engl. *area under the curve*, AUC) je bila mjera tačnosti ispitivanih parametara. Slijedeći *Hosmer*-ova i *Lemeshow*-a pravila [119], AUC u opsegu 0,91 – 1 su definisale odličnu dijagnostičku tačnost, 0,81 – 0,90 dobru dijagnostičku tačnost, 0,71 – 0,80 umjerenu dijagnostičku tačnost, 0,61 –

0,70 slabu dijagnostičku tačnost, dok je za vrijednosti AUC od 0,51 – 0,60 smatrano da ne zadovoljavaju kriterijume prihvatljive dijagnostičke tačnosti.

Minimalni uslov za postojanje statistički značajne razlike je bio kada je vjerovatnoća (p, nivo značajnosti) bio manji ili jednak 0,05. Podaci su analizirani pomoću programa *Microsoft Excel 2010* (*Microsoft*, Redmond, Vašington, SAD) i statističkih softvera *PASW Statistics 18* (ranije *SPSS Statistics*) (*IBM*, Armonk, Nju Jork, SAD) i *MedCalc ver. 11.4* (*MedCalc Software*, Ostend, Belgija).

4 Rezultati

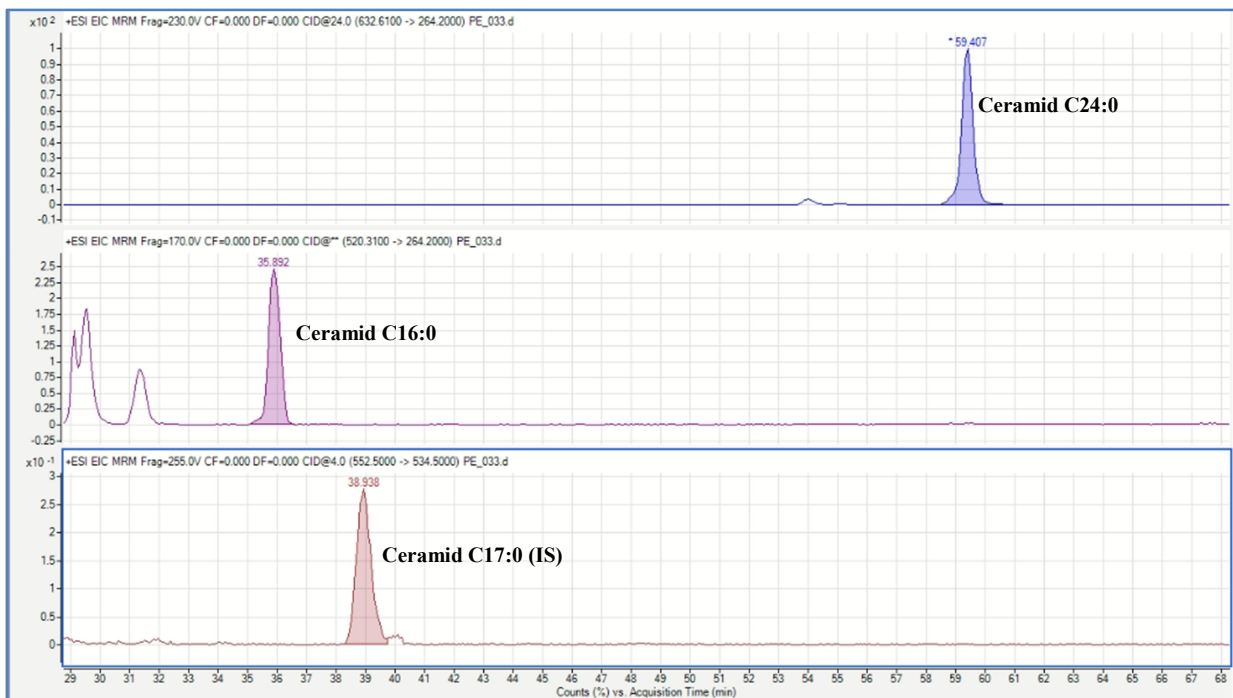
4.1 Razvoj i optimizacija metode za određivanje sfingolipida u plazmi

Jedan od glavnih ciljeva ove doktorske disertacije bio je razvoj bioanalitičke HPLC-MS/MS metode za određivanje sfingolipida u plazmi.

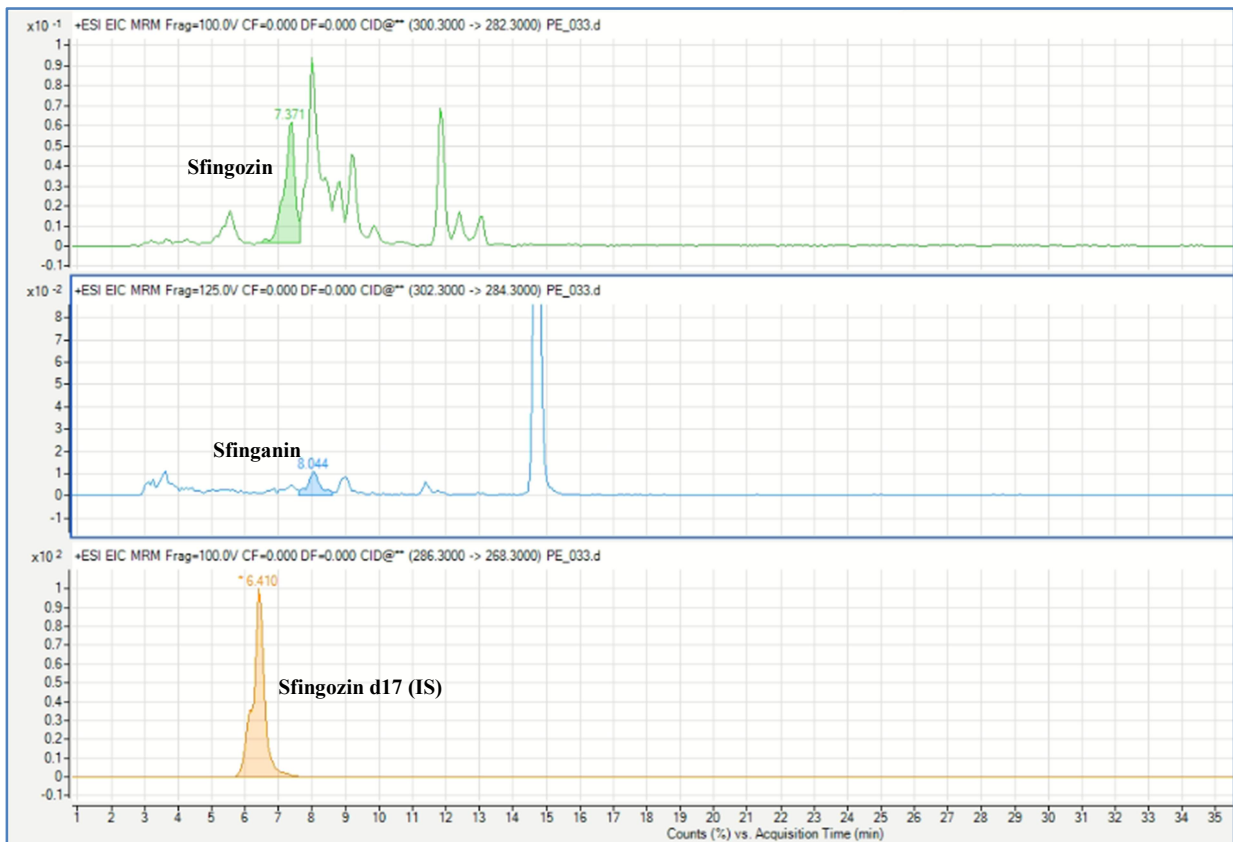
Tokom razvoja ove metode, testirani su različiti protokoli za pripremu uzoraka. Preliminarni eksperimenti su podrazumijevali ispitivanje različitih metoda za precipitaciju proteina, kao i ispitivanje različitih protokola za ekstrakciju u cilju postizanja optimalnog razdvajanja analita od interesa. Na ovaj način je izvršena optimizacija preanalitičke i analitičke faze određivanja izabranih sfingolipida i definisane su optimalne analitičke performanse.

U prvoj fazi ispitivani su jednostavni protokoli za pripremu uzorka, koji su uključivali samo taloženje proteina iz plazme dodatkom metanola. Međutim, kako takva priprema nije dala zadovoljavajuće efekte, dalje su primjenjivani različiti protokoli koji su uključivali i korak tečno-tečne ekstrakcije sa različitim organskim rastvaračima i različitim odnosima organskih rastvarača. Na kraju, optimizovan je protokol koji je podrazumijevao tečno-tečnu ekstrakciju smješom metanola, hloroforma i vode u odnosu 1: 1: 0,9 (v/v) sa 0,1% trifluorosirćetnom kiselinom, što je detaljno opisano u poglavlju 3.4.5.2. Trifluorosirćetna kiselina je dodavana sa ciljem povećanja rastvorljivosti i jonizacije ispitivanih sfingolipida. Ovakva vrsta pripreme uzorka je dala najbolji prinos analita od interesa iz uzorka, a priprema reagenasa je jednostavna i jeftina. Pored toga, procedura ne zahtijeva specijalnu opremu.

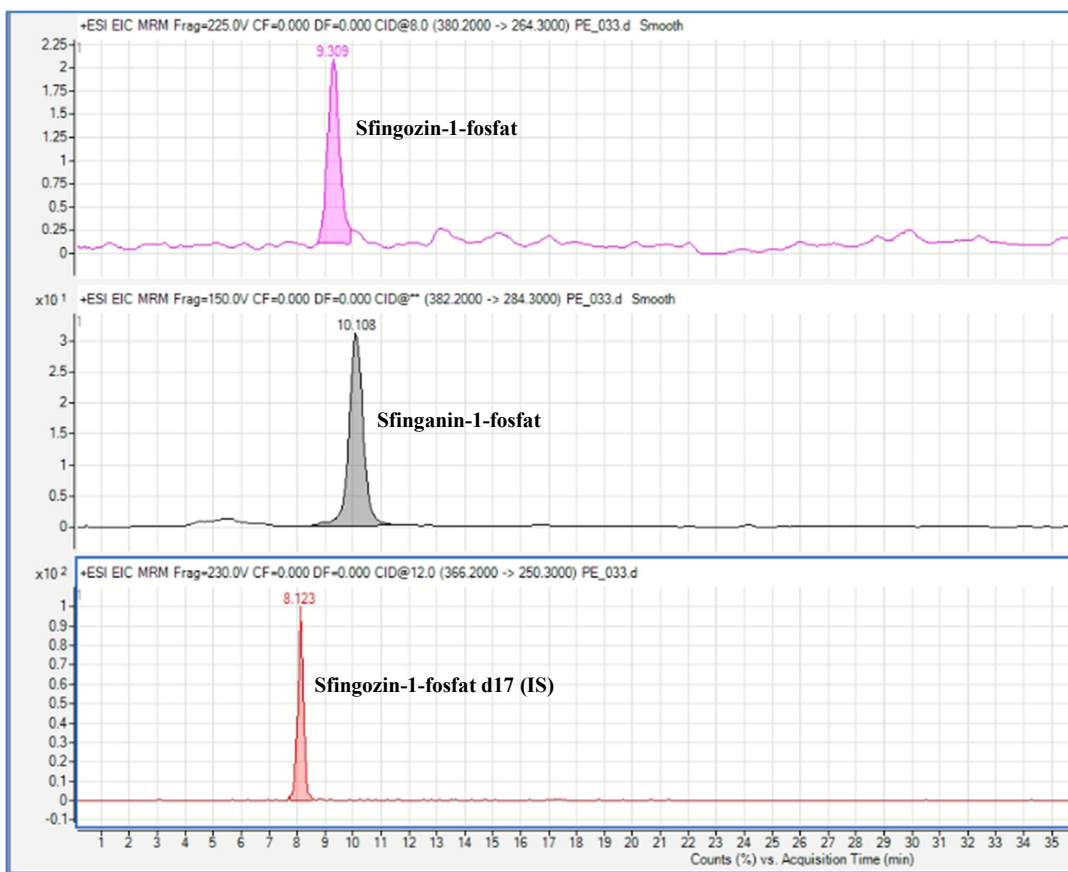
Prilikom optimizacije hromatografskih uslova, ispitivane su različite mobilne faze (izokratsko i gradijent eluiranje) i razdvajanje na dvije analitičke kolone Zorbax SB-C18 RRHT (2,1 x 50 mm, 1,8 μm) i Zorbax Eclipse Plus C8 (4,6 x 150 mm, 5 μm). Optimalno razdvajanje pikova svih ispitivanih sfingolipida postignuto je primjenom Zorbax Eclipse Plus C8 (4,6 x 150 mm, 5 μm) kolone i upotrebom gradijent eluiranja sa konstantnim protokom mobilne faze koju su činile dvije komponente – komponenta A (1 mM amonijum formijat u metanolu HPLC čistoće sa 0,2% mravljom kiselinom) i komponenta B (2 mM amonijum formijat u dejonizovanoj vodi HPLC čistoće sa 0,2% mravljom kiselinom). Uvođenjem duže kolone sa većim dijametrom produženo je vrijeme razdvajanja pikova od interesa, ali je postignuta i bolja rezolucija razdvajanja (Slike 16-19).



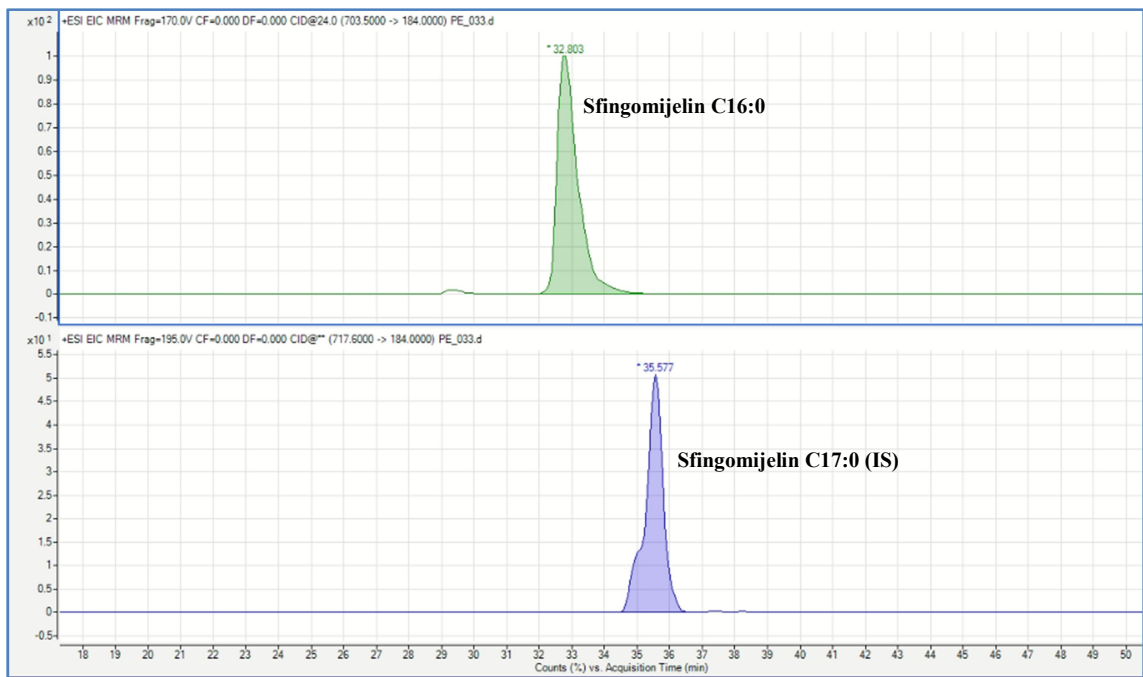
Slika 16 Dio hromatograma dobijen analizom uzorka na kome su prikazani ceramid C24:0, ceramid C16:0 i ceramid C17:0 (interni standard)



Slika 17 Dio hromatograma dobijen analizom uzorka na kome su prikazani sfingozin, sfinganin i sfingozin d17 (interni standard)



Slika 18 Dio hromatograma dobijen analizom uzorka na kome su prikazani sfingozin-1-fosfat, sfinganin-1-fosfat i sfingozin-1-fosfat d17 (interni standard)



Slika 19 Dio hromatograma dobijen analizom uzorka na kome su prikazani sfingomijelin C16:0 i sfingomijelin C17:0 (interni standard)

Retenciona vremena ispitivanih analita su prikazana u tabeli 2.

Optimizacija instrumentalnih uslova na masenom spektrometru podrazumijevala je upoređivanje rezultata dobijenih upotrebom ESI sa MMI jonskim izvorom. ESI jonizacija se pokazala kao pogodnija za analizu sfingolipida, tako da je dalji razvoj i optimizacija metode nastavljen pomoću ESI jonskog izvora. Konačni uslovi na masenom spektrometru su bili: temperatura gasa od 340 °C, temperatura isparavanja 250 °C, protok gasa od 12 L/min, pritisak raspršivača od 20 psi, pozitivan kapilarni napon od 4500 V, i negativan kapilarni napon od 4000 V. Vrijednosti kolizione energije i MRM tranzicije za ispitivane analite su prikazani u tabeli 2.

Jednačine standardnih krivih za ispitivane sfingolipide su date u tabeli 3. U istoj tabeli su prikazani LOD i LOQ, kao i opseg linearnosti za svaki od posmatranih analita.

Tabela 3 Kalibracione krive, rasponi koncentracija kalibracionih krivih, limiti detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) za ispitivane sfingolipide

Analit	Jednačina kalibracione krive i koeficijent korelacije	Opseg linearnosti	LOD	LOQ
SPH	$y = 0,000006 x + 0,0001$ $r = 0,9963$	3,91 – 1001,7 nmol/L	0,053 nmol/L	0,18 nmol/L
SAPH	$y = 0,000002 x + 0,00004$ $r = 0,9900$	3,50 – 223,7 nmol/L	0,066 nmol/L	0,22 nmol/L
S1P	$y = 0,00008 x - 0,0002$ $r = 0,9990$	10,29 – 1317,6 nmol/L	1,05 nmol/L	3,45 nmol/L
SAPH1P	$y = 0,0003 x + 0,0261$ $r = 0,9956$	1,02 – 524,2 nmol/L	0,11 nmol/L	0,36 nmol/L
Cer C16:0	$y = 34,837 x + 2,7597$ $r = 0,9973$	0,55 – 14,1 $\mu\text{mol/L}$	0,48 nmol/L	1,60 nmol/L
Cer C24:0	$y = 74,39 x + 276,44$ $r = 0,9923$	1,12 – 17,8 $\mu\text{mol/L}$	0,033 nmol/L	0,11 nmol/L
SM C16:0	$y = 0,0124 x - 0,252$ $r = 0,9945$	7,89 – 1010,0 $\mu\text{mol/L}$	0,43 nmol/L	1,43 nmol/L

LOD – limit detekcije; LOQ – limit kvantifikacije; SPH – sfingozin; SAPH – sfinganin; S1P – sfingozin-1-fosfat; SAPH1P – sfinganin-1-fosfat; Cer C24:0 – ceramid C24:0; Cer C16:0 – ceramid C16:0; SM C16:0 – sfingomijelin C16:0

Ispitana je i preciznost unutar serije i između serija za svaki od ispitivanih sfingolipida, a rezultati su prikazani u tabeli 4. KV_{US} za SPH, Cer C16:0 i SM C16:0 su bili manji od 15%, dok su KV_{US} za SAPH, S1P, SAPH1P i Cer C24:0 bili nešto veći od 15%, ali manji od 20%. KV_{IS} su bili su manji od 15% za Cer C16:0 i SM C16:0, dok su se KV_{IS} za SPH, SAPH, S1P, SAPH1P i Cer C24:0 kretali u opsegu između 15% i 20%. Dobijeni su zadovoljavajući rezultati za razliku između očekivanih i dobijenih koncentracija. Za ispitivanu metodu, tačnost se kretala u opsegu od $\pm 15\%$ od nominalne vrijednosti. Prosječna tačnost za SPH je bila 92,4%, za SAPH 111,5%, za S1P 91,0%, za SAPH1P 87,0%, za Cer C16:0 107,3%, za Cer C24:0 95,3% i za SM C16:0 93,7%.

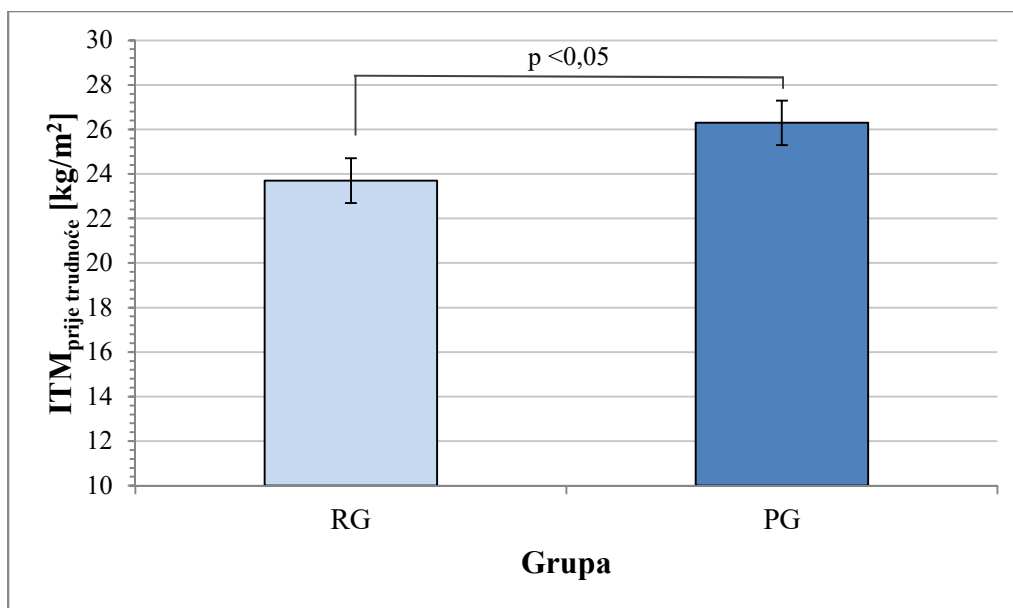
Tabela 4 Preciznost unutar serije i između serija za ispitivane sfingolipide

Analit	Unutar serije		Između serija	
	Koncentracija	KV (%)	Koncentracija	KV (%)
SPH	56,2 ± 6,34 nmol/L	11,3	76,3 ± 14,83 nmol/L	19,4
SAPH	34,6 ± 5,65 nmol/L	16,3	29,3 ± 4,46 nmol/L	15,2
S1P	379,7 ± 69,02 nmol/L	18,2	355,4 ± 62,85 nmol/L	17,7
SAPH1P	130,7 ± 23,25 nmol/L	17,8	107,7 ± 19,0 nmol/L	17,6
Cer C16:0	0,33 ± 0,042 μ mol/L	12,6	0,29 ± 0,034 μ mol/L	11,4
Cer C24:0	2,33 ± 0,440 μ mol/L	18,8	3,03 ± 0,508 μ mol/L	16,8
SM C16:0	242,6 ± 9,14 μ mol/L	3,8	235,1 ± 9,75 μ mol/L	4,1

KV – koeficijent varijacije; SPH – sfingozin; SAPH – sfinganin; S1P – sfingozin-1-fosfat; SAPH1P – sfinganin-1-fosfat; Cer C24:0 – ceramid C24:0; Cer C16:0 – ceramid C16:0; SM C16:0 – sfingomijelin C16:0

4.2 Kliničke i laboratorijske karakteristike ispitivane populacije

Utvrđeno je da ne postoji značajna razlika u godinama starosti između trudnica iz RG i PG (srednja vrijednost \pm standardna devijacija: $32,0 \pm 5,56$ godina u RG; nasuprot srednja vrijednost \pm standardna devijacija: $33,1 \pm 4,26$ godina u PG) ($p = 0,394$). ITM prije trudnoće je bio značajno veći u PG (geometrijska srednja vrijednost: $26,3 \text{ kg/m}^2$; 95% interval pouzdanosti: $24,4 - 28,4 \text{ kg/m}^2$) u poređenju sa RG (geometrijska srednja vrijednost: $23,7 \text{ kg/m}^2$; 95% interval pouzdanosti: $22,7 - 24,7 \text{ kg/m}^2$) ($p < 0,05$) (Slika 20). Težina novorođenčadi između trudnica iz RG i PG se nije značajno razlikovala (medijana: $3350,0 \text{ g}$; interkvartilni raspon: $3025,0 - 3675,0 \text{ g}$ u RG, naspram medijana: $3225,0 \text{ g}$; interkvartilni raspon: $2725,0 - 3712,5 \text{ g}$ u PG) ($p = 0,351$). Nije uočena statistički značajna razlika u udjelu žena koje su pušile prije trudnoće ($\chi^2 = 1,786$; $p = 0,181$), kao ni u udjelu onih koje su koristile vitaminsku suplementaciju ($\chi^2 = 0,121$; $p = 0,728$).



Slika 20 Indeks tjelesne mase (ITM) u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i u grupi trudnica sa preeklampsijom (PG)

Osnovne kliničke i laboratorijske karakteristike trudnica u obje studijske grupe koje su uočene tokom praćenja su prikazane u tabeli 5. U obje ispitivane grupe, uočen je isti trend promjena SAP. Nakon blagog pada u drugom trimestru, koji je u RG bio statistički značajan, od trećeg trimestra je uočen rast srednjih vrijednosti SAP. ITM je longitudinalno rastao i u RG i PG tokom trudnoće, pri čemu su za svaku ispitivanu tačku uočene statistički značajno više vrijednosti ITM u odnosu na prethodnu ispitivanu vremensku tačku unutar obje ispitivane grupe. Vrijednost MPI-UtA u RG se longitudinalno smanjivala od 1. trimestra do tačke pred porođaj. Isti trend je uočen i u PG, ali su statistički značajne razlike uočene samo u odnosu na vrijednost iz 1. trimestra (Tabela 5).

Tabela 5 Osnovni klinički i biohemijski parametri u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG)

	1. trimestar		2. trimestar		3. trimestar		37. NG (prije porođaja)		P ₁	P ₂
	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)		
NG	12,8 ± 0,81	12,7 ± 0,71	23,3 ± 0,82	23,4 ± 0,99	29,7 ± 1,31	29,8 ± 1,42	36,9 ± 0,89	36,6 ± 1,02		
SAP, mmHg	86,2 ± 11,45	92,4 ^{df} ± 9,01	82,6 ^{af} ± 11,54	89,8 ^{df} ± 9,64	84,7 ± 8,88	94,1 ^{ds} ± 11,98	88,2 ^{bs,cf} ± 9,23	98,2 ^{bfi,ds} ± 11,88	<0,001	<0,05
ITM*, kg/m ²	24,5 (23,4 – 25,5)	27,4 ^{df} (25,5 – 29,5)	26,3 ^{as} (25,3 – 27,4)	29,1 ^{as,df} (27,3 – 31,0)	27,6 ^{as,bs} (26,6 – 28,7)	30,4 ^{bs,df} (28,7 – 32,3)	28,9 ^{as,bs,cs} (27,9 – 30,0)	31,8 ^{as,bs,cs,df} (30,0 – 33,7)	<0,001	<0,001
Povećanje tjelesne mase*, kg	2,29 (1,63 – 2,95)	2,62 (1,19 – 4,05)	5,51 ^{as} (4,99 – 6,04)	5,00 (3,44 – 6,56)	3,35 ^{bs} (2,87 – 3,82)	3,41 (2,34 – 4,49)	3,58 ^{af,bs} (2,98 – 4,18)	4,08 (2,71 – 5,44)	<0,001	<0,05
Povećanje tjelesne mase*, %	3,41 (2,48 – 4,33)	3,98 (2,33 – 5,63)	7,39 ^{as} (6,66 – 8,12)	6,47 (4,35 – 8,60)	4,42 ^{bs} (3,83 – 5,01)	4,25 (2,94 – 5,56)	4,55 ^{bs} (3,88 – 5,22)	4,55 (2,92 – 6,18)	<0,001	0,075
MPI-UtA*	2,02 (1,88 – 2,17)	1,77 (1,54 – 2,03)	1,08 ^{as} (1,00 – 1,17)	1,06 ^{af} (0,88 – 1,27)	0,91 ^{as,bs} (0,85 – 0,98)	0,94 ^{as} (0,83 – 1,07)	0,80 ^{as,bs,cf} (0,75 – 0,85)	0,81 ^{as} (0,70 – 0,93)	<0,001	<0,001
Glukoza*, mmol/L	4,7 (4,6 – 4,9)	4,9 (4,5 – 5,3)	4,5 (4,4 – 4,7)	5,0 ^{df} (4,6 – 5,5)	4,8 (4,5 – 5,0)	5,0 (4,7 – 5,4)	4,4 ^{cf} (4,3 – 4,6)	4,6 (4,3 – 5,0)	<0,05	0,140
Urea*, mmol/L	2,73 (2,57 – 2,90)	2,90 (2,65 – 3,17)	2,65 (2,50 – 2,80)	2,46 (2,16 – 2,81)	2,50 ^{af} (2,34 – 2,67)	2,71 (2,38 – 3,08)	2,55 (2,40 – 2,72)	2,93 ^{bf} (2,47 – 3,46)	0,05	<0,05
Kreatinin, μmol/L	56,4 ± 8,24	58,5 ± 7,21	55,3 ± 7,28	55,8 ± 7,90	54,8 ± 6,58	56,3 ± 7,19	58,4 ^{bf,cf} ± 8,28	58,9 ± 8,31	<0,05	0,375
Ukupni proteini, g/L	66,8 ± 4,41	66,9 ± 3,80	63,4 ^{as} ± 4,06	63,0 ^{af} ± 4,41	62,5 ^{as} ± 3,72	62,0 ^{as} ± 4,01	61,8 ^{as,bf} ± 3,78	60,7 ^{as} ± 3,50	<0,001	<0,001
AST*, U/L	16,6 (15,7 – 17,5)	17,3 (15,4 – 19,5)	17,3 (15,9 – 18,9)	16,9 (14,6 – 19,6)	17,0 (15,8 – 18,3)	17,2 (15,5 – 19,0)	17,8 (16,8 – 18,9)	17,7 (15,8 – 19,9)	0,324	0,903
ALT*, U/L	14,5 (13,1 – 16,1)	17,3 (14,4 – 20,9)	15,7 (13,7 – 18,0)	16,2 (13,1 – 20,1)	14,6 (13,0 – 16,4)	16,2 (13,6 – 19,2)	13,4 (12,1 – 14,8)	14,2 (12,3 – 16,4)	0,112	0,261
PAPPA-A*, U/L	3,72 (3,22 – 4,29)	2,41 ^{df} (1,93 – 3,02)	38,4 ^{as} (32,5 – 45,3)	36,6 ^{as} (29,1 – 45,9)	58,8 ^{as,bs} (51,0 – 67,8)	58,4 ^{as,bf} (42,5 – 80,3)	95,4 ^{as,bs,cs} (82,9 – 109,7)	95,0 ^{af,bf,cf} (66,6 – 135,4)	<0,001	<0,001
PIGF-1*, pg/mL	33,9 (30,8 – 37,4)	33,0 (27,6 – 39,3)	215,2 ^{as} (191,3 – 242,2)	197,6 ^{as} (159,9 – 244,1)	316,3 ^{as,bs} (267,9 – 373,4)	273,1 ^{as,bf} (196,2 – 380,1)	142,8 ^{as,cs} (118,1 – 172,7)	117,2 ^{as,cs} (80,4 – 170,8)	<0,001	<0,001

sFlt-1* , pg/mL	1307,1 (1186,0 – 1440,1)	1168,7 (976,6 – 1398,9)	1373,4 (1218,7 – 1547,7)	1323,7 (1080,9 – 1621,4)	1424,0 (1272,3 – 1593,7)	1543,8 (1183,3 – 2014,7)	3037,4 ^{a§,b§,c§} (2632,7 – 3505,1)	3683,8 ^{a#,b#,c#} (2513,6 – 5400,1)	<0,001	<0,05
s-Flt-1/PlGF-1*	38,5 (34,0 – 43,7)	35,9 (29,5 – 43,8)	6,38 ^{a§} (5,48 – 7,44)	6,70 ^{a§} (5,11 – 8,78)	4,50 ^{a§} (3,62 – 5,60)	5,65 ^{a§} (3,44 – 9,28)	21,3 ^{b§,c§} (15,7 – 28,8)	31,4 ^{c#} (15,5 – 63,5)	<0,001	<0,05

RG – grupa trudnica sa visokorizičnom trudnoćom; PG – grupa trudnica sa preeklampsijom; NG – nedelja gestacije; SAP – srednji arterijski pritisak; ITM – indeks tjelesne mase; MPI-UtA – srednja vrijednost pulsatilnog indeksa uterinih arterija; AST – aspartat aminotransferaza; ALT – alanin aminotransferaza; PAPP-A – plazma protein - A povezan sa trudnoćom; PlGF-1 – placentalni faktor rasta; sFlt-1 - solubilni anti-angiogeni faktori

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; * - geometrijska srednja vrijednost (95% interval pouzdanosti)

p₁ – ANOVA ponovljenih mjerenja za RG; p₂ – ANOVA ponovljenih mjerenja za PG

Poređenje parova vrijednosti: ^a – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 1. trimestar; ^b – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 2. trimestar; ^c – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 3. trimestar

^d – statistički značajno različito u odnosu na RG

[§] - p <0,001; [#] - p <0,05

U RG je uočeno statistički značajno smanjenje koncentracije glukoze u tački prije porođaja u odnosu na 3. trimestar, dok je koncentracija uree u istoj grupi bila statistički značajno niža u 3. trimestru u odnosu na prvi (Tabela 5). S druge strane, koncentracija uree u PG je bila statistički značajno viša pred porođaj u odnosu na vrijednost u 2. trimestru (Tabela 5). U 2. trimestru, u obje ispitivane grupe, uočen je pad u koncentraciji ukupnih proteina, a vrijednosti su ostale na istom nivou do kraja trudnoće (Tabela 5). Ni u jednoj od ispitivanih grupa nije uočena statistički značajna promjena u koncentraciji kreatinina, kao ni u aktivnosti enzima AST i ALT tokom trudnoće (Tabela 5).

U obje ispitivane grupe zabilježen je progresivan rast vrijednosti PAPP-A tokom cijelog perioda praćenja. U ispitivanim kohortama je uočen isti trend promjena u koncentraciji PlGF-1. Koncentracije PlGF-1 su u obje grupe rasle od 1. do 3. trimestra trudnoće, a u tački pred porođaj vrijednosti su se smanjile do nivoa približnog vrijednostima zabilježenim u 2. trimestru (Tabela 5). Jedina statistički značajna promjena u koncentraciji sFlt-1 i u RG i u PG je bio značajan pad koncentracija u tački pred porođaj u odnosu na koncentracije zabilježene u 1, 2. i 3. trimestru (Tabela 5).

Sljedeći korak u ovoj studiji bilo je ispitivanje postojanja razlike praćenih parametara između dvije grupe trudnica u četiri tačke tokom trudnoće. Poređenjem SAP između ispitivanih grupa, uočeno je da su prosječne vrijednosti za SAP bile više u PG od početka do kraja trudnoće. Osim što je i u jednoj i u drugoj grupi uočen značajan longitudinalni rast ITM, primjećeno je i da su trudnice iz PG imale značajno viši ITM u poređenju sa RG u svakoj tački praćenja. Nisu uočene statistički značajne razlike u vrijednosti MPI-UtA između ispitivanih kohorti (Tabela 5).

Koncentracije glukoze su bile nešto više u PG u poređenju sa RG tokom cijelog perioda praćenja, ali je razlika bila statistički značajna samo u 2. trimestru (Tabela 5). Prosječne koncentracije uree, kreatinina i ukupnih proteina se nisu statistički značajno razlikovale između ispitivanih grupa, niti je bilo statistički značajne razlike u aktivnosti AST i ALT ni u jednoj od ispitivanih tačaka (Tabela 5).

Jedina značajna razlika u vrijednostima PAPP-A između ispitivanih grupa je zabilježena u 1. trimestru kada je prosječna vrijednost PAPP-A bila niža u PG u poređenju sa RG. Nije bilo statistički značajnih razlika u koncentracijama PlGF-1 i sFlt-1 između ispitivanih kohorti (Tabela 5).

4.3 Osnovni parametri lipidnog profila u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG)

U tabeli 6 su prikazane promjene u koncentraciji osnovnih parametara lipidnog profila u obje ispitivane grupe tokom cijele gestacije. I u RG i u PG su tokom trudnoće uočene statistički značajne promjene u koncentraciji ukupnog holesterola, LDL holesterola i triglicerida. Koncentracije ukupnog holesterola i triglicerida su progresivno rasle od 2. trimestra do kraja gestacije i u RG i u PG (Tabela 6). Sa druge strane, u 2. trimestru uočen je statistički značajan porast koncentracije LDL holesterola i u jednoj i u drugoj grupi u odnosu na vrijednosti zabilježene u 1. trimestru. U RG koncentracija LDL holesterola je nastavila da raste i u 3. trimestru, pa je prosječna koncentracija u 3. trimestru bila viša od onih koje su zabilježene u 1. i 2. trimestru. Koncentracija LDL holesterola u PG u 3. trimestru se nije statistički značajno razlikovala od 2. trimestra. U tački prije porođaja je uočen blagi pad vrijednosti LDL holesterola, ali bez statističke značajnosti (Tabela 6). U RG je u 2. trimestru uočena statistički značajno viša koncentracija HDL holesterola u poređenju sa 1. trimestrom. Ovaj porast u koncentraciji HDL holesterola unutar RG je ostao značajan do kraja trudnoće u poređenju sa koncentracijom iz 1. trimestra (Tabela 6). Međutim, u PG nije uočen sličan porast u koncentraciji HDL holesterola, tj. nije

bilo statistički značajnih promjena u koncentraciji HDL holesterola tokom perioda praćenja (Tabela 6).

Tabela 6 Osnovni parametri lipidnog profila u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG)

	1. trimestar		2. trimestar		3. trimestar		37. NG (prije porođaja)		P ₁	P ₂
	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)		
NG	12,8 ± 0,81	12,7 ± 0,71	23,3 ± 0,82	23,4 ± 0,99	29,7 ± 1,31	29,8 ± 1,42	36,9 ± 0,89	36,6 ± 1,02		
UH, mmol/L	5,33 ± 1,070	5,46 ± 0,762	6,81 ^{a§} ± 1,365	6,61 ^{a§} ± 1,236	7,30 ^{a§,b§} ± 1,511	6,98 ^{a§} ± 1,409	7,49 ^{a§,b§} ± 1,611	7,17 ^{a§,b#} ± 1,506	<0,001	<0,001
TG*, mmol/L	1,27 (1,18 – 1,38)	1,53 ^{d#} (1,27 – 1,85)	1,86 ^{a§} (1,73 – 2,00)	2,33 ^{a§,d#} (2,00 – 2,71)	2,34 ^{a§,b§} (2,18 – 2,52)	2,86 ^{a§,b#,d#} (2,52 – 3,25)	2,93 ^{a§,b§,c§} (2,72 – 3,16)	3,52 ^{a§,b§,c#,d#} (3,07 – 4,04)	<0,001	<0,001
HDL-h, mmol/L	1,77 ± 0,336	1,90 ± 0,587	2,11 ^{a§} ± 0,386	1,88 ^{d#} ± 0,363	2,02 ^{a§,b#} ± 0,437	2,02 ± 0,666	1,97 ^{a#} ± 0,520	1,91 ± 0,310	<0,001	0,830
LDL-h, mmol/L	2,94 ± 0,849	2,81 ± 0,633	3,81 ^{a§} ± 1,148	3,61 ^{a#} ± 1,104	4,18 ^{a§,b#} ± 1,259	3,61 ^{a#} ± 1,275	4,16 ^{a§} ± 1,273	3,51 ± 1,655	<0,001	<0,05

RG – grupa trudnica sa visokorizičnom trudnoćom; PG – grupa trudnica sa preeklampsijom; NG – nedelja gestacije; UH – ukupni holesterol; TG - trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; LDL-h – LDL holesterol

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; * - geometrijska srednja vrijednost (95% interval pouzdanosti)

p₁ – ANOVA ponovljenih mjerenja za RG; p₂ – ANOVA ponovljenih mjerenja za PG

Poređenje parova vrijednosti: ^a – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 1. trimestar; ^b – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 2. trimestar; ^c – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 3. trimestar

^d – statistički značajno različito u odnosu na RG

[§] - p < 0,001; [#] - p < 0,05

Dalje su poređene koncentracije osnovnih lipidnih parametara između RG i PG unutar svake od ispitivanih vremenskih odrednica. Nije bilo statistički značajnih razlika u koncentracijama ukupnog holesterola između RG i PG (Tabela 6). Sa druge strane, koncentracije triglicerida su se razlikovale između dvije studijske grupe tokom cijelog perioda praćenja. Prosječne koncentracije triglicerida su bile značajno više u PG u poređenju sa RG u 1, 2. i 3. trimestru, kao i prije porođaja (Tabela 6). Kao i za ukupni holesterol, nisu uočene statistički značajne razlike u koncentraciji LDL holesterola između studijskih grupa tokom perioda praćenja (Tabela 6). Kada su poređene koncentracije HDL holesterola između ispitivanih grupa, uočeno je da je koncentracija HDL holesterola u PG u 2. trimestru bila statistički značajno niža u poređenju sa RG (Tabela 6).

4.4 Neholesterolski steroli (NHS) u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG)

U tabeli 7 su prikazane promjene u koncentraciji NHS, tj. markera sinteze i apsorpcije holesterola, u obje ispitivane grupe. Povećanje koncentracije holesterola u RG (Tabela 6) je uglavnom bilo praćeno značajnim povećanjem koncentracija dezmosterola, 7-dehidroholesterola i latosterola (Tabela 7). S druge strane, u PG uprkos povećanju koncentracije ukupnog holesterola (Tabela 6), nisu uočene značajne promjene u koncentracijama dezmosterola i 7-dehidroholesterola tokom trudnoće (Tabela 7). Međutim, u ovoj studijskoj grupi je uočeno značajno povećanje koncentracije latosterola u 3. trimestru i pred porođaj, a u poređenju sa vrijednostima zabilježenim u 1. trimestru. Nivoi latosterola u 1. trimestru su bili viši u PG u poređenju sa RG (Tabela 7). Nije bilo statistički značajnih razlika u koncentraciji preostala dva prekursora holesterola između ispitivanih grupa (Tabela 7).

U RG je dobijena statistički značajno niža koncentracija β -sitosterola u tački pred porođaj u odnosu na ranije tačke ispitivanja. U PG nisu uočene značajne promjene u koncentraciji β -sitosterola. Nije bilo značajnih longitudinalnih promjena u koncentraciji kampesterola u obje ispitivane grupe (Tabela 7). Kada su posmatrane razlike u koncentraciji ispitivanih fitosterola između studijskih grupa, zapažene su značajno niže koncentracije β -sitosterola u 1. i 2. trimestru, i kampesterola u 2. trimestru u PG u odnosu na RG (Tabela 7).

Tabela 7 Markeri sinteze i apsorpcije holesterola u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG)

	1. trimestar		2. trimestar		3. trimestar		37. NG (prije porođaja)		P ₁	P ₂
	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)		
NG	12,8 ± 0,81	12,7 ± 0,71	23,3 ± 0,82	23,4 ± 0,99	29,7 ± 1,31	29,8 ± 1,42	36,9 ± 0,89	36,6 ± 1,02		
Dezmosterol* , μmol/L	1,56 (1,43 – 1,69)	1,92 (1,42 – 2,60)	2,15 ^{a#} (1,90 – 2,43)	2,07 (1,39 – 3,08)	2,56 ^{a#} (2,21 – 2,97)	2,64 (1,77 – 3,93)	3,17 ^{a§,b§} (2,78 – 3,61)	2,68 (2,00 – 3,60)	<0,001	0,427
7- dehidroholesterol* , μmol/L	1,47 (1,31 – 1,65)	1,64 (1,27 – 2,12)	1,93 (1,63 – 2,29)	1,75 (1,19 – 2,57)	2,05 ^{a#,b#} (1,72 – 2,46)	1,98 (1,40 – 2,81)	2,26 ^{a#,b§} (1,93 – 2,64)	2,09 (1,48 – 2,95)	<0,05	0,368
Latosterol* , μmol/L	9,5 (7,9 – 11,5)	15,0 ^{d#} (10,8 – 20,8)	17,9 ^{a§} (15,6 – 20,5)	20,2 (15,9 – 25,7)	22,1 ^{a§} (19,2 – 25,4)	24,3 ^{a#} (19,1 – 30,7)	22,9 ^{a§} (19,8 – 26,5)	24,7 ^{a#} (19,8 – 30,9)	<0,001	<0,05
Kampesterol* , μmol/L	2,47 (2,19 – 2,78)	2,08 (1,46 – 2,98)	2,56 (2,25 – 2,90)	1,87 ^{d#} (1,40 – 2,49)	2,50 (2,18 – 2,88)	2,21 (1,71 – 2,87)	2,12 ^{c#} (1,81 – 2,48)	1,87 (1,44 – 2,43)	0,099	0,364
β-sitosterol* , μmol/L	5,83 (5,37 – 6,32)	4,53 ^{d#} (3,50 – 5,86)	5,84 (5,08 – 6,70)	4,33 ^{d#} (3,47 – 5,41)	5,26 (4,77 – 5,80)	4,69 (3,90 – 5,65)	4,97 ^{a#,b#} (4,50 – 5,48)	4,04 (3,22 – 5,08)	<0,05	0,426

RG – grupa trudnica sa visokorizičnom trudnoćom; PG – grupa trudnica sa preeklampsijom; NG – nedelja gestacije

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; * - geometrijska srednja vrijednost (95% interval pouzdanosti)

p₁ – ANOVA ponovljenih mjerenja za RG; p₂ – ANOVA ponovljenih mjerenja za PG

Poređenje parova vrijednosti: ^a – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 1. trimestar; ^b – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 2. trimestar; ^c – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 3. trimestar

^d – statistički značajno različito u odnosu na RG

§ - p <0,001; # - p <0,05

Dodatno su ispitane longitudinalne promjene u metaboličkim indeksima u dvije ispitivane grupe, a rezultati statističke analize za te parametre su prikazani u tabeli 8. Trudnice iz RG su imale značajno niži odnos ukupni holesterol/ dezmosterol, koji odražava aktivnost enzima sterol: NADP⁺ Δ24-oksidoireduktaze, u tački pred porođaj u poređenju sa vrijednostima u 1, 2. i 3. trimestru, kao i statistički značajno niži odnos holesterol/ 7-dehidroholesterol, koji odražava aktivnost enzima holesterol: NADP⁺ Δ7-oksidoireduktaze, pred porođaj u odnosu na vrijednosti zabilježene u 3. trimestru (Tabela 8). Aktivnost enzima latosterol oksidaze (Δ7-sterol 5(6)-desaturaze) je izražena kroz odnos 7-dehidroholesterol/ latosterol, a navedeni odnos je u RG bio značajno niži u 2. trimestru, 3. trimestru i pred porođaj u poređenju sa vrijednostima izračunatim za 1. trimestar (Tabela 8). U PG nisu uočene statistički značajne promjene navedenih metaboličkih indeksa tokom trudnoće (Tabela 8). Takođe, nije bilo statistički značajnih razlika u ispitivanim metaboličkim indeksima između dvije studijske grupe (Tabela 8).

Prilikom ispitivanja odnosa koncentracija ukupnog holesterola i markera apsorpcije holesterola, kao jedina statistički značajna longitudinalna promjena se izvojila promjena u odnosu ukupni holesterol/ kampesterol, i to samo u RG (Tabela 8). Paralelno sa porastom koncentracije ukupnog holesterola od 2. trimestra u ovoj grupi (Tabela 6) uočen je i porast koncentracije količnika ukupni holesterol/ kampesterol (Tabela 8). Kada su posmatrane razlike u prethodno pomenutim odnosima između ispitivanih grupa, zapaženi su značajno viši odnosi ukupni holesterol/ kampesterol u 2. trimestru i ukupni holesterol/ β-sitosterol u 1. trimestru u PG u poređenju sa RG.

Tabela 8 Metabolički indeksi u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG)

	1. trimestar		2. trimestar		3. trimestar		37. NG (prije porođaja)		P ₁	P ₂
	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)		
NG	12,8 ± 0,81	12,7 ± 0,71	23,3 ± 0,82	23,4 ± 0,99	29,7 ± 1,31	29,8 ± 1,42	36,9 ± 0,89	36,6 ± 1,02		
UH/dezmosterol*, mmol/μmol	3,35 (3,09 – 3,63)	2,82 (2,09 – 3,81)	3,11 (2,75 – 3,51)	3,14 (2,07 – 4,76)	2,81 (2,43 – 3,25)	2,59 (1,70 – 3,95)	2,31 ^{a§,b§,c§} (2,02 – 2,64)	2,61 (1,90 – 3,59)	<0,001	0,255
UH/7- dehidroholesterol*, mmol/μmol	3,35 (3,14 – 4,03)	3,30 (2,56 – 4,26)	3,46 (2,90 – 4,14)	3,72 (2,50 – 5,52)	3,50 (2,91 – 4,21)	3,45 (2,42 – 4,92)	3,23 ^{cf} (2,76 – 3,80)	3,35 (2,32 – 4,85)	0,231	0,133
7-dehidroholesterol/ latosterol*	0,15 (0,13 – 0,19)	0,11 (0,08 – 0,15)	0,11 ^{af} (0,09 – 0,13)	0,09 (0,06 – 0,12)	0,09 ^{af} (0,08 – 0,11)	0,08 (0,06 – 0,10)	0,10 ^{af} (0,09 – 0,11)	0,08 (0,07 – 0,11)	<0,001	0,220
UH/kampesterol*, mmol/μmol	2,11 (1,87 – 2,39)	2,58 (1,84 – 3,62)	2,61 ^{af} (2,29 – 2,97)	3,51 ^{af,d#} (2,69 – 4,56)	2,86 ^{as} (2,50 – 3,26)	3,14 (2,49 – 3,97)	3,45 ^{as,b#,c#} (2,96 – 4,03)	3,86 (2,90 – 5,13)	<0,001	0,243
UH/β-sitosterol*, mmol/μmol	0,90 (0,82 – 0,98)	1,19 ^{d#} (0,94 – 1,52)	1,14 (0,99 – 1,33)	1,50 (1,21 – 1,86)	1,37 ^{as} (1,23 – 1,52)	1,46 (1,24 – 1,71)	1,47 ^{as} (1,32 – 1,64)	1,74 ^{af} (1,36 – 2,21)	0,117	0,063

RG – grupa trudnica sa visokorizičnom trudnoćom; PG – grupa trudnica sa preeklampsijom; NG – nedelja gestacije; UH – ukupni holesterol
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; * - geometrijska srednja vrijednost (95% interval pouzdanosti)

p₁ – ANOVA ponovljenih mjerenja za RG; p₂ – ANOVA ponovljenih mjerenja za PG

Poređenje parova vrijednosti: ^a – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 1. trimestar; ^b – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 2. trimestar; ^c – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 3. trimestar

^d – statistički značajno različito u odnosu na RG

§ - p <0,001; # - p <0,05

4.5 Sfingolipidi u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG)

U tabeli 9 su prikazane dobijene koncentracije sfingolipida u ispitivanim grupama tokom trudnoće. Ni u jednoj od ispitivanih grupa nije došlo do statistički značajnih promjena u koncentraciji SPH (Tabela 9). U RG su uočene statistički značajno više koncentracije S1P u 2. trimestru u poređenju sa 1. trimestrom, i vrijednosti su ostale povišene do kraja trudnoće (Tabela 9). U PG je u 2. trimestru zabilježen pad koncentracije S1P u odnosu na 1. trimestar, praćen daljim postepenim povećanjem do kraja trudnoće. Međutim, nijedna od ovih promjena u PG nije bila statistički značajna (Tabela 9). U obje kohorte je uočen sličan obrazac promjena koncentracije SAPH. U RG se već od 2. trimestra uočava značajan porast koncentracije SAPH, a u 3. trimestru je rast nastavljen, pa je ta prosječna koncentracija bila viša u odnosu i na 1. i na 2. trimestar. U PG je uočen postepeni porast koncentracije, koji postaje statistički značajan u tački pred porođaj, i to u odnosu na 1. i 2. trimestar (Tabela 9). Nisu uočene statistički značajne promjene u koncentraciji SAPH1P ni u jednoj od ispitivanih grupa (Tabela 9).

U obje grupe su uočeni slični obrasci promjena u koncentraciji ispitivanih ceramida. Značajno povećanje koncentracije Cer C16:0 i Cer C24:0 u RG je uočeno već tokom 2. trimestra. Rast koncentracija navedenih ceramida u RG je nastavljen do kraja trudnoće, a razlika je bila statistički značajna u odnosu na koncentracije iz 1. trimestra (Tabela 9). Sličan trend, tj. postepeni porast u koncentraciji Cer C16:0 i Cer C24:0, je uočen i u PG; međutim, nijedna od tih promjena unutar PG nije bila statistički značajna (Tabela 9).

Koncentracija SM C16:0 u RG je značajno porasla u 2. trimestru u poređenju sa 1. trimestrom, i vrijednosti su ostale statistički značajno više do kraja trudnoće. Nasuprot tome, koncentracija SM C16:0 u PG je značajno porasla u 3. trimestru u odnosu na 1. trimestar i održala se na tom nivou i u tački pred porođaj (Tabela 9).

Nakon detaljnog ispitivanja razlika u koncentraciji ispitivanih sfingolipida između RG i PG, uočene su statistički značajno niže koncentracije S1P u PG u 2. trimestru, 3. trimestru i neposredno pred porođaj u poređenju sa koncentracijama u RG. Međutim, studijske grupe se nisu statistički značajno međusobno razlikovale u odnosu na koncentraciju svih ostalih ispitivanih sfingolipida (Tabela 9).

Tabela 9 Ispitivani sfingolipidi u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG)

	1. trimestar		2. trimestar		3. trimestar		37. NG (prije porođaja)		P ₁	P ₂
	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)		
NG	12,8 ± 0,81	12,7 ± 0,71	23,3 ± 0,82	23,4 ± 0,99	29,7 ± 1,31	29,8 ± 1,42	36,9 ± 0,89	36,6 ± 1,02		
SPH*, nmol/L	67,2 (60,3 – 74,8)	79,0 (65,8 – 94,7)	77,6 (69,4 – 86,7)	79,1 (69,9 – 89,6)	82,2 (69,2 – 97,6)	87,4 (76,2 – 100,3)	96,9 (82,9 – 113,2)	100,9 (85,7 – 118,8)	0,204	0,081
SAPH*, nmol/L	28,8 (24,8 – 33,4)	37,0 (27,8 – 49,2)	42,1 ^{a#} (37,5 – 47,2)	40,6 (28,3 – 58,4)	51,7 ^{a§,b#} (44,9 – 59,5)	44,8 (31,5 – 63,6)	60,9 ^{a§,b§} (54,0 – 68,6)	63,5 ^{a#,b#} (42,6 – 94,7)	<0,001	<0,05
S1P*, nmol/L	566,8 (519,0 – 619,0)	499,7 (398,3 – 627,0)	666,7 ^{a#} (603,1 – 736,9)	409,8 ^{d#} (229,8 – 730,8)	735,5 ^{a§} (672,7 – 804,3)	557,1 ^{d#} (454,3 – 683,1)	798,0 ^{a§} (713,7 – 892,1)	618,0 ^{d#} (524,9 – 727,8)	<0,001	0,472
SAPH1P*, nmol/L	111,7 (99,5 – 125,4)	99,6 (80,2 – 123,7)	119,2 (103,9 – 136,8)	86,6 (52,9 – 141,9)	125,5 (114,7 – 137,2)	114,6 (89,3 – 146,9)	123,7 (109,6 – 139,6)	110,2 (88,4 – 137,3)	0,278	0,556
Cer C16:0*, μmol/L	0,24 (0,20 – 0,27)	0,19 (0,15 – 0,25)	0,27 ^{a§} (0,23 – 0,32)	0,20 (0,15 – 0,26)	0,28 ^{a§} (0,23 – 0,33)	0,24 (0,18 – 0,31)	0,29 ^{a§} (0,24 – 0,35)	0,25 (0,20 – 0,31)	<0,001	0,065
Cer C24:0*, μmol/L	1,55 (1,14 – 2,12)	1,64 (0,83 – 3,26)	2,62 ^{a§} (2,09 – 3,27)	2,81 (1,95 – 4,04)	3,15 ^{a#} (2,54 – 3,91)	3,47 (2,63 – 4,59)	3,51 ^{a§} (2,90 – 4,25)	3,13 (1,93 – 5,09)	<0,001	0,165
SM C16:0*, μmol/L	253,5 (243,5 – 264,0)	255,6 (239,3 – 273,0)	281,4 ^{a§} (271,7 – 291,5)	246,2 (185,5 – 326,9)	296,7 ^{a§,b#} (285,9 – 307,8)	298,4 ^{a#} (273,8 – 325,2)	299,3 ^{a§,b#} (286,7 – 312,5)	302,6 ^{a§} (282,3 – 324,5)	<0,001	<0,05

RG – grupa trudnica sa visokorizičnom trudnoćom; PG – grupa trudnica sa preeklampsijom; NG – nedelja gestacije; SPH – sfingozin; SAPH – sfinganin; S1P – sfingozin-1-fosfat; SAPH1P – sfinganin-1-fosfat; Cer C16:0 – ceramid C16:0; Cer C24:0 – ceramid C24:0; SM C16:0 – sfingomijelin C16:0
Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; * - geometrijska srednja vrijednost (95% interval pouzdanosti)

p₁ – ANOVA ponovljenih mjerenja za RG; p₂ – ANOVA ponovljenih mjerenja za PG

Poređenje parova vrijednosti: ^a – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 1. trimestar; ^b – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 2. trimestar; ^c – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 3. trimestar

^d – statistički značajno različito u odnosu na RG

[§] - p <0,001; [#] - p <0,05

4.6 Neholesterolski steroli u HDL frakciji (NHS_{HDL}) u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG)

U tabeli 10 su prikazane promjene u koncentraciji NHS u izdvojenoj HDL frakciji u dvije ispitivane grupe. Promjene u koncentraciji HDL holesterola su bile praćene i promjenama u koncentraciji NHS_{HDL} . Trendovi promjena u koncentraciji markera sinteze holesterola u HDL frakciji su bili slični u dvije ispitivane grupe. Koncentracija dezmosterola_{HDL} je rasla u toku gestacije u obje ispitivane grupe, a razlika je postala značajna pred porođaj i to u poređenju sa vrijednostima zabilježenim u 1. trimestru (Tabela 10). Kada su posmatrane koncentracije 7-dehidroholesterola_{HDL} i latosterola_{HDL}, prvo je u 2. trimestru uočen rast koncentracija, a onda postepeni pad do kraja trudnoće i u RG i u PG (Tabela 10). Statistička značajnost je postignuta jedino za latosterol_{HDL} u RG u 3. trimestru u poređenju sa koncentracijom iz 1. trimestra. Kada su poređene koncentracije markera sinteze holesterola u HDL frakciji između studijskih grupa, jedina statistički značajna razlika je bila značajno viša koncentracija dezmosterola_{HDL} u 1. trimestru u RG u odnosu na PG. Pored toga, uočeno je da su prosječne koncentracije svih markera sinteze holesterola u HDL frakciji bile nešto više u RG u poređenju sa PG, i to tokom cijele gestacije, ali ispitivane razlike nisu bile statistički značajne (Tabela 10).

Promjene u koncentraciji markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji su bile statistički značajne u RG (Tabela 10). Oba markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji su pokazala sličan trend promjena u RG. Prvo se u 2. trimestru uočava rast koncentracije u odnosu na koncentraciju iz 1. trimestra, pri čemu je ispitivana razlika bila statistički značajna za kampesterol_{HDL}. U RG, u 3. trimestru i pred porođaj uočava se statistički značajan pad u koncentraciji markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji u poređenju sa vrijednostima iz 2. trimestra (Tabela 10). Nasuprot tome, promjene u koncentraciji kampesterol_{HDL} i β -sitosterola_{HDL} u PG nisu bile statistički značajne, a trend promjena je bio drugačiji u odnosu na RG. U PG se u 2. trimestru uočava pad koncentracija oba ispitivana markera, a potom postepeni rast do kraja trudnoće, ali bez statističke značajnosti (Tabela 10). Dodatno, koncentracije kampesterol_{HDL} i β -sitosterola_{HDL} u PG u 2. trimestru su bile statistički značajno niže u poređenju sa prosječnim koncentracijama zabilježenim u RG (Tabela 10). Ovaj rezultat se poklapa sa statistički značajno nižom koncentracijom HDL holesterola u PG u poređenju sa RG (Tabela 6).

Tabela 10 Markeri sinteze i apsorpcije holesterola u HDL frakciji u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG)

	1. trimestar		2. trimestar		3. trimestar		37. NG (prije porođaja)		P ₁	P ₂
	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)		
NG	12,8 ± 0,81	12,7 ± 0,71	23,3 ± 0,82	23,4 ± 0,99	29,7 ± 1,31	29,8 ± 1,42	36,9 ± 0,89	36,6 ± 1,02		
Dezmosterol _{HDL} *, μmol/L	0,16 (0,15 - 0,18)	0,12 ^{d#} (0,10 - 0,15)	0,20 (0,18 - 0,24)	0,16 (0,13 - 0,20)	0,21 (0,18 - 0,24)	0,17 (0,13 - 0,21)	0,21 ^{a#} (0,19 - 0,24)	0,20 ^{a#} (0,15 - 0,26)	0,161	<0,05
7-dehidroholesterol _{HDL} *, μmol/L	0,36 (0,32 - 0,40)	0,34 (0,27 - 0,42)	0,43 (0,37 - 0,51)	0,41 (0,31 - 0,54)	0,40 (0,34 - 0,46)	0,39 (0,30 - 0,51)	0,37 (0,32 - 0,43)	0,39 (0,29 - 0,52)	<0,05	0,279
Latosterol _{HDL} *, μmol/L	0,92 (0,77 - 1,10)	0,90 (0,57 - 1,42)	1,23 (1,01 - 1,50)	1,08 (0,77 - 1,52)	1,02 ^{a#} (0,75 - 1,40)	0,84 (0,43 - 1,64)	1,07 (0,86 - 1,34)	0,95 (0,54 - 1,66)	0,201	0,496
Kampesterol _{HDL} *, μmol/L	0,59 (0,51 - 0,68)	0,45 (0,33 - 0,62)	0,74 ^{a#} (0,66 - 0,85)	0,35 ^{d#} (0,22 - 0,55)	0,58 ^{b#} (0,49 - 0,68)	0,45 (0,32 - 0,64)	0,53 ^{b#} (0,46 - 0,62)	0,49 (0,35 - 0,70)	<0,001	0,271
β-sitosterol _{HDL} *, μmol/L	2,65 (2,41 - 2,93)	2,23 (1,72 - 2,89)	2,89 (2,59 - 3,22)	2,22 ^{d#} (1,81 - 2,72)	2,67 ^{b#} (2,41 - 2,96)	2,58 (1,99 - 3,33)	2,36 ^{a#,b#} (2,14 - 2,62)	2,58 (1,99 - 3,34)	<0,05	0,132

RG – grupa trudnica sa visokorizičnom trudnoćom; PG – grupa trudnica sa preeklampsijom; NG – nedelja gestacije

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; * - geometrijska srednja vrijednost (95% interval pouzdanosti)

p₁ – ANOVA ponovljenih mjerenja za RG; p₂ – ANOVA ponovljenih mjerenja za PG

Poređenje parova vrijednosti: ^a – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 1. trimestar; ^b – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 2. trimestar; ^c – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 3. trimestar

^d – statistički značajno različito u odnosu na RG

[§] - p <0,001; [#] - p <0,05

4.7 Aktivnost enzima uključenih u metabolizam HDL čestica u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG)

U tabeli 11 su prikazane promjene u aktivnosti enzima uključenih u metabolizam HDL čestica u obje ispitivane grupe. Aktivnost LCAT je imala isti trend promjena u RG i PG. Nakon povećanja aktivnosti u 2. trimestru, u 3. trimestru je u obje ispitivane grupe uočen pad aktivnosti. U tački pred porođaj, aktivnost LCAT je u obje ispitivane grupe ostala na sličnom nivou kao i u 3. trimestru. Međutim, jedina statistički značajna razlika u posmatranim aktivnostima je značajno niža aktivnost u 3. trimestru u odnosu na 2. trimestar u RG (Tabela 11). Aktivnost CETP u RG je bila značajno niža u 3. trimestru i u tački pred porođaj u poređenju sa aktivnosti koja je zabilježena u 1. trimestru. Sa druge strane, u PG nije bilo statistički značajnih promjena u aktivnosti CETP, ali je uočen sličan trend kao i u RG, s tim da se u ovoj grupi pad aktivnosti CETP desio ranije, već u 2. trimestru (Tabela 11). Kada su posmatrane razlike u aktivnosti prethodna dva enzima između ispitivanih grupa, statistički značajne razlike su uočene u 3. trimestru. Naime, aktivnost i LCAT i CETP je bila statistički značajno viša u PG u poređenju sa RG u 3. trimestru trudnoće (Tabela 11).

Tabela 11 Aktivnost enzima uključenih u metabolizam HDL čestica u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG)

	1. trimestar		2. trimestar		3. trimestar		37. NG (prije porođaja)		P ₁	P ₂
	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)		
NG	12,8 ± 0,81	12,7 ± 0,71	23,3 ± 0,82	23,4 ± 0,99	29,7 ± 1,31	29,8 ± 1,42	36,9 ± 0,89	36,6 ± 1,02		
LCAT*, μmol/L/h	60,6 (42,7 – 86,1)	64,6 (35,1 – 118,9)	92,0 (73,6 – 115,1)	100,1 (72,8 – 137,7)	58,4 ^{b#} (48,5 – 70,3)	92,0 ^{d#} (75,4 – 112,2)	72,1 (62,5 – 83,1)	88,7 (75,8 – 103,7)	0,070	0,935
CETP*, μmol/L/h	53,8 (34,2 – 84,5)	69,2 (23,8 – 108,1)	56,3 (40,8 – 77,6)	41,2 (19,8 – 85,5)	26,7 ^{a#} (20,3 – 35,1)	47,1 ^{d#} (31,7 – 69,9)	27,3 ^{a#} (20,2 – 36,9)	31,2 (20,6 – 47,4)	<0,05	0,081

RG – grupa trudnica sa visokorizičnom trudnoćom; PG – grupa trudnica sa preeklampsijom; NG – nedelja gestacije; LCAT – lecitin-holesterol aciltransferaza; CETP – holesterol-estar transferni protein

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; * - geometrijska srednja vrijednost (95% interval pouzdanosti)

p₁ – ANOVA ponovljenih mjerenja za RG; p₂ – ANOVA ponovljenih mjerenja za PG

Poređenje parova vrijednosti: ^a – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 1. trimestar; ^b – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 2. trimestar; ^c – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 3. trimestar

^d – statistički značajno različito u odnosu na RG

[§] - p <0,001; [#] - p <0,05

4.8 Specifične proteinske komponente HDL čestica u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG)

U tabeli 12 su prikazane promjene u specifičnim proteinskim komponentama HDL čestica u obje ispitivane grupe. Masene koncentracije apoA-I su imale isti trend promjena u dvije studijske grupe. U 2. trimestru uočen je značajan porast koncentracije apoA-I i u RG i u PG u poređenju sa vrijednostima izmjerenim u 1. trimestru. Koncentracije navedenog biomarkera su se održale na istom nivou sve do kraja gestacije (Tabela 12). U RG je uočen kontinuirani pad koncentracije apoM do 3. trimestra, a u onda se u tački pred porođaj uočava rast. Sa druge strane, jedina statistički značajna longitudinalna promjena u koncentraciji apoM u PG je pad koncentracije u 3. trimestru u odnosu na vrijednosti zabilježene u 1. i 2. trimestru (Tabela 12). Nisu uočene statistički značajne razlike u koncentraciji apoA-I između ispitivanih studijskih grupa ni u jednoj od posmatranih tački. Za razliku od apoA-I, RG i PG su se međusobno razlikovale u koncentraciji apoM, pa je tako koncentracija apoM u 1. i 3. trimestru bila statistički značajno niža, a u 2. trimestru značajno viša u poređenju sa odgovarajućim vrijednostima koje su izmjerene u RG (Tabela 12).

Iako su promjene u aktivnosti PON1 imale sličan trend u obje ispitivane grupe – postepeni porast aktivnosti do 3. trimestra trudnoće, a onda pad aktivnosti u tački pred porođaj, ove promjene su bile statistički značajne jedino u RG (statistički značajno viša aktivnost u 2. i 3. trimestru u poređenju sa aktivnošću koja je određena u 1. trimestru) (Tabela 12). Prosječna aktivnost PON1 je bila viša u PG u poređenju sa RG tokom cijele gestacije, a statistički značajna razlika je zabilježena u 1. trimestru, 3. trimestru i u tački pred porođaj (Tabela 12).

Tabela 12 Specifične proteinske komponente HDL čestica u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) i grupi trudnica sa preeklampsijom (PG)

	1. trimestar		2. trimestar		3. trimestar		37. NG (prije porođaja)		P ₁	P ₂
	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)	RG (n=70)	PG (n=20)		
NG	12,8 ± 0,81	12,7 ± 0,71	23,3 ± 0,82	23,4 ± 0,99	29,7 ± 1,31	29,8 ± 1,42	36,9 ± 0,89	36,6 ± 1,02		
ApoA-I, g/L	1,95 ± 0,323	1,98 ± 0,358	2,32 ^{as} ± 0,347	2,29 ^{as} ± 0,445	2,28 ^{as} ± 0,389	2,32 ^{as} ± 0,373	2,23 ^{as} ± 0,407	2,34 ^{as} ± 0,425	<0,001	<0,001
ApoM, mg/L	52,8 ± 15,73	38,6 ^{d#} ± 17,83	35,7 ^{as} ± 12,13	51,2 ^{d#} ± 22,96	26,7 ^{as,b#} ± 11,77	21,0 ^{as,b#,d#} ± 8,66	40,2 ^{as,c§} ± 19,57	30,2 ± 14,91	<0,001	<0,05
PON1*, U/L	362,8 (299,8 – 439,0)	628,2 ^{d#} (493,2 – 800,4)	438,4 ^{as#} (353,6 – 543,6)	638,6 (472,7 – 862,6)	460,7 ^{as#} (383,5 – 553,3)	747,0 ^{d#} (570,7 – 977,7)	380,0 (311,2 – 464,0)	680,1 ^{d#} (479,6 – 964,5)	<0,05	<0,05

RG – grupa trudnica sa visokorizičnom trudnoćom; PG – grupa trudnica sa preeklampsijom; NG – nedelja gestacije; ApoA-I – apolipoprotein A-I; ApoM – apolipoprotein M; PON1 – paraoksonaza 1

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; * - geometrijska srednja vrijednost (95% interval pouzdanosti)

p₁ – ANOVA ponovljenih mjerenja za RG; p₂ – ANOVA ponovljenih mjerenja za PG

Poređenje parova vrijednosti: ^a – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 1. trimestar; ^b – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 2. trimestar; ^c – srednja vrijednost statistički značajno različita u odnosu na 3. trimestar

^d – statistički značajno različito u odnosu na RG

[§] - p <0,001; [#] - p <0,05

4.9 Spearman-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola (NHS) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila

U tabeli 13 su prikazani rezultati Spearman-ove korelacione analize između markera sinteze i apsorpcije holesterola i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u RG za koncentracije izmjerene u 1. trimestru. Uočena je statistički značajna pozitivna korelacija između markera sinteze – latosterola i ITM, dok su markeri apsorpcije holesterola bili u negativnoj korelaciji sa ITM (Tabela 12). Marker sinteze holesterola, dezmosterol i latosterol, su bili u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama ukupnog i LDL holesterola (Tabela 13).

Tabela 13 Spearman-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola (NHS) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) u 1. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
Dezmosterol	P	0,099	0,306	-0,026	0,194	0,310
	P	0,414	<0,05	0,833	0,108	<0,05
7-dehidroholesterol	P	0,068	0,093	-0,122	0,085	0,081
	P	0,577	0,441	0,313	0,484	0,506
Latosterol	P	0,394	0,387	0,216	0,159	0,349
	p	<0,05	<0,05	0,073	0,188	<0,05
Kampesterol	ρ	-0,311	0,067	-0,114	0,177	0,121
	p	<0,05	0,581	0,345	0,142	0,319
β-sitosterol	ρ	-0,318	0,104	-0,023	0,230	0,098
	p	<0,05	0,392	0,848	0,055	0,422

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni holesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; LDL-h – LDL holesterol; ρ – Spearman-ov koeficijent korelacije

U tabeli 14 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između markera sinteze i apsorpcije holesterola i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u PG za koncentracije izmjerene u 1. trimestru. Uočena je značajna negativna korelacija između kampesterola i ITM (Tabela 14). Koncentracije 7-dehidroholesterola i latosterola su bile u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom triglicerida, dok je koncentracija kampesterola, bila u statistički značajnoj negativnoj korelaciji sa koncentracijom triglicerida. Koncentracija kampesterola je bila u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom HDL i LDL holesterola. Koncentracija β -sitosterola je bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom ukupnog i LDL holesterola (Tabela 14).

Tabela 14 *Spearman*-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola (NHS) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa preeklampsijom (PG) u 1. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
Dezmosterol	ρ	0,084	0,126	0,198	-0,102	0,036
	p	0,724	0,596	0,402	0,670	0,880
7-dehidroholesterol	ρ	0,281	0,122	0,450	-0,030	-0,170
	p	0,230	0,609	<0,05	0,900	0,474
Latosterol	ρ	0,373	-0,150	0,595	-0,235	-0,424
	p	0,105	0,527	<0,05	0,319	0,062
Kampesterol	ρ	-0,701	0,478	-0,598	0,505	0,566
	p	<0,05	0,052	<0,05	<0,05	<0,05
β-sitosterol	ρ	-0,314	0,480	-0,232	0,259	0,472
	p	0,177	<0,05	0,326	0,270	<0,05

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni holesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; LDL-h – LDL holesterol; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 15 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između markera sinteze i apsorpcije holesterola i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u RG za koncentracije izmjerene u 2. trimestru. Kao i u 1. trimestru, i u 2. trimestru je uočena statistički značajna pozitivna korelacija između latosterola i ITM, dok su markeri apsorpcije holesterola bili u negativnoj korelaciji sa ITM (Tabela 15). Holesterolski prekursori su bili u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom ukupnog holesterola. Dodatno, latosterol je bio i u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom LDL holesterola. Nasuprot tome, markeri apsorpcije holesterola su bili u statistički značajnoj negativnoj korelaciji sa koncentracijom triglicerida (Tabela 15).

Tabela 15 *Spearman*-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola (NHS) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) u 2. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
Dezmosterol	ρ	0,051	0,248	0,081	0,204	0,178
	p	0,675	<0,05	0,503	0,089	0,141
7-dehidroholesterol	ρ	0,096	0,056	0,134	-0,054	0,060
	p	0,428	0,644	0,268	0,657	0,621
Latosterol	ρ	0,361	0,380	0,171	0,190	0,335
	p	<0,05	<0,05	0,158	0,116	<0,05
Kampesterol	ρ	-0,307	0,116	-0,343	0,216	0,168
	p	<0,05	0,342	<0,05	0,074	0,167
β-sitosterol	ρ	-0,413	-0,019	-0,427	0,138	0,043
	p	<0,001	0,878	<0,001	0,256	0,724

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni holesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; LDL-h – LDL holesterol; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 16 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između markera sinteze i apsorpcije holesterola i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u PG za koncentracije izmjerene u 2. trimestru. U ovom trimestru u PG su zabilježene samo značajne pozitivne korelacije između fitosterola (kampesterola i β -sitosterola) i koncentracije LDL holesterola (Tabela 16).

Tabela 16 *Spearman*-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola (NHS) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa preeklampsijom (PG) u 2. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
Dezmosterol	ρ	-0,288	0,037	-0,034	-0,196	0,038
	p	0,218	0,879	0,887	0,408	0,875
7-dehidroholesterol	ρ	-0,044	-0,197	0,054	-0,187	-0,122
	p	0,853	0,405	0,821	0,430	0,609
Latosterol	ρ	-0,158	-0,189	0,057	-0,342	-0,143
	p	0,506	0,425	0,811	0,140	0,548
Kampesterol	ρ	-0,442	0,331	-0,268	0,008	0,476
	p	0,066	0,180	0,281	0,976	<0,05
β-sitosterol	ρ	-0,074	0,354	-0,162	-0,118	0,474
	p	0,755	0,126	0,494	0,620	<0,05

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni kolesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL kolesterol; LDL-h – LDL kolesterol; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 17 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između markera sinteze i apsorpcije holesterola i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u RG za koncentracije izmjerene u 3. trimestru. U 3. trimestru ITM je statistički značajno pozitivno korelirao samo sa koncentracijom latosterola (Tabela 17). U ovoj tački je uočena i značajna pozitivna korelacija jednog od markera sinteze, latosterola, i jednog od markera apsorpcije holesterola, kampesterola, sa koncentracijama ukupnog i LDL holesterola. Dodatno, koncentracije dezmosterola i latosterola su bile u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom HDL holesterola (Tabela 17).

Tabela 17 *Spearman*-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola (NHS) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) u 3. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
Dezmosterol	ρ	0,145	0,199	0,009	0,262	0,152
	p	0,231	0,098	0,939	<0,05	0,213
7-dehidroholesterol	ρ	0,152	0,035	-0,069	0,077	0,035
	p	0,209	0,772	0,573	0,532	0,776
Latosterol	ρ	0,295	0,315	-0,049	0,325	0,276
	p	<0,05	<0,05	0,684	<0,05	<0,05
Kampesterol	ρ	-0,042	0,275	-0,039	0,169	0,305
	p	0,729	<0,05	0,748	0,169	<0,05
β-sitosterol	ρ	-0,214	0,145	-0,207	0,152	0,196
	p	0,075	0,230	0,085	0,212	0,106

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni holesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; LDL-h – LDL holesterol; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 18 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između markera sinteze i apsorpcije holesterola i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u PG za koncentracije izmjerene u 3. trimestru. U ovoj tački ispitivanja u PG uočene su statistički značajne korelacije jedino između koncentracije kampesterola i osnovnih parametara lipidnog profila. Navedeni marker apsorpcije je pozitivno korelirao sa koncentracijom ukupnog, HDL i LDL holesterola (Tabela 18).

Tabela 18 *Spearman*-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola (NHS) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa preeklampsijom (PG) u 3. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
Dezmosterol	ρ	-0,132	-0,078	0,098	0,123	-0,165
	p	0,578	0,743	0,682	0,605	0,486
7-dehidroholesterol	ρ	0,176	-0,059	0,268	-0,080	-0,114
	p	0,458	0,806	0,254	0,738	0,631
Latosterol	ρ	0,233	-0,176	0,279	-0,108	-0,191
	p	0,323	0,458	0,233	0,650	0,420
Kampesterol	ρ	-0,375	0,606	-0,463	0,476	0,505
	p	0,126	<0,05	0,053	<0,05	<0,05
β-sitosterol	ρ	-0,150	0,401	-0,420	0,211	0,364
	p	0,527	0,080	0,065	0,373	0,115

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni holesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; LDL-h – LDL holesterol; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 19 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između markera sinteze i apsorpcije holesterola i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u RG za koncentracije izmjerene u tački pred porođaj. Koncentracija latosterola je bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa ITM i u tački pred porođaj, kao i u svim prethodno ispitivanim tačkama u RG (Tabela 19). Uočena je i statistički značajna pozitivna korelacija između koncentracije latosterola i koncentracija ukupnog, HDL i LDL holesterola. Koncentracije dezmosterola i HDL holesterola su, takođe, bile u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji. Sa druge strane, β -sitosterol je bio u značajnoj negativnoj korelaciji sa koncentracijom triglicerida (Tabela 19).

Tabela 19 *Spearman*-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola (NHS) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) pred porođaj

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
Dezmosterol	ρ	0,074	0,086	-0,101	0,285	-0,026
	p	0,542	0,474	0,401	<0,05	0,833
7-dehidroholesterol	ρ	0,187	0,100	-0,049	0,178	0,039
	p	0,119	0,405	0,688	0,144	0,749
Latosterol	ρ	0,292	0,405	0,084	0,469	0,302
	p	<0,05	<0,001	0,486	<0,001	<0,05
Kampesterol	ρ	-0,087	0,176	-0,092	0,199	0,206
	p	0,469	0,142	0,444	0,101	0,087
β-sitosterol	ρ	-0,218	0,017	-0,351	0,231	0,043
	p	0,067	0,888	<0,05	0,056	0,721

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni holesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; LDL-h – LDL holesterol; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 20 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između markera sinteze i apsorpcije holesterola i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u PG za koncentracije izmjerene u tački pred porođaj. U ovoj tački praćenja, nisu uočene statistički značajne korelacije ni između NHS i ITM, niti između koncentracija NHS i koncentracija osnovnih parametara lipidnog profila (Tabela 20).

Tabela 20 *Spearman*-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola (NHS) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa preeklampsijom (PG) pred porođaj

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
Dezmosterol	P	-0,222	-0,107	0,218	0,108	-0,165
	P	0,347	0,654	0,356	0,668	0,512
7-dehidroholesterol	P	0,044	-0,129	0,168	0,044	-0,156
	P	0,855	0,587	0,478	0,861	0,537
Latosterol	P	-0,014	-0,113	0,212	0,103	-0,174
	P	0,952	0,636	0,369	0,683	0,489
Kampesterol	P	-0,101	-0,064	-0,238	0,325	-0,086
	P	0,701	0,808	0,358	0,237	0,761
β-sitosterol	P	0,005	0,029	-0,402	0,443	0,100
	P	0,982	0,905	0,079	0,066	0,693

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni holesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; LDL-h – LDL holesterol; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

4.10 *Spearman*-ova korelaciona analiza između sfingolipida i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila

U tabeli 21 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između ispitivanih sfingolipida i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u RG za koncentracije izmjerene u 1. trimestru. Statistički značajne pozitivne korelacije su uočene između koncentracije Cer C24:0 i SM C16:0 sa koncentracijom ukupnog holesterola. Koncentracija Cer C24:0 je bila i u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom triglicerida, dok su koncentracije S1P i triglicerida bile u statistički značajnoj negativnoj korelaciji. Koncentracije HDL i LDL holesterola su bile u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama SAPH1P i SM C16:0 (Tabela 21).

Tabela 21 *Spearman*-ova korelaciona analiza između sfingolipida i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) u 1. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
SPH	ρ	0,079	-0,042	-0,034	-0,117	0,013
	p	0,510	0,728	0,779	0,330	0,915
SAPH	ρ	0,083	0,213	0,014	0,053	0,243
	p	0,491	0,072	0,906	0,661	<0,05
S1P	ρ	-0,032	0,117	-0,238	0,112	0,144
	p	0,792	0,329	<0,05	0,350	0,227
SAPH1P	ρ	0,013	0,190	-0,202	0,253	0,259
	p	0,916	0,110	0,089	<0,05	<0,05
Cer C16:0	ρ	0,143	0,204	0,102	0,031	0,220
	p	0,235	0,087	0,399	0,795	0,065
Cer C24:0	ρ	0,128	0,275	0,293	0,081	0,172
	p	0,364	<0,05	<0,05	0,569	0,222
SM C16:0	ρ	0,110	0,548	0,165	0,508	0,499
	p	0,358	<0,001	0,166	<0,001	<0,001

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni holesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; LDL-h – LDL holesterol; SPH – sfingozin; SAPH – sfinganin; S1P – sfingozin-1-fosfat; SAPH1P – sfinganin-1-fosfat; Cer C16:0 – ceramid C16:0; Cer C24:0 – ceramid C24:0; SM C16:0 – sfingomijelin C16:0; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 22 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između ispitivanih sfingolipida i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u PG za koncentracije izmjerene u 1. trimestru. U PG kao jedina statistički značajna korelacija je izdvojena pozitivna korelacija između koncentracije triglicerida i SAPH1P (Tabela 22).

Tabela 22 *Spearman*-ova korelaciona analiza između sfingolipida i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa preeklampsijom (PG) u 1. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
SPH	ρ	-0,253	-0,020	-0,236	0,081	-0,012
	p	0,283	0,935	0,316	0,733	0,960
SAPH	ρ	0,202	0,122	-0,089	-0,342	0,417
	p	0,394	0,609	0,710	0,140	0,068
S1P	ρ	-0,011	0,218	0,065	0,197	0,024
	p	0,965	0,356	0,787	0,405	0,920
SAPH1P	ρ	0,125	-0,340	0,471	-0,254	-0,435
	p	0,600	0,143	<0,05	0,279	0,056
Cer C16:0	ρ	-0,325	-0,107	-0,024	-0,135	0,159
	p	0,162	0,654	0,920	0,569	0,502
Cer C24:0	ρ	-0,433	0,455	-0,226	0,275	0,433
	p	0,122	0,102	0,436	0,341	0,122
SM C16:0	ρ	-0,411	0,409	-0,137	0,342	0,274
	p	0,072	0,073	0,565	0,140	0,243

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni kolesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL kolesterol; LDL-h – LDL kolesterol; SPH – sfingozin; SAPH – sfinganin; S1P – sfingozin-1-fosfat; SAPH1P – sfinganin-1-fosfat; Cer C16:0 – ceramid C16:0; Cer C24:0 – ceramid C24:0; SM C16:0 – sfingomijelin C16:0; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 23 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između ispitivanih sfingolipida i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u RG za koncentracije izmjerene u 2. trimestru. U ovoj tački je uočena značajna negativna korelacija između koncentracije SAPH i ITM. Pored toga, koncentracija SAPH je bila u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom ukupnog i LDL kolesterola, i u statistički značajnoj negativnoj korelaciji sa koncentracijom triglicerida. Koncentracije Cer C24:0 i triglicerida su bile u značajnoj pozitivnoj korelaciji. Koncentracija SM C16:0 je pozitivno korelirala sa koncentracijom ukupnog, HDL i LDL kolesterola (Tabela 23).

Tabela 23 *Spearman*-ova korelaciona analiza između sfingolipida i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) u 2. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
SPH	ρ	-0,084	0,075	-0,062	-0,016	0,110
	p	0,492	0,541	0,614	0,898	0,369
SAPH	ρ	-0,287	0,234	-0,251	0,117	0,286
	p	<0,05	<0,05	<0,05	0,326	<0,05
S1P	ρ	-0,195	0,160	-0,174	0,059	0,209
	p	0,100	0,179	0,143	0,623	0,079
SAPH1P	ρ	-0,118	0,182	0,034	-0,031	0,206
	p	0,326	0,130	0,776	0,795	0,085
Cer C16:0	ρ	0,167	0,177	0,220	0,061	0,162
	p	0,161	0,138	0,064	0,611	0,174
Cer C24:0	ρ	0,142	0,225	0,281	0,060	0,155
	p	0,271	0,079	<0,05	0,643	0,229
SM C16:0	ρ	0,043	0,620	0,151	0,429	0,578
	p	0,720	<0,001	0,205	<0,001	<0,001

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni kolesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL kolesterol; LDL-h – LDL kolesterol; SPH – sfingozin; SAPH – sfinganin; S1P – sfingozin-1-fosfat; SAPH1P – sfinganin-1-fosfat; Cer C16:0 – ceramid C16:0; Cer C24:0 – ceramid C24:0; SM C16:0 – sfingomijelin C16:0; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 24 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između ispitivanih sfingolipida i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u PG za koncentracije izmjerene u 2. trimestru. U PG je u 2. trimestru uočena značajna negativna korelacija između koncentracija SAPH1P i HDL kolesterola. Koncentracija Cer C24:0 je bila u statistički značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama ukupnog, HDL i LDL kolesterola. Slično kao u RG, uočena je značajna pozitivna korelacija između koncentracija SM C16:0 i koncentracija ukupnog i LDL kolesterola (Tabela 24).

Tabela 24 Spearman-ova korelaciona analiza između sfingolipida i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa preeklampsijom (PG) u 2. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
SPH	ρ	-0,195	0,347	0,077	0,096	0,286
	p	0,438	0,158	0,760	0,705	0,250
SAPH	ρ	-0,146	0,024	0,309	-0,022	0,037
	p	0,552	0,923	0,198	0,929	0,881
S1P	ρ	0,026	-0,321	0,185	-0,373	-0,247
	p	0,915	0,168	0,435	0,105	0,295
SAPH1P	ρ	0,075	-0,309	0,071	-0,593	-0,220
	p	0,753	0,186	0,767	<0,05	0,352
Cer C16:0	ρ	-0,068	0,284	0,146	-0,019	0,223
	p	0,777	0,226	0,539	0,937	0,346
Cer C24:0	ρ	-0,100	0,633	0,009	0,552	0,544
	p	0,713	<0,05	0,974	<0,05	<0,05
SM C16:0	ρ	-0,226	0,780	0,032	0,133	0,820
	p	0,339	<0,001	0,895	0,576	<0,001

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni kolesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL kolesterol; LDL-h – LDL kolesterol; SPH – sfingozin; SAPH – sfinganin; S1P – sfingozin-1-fosfat; SAPH1P – sfinganin-1-fosfat; Cer C16:0 – ceramid C16:0; Cer C24:0 – ceramid C24:0; SM C16:0 – sfingomijelin C16:0; ρ – Spearman-ov koeficijent korelacije

U tabeli 25 su prikazani rezultati Spearman-ove korelacione analize između ispitivanih sfingolipida i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u RG za koncentracije izmjerene u 3. trimestru. SAPH je bio u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom HDL kolesterola. Koncentracija Cer C16:0 je značajno pozitivno korelirala sa ITM i sa koncentracijom triglicerida, dok je koncentracija Cer C24:0 bila u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama ukupnog kolesterola, triglicerida i LDL kolesterola. Uočena je i značajna pozitivna korelacija između SM C16:0 i koncentracije svih osnovnih parametara lipidnog profila (Tabela 25).

Tabela 25 *Spearman*-ova korelaciona analiza između sfingolipida i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) u 3. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
SPH	ρ	0,005	0,129	0,180	0,042	0,106
	p	0,965	0,299	0,145	0,738	0,398
SAPH	ρ	-0,112	0,190	-0,125	0,265	0,169
	p	0,357	0,115	0,301	<0,05	0,164
S1P	ρ	0,098	0,053	-0,086	0,054	0,063
	p	0,417	0,661	0,479	0,659	0,606
SAPH1P	ρ	0,062	0,143	0,052	-0,074	0,173
	p	0,614	0,245	0,674	0,550	0,159
Cer C16:0	ρ	0,261	0,117	0,362	-0,048	0,063
	p	<0,05	0,340	<0,05	0,700	0,611
Cer C24:0	ρ	0,204	0,445	0,384	0,184	0,329
	p	0,103	<0,001	<0,05	0,145	<0,05
SM C16:0	ρ	0,130	0,438	0,352	0,278	0,393
	p	0,282	<0,001	<0,05	<0,05	<0,05

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni kolesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL kolesterol; LDL-h – LDL kolesterol; SPH – sfingozin; SAPH – sfinganin; S1P – sfingozin-1-fosfat; SAPH1P – sfinganin-1-fosfat; Cer C16:0 – ceramid C16:0; Cer C24:0 – ceramid C24:0; SM C16:0 – sfingomijelin C16:0; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 26 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između ispitivanih sfingolipida i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u PG za koncentracije izmjerene u 3. trimestru. U ovom trimestru uočena je statistički značajna negativna korelacija između koncentracije S1P i ITM. Pored toga, kao statistički značajne izdvojile su se pozitivne korelacije između koncentracije SM C16:0 i koncentracija triglicerida i HDL kolesterola (Tabela 26).

Tabela 26 *Spearman*-ova korelaciona analiza između sfingolipida i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa preeklampsijom (PG) u 3. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
SPH	ρ	-0,309	0,097	-0,090	-0,114	0,146
	p	0,198	0,694	0,713	0,642	0,552
SAPH	ρ	-0,296	-0,326	0,249	-0,214	-0,305
	p	0,205	0,161	0,290	0,366	0,191
S1P	ρ	-0,450	-0,008	-0,124	0,030	0,069
	p	<0,05	0,975	0,602	0,900	0,772
SAPH1P	ρ	-0,277	0,032	-0,205	0,089	0,063
	p	0,238	0,892	0,387	0,710	0,791
Cer C16:0	ρ	0,054	0,047	0,052	0,119	-0,032
	p	0,821	0,843	0,828	0,618	0,895
Cer C24:0	ρ	-0,265	-0,021	-0,093	-0,179	0,062
	p	0,322	0,940	0,733	0,506	0,820
SM C16:0	ρ	-0,066	0,617	-0,309	0,445	0,436
	p	0,782	<0,05	0,185	<0,05	0,055

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni kolesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL kolesterol; LDL-h – LDL kolesterol; SPH – sfingozin; SAPH – sfinganin; S1P – sfingozin-1-fosfat; SAPH1P – sfinganin-1-fosfat; Cer C16:0 – ceramid C16:0; Cer C24:0 – ceramid C24:0; SM C16:0 – sfingomijelin C16:0; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 27 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između ispitivanih sfingolipida i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u RG za koncentracije određene pred porođaj. U ovoj tački uočene su značajne pozitivne korelacije između koncentracija SPH i SAPH sa koncentracijom HDL kolesterola. Koncentracija Cer C24:0 je pozitivno korelirala sa ITM, kao i sa koncentracijama ukupnog kolesterola i triglicerida. Kao i u prethodnoj ispitivanoj tački, i pred porođaj je uočena značajna pozitivna korelacija između SM C16:0 i koncentracije svih osnovnih parametara lipidnog profila (Tabela 27).

Tabela 27 *Spearman*-ova korelaciona analiza između sfingolipida i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) pred porođaj

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
SPH	ρ	-0,022	0,151	0,112	0,274	0,051
	p	0,864	0,232	0,378	<0,05	0,690
SAPH	ρ	-0,123	0,109	0,003	0,242	-0,006
	p	0,311	0,370	0,980	<0,05	0,962
S1P	ρ	0,077	0,216	-0,098	0,162	0,228
	p	0,522	0,070	0,414	0,183	0,058
SAPH1P	ρ	0,094	0,187	0,052	0,239	0,121
	p	0,440	0,124	0,670	0,052	0,327
Cer C16:0	ρ	0,148	0,192	0,216	0,093	0,117
	p	0,220	0,109	0,070	0,447	0,334
Cer C24:0	ρ	0,255	0,294	0,402	0,079	0,123
	p	<0,05	<0,05	<0,05	0,544	0,335
SM C16:0	ρ	0,177	0,559	0,304	0,436	0,501
	p	0,140	<0,001	<0,05	<0,001	<0,001

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni holesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; LDL-h – LDL holesterol; SPH – sfingozin; SAPH – sfinganin; S1P – sfingozin-1-fosfat; SAPH1P – sfinganin-1-fosfat; Cer C16:0 – ceramid C16:0; Cer C24:0 – ceramid C24:0; SM C16:0 – sfingomijelin C16:0; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 28 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između ispitivanih sfingolipida i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u PG za koncentracije određene pred porođaj. Jedine statistički značajne korelacije uočene u ovoj tački u PG su bile pozitivne korelacije između koncentracije SM C16:0 i koncentracija ukupnog i LDL holesterola (Tabela 28).

Tabela 28 Spearman-ova korelaciona analiza između sfingolipida i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica preeklampsijom (PG) pred porođaj

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
SPH	ρ	-0,061	-0,281	-0,081	-0,013	-0,324
	p	0,805	0,244	0,743	0,959	0,205
SAPH	ρ	-0,277	0,260	0,070	0,039	0,179
	p	0,252	0,283	0,775	0,877	0,478
S1P	ρ	-0,108	0,305	0,339	0,047	0,181
	p	0,660	0,204	0,156	0,852	0,473
SAPH1P	ρ	0,032	0,132	-0,058	0,013	0,187
	p	0,895	0,591	0,814	0,958	0,458
Cer C16:0	ρ	0,099	-0,162	0,066	-0,109	-0,238
	p	0,679	0,494	0,782	0,666	0,341
Cer C24:0	ρ	-0,326	0,169	0,051	-0,054	0,179
	p	0,201	0,516	0,844	0,841	0,506
SM C16:0	ρ	-0,266	0,620	-0,113	0,389	0,556
	p	0,258	<0,05	0,636	0,110	<0,05

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni kolesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL kolesterol; LDL-h – LDL kolesterol; SPH – sfingozin; SAPH – sfinganin; S1P – sfingozin-1-fosfat; SAPH1P – sfinganin-1-fosfat; Cer C16:0 – ceramid C16:0; Cer C24:0 – ceramid C24:0; SM C16:0 – sfingomijelin C16:0; ρ – Spearman-ov koeficijent korelacije

4.11 Spearman-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola u HDL frakciji (NHS_{HDL}) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila

U tabeli 29 su prikazani rezultati Spearman-ove korelacione analize između NHS_{HDL} i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u RG za koncentracije određene u 1. trimestru. Koncentracija $dezmosterola_{HDL}$ je bila u značajnoj negativnoj korelaciji sa koncentracijom triglicerida i značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom HDL kolesterola. Uočena je i značajna pozitivna korelacija između $latosterola_{HDL}$ i koncentracije HDL kolesterola. Sa koncentracijom HDL kolesterola su pozitivno korelirale i koncentracije biljnih sterola u HDL frakciji. Pored toga, uočena je i statistički značajna negativna korelacija između koncentracije β -sitosterola $_{HDL}$ i ITM (Tabela 29).

Tabela 29 *Spearman*-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola u HDL frakciji (NHS_{HDL}) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) u 1. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
Dezmosterol_{HDL}	ρ	-0,064	0,107	-0,285	0,334	0,108
	p	0,595	0,372	<0,05	<0,05	0,368
7-dehidroholesterol_{HDL}	ρ	-0,017	0,072	-0,104	0,181	-0,046
	p	0,888	0,553	0,388	0,131	0,705
Latosterol_{HDL}	ρ	-0,119	0,048	-0,040	0,272	-0,011
	p	0,383	0,724	0,769	<0,05	0,934
Kampesterol_{HDL}	ρ	-0,100	0,106	-0,150	0,346	0,100
	p	0,409	0,380	0,215	<0,05	0,409
β-sitosterol_{HDL}	ρ	-0,323	0,059	-0,020	0,243	0,004
	p	<0,05	0,630	0,870	<0,05	0,974

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni holesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; LDL-h – LDL holesterol; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 30 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između NHS_{HDL} i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u PG za koncentracije određene u 1. trimestru. Uočena je značajna pozitivna korelacija između 7-dehidroholesterola_{HDL} i HDL holesterola, a sa druge strane, latosterol_{HDL} je bio u značajnoj negativnoj korelaciji sa koncentracijom LDL holesterola. Koncentracija kampesterola_{HDL} je bila u statistički značajnoj korelaciji sa svim ispitivanim parametrima, i to u negativnoj korelaciji sa ITM i koncentracijom triglicerida, i pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama ukupnog, HDL i LDL holesterola. Koncentracija β -sitosterola_{HDL} je bila u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama ukupnog i HDL holesterola (Tabela 30).

Tabela 30 *Spearman*-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola u HDL frakciji (NHS_{HDL}) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa preeklampsijom (PG) u 1. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
Dezmosterol_{HDL}	ρ	-0,229	0,041	-0,301	0,072	0,330
	p	0,331	0,862	0,197	0,763	0,156
7-dehidroholesterol_{HDL}	ρ	-0,294	0,230	-0,372	0,724	-0,030
	p	0,208	0,329	0,106	<0,001	0,900
Latosterol_{HDL}	ρ	-0,030	-0,062	0,041	0,390	-0,524
	p	0,906	0,807	0,871	0,109	<0,05
Kampesterol_{HDL}	ρ	-0,541	0,488	-0,446	0,518	0,469
	p	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
β-sitosterol_{HDL}	ρ	-0,222	0,586	-0,119	0,789	0,031
	p	0,347	<0,05	0,618	<0,001	0,897

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni holesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; LDL-h – LDL holesterol; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 31 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između NHS_{HDL} i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u RG za koncentracije određene u 2. trimestru. U ovom trimestru zabilježena je statistički značajna pozitivna korelacija između svih ispitivanih markera sinteze holesterola u HDL frakciji (dezmosterol_{HDL}, 7-dehidroholesterol_{HDL} i latosterol_{HDL}) i koncentracije HDL holesterola. Koncentracija kampesterola_{HDL} je bila u značajnoj negativnoj korelaciji sa koncentracijom triglicerida, i značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijama HDL i LDL holesterola. Uočene su i značajne negativne korelacije između koncentracije β -sitosterola_{HDL} i ITM i koncentracije triglicerida (Tabela 31).

Tabela 31 *Spearman*-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola u HDL frakciji (NHS_{HDL}) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) u 2. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
Dezmosterol_{HDL}	ρ	-0,172	0,004	-0,178	0,273	-0,052
	p	0,149	0,970	0,135	<0,05	0,664
7-dehidroholesterol_{HDL}	ρ	0,159	0,077	-0,174	0,362	0,026
	p	0,181	0,520	0,143	<0,05	0,826
Latosterol_{HDL}	ρ	0,167	0,116	0,131	0,293	0,024
	p	0,205	0,382	0,322	<0,05	0,857
Kampesterol_{HDL}	ρ	-0,233	0,215	-0,371	0,489	0,240
	p	0,050	0,072	<0,05	<0,001	<0,05
β-sitosterol_{HDL}	ρ	-0,262	-0,098	-0,315	0,220	-0,100
	p	<0,05	0,411	<0,05	0,064	0,405

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni holesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; LDL-h – LDL holesterol; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 32 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između NHS_{HDL} i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u PG za koncentracije određene u 2. trimestru. Jedina značajna korelacija u PG u 2. trimestru je bila pozitivna korelacija između koncentracija kampesterola_{HDL} i HDL holesterola (Tabela 32).

Tabela 32 Spearman-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola u HDL frakciji (NHS_{HDL}) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa preeklampsijom (PG) u 2. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
Dezmosterol_{HDL}	ρ	-0,385	0,166	-0,372	0,229	0,033
	p	0,103	0,497	0,117	0,345	0,892
7-dehidroholesterol_{HDL}	ρ	-0,161	-0,247	-0,327	0,048	-0,084
	p	0,511	0,307	0,172	0,846	0,731
Latosterol_{HDL}	ρ	-0,042	-0,289	0,018	-0,082	-0,397
	p	0,868	0,245	0,945	0,748	0,103
Kampesterol_{HDL}	ρ	-0,363	0,389	-0,155	0,594	0,386
	p	0,126	0,100	0,525	<0,05	0,102
β-sitosterol_{HDL}	ρ	0,053	0,052	-0,088	0,181	0,143
	p	0,830	0,833	0,721	0,459	0,559

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni kolesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL kolesterol; LDL-h – LDL kolesterol; ρ – Spearman-ov koeficijent korelacije

U tabeli 33 su prikazani rezultati Spearman-ove korelacione analize između NHS_{HDL} i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u RG za koncentracije određene u 3. trimestru. U 3. trimestru je uočena značajna negativna korelacija između koncentracija dezmosterola_{HDL} i triglicerida ($p < 0,05$), dok je drugi prekursor kolesterola (latosterol_{HDL}) bio u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom HDL kolesterola ($p < 0,05$). Koncentracija kampesterola_{HDL} je bila u značajnoj negativnoj korelaciji sa ITM ($p < 0,05$) i značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom HDL kolesterola ($p < 0,05$) (Tabela 33).

Tabela 33 *Spearman*-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola u HDL frakciji (NHS_{HDL}) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) u 3. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
Dezmosterol_{HDL}	ρ	-0,082	-0,061	-0,273	0,100	-0,063
	p	0,497	0,614	<0,05	0,409	0,605
7-dehidroholesterol_{HDL}	ρ	0,099	0,115	-0,206	0,208	0,120
	p	0,413	0,341	0,084	0,083	0,324
Latosterol_{HDL}	ρ	-0,130	-0,009	-0,171	0,288	-0,070
	p	0,343	0,951	0,211	<0,05	0,615
Kampesterol_{HDL}	ρ	-0,274	0,183	-0,225	0,349	0,161
	p	<0,05	0,129	0,062	<0,05	0,186
β-sitosterol_{HDL}	ρ	-0,225	0,086	-0,046	0,167	0,081
	p	0,060	0,475	0,703	0,167	0,505

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni holesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; LDL-h – LDL holesterol; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 34 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između NHS_{HDL} i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u PG za koncentracije određene u 3. trimestru. U PG su u 3. trimestru uočene značajna negativna korelacija između koncentracije dezmosterola_{HDL} i koncentracije HDL holesterola, i značajne pozitivne korelacije između koncentracije latosterola_{HDL} i kampesterola_{HDL} sa koncentracijom HDL holesterola (Tabela 34).

Tabela 34 *Spearman*-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola u HDL frakciji (NHS_{HDL}) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa preeklampsijom (PG) u 3. trimestru

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
Dezmosterol_{HDL}	ρ	-0,360	-0,313	-0,030	-0,457	-0,392
	p	0,119	0,179	0,900	<0,05	0,087
7-dehidroholesterol_{HDL}	ρ	-0,172	-0,086	0,025	0,284	-0,105
	p	0,470	0,719	0,916	0,224	0,658
Latosterol_{HDL}	ρ	0,152	-0,086	-0,164	0,534	-0,169
	p	0,535	0,728	0,502	<0,05	0,488
Kampesterol_{HDL}	ρ	-0,440	0,417	-0,288	0,518	0,237
	p	0,052	0,068	0,218	<0,05	0,314
β-sitosterol_{HDL}	ρ	0,030	0,377	-0,123	0,223	0,311
	p	0,900	0,101	0,607	0,346	0,182

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni holesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; LDL-h – LDL holesterol; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 35 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između NHS_{HDL} i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u RG za koncentracije određene pred porođaj. U tački pred porođaj koncentracija dezmosterola_{HDL} je bila u statistički značajnoj negativnoj korelaciji sa ITM i koncentracijom triglicerida, dok je 7-dehidroholesterol_{HDL} negativno korelirao sa koncentracijom triglicerida. U istoj tački, kampesterol_{HDL} je bio u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom HDL holesterola, a β -sitosterol_{HDL} u značajnoj negativnoj korelaciji sa ITM (Tabela 35).

Tabela 35 *Spearman*-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola u HDL frakciji (NHS_{HDL}) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa visokorizičnom trudnoćom (RG) pred porođaj

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
Dezmosterol_{HDL}	ρ	-0,245	0,011	-0,331	0,152	0,012
	p	<0,05	0,930	<0,05	0,212	0,921
7-dehidroholesterol_{HDL}	ρ	0,004	0,004	-0,284	0,232	0,000
	p	0,976	0,975	<0,05	0,055	0,998
Latosterol_{HDL}	ρ	-0,164	0,077	-0,137	0,203	0,074
	p	0,215	0,561	0,300	0,131	0,581
Kampesterol_{HDL}	ρ	-0,227	-0,005	-0,215	0,242	-0,051
	p	0,061	0,966	0,076	<0,05	0,679
β-sitosterol_{HDL}	ρ	-0,261	0,073	-0,038	0,125	0,119
	p	<0,05	0,544	0,752	0,306	0,327

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni holesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; LDL-h – LDL holesterol; ρ – *Spearman*-ov koeficijent korelacije

U tabeli 36 su prikazani rezultati *Spearman*-ove korelacione analize između NHS_{HDL} i ITM, kao i osnovnih parametara lipidnog profila u PG za koncentracije određene pred porođaj. Jedine statistički značajne korelacije u PG u tački pred porođaj bile su pozitivne korelacije između latosterola_{HDL} i kampesterola_{HDL} sa koncentracijom HDL holesterola (Tabela 36).

Tabela 36 Spearman-ova korelaciona analiza između neholesterolskih sterola u HDL frakciji (NHS_{HDL}) i indeksa tjelesne mase (ITM) i osnovnih parametara lipidnog profila u grupi trudnica sa preeklampsijom (PG) pred porođaj

		ITM	UH	TG	HDL-h	LDL-h
Dezmosterol_{HDL}	ρ	-0,359	0,012	0,020	0,404	-0,052
	p	0,120	0,960	0,932	0,097	0,839
7-dehidroholesterol_{HDL}	ρ	-0,425	-0,065	-0,152	0,348	-0,122
	p	0,062	0,784	0,523	0,157	0,630
Latosterol_{HDL}	ρ	-0,242	0,104	-0,317	0,690	0,067
	p	0,319	0,670	0,186	<0,05	0,797
Kampesterol_{HDL}	ρ	-0,288	0,221	-0,355	0,564	0,109
	p	0,218	0,350	0,125	<0,05	0,668
β-sitosterol_{HDL}	ρ	-0,042	0,397	0,030	0,265	0,368
	p	0,860	0,083	0,900	0,287	0,132

ITM – indeks tjelesne mase; UH – ukupni holesterol; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; LDL-h – LDL holesterol; ρ – Spearman-ov koeficijent korelacije

4.12 Ispitivanje značaja specifičnih biomarkera u procjeni rizika za razvoj preeklampsije u 1. trimestru trudnoće

Da bi se ispitaio značaj specifičnih parametara ispitivanih u ovoj studiji kao potencijalnih parametara za procjenu rizika za razvoj preeklampsije, primijenjena je binarna logistička regresiona analiza. Za referentnu grupu je uzeta RG i kodirana je sa 0, dok je grupu ishoda predstavljala PG, koja je kodirana sa 1. Da bi se procijenilo da li se ishod trudnoće, tj. razvoj preeklampsije, može povezati sa specifičnim lipidnim biomarkerima, a koji su pokazali statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa u 1. trimestru, primijenjena je univarijantna binarna logistička regresiona analiza. Rezultati te analize su prikazani u tabeli 37.

Tabela 37 Binarna logistička regresiona analiza povezanosti kliničkih i biohemijskih parametara u 1. trimestru sa razvojem preeklampsije

	OR	95% IP	P
TG, mmol/L	2,251	0,990 – 5,115	0,053
Latosterol, $\mu\text{mol/L}$	1,054	1,003 – 1,107	<0,05
β -sitosterol, $\mu\text{mol/L}$	0,823	0,640 – 1,059	0,130
Dezmosterol _{HDL} , $\mu\text{mol/L}$	0,000	0,000 - 0,372	<0,05
ApoM, mg/L	0,950	0,915 – 0,985	<0,05
PON1, U/L	1,001	1,000 – 1,003	<0,05

OR – odnos šansi; IP – interval pouzdanosti; TG – trigliceridi; dezmosterol_{HDL} – dezmosterol u HDL frakciji; ApoM – apolipoprotein M; PON1 – paraoksonaza 1

p – univarijantna binarna logistička regresiona analiza

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 37, uočava se da se kao značajni parametri koji razdvajaju trudnice sa visokorizičnom trudnoćom koje će razviti preeklampsiju od onih koje uprkos postojećem riziku neće razviti ovo oboljenje, izdvajaju koncentracije latosterola, dezmosterola_{HDL}, apoM i PON1 određene u 1. trimestru. Iako su uočene značajne razlike u koncentracijama triglicerida i β -sitosterola između ispitivanih grupa u 1. trimestru, ova dva markera se nisu izdvojila kao značajno povezana sa razvojem preeklampsije (Tabela 37).

Dalja analiza se odnosila na ispitivanje nezavisnog uticaja parametara koji su se pokazali značajnim u univarijantnoj analizi kreiranjem modela koristeći multivarijantnu binarnu logističku regresionu analizu. Osim parametara koji su se pokazali značajnim u 1. trimestru u ispitivani model smo dodali i godine starosti, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, koncentraciju PlGF-1, koncentraciju sFlt-1, koncentraciju ukupnog holesterola i koncentraciju triglicerida, koje kliničari koriste kao tradicionalne markere za predikciju rizika od razvoja preeklampsije. Koncentracija PAPP-A i odnos sFlt-1/PlGF-1 su izuzeti iz modela zbog multikolinearnosti. Tabela 38 pokazuje da od svih varijabli iz 1. trimestra koje su uključene u multivarijantnu logističku regresionu analizu, samo koncentracija dezmosterola_{HDL} je imala značajne prediktivne karakteristike za preeklampsiju u trudnoći. Na osnovu rezultata multivarijantne binarne logističke regresione analize može se zaključiti da se skoro 43% (*Nagelkerke* $R^2 = 0,428$) zabilježenih slučajeva preeklampsije može povezati sa nižim koncentracijama dezmosterola u HDL frakciji (Tabela 38), kao i da je model tačno klasifikovao 87,1% slučajeva. Logistički regresioni model je dobro fitovao podatke ($\chi^2 = 11,267$; $p = 0,187$).

Tabela 38 Multivarijantna binarna logistička analiza u 1. trimestru

Preklampsija			
<i>Nagelkerke R² = 0,428</i>			
	OR	95% IP (OR)	p
Starost, godine	1,118	0,934 – 1,340	0,224
ITM prije trudnoće, kg/m²	1,093	0,920 – 1,298	0,314
SAP, mmHg	1,068	0,980 – 1,165	0,132
MPI-UtA	0,585	0,136 – 2,516	0,585
PIGF-1, pg/mL	1,017	0,964 – 1,074	0,536
sFlt-1, pg/mL	0,998	0,997 – 1,000	0,106
Holesterol, mmol/L	0,839	0,329 – 2,142	0,714
Trigliceridi, mmol/L	1,964	0,509 – 7,583	0,327
Latosterol, μmol/L	0,998	0,919 – 1,084	0,968
Dezmosterol_{HDL}, μmol/L	1,79*10 ⁻⁷	2.38*10 ⁻¹³ – 0,134	<0,05
ApoM, mg/L	0,986	0,939 – 1,036	0,572
PON1, U/L	1,000	0,998 – 1,002	0,934

OR – odnos šansi; IP – interval pouzdanosti; ITM – indeks tjelesne mase; SAP – srednji arterijski pritisak; MPI-UtA – srednja vrijednost pulsatilnog indeksa uterinih arterija; PIGF-1 – placentalni faktor rasta; sFlt-1 - solubilni anti-angiogeni faktori; dezmosterol_{HDL} – dezmosterol u HDL frakciji; ApoM – apolipoprotein M; PON1 – paraoksonaza 1

Sljedeći korak u ovoj studiji bio je ispitivanje potencijalne dijagnostičke tačnosti parametara koji su se koristili za razdvajanje ispitanica koje su razvile preeklampsiju u trudnoći od trudnica koje uprkos postojećem riziku nisu razvile preeklampsiju. ROC analiza je urađena za koncentraciju dezmosterola_{HDL}, za model 1 (starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, koncentracija PIGF-1, koncentracija sFlt-1, koncentracija holesterola i koncentracija triglicerida), kao i za model 2 koji je prethodno definisan za predikciju preeklampsije u trudnoći (starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, PIGF-1, sFlt-1, koncentracija holesterola, koncentracija triglicerida, koncentracija latosterola, koncentracija dezmosterola_{HDL}, koncentracija apoM i aktivnost PON1). Rezultati analize ROC krivih dati su u Tabeli 39, a ROC krive su prikazane na Slikama 21-23.

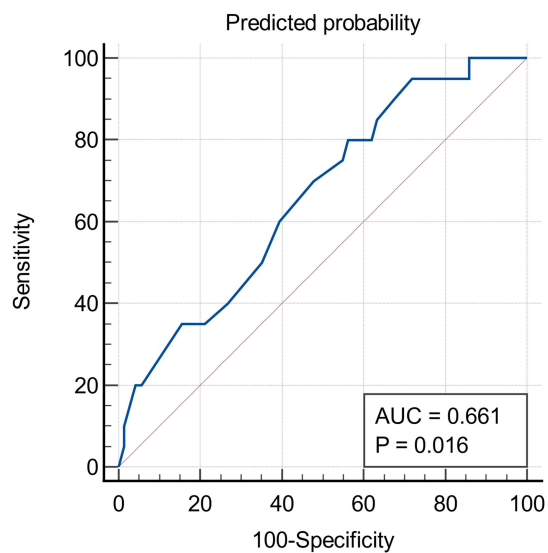
Tabela 39 Analiza ROC krivih u identifikovanju trudnica sa preeklampsijom u 1. trimestru

	AUC	95% IP	St. greška	p
Dezmosterol_{HDL}	0,661	0,554 – 0,757	0,0669	<0,05
Model 1	0,782	0,683 – 0,862	0,0670	<0,001
Model 2	0,847	0,741 – 0,922	0,0628	<0,001

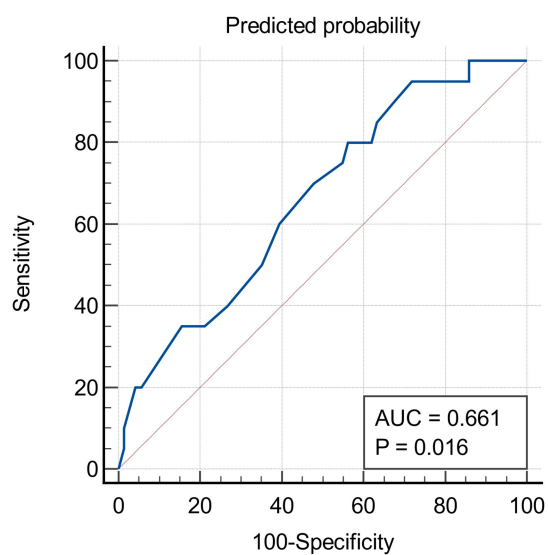
Model 1: starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, PlGF-1, sFlt-1, holesterol, trigliceridi

Model 2: starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, PlGF-1, sFlt-1, holesterol, trigliceridi, latosterol, dezmosterol_{HDL}, apoM, PON1

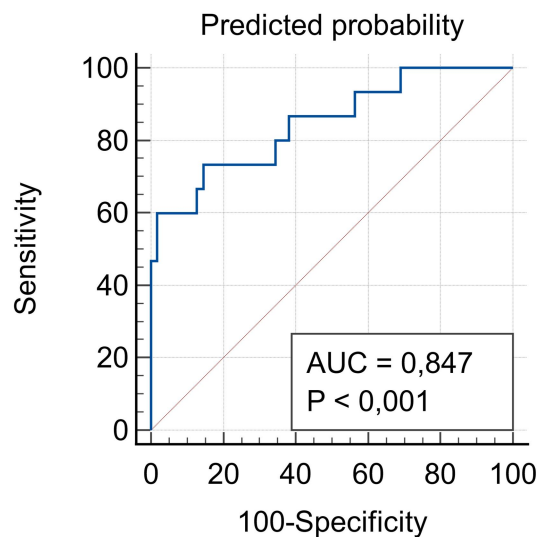
Analiza AUC je pokazala da koncentracija dezmosterola_{HDL} i prethodno definisani modeli mogu da se koriste u razdvajanju trudnica sa preeklampsijom od trudnica koje uprkos postojećem visokom riziku nisu razvile preeklampsiju, ali sa različitom dijagnostičkom tačnošću. Kao što se i očekivalo, dijagnostička tačnost je bila najbolja za model 2 koji je uključivao starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, PlGF-1, sFlt-1, koncentracije holesterola, triglicerida, latosterola, dezmosterola_{HDL}, masenu koncentraciju apoM i aktivnost PON1. Prema *Hosmer*-ovim i *Lemeshow*-ovim pravilima koncentracija dezmosterola_{HDL} je pokazala slabu dijagnostičku tačnost, dok je model 1, koji je uključivao starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, koncentraciju PlGF-1, koncentraciju sFlt-1, koncentraciju holesterola i koncentraciju triglicerida, pokazao umjerenu dijagnostičku tačnost. Model 2, koji je uključivao starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, koncentraciju PlGF-1, koncentraciju sFlt-1, koncentraciju holesterola, koncentraciju triglicerida, koncentraciju latosterola, koncentraciju dezmosterola_{HDL}, koncentraciju ApoM i aktivnost PON1, je pokazao dobru dijagnostičku tačnost (Tabela 39).



Slika 21 ROC kriva za desmosterol_{HDL} za predikciju preeklampsije u 1. trimestru

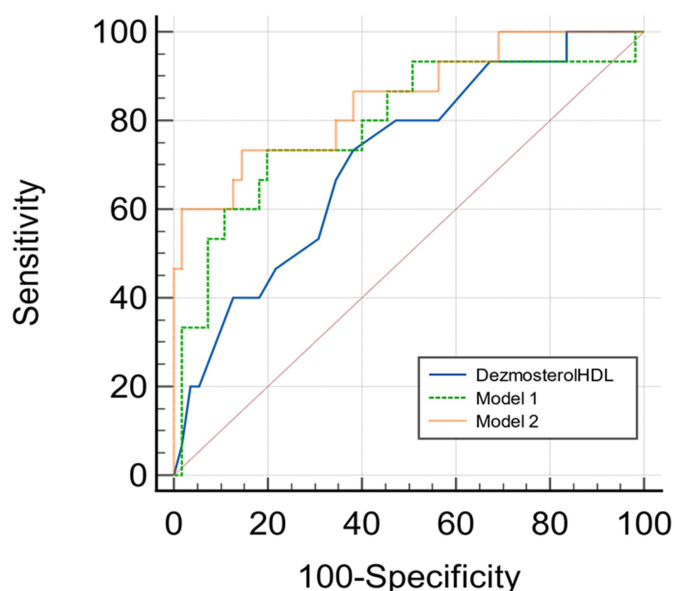


Slika 22 ROC kriva za model 1 (starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, koncentracija PlGF-1, koncentracija sFlt-1, koncentracija holesterola i koncentracija triglicerida) za predikciju preeklampsije u 1. trimestru



Slika 23 ROC kriva za model 2 (starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, koncentracija PIGF-1, koncentracija sFlt-1, koncentracija holesterola, koncentracija triglicerida, koncentracija latosterola, koncentracija dezmosterola_{HDL}, koncentracija apoM i aktivnost PON1) za predikciju preeklampsije u 1. trimestru

Upoređivanje dijagnostičke tačnosti koncentracije dezmosterola_{HDL} i dijagnostičke tačnosti prethodno datih modela za predikciju preeklampsije u trudnoći rađeno je poređenjem ROC krivih, a rezultati su prikazani na Slici 24.



	Dezmosterol _{HDL} vs. Model 1	Dezmosterol _{HDL} vs. Model 2	Model 1 vs. Model 2
Razlika između površina	0,0782	0,135	0,0570
Standardna greška	0,105	0,0649	0,0552
95 % interval pouzdanosti	-0,127 – 0,283	0,00799 – 0,262	-0,0512 – 0,165
Z statistika	0,748	2,083	1,032
Nivo značajnosti	p = 0,4545	p <0,05	p = 0,3019

Slika 24 Komparativna analiza ROC krivih za dezmosterol_{HDL}, model 1 (starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, koncentracija PIGF-1, koncentracija sFlt-1, koncentracija holesterola, koncentracija triglicerida) i model 2 (starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, koncentracija PIGF-1, koncentracija sFlt-1, koncentracija holesterola, koncentracija triglicerida, koncentracija latosterola, koncentracija dezmosterola_{HDL}, koncentracija apoM i aktivnost PON1)

Rezultati statističke analize su pokazali da nije bilo značajne razlike u dijagnostičkoj tačnosti između koncentracije dezmosterola_{HDL} i modela 1, ali se dijagnostička tačnost koncentracije dezmosterola_{HDL} i modela 2 statistički značajno razlikovala. Nije bilo statistički značajne razlike u dijagnostičkoj tačnosti modela 1 i modela 2 (Slika 24).

4.13 Ispitivanje značaja specifičnih lipidnih komponenti u procjeni rizika za razvoj preeklampsije u 2. trimestru trudnoće

Da bi se procijenilo da li se ishod trudnoće, tj. razvoj preeklampsije, može povezati sa specifičnim parametrima ispitivanim u ovoj studiji, a koji su pokazali statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa u 2. trimestru, kao i za analizu za parametre iz 1. trimestra, primijenjena je univarijantna binarna logistička regresiona analiza. Rezultati analize su prikazani u tabeli 40.

Tabela 40 Binarna logistička regresiona analiza povezanosti kliničkih i biohemijskih parametara u 2. trimestru sa razvojem preeklampsije

	OR	95% IP	p
Glukoza, mmol/L	2,070	1,077 – 3,977	<0,05
TG, mmol/L	2,714	1,309 – 5,628	<0,05
HDL-h, mmol/L	0,192	0,047 – 0,792	<0,05
Kampesterol, $\mu\text{mol/L}$	0,657	0,416 – 1,040	0,073
β -sitosterol, $\mu\text{mol/L}$	0,757	0,588 – 0,974	<0,05
S1P, nmol/L	0,997	0,995 – 0,999	<0,05
Kampesterol _{HDL} , $\mu\text{mol/L}$	0,036	0,005 – 0,283	<0,05
β -sitosterol _{HDL} , $\mu\text{mol/L}$	0,602	0,360 – 1,008	0,054
ApoM, mg/L	1,065	1,026 – 1,106	<0,05

OR – odnos šansi; IP – interval pouzdanosti; TG – trigliceridi; HDL-h – HDL holesterol; kampesterol_{HDL} – kampesterol u HDL frakciji; β -sitosterol_{HDL} – β -sitosterol u HDL frakciji; ApoM – apolipoprotein M

p – univarijantna binarna logistička regresiona analiza

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 40, uočava se da se kao značajni parametri koji razdvajaju trudnice sa visokorizičnom trudnoćom koje će razviti preeklampsiju od onih koje uprkos postojećem riziku neće razviti ovo oboljenje, izdvajaju koncentracije glukoze, triglicerida, HDL holesterola, β -sitosterola, S1P, kampesterola_{HDL} i apoM određene u 2. trimestru. Iako su uočene značajne razlike u koncentracijama kampesterola i β -sitosterola_{HDL} između ispitivanih grupa u 2. trimestru, ova dva markera se nisu izdvojili kao značajno povezani sa razvojem preeklampsije (Tabela 40).

Dalja analiza se odnosila na ispitivanje nezavisnog uticaja parametara koji su se pokazali značajnim u univarijantnoj analizi kreiranjem modela koristeći multivarijantnu binarnu logističku regresionu analizu. Osim parametara koji su se pokazali značajnim u 2. trimestru, u ispitivani model smo dodali i godine starosti, ITM prije trudnoće, SAP; MPI-UtA, odnos sFlt-1/PlGF-1 i koncentraciju holesterola, koje kliničari koriste kao tradicionalne markere za predikciju rizika za razvoj preeklampsije. Tabela 41 pokazuje da od svih varijabli iz 2. trimestra koje su uključene u multivarijantnu logističku regresionu analizu, samo je koncentracija apoM imala značajne prediktivne karakteristike za preeklampsiju u trudnoći. Na osnovu rezultata multivarijantne binarne logističke regresione analize može se zaključiti da se skoro 68% (*Nagelkerke* $R^2 = 0,677$) zabilježenih slučajeva preeklampsije može povezati sa višim koncentracijama apoM (Tabela 41), kao i da je model tačno klasifikovao 90,4% slučajeva. Logistički regresioni model je dobro fitovao podatke ($\chi^2 = 1,338$; $p = 0,995$).

Tabela 41 Multivarijantna binarna logistička analiza u 2. trimestru

Preklampsija			
<i>Negelkerke R² = 0,677</i>			
	OR	95% IP (OR)	P
Starost, godine	0,976	0,799 – 1,192	0,810
ITM prije trudnoće, kg/m²	1,033	0,776 – 1,374	0,826
SAP, mmHg	1,042	0,927 – 1,170	0,493
MPI-UtA	1,946	0,142 – 26,706	0,618
Glukoza, mmol/L	1,416	0,487 – 4,115	0,523
Holesterol, mmol/L	1,040	0,382 – 2,831	0,938
Trigliceridi, mmol/L	2,552	0,447 – 14,562	0,292
HDL-h, mmol/L	0,109	0,003 – 4,161	0,233
sFlt-1/PlGF-1	1,021	0,856 – 1,218	0,816
β-sitosterol, μmol/L	0,821	0,502 – 1,343	0,433
S1P, nmol/L	0,997	0,993 – 1,002	0,218
Kampesterol_{HDL}, μmol/L	0,037	0,000 – 2,712	0,132
ApoM, mg/L	1,115	1,028 – 1,208	<0,05

OR – odnos šansi; IP – interval pouzdanosti; ITM – indeks tjelesne mase; SAP – srednji arterijski pritisak; MPI-UtA - srednja vrijednost pulsatilnog indeksa uterinih arterija; HDL-h – HDL kolesterol; PlGF-1 – placentalni faktor rasta; sFlt-1 - solubilni anti-angiogeni faktori; S1P – sfingozin-1-fosfat; kampesterol_{HDL} – kampesterol u HDL frakciji; ApoM – apolipoprotein M

Kao i za 1. trimestar, sljedeći korak u ovoj studiji bio je ispitivanje potencijalne dijagnostičke tačnosti parametara koji su se koristili za razdvajanje ispitanica koje su razvile preeklampsiju u trudnoći od trudnica koje uprkos postojećem riziku nisu razvile preeklampsiju. U cilju provjere dijagnostičke tačnosti mjerenja prethodno navedenih markera u procesu razdvajanja trudnica sa preeklampsijom od žena koje u toku trudnoće nisu razvile ovu komplikaciju, rađena je analiza ROC krivih. ROC analiza je urađena za koncentraciju apoM, za model 1 (starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, odnos sFlt-1/PlGF-1, koncentracija kolesterola i koncentracija triglicerida), kao i za model 2 koji je prethodno definisan za predikciju preeklampsije u trudnoći (starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, odnos sFlt-1/PlGF-1, koncentracija glukoze, koncentracija kolesterola, koncentracija triglicerida, koncentracija HDL kolesterola, koncentracija β-sitosterola, koncentracija S1P, koncentracija kampesterola_{HDL} i koncentracija apoM). Rezultati analize ROC krivih dati su u Tabeli 42, a ROC krive su prikazane na Slikama 25-27.

Tabela 42 Analiza ROC krivih u identifikovanju trudnica sa preeklampsijom u 2. trimestru

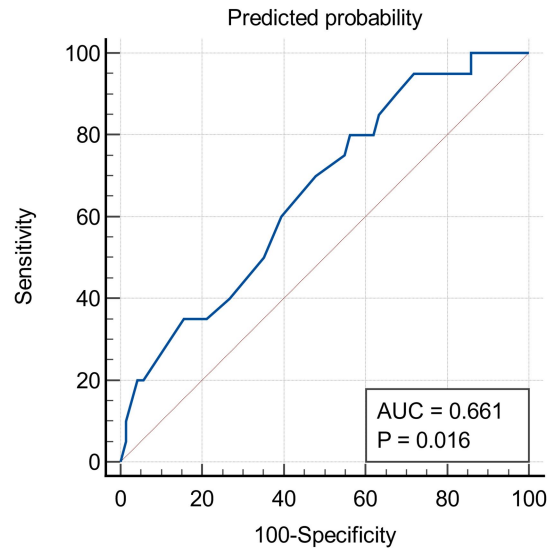
	AUC	95% IP	St. greška	p
ApoM	0,711	0,604 – 0,803	0,0901	<0,05
Model 1	0,769	0,669 – 0,851	0,0680	<0,001
Model 2	0,946	0,873 – 0,983	0,0279	<0,001

ApoM – apolipoprotein M

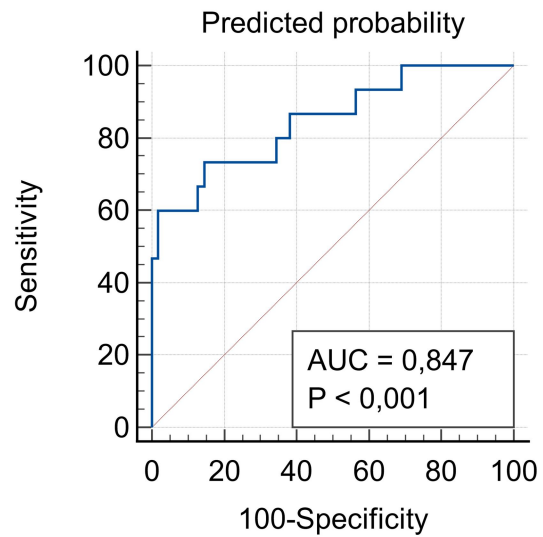
Model 1: starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, odnos sFlt-1/PlGF-1, holesterol, trigliceridi

Model 2: starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, odnos sFlt-1/PlGF-1, glukoza, holesterol, trigliceridi, HDL holesterol, β -sitosterol, S1P, kampesterol_{HDL}, apoM

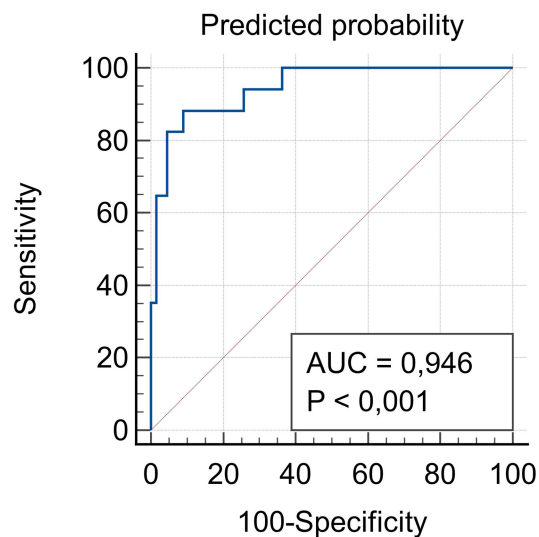
Analiza AUC je pokazala da koncentracija apoM i prethodno definisani modeli mogu da se koriste u razdvajanju trudnica sa preeklampsijom od trudnica koje uprkos postojećem visokom riziku nisu razvile preeklampsiju, ali sa različitom dijagnostičkom tačnošću. Kao što se i očekivalo, dijagnostička tačnost je bila najbolja za model 2 koji je uključivao starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, odnos sFlt-1/PlGF-1, koncentracije glukoze, holesterola, HDL holesterola, β -sitosterola, S1P, dezmosterola_{HDL} i masenu koncentraciju apoM. Prema *Hosmer*-ovim i *Lemeshow*-ovim pravilima koncentracija apoM i model 1, koji je uključivao starost, ITM prije trudnoće, SAP; MPI-UtA, odnos sFlt-1/PlGF-1, koncentraciju holesterola i koncentraciju triglicerida, su imali umjerenu dijagnostičku tačnost, dok je model 2, koji je uključivao starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, odnos sFlt-1/PlGF-1, koncentraciju glukoze, koncentraciju holesterola, koncentraciju triglicerida, koncentraciju HDL holesterola, koncentraciju β -sitosterola, koncentraciju S1P, koncentraciju kampesterola_{HDL} i koncentraciju apoM, pokazao odličnu dijagnostičku tačnost (Tabela 42).



Slika 25 ROC kriva za apolipoprotein M (apoM) za predikciju preeklampsije u 2. trimestru

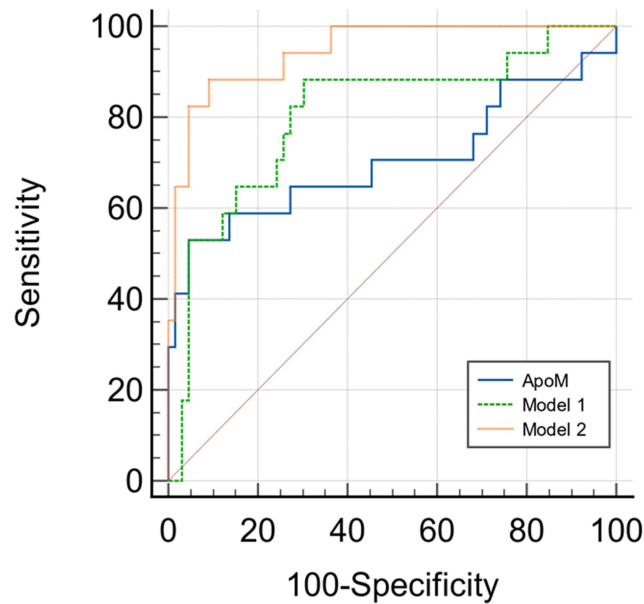


Slika 26 ROC kriva za model 1 (starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, sFlt-1/PlGF-1, koncentracija holesterola i koncentracija triglicerida) za predikciju preeklampsije u 2. trimestru



Slika 27 ROC kriva za model 2 (starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, sFlt-1/PlGF-1, koncentracija glukoze, koncentracija holesterola, koncentracija triglicerida, koncentracija HDL holesterola, koncentracija β -sitosterola, koncentracija S1P, koncentracija kampesterola_{HDL} i koncentracija apoM) za predikciju preeklampsije u 2. trimestru

Upoređivanje dijagnostičke tačnosti koncentracije apoM i dijagnostičke tačnosti prethodno datih modela za predikciju preeklampsije u 2. trimestru trudnoće rađeno je poređenjem ROC krivih, a rezultati su prikazani na Slici 28.



	ApoM vs. Model 1	ApoM vs. Model 2	Model 1 vs. Model 2
Razlika između površina	0,102	0,242	0,141
Standardna greška	0,129	0,0879	0,0632
95 % interval pouzdanosti	-0,150 – 0,354	0,0701 – 0,4150	0,0169 – 0,2650
Z statistika	0,790	2,757	2,228
Nivo značajnosti	p = 0,4295	p <0,05	p <0,05

Slika 28 Komparativna analiza ROC krivih za apoM, model 1 (starost, ITM prije trudnoće, SAP; MPI-UtA, odnos sFlt-1/PlGF-1, koncentracija holesterola, koncentracija triglicerida) i model 2 (starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, odnos sFlt-1/PlGF-1, koncentracija glukoze, koncentracija holesterola, koncentracija triglicerida, koncentracija HDL holesterola, koncentracija β -sitosterola, koncentracija S1P, koncentracija kampesterola_{HDL} i koncentracija apoM)

Rezultati statističke analize su pokazali da je dijagnostička tačnost modela koji uključuje starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, odnos sFlt-1/PlGF-1, koncentraciju glukoze, koncentraciju holesterola, koncentraciju triglicerida, koncentraciju HDL holesterola, koncentraciju β -sitosterola, koncentraciju S1P, koncentraciju kampesterola_{HDL} i masenu koncentraciju apoM, značajno veća u odnosu na određivanje samo koncentracije apoM, ali i odnosu na model 1 koji je uključivao starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, odnos sFlt-1/PlGF-1, koncentraciju holesterola i koncentraciju triglicerida u 2. trimestru. Nije bilo statistički značajne razlike između dijagnostičke tačnosti masene koncentracije apoM u 2. trimestru i modela 1 (Slika 28).

5 Diskusija

Uprkos velikom broju istraživanja posljednjih decenija, tačan mehanizam patogeneze preeklampsije još uvijek nije u potpunosti rasvijetljen. Međutim, rezultati studija jasno ukazuju na različite patofiziološke procese zaslužne za razvoj rane, odnosno kasne preeklampsije [24]. Iako su identifikovani različiti molekuli koji bi mogli biti uključeni u patofiziološke mehanizme koji dovode do razvoja ove komplikacije, terapija preeklampsije je i dalje vrlo ograničena, a jedini efikasan tretman je prevremeni porođaj [8]. Još uvijek postoji mnogo otvorenih pitanja i mogućnosti za poboljšanje prevencije i liječenja preeklampsije, naročito kasnog oblika ove komplikacije. Najviše pažnje je usmjereno ka kontinuiranom praćenju i pravovremenom otkrivanju žena koje imaju visok rizik da će razviti preeklampsiju. Cilj rane identifikacije žena sa visokorizičnom trudnoćom je uključivanje tih trudnica u sistem intenzivnog monitoringa i što ranije otkrivanje prvih simptoma i znakova oboljenja, kako bi se smanjila prevalencija preeklampsije. Glavni izazovi na ovom putu se ogledaju u identifikaciji novih biomarkera koji bi ukazivali na disfunkciju placente mnogo prije postavljanja dijagnoze preeklampsije, kako bi se razvile preventivne strategije kojim bi se spriječio dalji razvoj disfunkcije [24].

Rizik za razvoj preeklampsije se u kliničkoj praksi i dalje procjenjuje na osnovu tradicionalnih faktora rizika koji uključuju demografske karakteristike i medicinsku istoriju majke [34-37]. Uobičajene demografske karakteristike i klinički parametri koji ulaze u navedene modele su ITM, SKP i DKP, ili SAP u 1. trimestru, etnička pripadnost majke, istorija preeklampsije u prethodnim trudnoćama, prisustvo dijabetesa, hronične bubrežne bolesti ili autoimunih oboljenja, kao i porodična istorija hipertenzije i preeklampsije [35-37]. Posljednjih decenija, istraživanja su bila usmjerena ka identifikaciji demografskih faktora, biohemijskih markera i biofizičkih karakteristika, koji bi rano u toku trudnoće mogli ukazati da će kasnije doći do razvoja preeklampsije. Kako bi se postigle veća osjetljivost i specifičnost, u modele za predikciju preeklampsije se uz tradicionalne faktore rizika dodaju različiti biomarkeri, poput MPI-UtA, PAPP-A ili PIGF-1 [38-40]. U dosadašnjim studijama su predloženi različiti algoritmi za predikciju razvoja preeklampsije, ali nijedan od tih modela nije pokazao zadovoljavajuću dijagnostičku tačnost. Samo jedan mali dio ovih modela je i validiran, a njihovi klinički značaj i upotreba su i dalje ograničeni [43,44]. Dakle, iako su napravljeni napreci u razumijevanju patofiziologije preeklampsije, i dalje je teško definisati biomarkere i signalne puteve koji su povezani sa abnormalnim razvojem i izmijenjenom funkcijom placente [24]. Dodatno, najveći dio ispitivanih biomarkera ima veći klinički značaj u predikciji rane preeklampsije. Većina dosadašnjih istraživanja nije pravila razliku između tipova preeklampsije, a ostaje da se ispita da li i u kojoj mjeri su razvoj i funkcija placente izmijenjeni kod trudnica sa kasnom preeklampsijom [24]. Preeklampsiju sa kasnim početkom obično prati normalno remodelovanje spiralnih arterija, pri čemu se pretpostavlja da je stanje u velikoj mjeri posredovano faktorima rizika prisutnim u majke [27]. U svakom slučaju, nije dokazano da faktori rasta i neadekvatno remodelovanje spiralnih arterija imaju značaj u razvoju kasne preeklampsije [45].

Kao što je prethodno objašnjeno, utvrđeno je da kardiovaskularne bolesti i preeklampsija dijele više faktora rizika, uključujući endotelnu disfunkciju, hipertenziju, dijabetes i hroničnu inflamaciju niskog stepena [28]. Smatra se da bi faktori rizika koji su prisutni kod majke, poput hroničnih vaskularnih bolesti, gojaznosti, autoimunih oboljenja, insulinske rezistencije i hroničnih bolesti bubrega ili jetre, mogli uticati na obje faze u razvoju preeklampsije. Ovi faktori ne samo da usporavaju proces placentacije (faza 1), već povećavaju i osjetljivost krvnih sudova majke na citokine koje oslobađa placenta (faza 2). Povećana osjetljivost endotela krvnih sudova majke na citokine koje oslobađa placenta zasniva se na hroničnoj inflamaciji niskog stepena koja je kod ovih žena prisutna i prije

trudnoće [22]. S obzirom na to da je već odavno utvrđeno da poremećaji u metabolizmu lipida i lipoproteina imaju ključnu ulogu u nastanku ateroskleroze i razvoju kardiovaskularnih bolesti, nameće se potreba da se u okviru savremenih istraživanja u oblasti preeklampsije sveobuhvatnije istraže promjene metabolizma lipida i njihov značaj u procjeni rizika za razvoj ove komplikacije trudnoće.

Razvoj i upotreba novih sofisticiranih analitičkih metoda, poput savremenih hromatografskih tehnika spregnutih sa različitim vidovima detekcije, omogućili su selektivnu i specifičnu kvalitativnu i kvantitativnu analizu različitih jedinjenja od interesa u kompleksnim biološkim matriksima. Primjena savremenih analitičkih metoda u kombinaciji sa osjetljivim detektorima uslovlila je razvoj niza tehnologija koje se jednim imenom nazivaju „omikama“, a uključuju više disciplina – genomiku, transkriptomiku, proteomiku, metabolomiku i lipidomiku. Ove tehnologije su ključne u sistemskoj biologiji i personalizovanoj medicini, jer daju sveobuhvatnu sliku bioloških procesa, kao i informacije o tome kako se ti procesi mijenjaju u različitim patofiziološkim stanjima [120]. Naše istraživanje je bilo usmjereno na ispitivanje longitudinalnih promjena u koncentracijama osnovnih i specifičnih parametara lipidnog profila kod žena sa visokorizičnom trudnoćom i žena koje su razvile preeklampsiju sa kasnim početkom. Analiza specifičnih lipidnih parametara je podrazumijevala određivanje NHS u serumu i HDL frakciji, i izdvojenih predstavnika iz grupe sfingolipida. Prekursori holesterola (dezmosterol, 7-dehidroholesterol i latosterol) i markeri apsorpcije holesterola (kampesterol i β -sitosterol) u serumu i HDL frakciji kvantifikovani su HPLC-MS/MS metodama koje su prethodno implementirane i validirane u laboratoriji Katedre za medicinsku biohemiju [103], dok je za potrebe analize izabranih sfingolipida u plazmi razvijena i validirana HPLC-MS/MS metoda u okviru ovog istraživanja.

Iako se HPLC-MS/MS metode zbog svoje specifičnosti i selektivnosti vrlo često izdvajaju kao metode izbora prilikom analize različitih jedinjenja, razvoj ovakve metode predstavlja svojevrsan izazov. Pored toga što treba da obezbjedi brz i pouzdan rezultat da bi se mogla primjeniti u kliničkoj praksi, metoda treba da ispuni i niz zahtjeva koje nameću regulatorni standardi [105,110,121]. Razvoj HPLC-MS/MS metode nosi određene poteškoće koji uključuju optimizaciju hromatografskih uslova, ispitivanje efikasnosti jonizacije i uticaj matriksa u složenim uzorcima, kakvi su biološki uzorci. Dodatno, adekvatna priprema uzorka, validacija metode i održavanje samog aparata ključni su za postizanje tačnih, osjetljivih i ponovljivih rezultata [122]. Razvoj HPLC-MS/MS metode za endogene analite može biti naročito kompleksan, s obzirom na to da određivanje endogenih analita sa sobom nosi nekoliko specifičnosti. U ovom kontekstu, naročito je značajna procjena uticaja matriksa biološkog uzorka, jer matriks ispoljava uticaj na stepen jonizacije molekula, što može uticati na tačnost i osjetljivost metode. Pored toga, razlikovanje endogenih analita od sličnih jedinjenja unutar uzorka zahtjeva visoku specifičnost, a kako su ovakvi analiti često prisutni i u niskim koncentracijama, nameće se i potreba da ove metode budu veoma osjetljive [123].

Određivanje sfingolipida HPLC-MS/MS metodom nosi nekoliko analitičkih izazova zbog njihove strukturne raznolikosti, niskih koncentracija i kompleksnih interakcija u biološkim sistemima [124]. Prvi izvještaj o kvantitativnoj analizi sfingolipida LC-MS/MS metodom datira još iz 1997. godine, kada je uočen problem sa širinom pika S1P [125]. Kasnije je uvedena osjetljivija i pouzdanija metoda, ali samo za određivanje S1P i SPH [126]. Dalji razvoj u ovoj oblasti bio je usmjeren na razvoj osjetljivijih metoda kojima se mogu precizno mjeriti niske koncentracije prvenstveno S1P [127]. Jedno od najznačajnijih ograničenja prethodno pomenutih metoda bila je nemogućnost istovremenog određivanja većeg broja sfingolipida [124]. Metabolizam sfingolipida podrazumijeva složene interakcije u kojima se sfingolipidi konvertuju jedni u druge, stvarajući složenu metaboličku mrežu. Kako bi se razumjela uloga sfingolipida u različitim fiziološkim i patofiziološkim stanjima, neophodno je istovremeno analizirati različite molekule iz ove grupe [124]. Jedan od osnovnih ciljeva ove studije

bio je upravo razvoj metode za analizu različitih vrsta sfingolipida, uključujući S1P, SPH, SAPH, SAPH1P, odabrane ceramide i sfingomijelin u humanoj plazmi.

Glavna ograničenja u određivanju sfingolipida su njihova strukturna složenost i niske koncentracije. Sfingolipidi se sastoje od različitih molekularnih vrsta sa varijacijama u dužini lanca, zasićenosti i funkcionalnim grupama, što njihovo istovremeno razdvajanje i identifikaciju čini izazovnim. Pored toga, njihove niske koncentracije zahtjevaju visoko osjetljive metode detekcije kao što je HPLC-MS/MS. Prisustvo ovih analita u različitim koncentracijama u biološkim uzorcima, koje se mogu razlikovati i za dva do tri reda veličine, dodatno komplikuje analizu sfingolipida u samo jednom analitičkom *run*-u [124,128]. U okviru ovog istraživanja smo razvili i validirali HPLC-MS/MS metodu za određivanje odabranih sfingolipida u humanoj plazmi sa jednom analitičkom kolonom koja se zasniva na reverzno-faznoj hromatografiji i pozitivnoj jonizaciji molekula. Kvantifikaciji sfingolipida prethodi priprema uzorka tečno-tečnom ekstrakcijom sa sistemom organskih rastvarača i hromatografsko razdvajanje analita od interesa na C8 analitičkoj koloni uz gradijent eluciju pri konstantnoj brzini protoka mobilne faze. Jedno od manjih ograničenja metode je dužina trajanja razdvajanja, s obzirom na to da je potrebno 60 minuta da bi se svi ispitivani sfingolipidi eluirali sa kolone. Relativno dugo vrijeme obrta (engl. *turnaround time*, TAT) čini ovu metodu relativno teškom za implementaciju u rutinskoj biohemijskoj laboratoriji. Kvantifikacija je izvršena praćenjem MRM na tandem masenom spektrometru opremljenom ESI jonskim izvorom.

Nakon optimizacije preanalitičkih i analitičkih uslova, metoda je validirana. Složenosti određivanja sfingolipida u biološkim uzorcima značajno doprinose efekti matriksa. Složeni biološki matriks utiče na jonizaciju molekula, a prema tome i na intenzitet izmjerene signala [106,124]. Prethodna studija je pokazala da kalibracione krive generisane u surogat matriksima poput metanola ili fiziološkog rastvora, nisu dale zadovoljavajuće rezultate usljed postojanja sistemske proporcionalne greške u odnosu na kalibracione krive generisane u humanoj plazmi kao biološkom matriksu [106]. Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da je bilo potrebno riješiti problem efekta matriksa prilikom izrade kalibracionih krivih. S obzirom na to da su sfingolipidi endogeni analiti i da ne postoji humana plazma bez ovih jedinjenja, metoda standardnog dodatka se, kao i u nekim prethodnim studijama [106], pokazala kao najpogodniji pristup za konstrukciju kalibracionih krivih i kvantifikaciju ovih analita u plazmi. Tačnost se kretala u opsegu od $\pm 15\%$ od nominalne vrijednosti, tj. dobijeni su zadovoljavajući rezultati za razliku između očekivanih i dobijenih koncentracija za ispitivanu metodu. Još jedno od manjih ograničenja metode su vrijednosti KV_{US} i KV_{IS} . Dok su KV_{US} za SPH, Cer C16:0 i SM C16:0, kao i KV_{IS} za Cer C16:0 i SM C16:0 bili manji od 15%, KV_{US} za SAPH, S1P, SAPH1P i Cer C24:0, kao i KV_{IS} za SPH, SAPH, S1P, SAPH1P i Cer C24:0 su se kretali u opsegu između 15% i 20%. Iako bi bilo potrebno primijeniti neke modifikacije kako bi se poboljšala preciznost metode, smatramo da se ovom metodom mogu pratiti i razumjeti sveukupne dinamičke modulacije u odabranim sfingolipidima.

Nakon uspješnog razvoja i validacije metode za određivanje odabranih sfingolipidnih vrsta u humanoj plazmi, pristupili smo longitudinalnoj analizi specifičnih komponenti lipidoma kod žena sa visokorizičnom trudnoćom koje nisu razvile preeklampsiju i kod trudnica sa kasnom preeklampsijom. Promjene u koncentraciji osnovnih parametara lipidnog profila tokom trudnoće sa i bez komplikacija su dobro poznate [46-48], ali skoro da nema istraživanja koja su se bavila mehanizmima koji stoje iza ovih promjena. Dodatno, analiza rezultata prethodnih studija je ukazala na to da tradicionalni parametri lipidnog profila nisu dovoljno osjetljivi markeri promjena u metabolizmu holesterola koje prethode razvoju preeklampsije [48], te postoji naučna potreba za detaljnijom analizom specifičnih jedinjenja iz grupe lipida.

S obzirom na to da su demografski faktori i klinički parametri prepoznati kao tradicionalni faktori rizika za razvoj preeklampsije, naročito kasnog oblika ove komplikacije [34-37], u ovoj studiji oni su bili početna tačka za prikupljanje kohorte trudnica koje će činiti ispitivanu grupu. Mjerenje krvnog pritiska je rutinska procedura u okviru prenatalne njege. Visok krvni pritisak može biti prvi znak hipertenzivnog poremećaja i predstavlja jedan od dijagnostičkih kriterijuma [129]. Još od šezdesetih godina prošlog vijeka se pominju studije koje su proučavale značaj mjerenja krvnog pritiska u drugom trimestru u svrhu skrininga na preeklampsiju. Međutim, osjetljivost ovog kliničkog parametra se kretala u opsegu od 8 do 93%, a velike varijacije se pripisuju razlikama u metodološkom pristupu koji je korišten u studijama (definicija preeklampsije, metoda skrininga populacije i *cutoff* vrijednosti) [130]. SAP je ostao predmet naučnih istraživanja koja se bave predikcijom preeklampsije i rutinska procedura prenatalnog nadzora [131]. U dosadašnjim studijama su uočeni različiti obrasci promjena arterijskog krvnog pritiska u toku trudnoće bez komplikacija i u toku trudnoće u kojoj dolazi do razvoja hipertenzivnih komplikacija. U trudnoći bez komplikacija obično dolazi do pada vrijednosti krvnog pritiska tokom prve polovine trudnoće, dok drugu polovinu trudnoće odlikuje konstantan rast krvnog pritiska sve do porođaja [132]. Nasuprot tome, kod žena sa hipertenzivnim poremećajem (gestacijska hipertenzija ili preeklampsija) krvni pritisak je generalno stabilan tokom prve polovine trudnoće, a potom raste do porođaja [131]. U našoj studiji je uočen sličan trend promjena u obje ispitivane kohorte – pad prosječnih vrijednosti SAP u drugom trimestru, koji je bio statistički značajan samo u RG, a potom postepeni rast do kraja trudnoće. Poređenjem SAP između ispitivanih grupa, uočeno je da su prosječne vrijednosti za SAP bile više u PG u odnosu na RG od početka do kraja trudnoće (Tabela 5). Iako je u brojnim studijama uočeno da trudnice sa preeklampsijom imaju više vrijednosti SAP još početkom trudnoće [130,131,133,134], dijagnostički potencijal ovog parametra, mjeren kroz AUC, se razlikovao između studija [131]. Veća prediktivna moć je uočena kada se SAP mjeri u 1. trimestru, posebno kada se kombinuje sa drugim faktorima rizika koji su prisutni kod majke [130,133,134], što omogućava ranu identifikaciju trudnica sa visokim rizikom za razvoj različitih komplikacija u trudnoći i pravovremenu intervenciju kako bi se taj rizik smanjio. U studiji *Tayyar* i sar. [135] je uočena slična prediktivna moć SAP i kada se mjeri u 2. trimestru trudnoće, što može biti od velikog značaja s obzirom na to da su u 2. trimestru još uvijek moguće brojne korekcije i intervencije kako bi ishod trudnoće bio što je moguće povoljniji.

Prema našim ispitivanjima, žene koje su razvile preeklampsiju do kraja trudnoće imale su veći ITM i prije začeća (Slika 20), a značajne razlike u ITM su perzistirale tokom cijele trudnoće (Tabela 5). Bitno je napomenuti da bi prekomjerna tjelesna masa i, prije svega, gojaznost mogli biti ključni faktori rizika za razvoj preeklampsije. Naime, ITM preko 30 kg/m^2 je povezan sa skoro trostrukim povećanjem rizika za razvoj preeklampsije [136,137].

I rana i kasna preeklampsija su praćene placentalnom ishemijom, koja je kod trudnica sa ranom preeklampsijom rezultat nepotpunog remodelovanja spiralnih arterija [8], dok kod žena sa preeklampsijom sa kasnim početkom posteljica koja sazrijeva prerasta kapacitet materice i drugih podržavajućih struktura i postaje nedovoljno prokrvljena [22]. Postojanje i stepen placentalne ishemije se mogu utvrditi mjerenjem doplerskih indeksa uterinih arterija. Trudnoća bez komplikacija se odlikuje visokim brzinama protoka i malim otporom u uterinim arterijama, dok kod preeklampsije postoji poremećaj protoka sa povišenim otporima [138-140]. Procjena doplerskih indeksa uterinih arterija, naročito pulsatilnih indeksa, se smatra najznačajnijim ultrazvučnim markerom u predikciji preeklampsije, a vrijednost MPI-UtA iznad 90. percentila za gestacijsku starost se smatra značajnim faktorom rizika za preeklampsiju [141].

Tokom gestacije, vrijednosti MPI-UtA se smanjuju otprilike do 34. nedelje gestacije, nakon čega ostaju relativno stabilne. Poremećaj placentacije je udružen sa povišenim otporom u uteroplacentalnoj

cirkulaciji i rezultuje povišenim vrijednostima pulsatilnog indeksa, pa se kod pacijentkinja sa preeklampsijom uobičajeno uočavaju povišene vrijednosti pulsatilnog indeksa u sva tri trimestra [141-145]. Ipak, MPI-UtA izmjeren u prvom trimestru se pokazao kao dobar prediktor rane, a manje pouzdan prediktor kasne preeklampsije [142,146].

Longitudinalne promjene MPI-UtA u našoj studiji su pratile prethodno opisane trendove i u RG i u PG. Međutim, nisu uočene značajne razlike u vrijednostima ovog parametra između ispitivanih kohorti (Tabela 5). Ovakav rezultat najvjerojatnije je posljedica toga što su sve ispitanice imale visokorizičnu trudnoću, a dio trudnica iz RG iako nije razvio preeklampsiju, je završio trudnoću sa drugim komplikacijama, uključujući gestacijsku hipertenziju. Dodatno, sve ispitanice iz naše studije su razvile kasnu preeklampsiju, čime je još jednom potvrđeno da je MPI-UtA manje pouzdan prediktor kasne preeklampsije.

Uz prethodno opisane kliničke parametre, u našoj studiji su praćeni i osnovni biohemijski parametri – koncentracije glukoze, uree, kreatinina i ukupnih proteina, kao i aktivnost enzima AST i ALT – koji su dio rutinske laboratorijske procjene tokom trudnoće. Svaku trudnoću prate brojne fiziološke promjene, što se odražava i na rezultate biohemijskih testova [147]. Jedna od najznačajnijih adaptacija u trudnoći je izmijenjen metabolizam glukoze i razvoj insulinske rezistencije još od kraja 1. trimestra. Ove promjene imaju za cilj zadovoljenje nutritivnih potreba majke i fetusa [148,149], a rezultat su hormonskih promjena u toku trudnoće [149,150]. Kao faktori odgovorni za regulaciju osjetljivosti na insulin navode se povećane koncentracije prolaktina, estrogena, progesterona i humanog placentalnog laktogena [149,150]. U našoj studiji, koncentracija glukoze je bila nešto viša kod trudnica iz PG tokom cijele trudnoće, ali razlike, osim u 2. trimestru, nisu bile ni statistički ni klinički značajne (Tabela 5). Nešto lošija glikemijska kontrola u PG se može objasniti većim relativnim udjelom žena koje su razvile gestacijski dijabetes u PG u odnosu na RG. Sa druge strane, iako su neke od ispitanica razvile gestacijski dijabetes, prosječne koncentracije glukoze su bile u okviru referentnih vrijednosti, s obzirom na to da su sve trudnice bile u metabolički i klinički stabilnom stanju u posmatranim tačkama.

Tokom trudnoće dolazi do značajnih adaptacija na nivou bubrega. Brzina glomerularne funkcije se povećava za 40-50%, što rezultuje nižim koncentracijama kreatinina, uree i mokraćne kiseline u serumu [151]. Ukupna količina natrijuma, kalijuma i vode u organizmu se povećava, ali se usljed hormonskih promjena smanjuje vaskularni otpor i povećava protok krvi na nivou bubrega, pa je krvni pritisak obično niži za oko 10 mmHg. Ove hemodinamske adaptacije su neophodne kako bi se zadovoljile potrebe i majke i fetusa [151]. U trudnoći se povećava i urinarna ekskrecija proteina, što se u najvećoj mjeri pripisuje porastu brzine glomerularne funkcije, iako se pik ekskrecije vremenski ne poklapa sa uočenom najvećom brzinom glomerularne filtracije [151]. Drugi mogući razlog za povećanu renalnu ekskreciju proteina je promjena u selektivnosti glomerularne membrane [147], a prekomjerno izlučivanje proteina putem urina, tj. pojava proteinurije, se koristi kao jedan od kriterijuma prilikom postavljanja dijagnoze preeklampsije [9]. Kao i bubrezi, tako i jetra prolazi kroz niz fizioloških adaptacija u toku trudnoće. U nekomplikovanoj trudnoći, ove promjene su uglavnom blage i privremene, dok kod trudnica sa preeklampsijom funkcija jetre može biti značajno narušena. Dok u fiziološkoj trudnoći ne dolazi do značajnih promjena u aktivnosti AST i ALT, oštećenje jetre koje se ponekad sreće kod trudnica sa preeklampsijom se manifestuje kroz povišenu aktivnost prethodno pomenutih jetrenih enzima, smanjen protok krvi kroz jetru i potencijalne komplikacije kao što je HELLP sindrom [8,147]. U našoj studiji nije bilo klinički značajnih promjena u koncentracijama uree, kreatinina, ukupnih proteina, kao ni u aktivnostima AST i ALT, niti je bilo statistički značajnih razlika u prosječnim vrijednostima ovih parametara između ispitivanih kohorti u ispitivanim tačkama (Tabela 5). S obzirom na to da su naše ispitanice u tačkama kada je uzorkovana krv za analizu bile u

metabolički kontrolisanom stanju, takav rezultat je sasvim očekivan. Prethodno navedeni parametri su ciljano izabrani za praćenje, kako bi se na vrijeme uočili prvi znaci preeklampsije.

PAPP-A, protein kog produkuje placenta i koji se uobičajeno koristi u skriningu na aneuploidije, se navodi i kao marker placentalne funkcije. Kroz interakciju sa insulinu sličnim faktorima rasta (engl. *insulin-like growth factors*, IGFs), PAPP-A ostvaruje značajnu ulogu u pravilnom razvoju placente. Niske koncentracije PAPP-A, posebno u 1. trimestru, mogu ukazati na oštećenu placentalnu funkciju, čime se ovaj protein izdvaja kao značajan marker u ranom skriningu na preeklampsiju i povezane komplikacije, poput IUGR [152-154]. U kontekstu preeklampsije, PAPP-A je ispitivan kao potencijalni biomarker u svim trimestrima [155]. Prve studije su ispitivale PAPP-A u 3. trimestru. U nekim studijama trudnoća sa preeklampsijom se povezivala sa višim koncentracijama PAPP-A u 3. trimestru [156,157], dok su rezultati drugih studija ukazivali na to da nije bilo razlike u koncentracijama PAPP-A između zdravih trudnica i trudnica sa preeklampsijom [158]. Novija istraživanja ukazuju da iako se nivoi PAPP-A povećavaju u preeklampsiji, posebno u teškim slučajevima, ne postoje čvrsti dokazi koji podržavaju njegovu upotrebu kao pouzdanog markera za skrining preeklampsije u 3. trimestru [155]. Rezultati studija koje su ispitivale nivo PAPP-A u 2. trimestru, takođe, nisu konzistentni. *Bersinger* i sar. [159] su uočili niže koncentracije ovog proteina u 17. nedelji gestacije kod žena koje su kasnije razvile preeklampsiju. *D'Anna* i sar. [160] su, takođe, uočili pad koncentracije PAPP-A, što ukazuje na to da bi se PAPP-A mogao koristiti u predikciji preeklampsije, dok sa druge strane *Bestwick* i sar. [161] nisu otkrili razlike u nivoima PAPP-A tokom ranog 2. trimestra. U literaturi se mogu naći i različiti podaci o prediktivnoj vrijednosti PAPP-A u 1. trimestru. Dok neki autori povezuju preeklampsiju sa nižim koncentracijama PAPP-A u 1. trimestru [162-164], drugi nisu uočili značajne razlike u koncentracijama ovog markera između zdravih trudnica i trudnica koje su kasnije razvile preeklampsiju [165,166]. Iako je njegova osjetljivost kao jednog markera ograničena, kombinovanjem sa drugim markerima kao što su ultrazvučni parametri, PlGF-1 i faktori rizika prisutni kod majke, značajno se povećava stopa otkrivanja, posebno za ranu preeklampsiju [155]. U našoj studiji koncentracija PAPP-A je bila statistički značajno niža u 1. trimestru u PG u poređenju sa RG; ali se vrijednosti kasnije tokom trudnoće nisu razlikovale (Tabela 5). Ovaj rezultat sugerise da bi PAPP-A mogao imati značajnu ulogu u ranom skriningu preeklampsije, posebno u kombinaciji sa drugim biomarkerima i kliničkim parametrima. S obzirom na to da su naša zapažanja u skladu sa studijama koje povezuju preeklampsiju sa nižim koncentracijama PAPP-A u 1. trimestru [162-164], naši rezultati dodatno podržavaju hipotezu da ovaj protein može služiti kao indikator oštećene placentalne funkcije u ranoj trudnoći. Međutim, s obzirom na varijabilnost nalaza u literaturi i ograničenu prediktivnu vrednost PAPP-A kao pojedinačnog markera, njegova upotreba bi mogla biti najefikasnija u okviru multimarkerskih modela koji uključuju biohemijske, ultrazvučne i kliničke faktore rizika. Zbog multikolinearnosti PAPP-A je izuzet iz modela koji smo definisali za predikciju preeklampsije u 1. trimestru trudnoće (Tabela 38).

PlGF-1 i sFlt-1 bi mogli biti značajni faktori u patofiziološkim mehanizmima uključenim u razvoj preeklampsije, naročito rane forme [29,30], što je detaljno opisano u poglavlju 1.4.2.1. Koncentracije PlGF-1 obično rastu tokom gestacije i stimulišu vaskularizaciju placente, dok antiangiogeni sFlt-1 ima ulogu u kontroli ovog procesa vezivanjem za PlGF-1 i VEGF, ograničavajući njihove efekte [167]. U trudnoći bez komplikacija, koncentracija sFlt-1 je relativno niska, a koncentracija PlGF-1 dostiže pik sredinom gestacije, nakon čega blago pada [167,168]. Kod trudnica sa preeklampsijom uočene su niže koncentracije PlGF-1 u trenutku postavljanja dijagnoze, ali i prije pojave prvih simptoma oboljenja, vjerovatno zbog smanjene ekspresije PlGF-1 i zbog vezivanja slobodnog PlGF-1 za sFlt-1, koji je povišen kod ovih trudnica [169]. Niske koncentracije PlGF-1 u 1. trimestru mogu ukazivati na postojanje rizika za razvoj preeklampsije, ali sam PlGF-1 nije pouzdan prediktor zbog niske osjetljivosti (32% za stopu lažno pozitivnih rezultata od 5%) [170]. Kao bolji pristup trenutno se

izdvaja kombinovanje angiogenih faktora kao što je sFlt-1/PlGF-1 odnos sa kliničkim podacima, kao što su medicinska istorija majke ili ultrazvučni parametri, kako bi se kreirali multifaktorski modeli za predikciju preeklampsije sa boljim dijagnostičkim karakteristikama. Na primjer, prediktivni algoritam koji je predložilo FMF, a koji uključuje kombinaciju faktora rizika prisutnih kod majke, SAP, MPI-UtA, PAPP-A i PlGF-1 otkriva 95% žena sa ranom i 46% trudnica sa kasnom preeklampsijom, sa stopom lažno pozitivnih rezultata od 10% [134]. Međutim, ovi modeli još uvijek nemaju široku primjenu u kliničkoj praksi. Primjena angiogenih faktora poput PlGF-1, VEGF i sFlt-1 u predikciji preeklampsije je ograničena zbog različite prirode bolesti, koja se kreće od teških oblika rane preeklampsije do slučajeva kasne preeklampsije sa blagim simptomima. Rani i teški oblici preeklampsije, koji uključuju abnormalnu placentaciju, snažnije su povezani sa promjenama u koncentraciji ovih faktora [167]. Analizom rezultata naše studije, uočava se da i PlGF-1 i sFlt-1 prate prethodno opisane trendove. Koncentracije PlGF-1 su u obje ispitivane grupe rasle do 3. trimestra, a onda je pred porođaj zabilježen pad koncentracije, dok su koncentracije sFlt-1 postepeno rasle u toku trudnoće u obje ispitivane grupe. Iako su koncentracije PlGF-1 tokom cijele trudnoće bile nešto niže, a nivoi sFlt-1 u kasnoj trudnoći nešto viši u PG u odnosu na RG, nijedna od ispitivanih razlika nije bila statistički značajna (Tabela 5). Ovakav rezultat bi djelimično mogao biti posljedica toga što u studiju nisu uključene trudnice bez rizika, odnosno sve trudnice su imale visokorizičnu trudnoću. Sa druge strane, trudnice u našoj studiji su razvile preeklampsiju sa kasnim početkom, a već je pokazano da je značaj angiogenih markera u predikciji kasne preeklampsije ograničen.

Fiziološku trudnoću karakteriše značajno, ali prolazno, izmjenjen metabolizam lipida i lipoproteina. Ove promjene se dešavaju kako bi se zadovoljile potrebe majke i fetusa [47]. Lipidi u trudnoći imaju višestruku ulogu – predstavljaju esencijalnu komponentu za razvoj fetusa, obezbjeđuju značajnu rezervu energije i za majku i za fetus, predstavljaju ključne strukturne elemente ćelijske membrane, i služe kao prekursori za sintezu brojnih hormona [171]. Neophodni su za pravilan razvoj fetusa, jer učestvuju u formiranju vitalnih organa, tkiva i nervnog sistema [171]. Ovo istraživanje predstavlja nastavak istraživanja koje je započeto prije više od 15 godina, a u kome se ispitivao značaj promjena u metabolizmu lipida tokom trudnoće bez komplikacija [172]. Poremećaji u metaboličkim putevima lipida su povezani sa patogenezom preeklampsije. Iako rezultati različitih studija nisu u potpunosti konzistentni, slično našim zapažanjima (Tabela 6), pokazano je da trudnice sa preeklampsijom uglavnom imaju više koncentracije triglicerida, niže koncentracije HDL holesterola, i u nekim slučajevima je i koncentracija LDL holesterola povišena [47,48].

Prethodno je istaknuto da su pacijentkinje sa preeklampsijom u našoj studiji imale viši ITM tokom cijele gestacije (Tabela 5), a veću tjelesnu masu pratio je aterogeniji lipidni profil (Tabela 6). Trudnice iz PG su u ovoj studiji imale značajno veću koncentraciju triglicerida u poređenju sa RG tokom cijelog perioda posmatranja. Sa druge strane, promjene u koncentraciji holesterola nisu bile toliko izražene (Tabela 6). Iako je u obje grupe uočen porast koncentracija ukupnog i LDL holesterola, razlike između RG i PG su bile male ili nisu bile statistički i klinički značajne. Kada se holesterol posmatra u kontekstu trudnoće, promjene u koncentraciji HDL holesterola su vjerovatno najzanimljivije sa naučnog aspekta. Iako se kod zdravih trudnica uobičajeno povećava koncentracija HDL holesterola [172,173,174], očekivano povećanje u prvoj polovini trudnoće kod trudnica sa preeklampsijom obično izostaje [175]. Rezultati ove studije su bili u korelaciji sa rezultatima iz prethodnih studija, pa protektivni porast nivoa HDL holesterola u 2. trimestru nije zabilježen kod trudnica sa preeklampsijom (Tabela 6). Pored toga, koncentracija HDL holesterola u 2. trimestru je bila značajno niža u PG u poređenju sa RG. Dok se progresivni porast koncentracije osnovnih parametara lipidnog profila kod žena sa nekomplikovanom trudnoćom smatra fiziološkim i neaterogenim, promjene u lipidnom profilu žena sa preeklampsijom se mogu smatrati potencijalno aterogenim [173,176]. Pored pojedinačnih

parametara lipidnog profila, i njihove kombinacije u okviru različitih indeksa su proučavane kao potencijalni prediktori preeklampsije i markeri aterogenih promjena u trudnoći. Aterogeni indeks plazme (AIP), koji se izračunava kao logaritam odnosa koncentracija triglicerida i HDL holesterola, predložen je kao sveobuhvatnija mjera aterogenog potencijala lipida. Smatra se da ovaj indeks odražava ravnotežu između zaštitne (HDL holesterol) i potencijalno štetne lipidne komponente (trigliceridi), pa je izdvojen kao bolji prediktor kardiovaskularnog rizika u poređenju sa pojedinačnim lipidnim komponentama. AIP bi mogao biti bolja mjera ukupnih metaboličkih poremećaja i povećanog kardiovaskularnog rizika povezanog sa ovim stanjem [174,177].

Međutim, niti se prethodno opisane promjene u lipidnom profilu mogu univerzalno primjeniti na svaki slučaj preeklampsije, niti je njihov značaj još uvijek u potpunosti razjašnjen. Disbalans u nivou pojedinih lipidnih komponenti, posebno triglicerida, holesterola i fosfolipida, koji je primijećen u preeklampsiji, potencijalno utiče na funkciju endotela, razvoj generalizovane inflamacije i oksidativnog stresa, kao i na narušavanje integriteta vaskularnog sistema [178]. Razumijevanje zamršene veze između izmijenjenog metabolizma lipida i razvoja preeklampsije bi moglo biti od velikog značaja u razjašnjavanju patofizioloških mehanizama uključenih u razvoj ove komplikacije i otkrivanju potencijalnih meta za preventivne i terapijske intervencije [178]. Prema tome, od suštinskog značaja je da se ove promjene dalje istraže, kako bi se u potpunosti otkrila njihova uloga i značaj u preeklampsiji.

Kako bismo bolje razumjeli promjene u homeostazi holesterola u trudnoći sa preeklampsijom, dalje smo u okviru ove studije ispitivali promjene u koncentracijama markera sinteze i apsorpcije holesterola, kao i njihove međusobne veze. U RG, paralelno sa povećanjem koncentracije triglicerida, LDL i HDL holesterola (Tabela 6), primijećen je i porast koncentracija prekursora holesterola, bez značajnih promjena u koncentraciji biljnih sterola (Tabela 7). Takvi rezultati ukazuju da su povišeni nivoi holesterola vjerovatno rezultat povećane sinteze ovog fiziološki nezamjenljivog biomolekula. Zanimljivo je da u PG, uprkos povećanju koncentracija triglicerida i LDL holesterola (Tabela 6), nije bilo paralelnog povećanja koncentracija dezmosterola i 7-dehidroholesterola (Tabela 7). U ovom slučaju se nameće hipoteza da bi izostanak promjena u koncentraciji holesterolskih prekursora mogao biti povezan sa smanjenom sintezom HDL čestica i nižom koncentracijom HDL holesterola kod trudnica sa preeklampsijom. Da bi se potvrdila prethodna hipoteza, potrebno je sprovesti dodatne studije koje bi se bavile ispitivanjem sinteze HDL čestica i ugrađivanjem holesterola u te čestice. Ne treba zanemariti povećanje koncentracije latosterola, jednog od holesterolskih prekursora, koje smo uočili u PG. Međutim, ovo povećanje postalo je značajno tek pri kraju trudnoće (Tabela 7), kada bismo očekivali da sinteza i nivo holesterola kod majke prestaju da rastu, jer se fetus u drugom dijelu trudnoće oslanja prvenstveno na sopstvenu sintezu holesterola [179]. Dodatno, koncentracija latosterola u 1. trimestru je bila viša u PG u odnosu na RG (Tabela 7). Mogli bismo pretpostaviti da je sinteza holesterola kod trudnica koje će kasnije razviti preeklampsiju veća u poređenju sa ženama sa visokorizičnom trudnoćom već od početka trudnoće, što je, prema rezultatima naše studije, vidljivo jedino kroz sveobuhvatnu analizu holesterolskih prekursora.

Odnosi holesterol/dezmosterol i holesterol/7-dehidroholesterol, čije koncentracije zavise od aktivnosti enzima sterol: NADP⁺ Δ24-oksidoireduktaze i holesterol: NADP⁺ Δ7-oksidoireduktaze, su korišteni kao surogat markeri za procjenu sinteze holesterola, dok je odnos 7-dehidroholesterol/ latosterol upotrebljen kao indikator aktivnosti enzima latosterol oksidaze [63]. U RG su u tački prije porođaja uočene niže aktivnosti enzima sterol: NADP⁺ Δ24-oksidoireduktaze i holesterol: NADP⁺ Δ7-oksidoireduktaze u odnosu na vrijednosti zabilježene u prve tri tačke praćenja. Aktivnost latosterol oksidaze u istoj grupi je opadala već od 2. trimestra (Tabela 8). Sa druge strane, u PG nije došlo do značajnih promjena u aktivnosti enzima (Tabela 8), ukazujući na to da se stepen sinteze holesterola kod majke nije smanjivao do porođaja. Slično našim rezultatima, Lee i sar. [63] su pokazali da pacijentkinje

sa preeklampsijom imaju veći odnos holesterol/ dezmosterol i holesterol/ 7-dehidroholesterol u poređenju sa trudnicama sa drugim medicinskim indikacijama za jatrogeni prevremeni porođaj. U našoj studiji nisu uočene statistički značajne razlike u ovim odnosima između ispitivanih kohorti. Izostanak značajnih razlika između studijskih grupa se bar djelimično može pripisati činjenici da su sve žene uključene u studiju imale značajan rizik za razvoj preeklampsije, odnosno da su imale prisutne neke od faktora rizika poput visokog ITM ili hipertenzije već u trenutku uključivanja u studiju. S obzirom na to da je prilikom ispitivanja odnosa koncentracije holesterola i fitosterola jedina značajna longitudinalna promjena bio porast količnika ukupni holesterol/ kampesterol u RG, mogli bismo pretpostaviti da je sinteza holesterola imala veći doprinos ukupnoj koncentraciji holesterola u odnosu na apsorpciju u obje ispitivane kohorte. Značajno viši odnosi ukupni holesterol/ kampesterol u 2. trimestru i ukupni holesterol/ β -sitosterol u 1. trimestru u PG u poređenju sa RG (Tabela 8) su rezultat značajno nižih koncentracija kampesterola u 2. trimestru i β -sitosterola u 1. trimestru u PG (Tabela 7).

Dodatno, očekuje se da će kod zdravih pojedinaca povećana sinteza holesterola biti praćena smanjenom apsorpcijom i obrnuto, a sve u cilju održavanja homeostaze holesterola. Međutim, izmjenjeni obrasci sinteze i apsorpcije holesterola se vrlo često sreću u različitim metaboličkim oboljenjima [52]. Zanimljivo je da je porast koncentracije holesterolskog prekursora, dezmosterola, krajem trudnoće u RG bio praćen statistički značajnim padom koncentracija markera apsorpcije, dok u PG uprkos porastu koncentracije dezmosterola nije bilo statistički značajnih promjena u koncentracijama biljnih sterola (Tabela 7). Ovakvi rezultati sugerišu da kod trudnica sa preeklampsijom povećana sinteza holesterola nije bila praćena smanjenom apsorpcijom, tj. da je homeostaza holesterola djelimično izmjenjena u PG krajem trudnoće. Kako iste promjene nisu primjećene u drugoj studijskoj grupi, to dodatno potvrđuje naše sumnje da žene sa preeklampsijom razvijaju značajnu disregulaciju homeostaze holesterola.

Prema rezultatima našeg istraživanja, nisu uočene značajne razlike u koncentraciji ukupnog i LDL holesterola između ispitivanih grupa (Tabela 6). Sa druge strane, analizom nivoa NHS u krvi, pokazalo se da je kod trudnica sa preeklampsijom povećana sinteza holesterola, kao i da je poremećen proces regulacije homeostaze holesterola. Ovi djelimično nedosljedni rezultati mogu se objasniti na dva načina. Prvo, u studiju su uključene samo trudnice sa visokim rizikom za razvoj preeklampsije, pri čemu su one koje su trudnoće završile bez preeklampsije činile kontrolnu grupu za trudnice sa preeklampsijom. Odsustvo uobičajene kontrolne grupe, koju bi činile trudnice bez prisutnih faktora rizika, moglo bi da utiče na statističku značajnost rezultata, jer su razlike procjenjivane u odabranoj populaciji sa visokim rizikom za razvoj preeklampsije. Međutim, istraživanja poput ovog su od izuzetne važnosti, s obzirom na to da se određeni faktori rizika, na osnovu kojih se žene sa visokorizičnom trudnoćom biraju iz opšte populacije trudnica, već primjenjuju u kliničkoj praksi za procjenu rizika za razvoj preeklampsije. Međutim, i dalje je nejasno koji su to odlučujući faktori koji određuju koja žena sa visokim rizikom će razviti preeklampsiju, a koja neće. Dakle, jedan od izazova koji još uvijek čekaju naučni odgovor jeste kako razlikovati ove dvije grupe. Osim toga, odsustvo značajnih razlika može se pripisati relativno malom broju ispitanica, što je još jedno od ograničenja ove studije. Moguće je da metaboličko profilisanje holesterola, tj. analiza NHS, daje uvid u suptilne promjene u homeostazi holesterola, koje nisu vidljive ispitivanjem nivoa tradicionalnih parametara lipidnog profila [63]. Dakle, samo sveobuhvatnom analizom longitudinalnih promjena u koncentraciji osnovnih parametara lipidnog profila i NHS u krvi majke, se može dobiti jasna i potpuna slika promjena u metabolizmu holesterola u kompleksnom oboljenju kao što je preeklampsija.

Prethodno je opisana uloga holesterola u razvoju preeklampsije, a u nastavku će detaljnije biti objašnjene promjene u sfingolipidnom profilu određenom u plazmi trudnica iz ispitivanih kohorti. Primarni cilj je bio da se ispituju karakteristične longitudinalne varijacije unutar RG i PG, i identifikuju

molekuli iz grupe sfingolipida koji bi mogli poslužiti kao potencijalni rani prediktivni biomarkeri za preeklampsiju.

Smatra se da bioaktivni sfingolipidi, posebno ceramidi i S1P, utiču na funkciju trofoblasta, a neravnoteža u koncentraciji ovih molekula se povezuju sa razvojem vaskularne disfunkcije, inflamacije i nastankom oksidativnog stresa, potencijalno igrajući ulogu i u patogenezi preeklampsije [66,180]. Povišeni nivoi ceramida u trofoblastima placente uočeni kod trudnica sa preeklampsijom bi mogli rezultovati povećanom autofagijom i apoptotskom ćelijskom smrti [66], dok se disfunkcija signalnih puteva S1P na nivou vaskularnih endotelnih ćelija dovodi u vezu sa neadekvatnim ćelijskim odgovorom i gubitkom ateroprotektivnih svojstava ovih ćelija [71]. Dakle, ceramidi i S1P pokazuju suprotne uloge u ćelijskim mehanizmima, pri čemu su ceramidi uključeni u razvoj ćelijskog stresa i proces apoptoze, dok S1P stimuliše preživljavanje i proliferaciju ćelija.

U ovoj studiji nisu zabilježene statistički značajne longitudinalne promjene u koncentraciji SAPH1P ni u jednoj od ispitivanih grupa, niti su primjećene značajne razlike između dvije posmatrane kohorte. Koncentracije SAPH su pokazale progresivno povećanje u obje grupe, dostižući statističku značajnost u RG već od 2. trimestra, a u PG samo u tački pred porođaj (Tabela 9). Međutim, trend promjena u koncentraciji SAPH je bio sličan u obje kohorte, a izostanak statističke značajnosti u PG tokom 2. i 3. trimestra bi se mogao pripisati veličini uzorka, prije nego različitim obrascima promjena u RG i PG. Promjene u koncentraciji SPH su imale sličan trend kao i promjene u koncentraciji SAPH, ali nijedna od uočenih promjena nije bila statistički značajna (Tabela 9). Među parametrima unutar grupe sfingolipida, kao najinteresantniji u kontekstu preeklampsije se pokazao S1P, kako u pogledu longitudinalnih promjena unutar ispitivanih kohorti, tako i sa aspekta uočenih razlika između RG i PG (Tabela 9). U RG je uočen trend povećanja koncentracija S1P od početka do kraja gestacije, pri čemu su koncentracije u 2. i 3. trimestru, kao i u tački prije porođaja bile statistički značajno više u odnosu na vrijednosti iz 1. trimestra. Nasuprot tome, u PG je zabilježen pad koncentracija S1P tokom 2. trimestra, a potom rast do kraja gestacije. Ipak, nijedna od ovih promjena nije dostigla statističku značajnost. Jedan od najvažnijih rezultata bila je statistički značajna razlika u koncentracijama S1P između ispitivanih grupa. Konkretno, koncentracija S1P je bila značajno niža u PG u poređenju sa RG tokom 2. i 3. trimestra, kao i prije porođaja (Tabela 9).

Nasuprot našim rezultatima, prethodne studije su pokazale da nema promjena u koncentraciji S1P tokom trudnoće bez komplikacija [80,81]. Takođe, u istim studijama je uočeno da je nivo S1P kod trudnica koje su razvile preeklampsiju bio sličan vrijednostima koje su zabilježene u trudnoći bez komplikacija u sva tri trimestra [80,81]. Sa druge strane, *Walsh i sar.* [181] su uočili značajno više koncentracije S1P kod žena sa teškim oblikom preeklampsije koje se bile na terapiji aspirinom, u poređenju sa koncentracijama izmjerenim u trudnoći bez komplikacija. Autori navode da bi sekrecija S1P iz placente mogla biti odgovorna za visoke vrijednosti ovog parametra u cirkulaciji trudnica sa preeklampsijom [181]. Zanimljivo je da nedavna istraživanja ukazuju na smanjenje nivoa S1P vezanog za HDL čestice kod žena sa preeklampsijom [182]. Dejstvo S1P se mijenja u zavisnosti od njegovog vezivanja za različite nosače; na primjer, S1P vezan za HDL čestice ostvaruje dugotrajniji efekat na jačanje endotelne barijere u poređenju sa S1P koji je vezan za albumin [183]. Interesantno, u našoj studiji je u 2. trimestru uočen značajan pad u koncentraciji HDL holesterola u PG, što se poklapa sa granično sniženim koncentracijama S1P unutar iste grupe tokom istog trimestra (Tabela 6 i Tabela 9). Dakle, niža koncentracija S1P uočena u PG bi, bar djelimično, mogla biti rezultat smanjenog vezivanja S1P za HDL čestice, što potencijalno doprinosi disfunkciji endotelne barijere koja je uobičajen nalaz kod pacijentkinja sa preeklampsijom. Štaviše, apoM služi kao specifičan nosač za S1P koji utiče na HDL-S1P homeostazu. ApoM olakšava oslobađanje S1P iz eritrocita, štiti S1P od enzimske degradacije, čime se povećava koncentracija HDL-S1P [184], i stimulišu anti-aterosklerotska dejstva

HDL-S1P kompleksa [184]. Longitudinalna analiza koncentracija apoM u našoj studiji je pokazala dinamičan obrazac sa značajnim promjenama u obje ispitivane kohorte (Tabela 12). Dodatno, poređenjem prosječnih vrijednosti između RG i PG otkrivene su značajne razlike u koncentracijama apoM između ispitivanih grupa. Koncentracija apoM u PG je bila značajno niža u 1. i 3. trimestru u poređenju sa RG, dok su u 2. trimestru uočene značajno više vrijednosti apoM u PG u odnosu na RG (Tabela 12). Uprkos tome što je tokom većeg dijela trudnoće zabilježena značajno niža koncentracija apoM u PG u odnosu na RG, upravo u 2. trimestru, kada su uočene značajno niže koncentracije HDL holesterola i S1P u PG (Tabela 6 i Tabela 9), izmjerena je značajno viša koncentracija apoM (Tabela 12). Ovaj fenomen bi mogao imati protektivni značaj za PG, s obzirom na to da apoM potencijalno stimuliše anti-aterosklerotske karakteristike HDL-S1P kompleksa. Međutim, bitno je napomenuti da u dosadašnjim studijama nije uočena korelacija između koncentracije apoM i S1P u humanoj plazmi, a lipofilni džep na apoM za koji se vezuje S1P, služi kao vezujući domen i za druge molekule koji se takmiče sa S1P za vezivanje. Ovo sugerise postojanje alternativnih molekula koje bi mogle uticati na vezu između HDL čestica i S1P, što svakako može da utiče na regulaciju nivoa S1P u plazmi [185,186].

U našoj studiji zabilježen je isti trend promjena u koncentraciji Cer C16:0 i Cer C24:0 u obje ispitivane grupe. Naime, od 2. trimestra do kraja trudnoće se uočava povećanje koncentracije dva ispitivana ceramida, ali su promjene bile statistički značajne samo u RG (Tabela 12). Prema rezultatima prethodnih studija, kako trudnoća bez komplikacija napreduje u 3. trimestar, dolazi do porasta nivoa Cer C16:0, Cer C18:0 i Cer C24:0 u plazmi majke, što ukazuje na to da bi proinflamatorni ceramidi mogli imati ulogu u porođaju, slično uticaju primijećenom za proinflamatorne citokine [80,81]. Alternativno, porast u kasnoj trudnoći potencijalno ukazuje na povećanje pro-apoptotskih ceramida unutar placentalnih sincicijalnih čvorova, koji se oslobađaju u krvotok majke kao dio procesa obnavljanja trofoblasta placente [78]. Prethodno je uočeno da su pojedine vrste ceramida, uključujući ceramid C14:0 i Cer C24:0, povišene u plazmi žena sa preeklampsijom tokom trećeg trimestra, što je potencijalno povezano sa razvojem teških komplikacija, kao što su HELLP sindrom, proteinurija i prevremeni porođaj, koji nisu nužno praćeni pojavom hipertenzije [187]. Nasuprot tome, *Melland-Smith* i sar. [66] su ukazali na to da određene vrste ceramida, uključujući Cer C16:0, Cer C18:0, Cer C20:0 i Cer C24:0, pokazuju povišene nivoe u krvi majke i placenti žena sa preeklampsijom u poređenju sa normotenzivnim trudnicama sa prevremenim porođajem, dok za druge poput Cer C22:0 nisu uočene značajne razlike između grupa. Izostanak značajnih razlika u nivoima ceramida između RG i PG u našoj studiji bi mogao proizaći iz tog što u studiju nisu bile uključene trudnice bez faktora rizika za preeklampsiju ili mogu biti rezultat pažljivog nadzora i kontrole trudnoće kod svih trudnica tokom čitavog perioda praćenja.

SM C16:0 je izabran kao predstavnik iz grupe sfingomijelina. Koncentracija SM C16:0 u RG je kontinuirano rasla od 2. trimestra tokom cijelog perioda posmatranja, dok je u PG primjetno povećanje koncentracije uočeno tokom 3. trimestra. Međutim, nisu uočene statistički značajne razlike u koncentraciji SM C16:0 između dvije ispitivane kohorte (Tabela 12). Rezultati prethodno sprovedene studije su ukazali na trend povećanja koncentracije svih izmjerenih sfingolipida (SM C16:0, SM C18:0, sfingomijelina C18:1 (engl. *sphingomyelin C18:1*, SM C18:1) i sfingomijelina C24:0 (engl. *sphingomyelin C24:0*, SM C24:0)) u plazmi trudnica sa preeklampsijom, ali i u kontrolnoj grupi [80]. Iako su prosječne vrijednosti za SM C16:0 i SM C18:1 bile veće u kontrolnoj grupi nego u grupi sa preeklampsijom, koncentracija SM C18:0 je u kasnoj gestaciji bila viša kod pacijentkinja sa preeklampsijom [80], što je u skladu sa prethodnim studijama koje su našle vezu između povišenih koncentracija SM C18:0 i preeklampsije [188]. Visoke koncentracije sfingomijelina u plazmi su u velikoj mjeri povezane sa subkliničkom aterosklerozom i bolešću koronarnih arterija, što ukazuje na

njihovu potencijalnu dvostruku ulogu kao indikatora za početak i progresiju preeklampsije i kasnijih kardiovaskularnih komplikacija kod žena sa istorijom preeklampsije u trudnoći [80].

Osim značajno više koncentracije triglicerida u PG, jedina značajna razlika u osnovnim parametrima lipidnog profila između dvije studijske grupe bila je niža koncentracija HDL holesterola u PG u 2. trimestru (Tabela 6). Prethodne studije su pokazale da kod žena sa trudnoćom bez komplikacija dolazi do povećanja koncentracije HDL holesterola u 2. trimestru, dok u isto vrijeme takvo povećanje izostaje kod žena koje u trudnoći razvijaju komplikacije poput preeklampsije [48]. Niske koncentracije HDL holesterola se tradicionalno vezuju sa rizikom od razvoja ateroskleroze, kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa [91]. Prethodno smo uočili da su kod trudnica koje su kasnije razvile preeklampsiju koncentracije HDL holesterola kao i koncentracija S1P, bioaktivnog sfingolipida koji se prenosi HDL česticama, u 2. trimestru bile niže u poređenju sa trudnicama koje nisu razvile preeklampsiju, što bi moglo da utiče na vaskularni odgovor i razvoj sistemske inflamacije povezanih sa razvojem ove komplikacije. Prema tome, dalje smo za cilj imali da ispitamo promjene u metabolizmu HDL čestica u RG i PG, kroz analizu koncentracije markera sinteze i apsorpcije holesterola unutar HDL čestica, aktivnosti glavnih modulatora sadržaja HDL holesterola i nivoa glavnih funkcionalnih proteina HDL čestica.

Uloga i značaj HDL-a u trudnoći su malo istraženi i nisu dovoljno razjašnjeni. Smatra se da ove čestice mogu uticati na ravnotežu sterola u trofoblastima [189,190]. HDL čestice majke bi mogle predstavljati važan izvor holesterola za placentu tokom rane trudnoće [189], i obrnuto, čini se da ove čestice posreduju u efluku holesterola iz trofoblasta tokom sredine gestacije, kao i u kasnoj trudnoći [190]. HDL čestice nose kombinaciju anti-inflamatornih proteina, uključujući antioksidativne enzime, inhibitore proteaza i proteine koji regulišu sistem komplementa. HDL utiče na aktivnost ćelija imunog sistema tako što reguliše homeostazu sterola u ovim ćelijama [189]. Očuvanje strukture endotela i adekvatno snabdijevanje fetusa krvlju majke je kritično za očuvanje trudnoće, a čini se da HDL igra glavnu ulogu u ovim procesima kroz različite funkcije, uključujući stimulaciju sinteze NO [189]. Na osnovu rezultata ove studije možemo zaključiti da je smanjena koncentracija HDL holesterola u 2. trimestru u PG bar djelimično posljedica narušenog kapaciteta HDL čestica da preuzimaju holesterol iz perifernih tkiva. Kao što je prethodno pomenuto, ovo bi moglo dovesti do smanjenog efluka holesterola i neravnoteže u koncentraciji sterola u trofoblastima i ćelijama imunog sistema, što prethodi razvoju kasne preeklampsije.

Trudnoću karakterišu značajne promjene u strukturi HDL čestica u poređenju sa ženama koje nisu trudne [190]. Prethodne studije su pokazale da su sastav i veličina HDL čestica kod žena sa preeklampsijom promijenjeni u poređenju sa fiziološkom trudnoćom [87]. Ipak, nijedna od ovih studija se nije bavila ispitivanjem metaboličkog profila holesterola u HDL česticama.

U daljem toku našeg istraživanja analizirali smo kvantitativni metabolički profil holesterola u HDL frakciji. Naši prethodni rezultati analize NHS u ukupnoj plazmi ukazali su na postojanje neravnoteže u homeostazi holesterola kod trudnica koje imaju sklonost ka razvoju preeklampsije. Slično našim rezultatima, i u drugoj studiji, trudnoća u kojoj je došlo do razvoja preeklampsije je bila povezana sa istovremenim povećanjem sinteze i apsorpcije holesterola [63]. Detaljnim profilisanjem NHS u HDL frakciji dobili smo dalji uvid u strukturu HDL čestica. Obrasci longitudinalnih promjena u koncentracijama holesterolskih prekursora u HDL frakciji su bili slični u dvije ispitivane grupe, pri čemu su statistički značajne razlike uočene u RG (Tabela 10). Izostanak značajnih razlika u PG je vjerovatno posljedica malog broja ispitanica u toj kohorti. Jedina značajna razlika u koncentracijama markera sinteze u HDL frakciji bila je statistički značajno niža koncentracija dezmosterola_{HDL} u 1. trimestru u PG u poređenju sa RG (Tabela 10). Niža koncentracija dezmosterola_{HDL} u PG mogla bi biti

posljedica poremećaja u sintezi holesterola i metabolizmu lipida, koji su uobičajeni kod preeklampsije. Kako je dezmosterol intermedijer u putu biosinteze holesterola, njegovi smanjeni nivoi mogu ukazivati na izmijenjenu sintezu ili povećanu potrošnju holesterola u tkivima, potencijalno zbog pojačanog inflamatornog odgovora i oksidativnog stresa povezanog sa preeklampsijom.

U našoj studiji u RG su uočene statistički značajne promjene u koncentraciji markera apsorpcije holesterola u HDL frakciji. Oba markera, kampesterol_{HDL} i β -sitosterol_{HDL}, su pratili slične obrasce promjena – porast koncentracija u 2. trimestru, praćen značajnim padom koncentracija u 3. trimestru i u tački pred porođaj (Tabela 10). Nasuprot tome, u PG nisu uočene statistički značajne varijacije u koncentraciji kampesterola_{HDL} i β -sitosterola_{HDL}, a obrasci longitudinalnih promjena su se značajno razlikovali u odnosu na RG. U PG je uočen pad koncentracija oba markera u 2. trimestru, praćen postepenim povećanjem do kraja trudnoće (Tabela 10). Dodatno, koncentracije kampesterola_{HDL} i β -sitosterola_{HDL} u 2. trimestru su bile značajno niže u PG u poređenju sa RG (Tabela 10). Dakle, niže koncentracije HDL holesterola kod žena sa preeklampsijom u 2. trimestru su bile istovremeno praćene nižim nivoima markera apsorpcije holesterola. Više koncentracije fitosterola su generalno povezane sa nižim rizikom od kardiovaskularnih bolesti [191]. Holesterol iz hrane se apsorbuje pomoću dva nezavisna puta na nivou enterocita – jedan uključuje hilomikrone, a drugi uključuje interakciju ATP vezujućeg kasetnog transportera (engl. *ATP binding cassette subfamily A member 1*, ABCA1) i apoA-I i apsorpciju HDL česticama (HDL put) [192]. Smatra se da se crijevna apsorpcija fitosterola odvija kroz sličan proces kao i apoA-I lipidacija [193]. U skladu sa ovim, predloženo je da se apsorpcija fitosterola putem HDL puta može koristiti kao marker intestinalne ABCA1/ApoA-I aktivnosti [193]. Istraživanje na miševima je otkrilo da crijevni HDL put može da doprinese i sa 30% nivou HDL holesterola u plazmi [193]. Dakle, mogli bismo pretpostaviti da je kod žena sklonih razvoju kasne preeklampsije smanjen kapacitet za sintezu novonastalih HDL čestica na nivou enterocita. Ova pretpostavka otvara nove perspektive u terapijskim i preventivnim pristupima za preeklampsiju.

Sljedeći korak u ovom istraživanju bio je ispitivanje promjene u aktivnosti LCAT i CETP, tj. enzima uključenih u metabolizam holesterola i ključnih proteina u sazrijevanju HDL čestica [93]. U našoj studiji, aktivnost LCAT je porasla u 2. trimestru i u PG i u RG, nakon čega je došlo do pada aktivnosti u 3. trimestru. Međutim, jedina statistički značajna promjena je bio pad aktivnosti između 2. i 3. trimestra u RG (Tabela 11). Niža aktivnost LCAT se obično vezuje sa niskim nivoom HDL holesterola i povećanim rizikom od ateroskleroze i kasnijim razvojem kardiovaskularnih bolesti, s obzirom na to da LCAT igra ključnu ulogu u esterifikaciji holesterola i sazrijevanju HDL-a [93]. Studije su pokazale da fluktuacije u LCAT aktivnosti mogu odražavati promjene u metabolizmu HDL-a [194], na koje mogu uticati fiziološki zahtjevi vezani za trudnoću. Povećana aktivnost LCAT primjećena u našoj studiji u obje ispitivane grupe u 2. trimestru bi mogla biti povezana sa povećanom potrebom za transportom holesterola i sintezom ćelijske membrane kako trudnoća napreduje. Kada je poređena aktivnost enzima LCAT između dvije grupe, značajna razlika je zabilježena u 3. trimestru, pri čemu je aktivnost LCAT bila značajno viša u PG u odnosu na RG (Tabela 11). Pad aktivnosti LCAT u 3. trimestru u RG, u kombinaciji sa stabilnom aktivnošću u PG, može ukazivati na različite odgovore na promjene u metabolizmu lipida u kasnoj trudnoći. Značajno viša aktivnost LCAT može sugerisati na kompenzatorni odgovor organizma na oksidativni stres i sistemsku inflamaciju, koji su karakteristični za preeklampsiju [27], a u cilju povećanja koncentracije ateroprotektivnog i anti-inflamatornog HDL-a. Povećana aktivnost LCAT kod trudnica sa preeklampsijom, prema tome, može biti adaptivni mehanizam za održavanje funkcionalnosti HDL čestica u inflamatornim stanjima, što može uticati na ishod zdravlja majke i fetusa. Prema našim saznanjima, ovo istraživanje je prvo koje se bavilo ispitivanjem LCAT kod trudnica sa preeklampsijom, a ove preliminarne rezultate je potrebno potvrditi u većim studijama.

Kako je trudnoća praćena značajnim povećanjem koncentracije triglicerida, obično se kod žena sa trudnoćom bez komplikacija uočava i odgovarajuće povećanje aktivnosti CETP [47]. Iako su promjene u aktivnosti CETP detaljno opisane u fiziološkoj trudnoći [47] i nekim komplikacijama kod majke i fetusa [95], nema istraživanja koja su se bavila ispitivanjem aktivnosti ovog enzima, koji je značajan za remodelovanje HDL čestica, kod trudnica sa preeklampsijom. U našem istraživanju, u RG je uočen značajan pad aktivnosti CETP u 3. trimestru i u tački pred porođaj u poređenju sa nivoima zabilježenim u 1. trimestru (Tabela 11). Naši rezultati su ukazali na to da je smanjenje koncentracije HDL holesterola bilo praćeno padom aktivnosti CETP u RG. Pored toga, u istom vremenskom periodu je zabilježeno povećanje koncentracije triglicerida (Tabela 6). Kad se svi navedeni rezultati posmatraju zajedno, mogli bismo pretpostaviti da trigliceridi u plazmi nisu imali značajnu ulogu u strukturnim promjenama HDL čestica u RG. Vjerovatnije je da je pad koncentracije HDL holesterola u ovoj grupi bio rezultat različitih mehanizama koji uključuju smanjenu apsorpciju holesterola putem ABCA1/ApoA-I sistema i sniženu LCAT aktivnost. U PG nisu zabilježene statistički značajne promjene u CETP aktivnosti, iako je uočen sličan trend sa opadanjem aktivnosti CETP koji se u ovoj grupi dogodio još ranije, tokom 2. trimestra (Tabela 11). Ovim je još jednom potvrđeno da su neki drugi faktori, koji ne uključuju aktivnost CETP i obogaćivanje HDL čestica trigliceridima, važniji za remodelovanje HDL-a kod trudnica sa kasnom preeklampsijom. Kada su poređene CETP aktivnosti između ispitivanih kohorti, jedina statistički značajna razlika bila je viša aktivnost CETP u 3. trimestru, što može sugerisati na ubranu razmjenu estara holesterola i triglicerida između lipoproteina u kasnoj trudnoći, a to bi moglo imati negativne efekte na funkcionalnost HDL čestica.

Promjene koje smo uočili u specifičnim proteinskim komponentama HDL-a, apoA-I i apoM, zajedno sa aktivnošću PON1, otkrivaju različite obrasce u dvije studijske grupe, potencijalno ukazujući na različite fiziološke odgovore na trudnoću. Koncentracije apoA-I su pratile sličan trend u obje grupe – došlo je do značajnog rasta u 2. trimestru u poređenju sa vrijednostima iz 1. trimestra, a zatim se stabilizovale tokom ostatka trudnoće (Tabela 12). Ovaj jedinstveni trend promjena u apoA-I sugeriše dosljednu regulaciju koja može biti povezana sa adaptacijama u transportu lipida i antioksidativnim odbrambenim mehanizmima u trudnoći, pošto je apoA-I ključan za funkciju HDL čestica i efluks holesterola [91,96]. Ovaj rezultat je i očekivan, jer u trudnoći placenta dodatno luči apoA-I [195]. Nasuprot tome, uočeni su specifični obrasci promjena u koncentraciji apoM. Koncentracije apoM u RG su kontinuirano opadale do 3. trimestra, uz blagi porast u tački pred porođaj. Jedina statistički značajna promjena u nivou apoM u PG je bio značajan pad koncentracije u 3. trimestru (Tabela 12). Pored toga, koncentracije apoM su se značajno razlikovale i između grupa - nivo apoM je bio značajno niži u PG u 1. i 3. trimestru, ali značajno viši u 2. trimestru u poređenju sa RG (Tabela 12). Različiti trendovi promjena koncentracije apoM vjerovatno su rezultat odgovora na specifične faktore u svakoj od ispitivanih grupa, uključujući i sistemski inflamatorni odgovor, kao i varijacije u metabolizmu lipida. Određivanje apoM uz HDL holesterol i S1P je od posebnog značaja, jer se na taj način može steći uvid u njihove kombinovane uloge u zaštiti kardiovaskularnog sistema tokom trudnoće sa i bez komplikacija. Kako je prethodno diskutovano, iako su koncentracije apoM bile značajno niže u PG u poređenju sa RG tokom većeg dijela trudnoće, prosječna koncentracija apoM je bila značajno viša u 2. trimestru u PG, što se poklapa sa nižim nivoima HDL holesterola i S1P (Tabele 6, 9 i 12). Porast koncentracije apoM u 2. trimestru bi mogao da ima protektivni značaj za PG, s obzirom na to da apoM promovira anti-aterosklerotska svojstva HDL-S1P kompleksa. Međutim, potrebna su dalja istraživanja u ovom smjeru, kako bi se potvrdio definitivni značaj apoM, s obzirom na to da se i neki drugi molekuli mogu takmičiti sa S1P za isto vezujuće mjesto na apoM [185,186].

Izmjenjen lipidni profil (Tabela 6) i odnos između markera sinteze i apsorpcije holesterola (Tabela 10), bili su praćeni i različitom aktivnošću PON1 (Tabela 12). Opšte je prihvaćeno da se aktivnost PON1

povećava tokom trudnoće; međutim, rezultati u vezi sa aktivnošću PON1 kod preeklampsije su prilično oprečni [196-200]. Prema rezultatima našeg istraživanja, aktivnost PON1 je bila viša u PG u poređenju sa RG (Tabela 12). Osim toga, zanimljivo je da je značajan pad koncentracije HDL holesterola (Tabela 6) u RG u drugoj polovini trudnoće bio praćen značajno nižim sadržajem fitosterola u HDL frakciji (Tabela 10), kao i blagim, ali ne i značajnim padom, masene koncentracije apoA-I i aktivnosti PON 1 (Tabela 12). S druge strane, sve ove longitudinalne promjene su izostale u PG (Tabele 6, 10 i 12). Prema tome, mogli bismo spekulirati da je uočeni pad u koncentraciji HDL holesterola u RG većim dijelom rezultat smanjenja aktivnosti ABCA1/ApoA-I sistema u crijevima i smanjenog reverznog transporta holesterola u drugoj polovini trudnoće. Ovi procesi su u PG ostali nepromijenjeni tokom cijele gestacije, a odgovarali su nešto nižim nivoima koji su u RG uočeni u 3. trimestru.

Spearman-ovom korelacionom analizom smo potvrdili različite obrasce odnosa između markera sinteze i apsorpcije holesterola, ITM i osnovnih parametara lipidnog profila u RG i PG (Tabele 14 – 20). U RG je uočena konstantna pozitivna korelacija između holesterolskog prekursora latosterola i ITM, pored pozitivne korelacije između markera sinteze (dezmosterol i latosterol) i ukupnog i LDL holesterola, ukazujući na to da su više koncentracije ukupnog i LDL holesterola rezultat povećane sinteze u ovoj grupi, kao i da je povećana sinteza bar djelimično odgovor na veći ITM. Istovremeno, markeri apsorpcije (kampesterol i β -sitosterol) su bili u negativnoj korelaciji sa ITM i trigliceridima; dakle, trudnice kod kojih je očuvana apsorpcija holesterola i kod kojih se bilježe više koncentracije biljnih sterola su imale niži ITM i nižu koncentraciju triglicerida, čime je još jednom istaknut značaj fitosterola u smanjenju rizika za nastanak kardiovaskularnih bolesti [191]. Sa druge strane, u PG nije uočen trend konstantnih značajnih korelacija između markera sinteze i apsorpcije holesterola i osnovnih parametara lipidnog profila, a izdvojile su se pozitivne korelacije između kampesterola i β -sitosterola sa koncentracijom LDL i HDL holesterola. Dok bi pozitivna korelacija između biljnih sterola i HDL holesterola mogla označavati protektivni adaptivni mehanizam u cilju povećanja koncentracije HDL holesterola i očuvanja protektivnih karakteristika HDL čestica, pozitivna asocijacija između određivanih fitosterola i LDL holesterola još jednom ukazuje na narušen odnos između sinteze i apsorpcije holesterola, tj. izmjenjenu homeostazu holesterola u PG.

U okviru ovog istraživanja, *Spearman*-ovom korelacionom analizom smo ispitivali i međuzavisnost između koncentracija određivanih sfingolipida i osnovnih parametara lipidnog profila (Tabele 21 – 28). Ni u jednoj od ispitivanih grupa nije uočen trend korelacija između sfingolipida i parametara lipidnog profila koji bi bio sledljiv kroz sve trimestre. Kao najzanimljivije izdvojile su se pozitivne korelacije između Cer C24:0 i SM C16:0 sa ITM i koncentracijama triglicerida, ukupnog i LDL holesterola. Kako se sfingolipidi u plazmi transportuju u sklopu HDL čestica, lipoproteina koji sadrže apoB i vezani za albumin [201-203], nisu iznenađujuće ni pozitivne korelacije zabilježene između koncentracije Cer C24:0 i SM C16:0 sa koncentracijama osnovnih parametara lipidnog profila. Međutim, interesantno je da se tokom cijele trudnoće održala značajna korelacija sa koncentracijama triglicerida, ukupnog i LDL holesterola, ali ne i HDL holesterola, a ceramidi su podjednako raspodijeljeni između lipoproteinskih čestica koje sadrže apoB i HDL čestica, dok je taj odnos za sfingomijelin 63-75% sfingomijelina vezanog za VLDL/LDL i 25-35% za HDL čestice [203]. Mnoge eksperimentalne i kliničke studije povezuju sfingolipide i patogenezu različitih metaboličkih bolesti [204]. Uočeno je da promjene u metabolizmu i koncentraciji sfingolipida mogu doprinijeti razvoju kardiovaskularnih bolesti [204,205]. Više koncentracije sfingomijelina u plazmi su povezane sa izaženijom aterosklerozom i predloženi su kao nezavisni faktori rizika za koronarnu bolest srca [206]. Uočeno je i da se sfingomijelin akumulira u aterosklerotskim plakovima, kao i da LDL prisutan u aterosklerotskim plakovima ima više nivoje sfingomijelina u poređenju sa LDL česticama iz plazme [207,208]. Slično sfingomijelinima, povećani nivoi ceramida u plazmi i aorti se takođe vezuju sa povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih

bolesti [209]. Smatra se da ceramidi stimulišu agregaciju lipoproteina, nestabilnost plaka, upalu i apoptozu [208]. Određene vrste ceramida se navode ka potencijalni biomarkeri koji mogu pomoći u predviđanju rizika od smrtnosti i identifikaciji pacijenata sa visokim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti [208]. Kako je već i navedeno, kardiovaskularne bolesti i preeklampsija dijele niz zajedničkih faktora rizika, koji između ostalog uključuju i endotelnu disfunkciju, a visoke koncentracije sfingomijelina u plazmi se vezuju sa aterosklerotskim promjenama i bolesti koronarnih arterija, što još jednom ukazuje da bi ovi molekuli mogli imati ulogu u patofiziologiji preeklampsije, a sa druge strane izdvajaju se i kao potencijalni prediktivni biomarkeri za razvoj kardiovaskularnih komplikacija kod žena sa istorijom preeklampsije u trudnoći.

Rezultati *Spearman*-ove korelacione analize NHS_{HDL} sa ITM i osnovnim parametrima lipidnog profila prikazani su u Tabelama 29–36. Osim očekivanih pozitivnih korelacija između koncentracije pojedinih NHS_{HDL} i koncentracije HDL holesterola, u RG su u 1. i 3. trimestru, kao i u tački pred porođaj uočene značajne negativne korelacije između dezmosterola $_{HDL}$ i koncentracije triglicerida. Takva korelacija ukazuje na to da povećanu sintezu HDL čestica prati pad koncentracije triglicerida. Ovaj inverzni odnos se djelimično može objasniti kroz metabolizam HDL čestica. Naime, HDL čestice bogate holesterolom učestvuju u razmjeni holesterol estara za trigliceride iz VLDL čestica, a prenos je posredovan CETP-om. Preostale HDL čestice se u sklopu reverznog transporta holesterola transportuju nazad u jetru radi izlučivanja viška holesterola. Efikasan reverzni transport holesterola je ujedno povezan i sa nižim nivoima triglicerida, pošto povećan klirens lipida može smanjiti potrebu za sintezom i oslobađanjem triglicerida na nivou jetre [210]. Slično markerima apsorpcije u ukupnoj plazmi koji su bili u negativnoj korelaciji sa ITM, u RG je potvrđena i negativna korelacija između β -sitosterola $_{HDL}$ i ITM. U PG nije uočen jasan trend korelacija kroz trimestre, a kao najznačajnije se izdvajaju negativne korelacije kampesterola $_{HDL}$ sa ITM i koncentracijom triglicerida, kao i β -sitosterola $_{HDL}$ sa koncentracijom triglicerida u 1. trimestru. Ovakva međuzavisnost bi mogla imati protektivni karakter, a blagotvorni efekti fitosterola u smanjivanju rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti su već opisani [191].

U daljoj analizi u okviru naše studije, svi oni parametri koji su pokazali statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa u 1. trimestru su dalje uzeti u razmatranje kao potencijalni biomarkeri koji bi se mogli koristiti u procjeni rizika za razvoj preeklampsije. U prethodnim studijama visoke koncentracije triglicerida i apoB su povezane sa većim rizikom za razvoj preeklampsije, kao i sa većim kardiovaskularnim rizikom kod majke i djeteta [211,212]. Sa druge strane, po prvi put u našoj studiji su prekursori holesterola izdvojeni kao markeri koji bi mogli imati značaj u procjeni rizika za razvoj preeklampsije. Kao značajni parametri koji razdvajaju trudnice sa visokorizičnom trudnoćom koje će razviti preeklampsiju od onih koje uprkos postojećem riziku neće razviti ovo oboljenje u 1. trimestru, u našoj studiji su se izdvojili latosterol, dezmosterol $_{HDL}$, apoM i PON1 (Tabela 37).

Preeklampsija predstavlja heterogeno i kompleksno oboljenje sa nedovoljno razjašnjenom patogenezom, a prema novijim shvatanjima radi se o komplikaciji koja je vjerovatno rezultat sinergističkog djelovanja više različitih faktora. Prethodne studije su se uglavnom bavile ispitivanjem kombinacije demografskih i kliničkih karakteristika majke u kombinaciji sa različitim biomarkerima, a ukazale su na to da bi multi-markerski pristup u predikciji preeklampsije mogao imati veći klinički značaj i primjenu, s obzirom na to da takvi modeli obično imaju veću osjetljivost i specifičnost [38]. Vođeni tim zaključkom, i mi smo u daljoj analizi pokušali da definišemo model koji će obuhvatiti više kliničkih karakteristika i biohemijskih parametara koji se rutinski određuju u biohemijskim laboratorijama, zajedno sa specifičnim lipidnim markerima ispitivanim u ovoj studiji, a na osnovu kog bi mogle da se izdvoje one trudnice koje će razviti preeklampsiju iz grupe žena sa visokorizičnom trudnoćom. U razmatranje smo uzeli sve parametre koji su se u univarijantnoj binarnoj logističkoj

analizi pokazali kao značajni u procjeni rizika za razvoj preeklampsije (Tabela 37), a u model smo dodali i godine starosti, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, koncentraciju PIGF-1, koncentraciju sFlt-1, koncentraciju ukupnog holesterola i koncentraciju triglicerida, koje kliničari koriste kao tradicionalne markere za predikciju rizika za razvoj preeklampsije. Primjenom multivarijantne binarne logističke regresione analize ispostavilo se da je samo koncentracija dezmosterola_{HDL} imala značajne prediktivne karakteristike za preeklampsiju u trudnoći (Tabela 38). Skoro 43% (*Negelkerke* $R^2 = 0,428$) zabilježenih slučajeva preeklampsije se može povezati sa nižim koncentracijama dezmosterola_{HDL}, a model je tačno klasifikovao 87,1% slučajeva. Dodatno, određivanjem AUC pokazano je da koncentracija dezmosterola_{HDL} može da se koristi u razdvajanju trudnica sa preeklampsijom od trudnica koje uprkos postojećem visokom riziku nisu razvile preeklampsiju, ali je dijagnostička tačnost ovog parametra bila slaba (Tabela 39) (Slika 21). Sljedeći korak u istraživanju je bio da se provjeri da li se dodavanjem kliničkih i biohemijskih parametara, koje kliničari koriste kao tradicionalne markere za predikciju rizika za razvoj preeklampsije, povećava dijagnostička tačnost u procjeni rizika za preeklampsiju. Analiza dijagnostičke tačnosti ispitivanih modela je pokazala da je model 1, koji je uključivao starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, koncentraciju PIGF-1, koncentraciju sFlt-1, koncentraciju holesterola i koncentraciju triglicerida, pokazao veću dijagnostičku tačnost, dok je model 2, koji je uključivao starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, koncentraciju PIGF-1, koncentraciju sFlt-1, koncentraciju holesterola, koncentraciju triglicerida, koncentraciju latosterola, koncentraciju dezmosterola_{HDL}, koncentraciju apoM i aktivnost PON1 pokazao najveću dijagnostičku tačnost (Tabela 39) (Slike 22-24). Međutim, statistički gledano, značajna razlika je uočena samo između dijagnostičkih tačnosti dezmosterola_{HDL} i modela 2. Dakle, rezultati naše studije ukazuju na to da je model kog čini više markera, a koji uključuje kliničke, osnovne biohemijske i specifične lipidne parametre, vjerovatno najbolji pristup za procjenu rizika za razvoj preeklampsije u trudnoći. Iako su se koncentracije latosterola, dezmosterola_{HDL} i apoM, kao i aktivnost PON1 u 1. trimestru izdvojili kao markeri koji bi se mogli koristiti u procjeni rizika za razvoj preeklampsije, dodavanjem ovih biohemijskih parametara parametrima koji se već standardno koriste pri procjeni rizika za razvoj preeklampsije, dijagnostički potencijal se značajno ne mijenja (Slika 24).

Kako se kasna preeklampsija razvija nakon 34. nedelje gestacije [22], od značaja za procjenu rizika za razvoj ove komplikacije bi mogli biti i parametri određivani u 2. trimestru. Iz tog razloga, analizu koju smo prethodno predstavili za parametre određivane u 1. trimestru, smo uradili i za parametre mjerene u 2. trimestru. Svi oni parametri koji su pokazali statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa u 2. trimestru su dalje uzeti u razmatranje kao potencijalni biomarkeri koji bi se mogli koristiti u procjeni rizika za razvoj preeklampsije. Kao značajni parametri koji razdvajaju trudnice sa visokorizičnom trudnoćom koje će razviti preeklampsiju od onih koje uprkos postojećem riziku neće razviti ovo oboljenje u 2. trimestru, u našoj studiji su se izdvojili koncentracije glukoze, triglicerida, HDL holesterola, β -sitosterola, S1P, kampesterola_{HDL} i apoM (Tabela 40).

U daljoj analizi smo pokušali da definišemo model koji bi obuhvatao kliničke i biohemijske parametre koji se tradicionalno koriste u procjeni rizika za razvoj preeklampsije i specifične parametre koji su ispitivani u našoj studiji. Kao i u 1. trimestru, osnovni cilj definisanja ovakvog modela bio je da se izdvoje one trudnice koje će razviti preeklampsiju iz grupe žena sa visokorizičnom trudnoćom. Osim parametara koji su se pokazali značajnim u 2. trimestru, u ispitivani model smo dodali i godine starosti, ITM prije trudnoće, SAP; MPI-UtA, odnos sFlt-1/PIGF-1 i koncentraciju holesterola, koje kliničari koriste kao tradicionalne markere za predikciju rizika za razvoj preeklampsije. Primjenom multivarijantne binarne logističke regresione analize ispostavilo se da je samo koncentracija apoM imala značajne prediktivne karakteristike za preeklampsiju u trudnoći (Tabela 41). Skoro 68%

(*Negelkerke* $R^2 = 0,677$) zabilježenih slučajeva preeklampsije se može povezati sa višim koncentracijama apoM u 2. trimestru, a model je tačno klasifikovao 94,0% slučajeva.

Određivanjem AUC pokazano je da koncentracija apoM u 2. trimestru pokazuje dobru dijagnostičku tačnost i može da se koristi u razdvajanju trudnica sa preeklampsijom od trudnica koje uprkos postojećem visokom riziku nisu razvile preeklampsiju (Tabela 42) (Slika 25). U daljoj analizi smo ispitali da li se dodavanjem kliničkih i biohemijskih parametara, koje kliničari koriste kao tradicionalne markere za predikciju rizika za razvoj preeklampsije u 2. trimestru, povećava dijagnostička tačnost u procjeni rizika za preeklampsiju. Analiza dijagnostičke tačnosti ispitivanih modela je pokazala da je model 1, koji je uključivao starost, ITM prije trudnoće, SAP; MPI-UtA, odnos sFlt-1/PlGF-1, koncentraciju holesterola i koncentraciju triglicerida pokazao nešto veću, ali takođe, umjerenu dijagnostičku tačnost, dok je model 2, koji je uključivao starost, ITM prije trudnoće, SAP, MPI-UtA, odnos sFlt-1/PlGF-1, koncentraciju glukoze, koncentraciju holesterola, koncentraciju triglicerida, koncentraciju HDL holesterola, koncentraciju β -sitosterola, koncentraciju S1P, koncentraciju kampesterola_{HDL} i koncentraciju apoM pokazao najveću dijagnostičku tačnost (Tabela 42) (Slike 26-28). Statistički značajna razlika je uočena između dijagnostičkih tačnosti apoM i modela 2, ali i između modela 1 i modela 2. Dakle, još jednom smo potvrdili da je primjena modela kog čini više markera, a koji uključuje kliničke, biohemijske i specifične lipidne parametre, vjerovatno najbolji pristup za procjenu rizika za razvoj preeklampsije u trudnoći. Međutim, u 2. trimestru je pokazano da se dodavanjem koncentracije glukoze, HDL holesterola, β -sitosterola, S1P, kampesterola_{HDL} i apoM u model koji uključuje parametre koji se tradicionalno koriste u procjeni rizika za razvoj preeklampsije značajno povećava dijagnostički potencijal modela (Slika 28). Model 2, kog su činili kombinacija kliničkih, biohemijskih i specifičnih parametara povezanih sa metabolizmom lipida je pokazao odličnu dijagnostičku tačnost u identifikaciji trudnica koje će razviti kasnu preeklampsiju.

Rezultati našeg istraživanja su ukazali na to da je kasna preeklampsija povezana sa značajno izmjenjenim metaboličkim i lipidnim profilom, čija je osnovna karakteristika njegova proaterogena priroda. Razvoju kasne preeklampsije je prethodio pad u koncentraciji HDL holesterola u 2. trimestru, a pored toga, u trudnoći sa preeklampsijom je uočena i neravnoteža u regulaciji homeostaze holesterola. Kasnu preeklampsiju je pratio i disbalans u nivou ispitivanih sfingolipida, uključujući niže koncentracije S1P u 2. i 3. trimestru, zajedno sa povišenim nivoima ceramida i sfingomijelina. U budućim studijama u ovoj oblasti, potrebno je razmoriti uključivanje većih kohorti, kao i grupu trudnica bez prisutnih faktora rizika; ovakav pristup bi mogao biti osnova u uspostavljanju novih preventivnih i terapijskih strategija za preeklampsiju.

6 Zaključci

- HPLC-MS/MS metoda za kvantifikaciju izabranih sfingolipida (SPH, SAPH, S1P, SAPH1P, Cer C16:0, Cer C24:0 i SM C16:0) u humanoj plazmi je uspješno optimizovana i validirana u našoj laboratoriji. Manje ograničenje metode je relativno dug TAT, a u cilju eliminacije interferencija koje potiču od matriksa, kao matriks za pripremu standardnih krivih potrebno je koristiti *pool* humane plazme. Metoda omogućava simultanu kvantifikaciju više vrsta sfingolipida, što je ključno za razumijevanje njihove uloge u fiziološkim i patofiziološkim procesima, uključujući složene interakcije u metaboličkoj mreži sfingolipida.
- Kasna preeklampsija je povezana sa značajno izmijenjenim metaboličkim i lipidnim profilom. Koncentracija triglicerida kod trudnica sa kasnom preeklampsijom je viša u odnosu na trudnice koje uprkos postojećem visokom riziku nisu razvile preeklampsiju. Takođe, kod trudnica sa preeklampsijom izostaje protektivni porast nivoa HDL holesterola u 2. trimestru, koji se bilježi u trudnoćama bez komplikacija. Dakle, preeklampsiju sa kasnim početkom karakteriše prisustvo dislipidemije, čija je osnovna karakteristika proaterogena priroda.
- Metaboličko profilisanje holesterola kroz analizu NHS daje uvid u suptilne promjene u homeostazi holesterola, koje nisu vidljive posmatranjem samo osnovnih parametara lipidnog profila.
- Povećanje koncentracije holesterola kod trudnica sa visokorizičnom trudnoćom je praćeno porastom koncentracije holesterolskih prekursora, tj. viši nivoi holesterola su rezultat povećane sinteze ovog biomolekula. Nasuprot tome, kod trudnica sa preeklampsijom nisu uočene takve longitudinalne promjene u većini holesterolskih prekursora, što može ukazivati na smanjenu sintezu HDL čestica i niže koncentracije HDL holesterola. Međutim, važno je istaći da je latosterol, jedan od holesterolskih prekursora, bio povišen u PG u 1. trimestru u odnosu na RG, što sugerira da je sinteza holesterola kod žena sa preeklampsijom mogla biti povećana u ranoj trudnoći. Ovi rezultati ističu važnost detaljne analize holesterolskih prekursora za bolje razumijevanje promjena u homeostazi holesterola u preeklampsiji.
- Porast koncentracije markera sinteze holesterola kod žena sa visokorizičnom trudnoćom je praćen padom koncentracije markera apsorpcije holesterola u kasnoj gestaciji. Kod trudnica sa preeklampsijom uprkos porastu koncentracije markera sinteze dezmosterola, nema promjena u koncentraciji biljnih sterola. Prema tome, možemo pretpostaviti da su kod žena sa kasnom preeklampsijom povećane i sinteza i apsorpcija holesterola, odnosno da postoji neravnoteža u regulaciji homeostaze holesterola.
- Dislipidemija kod trudnica sa preeklampsijom podrazumijeva promjene u koncentraciji brojnih lipidnih vrsta, uključujući i sfingolipide. Kod trudnica sa visokorizičnom trudnoćom koje nisu razvile preeklampsiju uočava se konzistentan porast koncentracije S1P tokom trudnoće. Kod trudnica sa preeklampsijom uočava se pad koncentracije S1P u 2. trimestru, praćen povećanjem koncentracije pred porođaj. Koncentracija S1P je niža kod trudnica sa preeklampsijom u 2. i 3. trimestru u poređenju sa trudnicama iz grupe sa visokorizičnom trudnoćom. Pad koncentracije HDL holesterola u 2. trimestru se poklapa sa niskim koncentracijama S1P u istom periodu kod trudnica sa preeklampsijom.

- I kod trudnica sa preeklampsijom i kod žena sa visokorizičnom trudnoćom se uočava trend rastućih koncentracija ispitivanih ceramida i sfingomijelina, bez značajnih razlika između kohorti. Visoke koncentracije ovih molekula su povezane sa subkliničkom aterosklerozom i kardiovaskularnim komplikacijama, što u kombinaciji sa niskom koncentracijom S1P može biti od značaja u procjeni rizika za kardiovaskularne komplikacije kod trudnica sa preeklampsijom.
- Kod trudnica sa preeklampsijom, koncentracija dezmosterola_{HDL}, u 1. trimestru trudnoće je bila značajno niža u poređenju sa koncentracijama zabilježenim kod trudnica sa visokorizičnom trudnoćom. S obzirom na to da je dezmosterol intermedijer u biosintezi holesterola, snižene koncentracije dezmosterola u HDL frakciji mogu ukazivati na smanjenu sintezu HDL čestica ili povećanu potrošnju holesterola u tkivima.
- Dok je u grupi sa visokorizičnom trudnoćom u 2. trimestru zabilježen rast koncentracija kampesterola_{HDL} i β -sitosterola_{HDL}, kod trudnica koje su kasnije razvile preeklampsiju u 2. trimestru je uočen pad u koncentraciji navedenih markera. Po prvi put u našoj studiji smo potvrdili da je snižena koncentracija HDL holesterola u 2. trimestru praćena nižim koncentracijama markera apsorpcije holesterola (kampesterola i β -sitosterola) u HDL frakciji. Prema tome, kod trudnica sklonih razvoju preeklampsije kapacitet za sintezu HDL čestica na nivou enterocita bi mogao biti smanjen.
- Prvi put u našoj studiji su ispitivane i promjene u aktivnosti LCAT i CETP. Veća LCAT aktivnost u 3. trimestru kod trudnica sa preeklampsijom bi mogla ukazivati na kompenzatorni odgovor organizma na oksidativni stres i sistemsku inflamaciju, a u cilju povećanja koncentracije HDL holesterola. Prema rezultatima našeg istraživanja, promjene u aktivnosti CETP nisu pratile promjene u koncentraciji triglicerida ni u jednoj od ispitivanih grupa, što ukazuje da CETP nije značajno uticao na remodelovanje HDL čestica kod naših ispitanica.
- Naša studija je pokazala različite obrasce promjena u koncentracijama apoA-I i apoM i aktivnosti PON1 između trudnica s preeklampsijom u odnosu na visokorizičnu trudnoću, pri čemu je PG imala višu aktivnost PON1 i specifičan trend porasta apoM u 2. trimestru, što sugeriše moguće adaptivne mehanizme koji uključuju očuvanje anti-aterosklerotskih svojstava HDL-S1P kompleksa i reverznog transporta holesterola.
- Kao parametri koji bi mogli da se koriste u procjeni rizika za razvoj preeklampsije u 1. trimestru su se izdvojili latosterol, dezmosterol_{HDL}, apoM i PON1, a u 2. trimestru su to bili glukoza, trigliceridi, HDL holesterol, β -sitosterol, S1P, kampesterol_{HDL} i apoM. Dezmosterol_{HDL} u 1. trimestru i apoM u 2. trimestru su pokazali značajan prediktivni potencijal za preeklampsiju. Dijagnostička tačnost dezmosterola_{HDL} je bila slaba, dok je apoM u 2. trimestru pokazao dobru dijagnostičku tačnost.
- Uključivanje specifičnih lipidnih parametara u modele sa markerima koje kliničari koriste kao tradicionalne parametre za procjenu rizika za razvoj preeklampsije značajno poboljšava dijagnostičku tačnost ovih modela. Kao najbolji pristup u procjeni rizika za razvoj preeklampsije izdvojio se multimarkerski pristup, tj. primjena kombinovanih modela koji uključuju tradicionalne kliničke, biohemijske i specifične lipidne parametre.
- Sveukupno posmatrano, određivanje lipidnih parametara, uključujući osnovne, ali i specifične lipidne parametre, značajno poboljšava stepen predikcije preeklampsije, nudeći

komplementarni alat tradicionalnim kliničkim markerima za bolje identifikovanje rizičnih trudnoća. Ovaj pristup fokusiran na lipide otvara i mogućnost za efikasnije, personalizovane terapijske pristupe, kao i intervencije usmjerene ka očuvanju budućeg kardiometaboličkog zdravlja majke i djeteta.

7 Literatura

1. National Institutes of Health. About Pregnancy [Internet]. US Department of Health and Human Services [cited 2024 June 15]. Dostupno na: <https://www.nichd.nih.gov/health/topics/pregnancy/conditioninfo>
2. World Health Organization. Framework for action strengthening quality midwifery education for universal health coverage 2030. World Health Organization, Switzerland, Geneva; 2019.
3. United Nations Millennium Development Goals [Internet]. United Nations [cited 2024 June 15]. Dostupno na: <https://www.un.org/millenniumgoals/maternal.shtml>
4. World Health Organization. Making Pregnancy Safer—report by the secretariat. World Health Organization, Switzerland, Geneva; 2000.
5. The Sustainable Development Goals [Internet]. United Nations [cited 2024 June 15]. Dostupno na: <https://www.undp.org/sustainable-development-goals>
6. World Health Organization. Managing complications in pregnancy and childbirth: a guide for midwives and doctors. World Health Organization, Switzerland, Geneva; 2017.
7. National Institutes of Health. What are some common complications of pregnancy [Intenet]. US Department of Health and Human Services [cited 2024 June 15]. Dostupno na: <https://www.nichd.nih.gov/health/topics/pregnancy/conditioninfo/complications>
8. American College of Obstetricians and Gynecologists. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' task force on hypertension in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2013; 122(5):1122-31.
9. American College of Obstetricians and Gynecologists. Gestational hypertension and preeclampsia: ACOG practice bulletin, number 222. *Obstet Gynecol.* 202; 135(6):e237-60.
10. Zeeman GG. Neurologic complications of pre-eclampsia. *Semin Perinatol.* 2009; 33(3):166–72.
11. Sibai BM. Diagnosis, prevention, and management of eclampsia. *Obstet Gynecol.* 2005; 105(2):402–10.
12. Noraihan MN, Sharda P, Jammal AB. Report of 50 cases of eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res.* 2005; 31(4):302–9.
13. Sibai BM, Stella CL. Diagnosis and management of atypical preeclampsia-eclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200(5):481.e1–7.
14. Williams D. Long-term complications of preeclampsia. *Semin Nephrol* 2011; 31(1):111–22.
15. Osungbade K, Ige O. Public health perspectives of preeclampsia in developing countries: implication for health system strengthening. *J Pregnancy.* 2011; 2011:481095.

16. Ananth C, Keyes K, Wapner R. Pre-eclampsia rates in the United States, 1980–2010: age-period-cohort analysis. *BMJ*. 2013; 347:f6564.
17. Abalos E, Cuesta C, Grosso A, Chou D, Say L. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: a systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013; 170(1):1–7.
18. Wang W, Xie X, Yuan T, Wang Y, Zhao F, Zhou Z, Zhang H. Epidemiological trends of maternal hypertensive disorders of pregnancy at the global, regional, and national levels: a population-based study. *BMC pregnancy and childbirth*. 2021; 21(1):364.
19. Ayala-Ramírez P, Serrano N, Barrera V, Bejarano JP, Silva JL, Martínez R, Gil F, Olaya-C M, García-Robles R. Risk factors and fetal outcomes for preeclampsia in a Colombian cohort. *Heliyon*. 2020; 6(9):e05079.
20. Ganchimeg T, Mori R, Ota E, Koyanagi A, Gilmour S, Shibuya K, Torloni MR, Betran AP, Seuc A, Vogel J, Souza JP. Maternal and perinatal outcomes among nulliparous adolescents in low and middle-income countries: a multi-country study. *BJOG: Int J Obstetr Gynaecol*. 2013; 120(13):1622–30.
21. Patil A, Patel N. Impact of adolescent pregnancy on obstetric outcome. *Indian J Trauma Emerg Pediatr*. 2017; 9(2):43-7.
22. Staff AC, Redman CW. The differences between early- and late-onset pre-eclampsia. In: Saito S. (ed.) *Preeclampsia: Comprehensive Gynecology and Obstetrics*. Springer, Singapore; 2018; pp. 157-72.
23. Lyall F, Robson SC, Bulmer JN. Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction: relationship to clinical outcome. *Hypertension*. 2013; 62(6):1046-54.
24. Dimitriadis E, Rolnik DL, Zhou W, Estrada-Gutierrez G, Koga K, Francisco RP, Whitehead C, Hyett J, da Silva Costa F, Nicolaides K, Menkhorst E. Pre-eclampsia. *Nat Rev Dis Primers*. 2023; 9(1):8.
25. Huppertz B. Trophoblast invasion: remodelling of spiral arteries and beyond. In: Saito S. (ed.) *Preeclampsia: Comprehensive Gynecology and Obstetrics*. Springer, Singapore; 2018; pp. 47-62.
26. Burton GJ, Woods AW, Jauniaux E, Kingdom JC. Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*. 2009; 30(6):473-82.
27. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 2005; 308(5728):1592-4.
28. Raymond D, Peterson E. A critical review of early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv*. 2011; 66(8):497-506.
29. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology*. 2009; 24(3):147-58.

30. Mutter WP, Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res.* 2008; 75(1):1-8.
31. Obed SA, Aniteye P. Birth weight and ponderal index in preeclampsia: a comparative study. *Ghana Med J.* 2006; 40(1):8–13.
32. Ihle BU, Long P, Oats J. Early onset preeclampsia: recognition of underlying renal disease. *Br Med J.* 1987; 294(6564):79–81.
33. Crispi F, Llurba E, Dominguez C, Martin-Gallan P, Cabero L, Gratacos E. Predictive value of angiogenic factors and uterine artery Doppler for early- versus late-onset preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008; 31(3):303–9.
34. Gomez-Arriaga PI, Herraiz I, Lopez-Jimenez EA, Escribano D, Denk B, Galindo A. Uterine artery Doppler and sFlt-1/PlGF ratio: prognostic value in early-onset preeclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014; 43(5):525-32.
35. ACOG Committee on Practice Bulletins--Obstetrics. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. *Obstet Gynecol.* 2002; 99(1):159–67.
36. ACOG. Committee opinion No. 638: First-trimester risk assessment for early-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol.* 2015; 126(3):e25–7.
37. National Institute of Health and Excellence (NICE). Quality standard [QS35]: Hypertension in pregnancy [Intenet]. NICE [Cited 2024 June 17]. Dostupno na: <https://www.nice.org.uk/guidance/qs35>
38. Myers JE, Kenny LC, McCowan LM, Chan EH, Dekker GA, Poston L, Simpson NA, North RA. Angiogenic factors combined with clinical risk factors to predict preterm pre-eclampsia in nulliparous women: a predictive test accuracy study. *BJOG.* 2013; 120(10):1215-23.
39. Fox A, McHugh S, Browne J, Kenny LC, Fitzgerald A, Khashan AS, Dempsey E, Fahy C, O'Neill C, Kearney PM. Estimating the cost of preeclampsia in the healthcare system: cross-sectional study using data from SCOPE study (Screening for Pregnancy End Points). *Hypertension.* 2017; 70(6):1243-9.
40. Akolekar R, Syngelaki A, Poon L, Wright D, Nicolaides KH. Competing risks model in early screening for preeclampsia by biophysical and biochemical markers. *Fetal Diagn Ther.* 2013; 33(1): 8–15.
41. Akolekar R, Syngelaki A, Sarquis R, Zvanca M, Nicolaides KH. Prediction of early, intermediate and late pre-eclampsia from maternal factors, biophysical and biochemical markers at 11-13 weeks. *Prenat Diagn.* 2011; 31(1): 66–74.
42. Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennstrom M, Olovsson M, Brennecke SP, Stepan H, Allegranza D, Dilba P, Schoedl M, Hund M, Verlohren S. Predictive Value of the sFlt-1:PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N Engl J Med.* 2016; 374(1):13-22.

43. Antwi E, Amoakoh-Coleman M, Vieira DL, Madhavaram S, Koram KA, Grobbee DE, Agyepong IA, Klipstein-Grobusch K. Systematic review of prediction models for gestational hypertension and preeclampsia. *PLoS One*. 2020; 15(4):e0230955.
44. De Kat AC, Hirst J, Woodward M, Kennedy S, Peters SA. Prediction models for preeclampsia: a systematic review. *Pregnancy Hypertens*. 2019; 16:48-66.
45. Agrawal S, Shinar S, Cerdeira AS, Redman C, Vatish M. Predictive performance of PlGF (placental growth factor) for screening preeclampsia in asymptomatic women: A systematic review and meta-analysis. *Hypertension*. 2019; 74(5):1124-35.
46. Herrera E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *European journal of clinical nutrition*. 2000; 54(S1):S47.
47. Grimes SB, Wild R. Effect of Pregnancy on Lipid Metabolism and Lipoprotein Levels. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Hofland J, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, McLachlan R, Morley JE, New M, Purnell J, Singer F, Stratakis CA, Trencle DL, Wilson DP. (eds.) *Endotext* [Internet]. MDText, Inc., South Dartmouth, Massachusetts, USA; 2018.
48. Spracklen CN, Smith CJ, Saftlas AF, Robinson JG, Ryckman KK. Maternal hyperlipidemia and the risk of preeclampsia: a meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2014; 180(4):346-58.
49. Charlton F, Tooher J, Rye KA, Hennessy A. Cardiovascular risk, lipids and pregnancy: preeclampsia and the risk of later life cardiovascular disease. *Heart, Lung and Circulation*. 2014; 23(3):203-12.
50. Huda SS, Forrest R, Paterson N, Jordan F, Sattar N, Freeman DJ. In preeclampsia, maternal third trimester subcutaneous adipocyte lipolysis is more resistant to suppression by insulin than in healthy pregnancy. *Hypertension*. 2014; 63(5):1094-101.
51. Jarvie E, Hauguel-de-Mouzon S, Nelson SM, Sattar N, Catalano PM, Freeman DJ. Lipotoxicity in obese pregnancy and its potential role in adverse pregnancy outcome and obesity in the offspring. *Clinical Science*. 2010; 119(3):123-9.
52. Wu WF, Wang QH, Zhang T, Mi SH, Liu Y, Wang LY. Gas chromatography analysis of serum cholesterol synthesis and absorption markers used to predict the efficacy of simvastatin in patients with coronary heart disease. *Clin Biochem*. 2013; 46(12):993-8.
53. Silbernagel G, Fauler G, Hoffmann MM, Lütjohann D, Winkelmann BR, Boehm BO, März W. The associations of cholesterol metabolism and plasma plant sterols with all-cause and cardiovascular mortality. *J Lipid Res*. 2010; 51(8):2384-93.
54. Luo J, Yang H, Song BL. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020; 21(4):225-45.
55. Olkkonen VM, Gylling H, Ikonen E. Plant sterols, cholesterol precursors and oxysterols: Minute concentrations—Major physiological effects. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2017; 169:4-9.

56. Van der Wulp MY , Verkade HJ, Groen AK. Regulation of cholesterol homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 2013; 368(1-2):1-16.
57. Miettinen HE, Rönö K, Koivusalo S, Stach-Lempinen B, Pöyhönen-Alho M, Eriksson JG, Hiltunen TP, Gylling H. Elevated serum squalene and cholesterol synthesis markers in pregnant obese women with gestational diabetes mellitus. *J Lipid Res.* 2014; 55(12):2644-54.
58. Matthan NR, Pencina M, Larocque JM, Jacques PF, D'Agostino RB, Schaefer EJ, Lichtenstein AH. Alterations in cholesterol absorption and synthesis characterize Framingham offspring study participants with coronary heart disease. *J Lipid Res.* 2009; 50(9):1927–35.
59. Weingartner O, Lutjohann D, Vanmierlo T, Müller S, Günther L, Herrmann W, Böhm M, Laufs U, Hermann M. Markers of enhanced cholesterol absorption are a strong predictor for cardiovascular diseases in patients without diabetes mellitus. *Chem Phys Lipids.* 2011; 164(6):451–6.
60. Mashnafi S, Plat J, Mensink RP, Baumgartner S. Non-cholesterol sterol concentrations as biomarkers for cholesterol absorption and synthesis in different metabolic disorders: a systematic review. *Nutrients.* 2019; 11(1):124.
61. Zaccardi F, Webb DR, Yates T, Davies MJ. Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: A 90-year perspective. *Postgrad Med J.* 2016; 92(1084):63–9.
62. Nikkilä K, Riikonen S, Lindfors M, Miettinen TA. Serum squalene and noncholesterol sterols before and after delivery in normal and cholestatic pregnancy. *Journal of lipid research.* 1996; 37(12):2687-95.
63. Lee SM, Moon JY, Lim BY, Kim SM, Park CW, Kim BJ, Jun JK, Norwitz ER, Choi MH, Park JS. Increased biosynthesis and accumulation of cholesterol in maternal plasma, but not amniotic fluid in pre-eclampsia. *Sci Rep.* 2019; 9(1):1550.
64. Shevchenko A, Simons K. Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11(8):593-8.
65. Sunshine H, Iruela-Arispe ML. Membrane lipids and cell signaling. *Curr Opin Lipidol.* 2017; 28(5):408-13.
66. Melland-Smith M, Ermini L, Chauvin S, Craig-Barnes H, Tagliaferro A, Todros T, Post M, Caniggia I. Disruption of sphingolipid metabolism augments ceramide-induced autophagy in preeclampsia. *Autophagy.* 2015; 11(4):653–69.
67. Dobierzewska A, Palominos M, Sanchez M, Dyhr M, Helgert K, Venegas-Araneda V, Tong S, Illanes SE. Impairment of Angiogenic Sphingosine Kinase-1/Sphingosine-1-Phosphate Receptors pathway in Preeclampsia. *PLoS One.* 2016; 11(6):e0157221.
68. Singh AT, Dharmarajan A, Aye IL, Keelan JA. Ceramide biosynthesis and metabolism in trophoblast syncytialization. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 362(1–2):48–59.

69. Singh AT, Dharmarajan A, Aye IL, Keelan JA. Sphingosine-sphingosine-1-phosphate pathway regulates trophoblast differentiation and syncytialization. *Reprod Biomed Online*. 2012; 24(2):224–34.
70. Mizugishi K, Li C, Olivera A, Bielawski J, Bielawska A, Deng CX, Proia RL. Maternal disturbance in activated sphingolipid metabolism causes pregnancy loss in mice. *J Clin Invest*. 2007; 117(10):2993–3006.
71. Del Gaudio I, Sasset L, Lorenzo AD, Wadsack C. Sphingolipid signature of human feto-placental vasculature in preeclampsia. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(3):1019.
72. Dantas APV, Igarashi J, Michel T. Sphingosine 1-phosphate and control of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284(6):H2045–52.
73. Kimura T, Watanabe T, Sato K, Kon J, Tomura H, Tamama K, Kuwabara A, Kanda T, Kobayashi I, Ohta H, Ui M, Okajima F. Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3. *Biochem J*. 2000; 348 Pt 1:71–6.
74. Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, Galvani S, Ahnström J, Sevvana M, Egerer-Sieber C, Muller YA, Hla T, Nielsen LB, Dahlbäck B. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(23):9613-8.
75. Argraves KM, Gazzolo PJ, Groh EM, Wilkerson BA, Matsuura BS, Twal WO, Hammad SM, Argraves WS. High density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate promotes endothelial barrier function. *J Biol Chem*. 2008; 283(36):25074-81.
76. Hemmings DG. Signal transduction underlying the vascular effects of sphingosine 1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2006; 373(1):18-29.
77. Wang X, Wang F. Vascular protection by high-density lipoprotein-associated sphingosine-1-phosphate. *J Geriatr Cardiol*. 2017; 14(11):696-702.
78. Fakhr Y, Brindley DN, Hemmings DG. Physiological and pathological functions of sphingolipids in pregnancy. *Cell Signal*. 2021; 85:110041.
79. Deevska GM, Sunkara M, Morris AJ, Nikolova-Karakashian MN. Characterization of secretory sphingomyelinase activity, lipoprotein sphingolipid content and LDL aggregation in *ldlr*^{-/-} mice fed on a high fat diet. *Biosci Rep*. 2012; 32(5):479–90.
80. Dobierzewska A, Soman S, Illanes SE, Morris AJ. Plasma cross-gestational sphingolipidomic analyses reveal potential first trimester biomarkers of preeclampsia. *PLoS One*. 2017; 12(4):e0175118.
81. Charkiewicz K, Goscik J, Blachnio-Zabielska A, Raba G, Sakowicz A, Kalinka J, Chabowski A, Laudanski P. Sphingolipids as a new factor in the pathomechanism of preeclampsia—Mass spectrometry analysis. *PLoS One*. 2017; 12(5):e0177601.

82. Tailleux A, Fruchart JC. HDL heterogeneity and atherosclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1996; 33(3):163–201.
83. Vaisar T, Pennathur S, Green PS, Gharib SA, Hoofnagle AN, Cheung MC, Byun J, Vuletic S, Kassim S, Singh P, Chea H, Knopp RH, Brunzell J, Geary R, Chait A, Zhao XQ, Elkon K, Marcovina S, Ridker P, Oram JF, Heinecke JW. Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL. *J Clin Invest.* 2007; 117(3):746–56.
84. Kontush A, Lhomme M, Chapman MJ. Unraveling the complexities of the HDL lipidome. *J Lipid Res.* 2013; 54(11):2950–63.
85. Nakaya K, Ayaori M, Ikewaki K. Role of ATP-binding cassette transporters A1 and G1 in reverse cholesterol transport and atherosclerosis. . In: Komoda T. (ed.) *The HDL Handbook: Biological Functions and Clinical Implications*, 3rd ed. Academic Press, Cambridge, United Kingdom; 2017. pp. 121-51.
86. Kontush A, Chapman MJ. Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol.* 2010; 21(4):312–8.
87. Einbinder Y, Biron-Shental T, Agassi-Zaitler M, Tzadikevitch-Geffen K, Vaya J, Khatib S, Ohana M, Benchetrit S, Zitman-Gal T. High-density lipoproteins (HDL) composition and function in preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 2018; 298(2):405-13.
88. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res.* 2006; 98(11): 1352–64.
89. Tran-Dinh A, Diallo D, Delbosc S, Varela-Perez LM, Dang QB, Lapergue B, Burillo E, Michel JB, Levoye A, Martin-Ventura JL, Meilhac O. HDL and endothelial protection. *Br J Pharmacol.* 2013; 169(3):493-511.
90. Kontush A, Chapman MJ. Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol Rev.* 2006; 58(3):342-74.
91. Kosmas CE, Martinez I, Sourlas A, Bouza KV, Campos FN, Torres V, Montan PD, Guzman E. High-density lipoprotein (HDL) functionality and its relevance to atherosclerotic cardiovascular disease. *Drugs in context.* 2018; 7:212525.
92. Vladimirov S, Gojkovic T, Zeljkovic A, Jelic-Ivanovic Z, Zeljkovic D, Antonic T, Trifunovic B, Spasojevic-Kalimanovska V. Can non-cholesterol sterols indicate the presence of specific dysregulation of cholesterol metabolism in patients with colorectal cancer?. *Biochem Pharmacol.* 2022; 196:114595.
93. Ahsan L, Ossoli AF, Freeman L, Vaisman B, Amar MJ, Shamburek RD, Remaley AT. Role of lecithin: cholesterol acyltransferase in HDL metabolism and atherosclerosis. In: Komoda T. (ed.) *The HDL Handbook: Biological Functions and Clinical Implications*, 2nd ed. Academic Press, Cambridge, United Kingdom; 2014. pp. 159-94.

94. Filippatos TD, Kei A, Elisaf MS. Anacetrapib, a new CETP inhibitor: The new tool for the management of dyslipidemias? *Diseases*. 2017; 5(4):21.
95. Roland MC, Godang K, Aukrust P, Henriksen T, Lekva T. Low CETP activity and unique composition of large VLDL and small HDL in women giving birth to small-for-gestational age infants. *Sci Rep*. 2021; 11(1):1-3.
96. Bayly GR. Lipids and disorders of lipoprotein metabolism. In: Marshall WJ, Lapsley M, Day A, Ayling R. (eds.) *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects*, 3rd ed. Elsevier, London, United Kingdom; 2014. pp. 702-36.
97. Viktorinova A, Jurkovicova I, Fabryova L, Kinova S, Koren M, Stecova A, Svitekova K. Abnormalities in the relationship of paraoxonase 1 with HDL and apolipoprotein A1 and their possible connection to HDL dysfunctionality in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018; 140:174-82.
98. Rosenblat M, Volkova N, Aviram M. Injection of paraoxonase 1 (PON1) to mice stimulates their HDL and macrophage antiatherogenicity. *Biofactors*. 2011; 37(6):462-7.
99. Ikhlef S, Berrougui H, Kamtchueng Simo O, Zerif E, Khalil A. Human paraoxonase 1 overexpression in mice stimulates HDL cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *PLoS One*. 2017; 12(3):e0173385.
100. Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL. Indices of relative weight and obesity. *Int J Epidemiol*. 2014; 43(3):655-65.
101. Katz ED, Ruoff BE. Commonly Used Formulas and Calculations. In: Roberts J, Hedges J. (eds.) *Clinical Procedures in Emergency Medicine*, 4th ed. Elsevier Mosby Publishing, Philadelphia, USA; 2004. p. 1434.
102. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972; 18(6):499-502.
103. Vladimirov S, Gojković T, Zeljković A, Jelić-Ivanović Z, Spasojević-Kalimanovska V. Determination of non-cholesterol sterols in serum and HDL fraction by LC/MS-MS: Significance of matrix-related interferences. *J Med Biochem*. 2020, 39(3):299-308.
104. Gojkovic T, Vladimirov S, Spasojevic-Kalimanovska V, Zeljkovic A, Vekic J, Arsenijevic J, Djuricic I, Sobajic S, Jelic-Ivanovic Z. Preanalytical and analytical challenges in gas chromatographic determination of cholesterol synthesis and absorption markers. *Clin Chim Acta* 2018; 478:74-81.
105. US Food and Drug Administration. *Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry*. 2018.
106. Schmidt H, Schmidt R, Geisslinger G. LC-MS/MS-analysis of sphingosine-1-phosphate and related compounds in plasma samples. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2006; 81(3-4):162-70.
107. Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*. 2005; 38(4):328-34.

108. Gosetti F, Mazzucco E, Zampieri D, Gennaro MC. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2010; 1217(25):3929-37.
109. Periat A, Kohler I, Thomas A, Nicoli R, Boccard J, Veuthey JL, Schappler J, Guillaume D. Systematic evaluation of matrix effects in hydrophilic interaction chromatography versus reversed phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2016; 1439:42-53.
110. European Medicines Agency. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study samples analysis. 2022.
111. Tsikas D. Bioanalytical method validation of endogenous substances according to guidelines by the FDA and other organizations: Basic need to specify concentration ranges. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2018; 1093-1094:80-1.
112. Augustijns P, Nelis M, Cabooter D. Strategies for the quantification of endogenously present small molecules in biological samples. *LCGC Asia Pacific*. 2019; 22(3):354-63.
113. International Conference on Harmonisation. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). 2005.
114. van de Merbel NC. Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques. *Trends Analyt Chem*. 2008; 27(10):924-33.
115. Asztalos BF, Swarbrick MM, Schaefer EJ, Dallal GE, Horvath KV, Ai M, Stanhope KL, Austrheim-Smith I, Wolfe BM, Ali M, Havel PJ. Effects of weight loss, induced by gastric bypass surgery, on HDL remodeling in obese women. *J Lipid Res*. 2010; 51(8):2405-12.
116. Richter RJ, Furlong CE. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics*. 1999; 9(6):745-53.
117. Kotur-Stevuljevic J, Spasic S, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V, Stefanovic A, Vujovic A, Memon L, Kalimanovska-Ostic D. PON1 status is influenced by oxidative stress and inflammation in coronary heart disease patients. *Clin Biochem*. 2008; 41(13):1067-73.
118. Kotur-Stevuljevic J, Spasic S, Stefanovic A, Zeljkovic A, Bogavac-Stanojevic N, Kalimanovska-Ostic D, Spasojevic-Kalimanovska V, Jelic-Ivanovic Z. Paraoxonase-1 (PON1) activity, but not PON1Q192R phenotype, is a predictor of coronary artery disease in a middle-aged Serbian population. *Clin Chem Lab Med*. 2006; 44(10):1206-13.
119. Hosmer DW, Lemeshow S. Assessing the fit of the model. *Applied logistic regression*. NY: John Wileyandsons; 2000; pp. 160–4.
120. Hasin Y, Seldin M, Lusk A. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biol*. 2017; 18(1):83.
121. Vogeser M, Seger C. A decade of HPLC–MS/MS in the routine clinical laboratory—Goals for further developments. *Clin Biochem*. 2008; 41(9):649-62.

122. Kostianen R, Kauppila TJ. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2009; 1216(4):685-99.
123. Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*. 2005; 38(4):328-34.
124. Uranbileg B, Sakai E, Kubota M, Isago H, Sumitani M, Yatomi Y, Kurano M. Development of an advanced liquid chromatography–tandem mass spectrometry measurement system for simultaneous sphingolipid analysis. *Sci Rep*. 2024; 14(1):5699.
125. Mano N, Oda Y, Yamada K, Asakawa N, Katayama K. Simultaneous quantitative determination method for sphingolipid metabolites by liquid chromatography/ion spray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*. 1997; 244(2):291–300.
126. Lan T, Huichang B, Weihua L, Xi X, Suowen X, Heqing H. Simultaneous determination of sphingosine and sphingosine 1-phosphate in biological samples by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2011; 879(7-8):520–26.
127. Cutignano A, Chiuminatto U, Petruzzello F, Vella FM, Fontana A. UPLC–MS/MS method for analysis of sphingosine 1-phosphate in biological samples. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2010; 93(1-2):25–9.
128. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(2):139-50.
129. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet*. 2005; 365(9461):785–99.
130. Poon LC, Kametas NA, Pandeva I, Valencia C, Nicolaides KH. Mean arterial pressure at 11(+0) to 13(+6) weeks in the prediction of preeclampsia. *Hypertension*. 2008; 51(4):1027–33.
131. Mayrink J, Souza RT, Feitosa FE, Rocha Filho EA, Leite DF, Vettorazzi J, Calderon IM, Costa ML, Kenny L, Baker P, Cecatti JG. Mean arterial blood pressure: potential predictive tool for preeclampsia in a cohort of healthy nulliparous pregnant women. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2019; 19(1):460.
132. van der Tuuk K, Tajik P, Koopmans CM, van den Berg PP, Mol BWJ, van Pampus MG, Groen H, HYPITAT study group. Blood pressure patterns in women with gestational hypertension or mild preeclampsia at term. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017; 210:360–5.
133. Gasse C, Boutin A, Coté M, Chaillet N, Bujold E, Demers S. First-trimester mean arterial blood pressure and the risk of preeclampsia: the great obstetrical syndromes (GOS) study. *Pregnancy Hypertens*. 2018; 12:178–82.
134. Poon LC, Syngelaki A, Akolekar R, Lai J, Nicolaides KH. Combined screening for preeclampsia and small for gestational age at 11-13 weeks. *Fetal Diagn Ther*. 2013; 33(1):16–27.
135. Tayyar A, Krithinakis K, Wright A, Wright D, Nicolaides KH. Mean arterial pressure at 12, 22, 32 and 36 weeks' gestation in screening for pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016; 47(5):573–9.

136. Wojcik-Baszko D, Charkiewicz K, Laudanski P. Role of dyslipidemia in preeclampsia – a review of lipidomic analysis of blood, placenta, syncytiotrophoblast microvesicles and umbilical cord artery from women with preeclampsia. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2018; 139:19-23.
137. Paré E, Parry S, McElrath TF, Pucci D, Newton A, Lim KH. Clinical risk factors for preeclampsia in the 21st century. *Obstet Gynecol.* 2014; 124(4):763-70.
138. Rana S, Lemoine E, Granger J, Karumanchi SA. Preeclampsia: Pathophysiology, Challenges, and Perspectives. *Circ Res.* 2019; 124(7):1094–112.
139. Lin S, Shimizu I, Suehara N, Nakayama M, Aono T. Uterine artery doppler velocimetry in relation to trophoblast migration into the myometrium of the placental bed. *Obstet Gynecol.* 1995; 85(5):760–5.
140. North RA, Perrier C, Long D, Townsend K, Kincaid-Smith P. Uterine artery doppler flow velocity waveforms in the second trimester for the prediction of preeclampsia and fetal growth retardation. *Obstet Gynecol.* 1994; 83(3):378–86.
141. Plasencia W, Maiz N, Poon L, Yu C, Nicolaides KH. Uterine artery Doppler at 11+ 0 to 13+ 6 weeks and 21+ 0 to 24+ 6 weeks in the prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008; 32(2):138-46.
142. O’Gorman N, Tampakoudis G, Wright A, Wright D, Nicolaides KH. Uterine artery pulsatility index at 12, 22, 32 and 36 weeks’ gestation in screening for pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016; 47(5):565–72.
143. Lai J, Poon LCY, Pinas A, Bakalis S, Nicolaides KH. Uterine artery doppler at 30-33 weeks’ gestation in the prediction of preeclampsia. *Fetal Diagn Ther.* 2013; 33(3):156–63.
144. Tayyar A, Garcia-Tizon Larroca S, Poon LC, Wright D, Nicolaides KH. Competing risk model in screening for preeclampsia by mean arterial pressure and uterine artery pulsatility index at 30-33 weeks’ gestation. *Fetal Diagn Ther.* 2014; 36(1):18–27.
145. Tayyar A, Guerra L, Wright A, Wright D, Nicolaides KH. Uterine artery pulsatility index in the three trimesters of pregnancy: Effects of maternal characteristics and medical history. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015; 45(6):689–97.
146. Pedroso MA, Palmer KR, Hodges RJ, Costa F da S, Rolnik DL. Uterine artery doppler in screening for preeclampsia and fetal growth restriction. *Rev Bras Ginecol e Obstet.* 2018; 40(5):287–93.
147. Teasdale S, Morton A. Changes in biochemical tests in pregnancy and their clinical significance. *Obstet Med.* 2018; 11(4):160-70.
148. Catalano PM, Tyzbit ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 165(6 Pt 1):1667-72.
149. Sibai BM, Viteri OA. Diabetic ketoacidosis in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 2014; 123(1):167-78.

150. Ryan EA, Enns L. Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988; 67(2):341-7.
151. Cheung KL, Lafayette RA. Renal physiology of pregnancy. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2013; 20(3):209-14.
152. Monget P, Oxvig C. PAPP-A and the IGF system. *Ann Endocrinol (Paris).* 2016; 77(2):90–6.
153. Sifakis S, Androutsopoulos VP, Pontikaki A, Velegrakis A, Papaioannou GI, Koukoura O, Spandidos DA, Papantoniou N. Placental expression of PAPP-A, PAPP-A-2 and PLAC-1 in pregnancies is associated with FGR. *Mol Med Rep.* 2018; 17(5):6435-40.
154. Fruscalzo A, Cividino A, Rossetti E, Maurigh A, Londero AP, Driul L. First trimester PAPP-A serum levels and long-term metabolic outcome of mothers and their offspring. *Sci Rep.* 2020; 10(1):5131.
155. Kalousova M, Muravska A, Zima T. Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) and preeclampsia. *Adv Clin Chem.* 2014; 63:169-209.
156. Deveci K, Sogut E, Evliyaoglu O, Duras N. Pregnancy-associated plasma protein-A and C-reactive protein levels in pre-eclamptic and normotensive pregnant women at third trimester. *J Obstet Gynaecol Res.* 2009; 35(1):94-8.
157. Muravská A, Germanová A, Jáchymová M, Hájek Z, Švarcová J, Zima T, Kalousová M. Association of pregnancy-associated plasma protein A polymorphism with preeclampsia—A pilot study. *Clin Biochem.* 2011; 44(17-18):1380-4.
158. Lai J, Pinas A, Poon LC, Agathokleous M, Nicolaides KH. Maternal serum placental growth factor, pregnancy-associated plasma protein-a and free β -human chorionic gonadotrophin at 30-33 weeks in the prediction of pre-eclampsia. *Fetal Diagn Ther.* 2013; 33(3):164-72.
159. Bersinger NA, Ødegård RA. Second-and third-trimester serum levels of placental proteins in preeclampsia and small-for-gestational age pregnancies. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004; 83(1):37-45.
160. D'Anna R, Baviera G, Giordano D, Russo S, Santamaria A, Granese R, Corrado F. ADAM 12 and PAPP-A at 14–17 weeks' gestation as biomarkers of pre-eclampsia. *Prenat Diagn.* 2011; 31(6):602-4.
161. Bestwick JP, George LM, Wu T, Morris JK, Wald NJ. The value of early second trimester PAPP-A and ADAM12 in screening for pre-eclampsia. *J Med Screen.* 2012; 19(1):51-4.
162. Wortelboer EJ, Koster MP, Cuckle HS, Stoutenbeek PH, Schielen PC, Visser GH. First-trimester placental protein 13 and placental growth factor: markers for identification of women destined to develop early-onset pre-eclampsia. *BJOG.* 2010; 117(11):1384-9.
163. Stamatopoulou A, Cowans NJ, Matwejew E, von Kaisenberg C, Spencer K. Placental Protein-13 and pregnancy-associated plasma Protein-A as first trimester screening markers for hypertensive disorders and small for gestational age outcomes. *Hypertens Pregnancy.* 2011; 30(4):384-95.

164. Ranta JK, Raatikainen K, Romppanen J, Pulkki K, Heinonen S. Decreased PAPP-A is associated with preeclampsia, premature delivery and small for gestational age infants but not with placental abruption. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011; 157(1):48-52.
165. Di Lorenzo GI, Ceccarello MA, Cecotti V, Ronfani L, Monasta L, Brumatti LV, Montico M, D'Ottavio G. First trimester maternal serum PIGF, free β -hCG, PAPP-A, PP-13, uterine artery Doppler and maternal history for the prediction of preeclampsia. *Placenta.* 2012; 33(6):495-501.
166. Mikat B, Zeller A, Scherag A, Drommelschmidt K, Kimmig R, Schmidt M. β hCG and PAPP-A in first trimester: predictive factors for preeclampsia?. *Hypertens Pregnancy.* 2012; 31(2):261-7.
167. Chau K, Hennessy A, Makris A. Placental growth factor and pre-eclampsia. *J Hum Hypertens.* 2017; 31(12):782-6.
168. Saffer C, Olson G, Boggess KA, Beyerlein R, Eubank C, Sibai BM. Determination of placental growth factor (PIGF) levels in healthy pregnant women without signs or symptoms of preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2013; 3(2):124–32.
169. Levine RJ, Maynard SE, Qian C, Lim KH, England LJ, Yu KF, Schisterman EF, Thadhani R, Sachs BP, Epstein FH, Sibai BM. Circulating angiogenic factors and the risk of preeclampsia. *N Engl J Med.* 2004; 350(7):672-83.
170. Kleinrouweler CE, Wiegerinck MM, Ris-Stalpers C, Bossuyt PM, van der Post JA, von Dadelszen P, Mol BW, Pajkrt E, EBM Connect Collaboration. Accuracy of circulating placental growth factor, vascular endothelial growth factor, soluble fms-like tyrosine kinase 1 and soluble endoglin in the prediction of pre-eclampsia: a systematic review and meta-analysis. *BJOG.* 2012; 119(7):778-87.
171. Wild R, Feingold KR. Effect of Pregnancy on Lipid Metabolism and Lipoprotein Levels. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Kapoor N, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère, Levy M, McGee EA, McLachlan R, New M, Purnell J, Sahay R, Shah AS, Singer F, Sperling MA, Sratakis CA, Trencze DL, Wilson DP. (eds.) *Endotext* [Internet]. MDText, Inc., South Dartmouth, Massachusetts, USA; 2023.
172. Doktorska disertacija: "Pokazatelji oksidativnog stresa, lipidni profil i status enzima paraoksonaza 1 tokom trudnoće bez komplikacija i nakon porođaja", Daniela Č. Ardalić, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd, 2014.
173. Belo L, Caslake M, Gaffney D, Santos-Silva A, Pereira-Leite L, Quintanilha A, Rebelo I. Changes in LDL size and HDL concentration in normal and preeclamptic pregnancies. *Atherosclerosis.* 2002; 162(2):425-32.
174. Ardalić D, Stefanović A, Kotur-Stevuljević J, Ninić A, Spasić S, Spasojević-Kalimanovska V, Jelić-Ivanović Z, Miković Ž. Lipid indexes and parameters of lipid peroxidation during physiological pregnancy. *Journal of laboratory medicine.* 2019; 43(2):93-9.
175. Bodnar LM, Ness RB, Markovic N, Roberts JM. The risk of preeclampsia rises with increasing prepregnancy body mass index. *Ann Epidemiol.* 2005; 15(7):475-82.

176. Wiznitzer A, Mayer A, Novack V, Sheiner E, Gilutz H, Malhotra A, Novack L. Association of lipid levels during gestation with preeclampsia and gestational diabetes mellitus: a population-based study. *Am J Obstet Gynecol.* 2009; 201(5):482.e1-8.
177. Ardalić D, Stefanović A, Banjac G, Cabunac P, Miljković M, Mandić-Marković V, Stanimirović S, Pažin BD, Spasić S, Spasojević-Kalimanovska V, Karadžov-Orlić N. Lipid profile and lipid oxidative modification parameters in the first trimester of high-risk pregnancies-possibilities for preeclampsia prediction. *Clin Biochem.* 2020; 81:34-40.
178. Yang Y, Wang Y, Lv Y, Ding H. Dissecting the roles of lipids in preeclampsia. *Metabolites.* 2022; 12(7):590.
179. Baardman ME, Kerstjens-Frederikse WS, Berger RM, Bakker MK, Hofstra RM, Plösch T. The role of maternal-fetal cholesterol transport in early fetal life: current insights. *Biol Reprod.* 2013; 88(1):24.
180. Ausman J, Abbade J, Ermini L, Farrell A, Tagliaferro A, Post M, Caniggia I. Ceramide-induced BOK promotes mitochondrial fission in preeclampsia. *Cell Death Dis.* 2018; 9(3):298.
181. Walsh SW, Reep DT, Alam SK, Washington SL, Al Dulaimi M, Lee SM, Springel EH, Strauss JF, Stephenson DJ, Chalfant CE. Placental production of eicosanoids and sphingolipids in women who developed preeclampsia on low-dose aspirin. *Reprod Sci.* 2020; 27(12):2158-69.
182. Picot M, Croyal M, Duparc T, Combes G, Vayssière C, Perret B, Hamdi S, Martinez L, Genoux A. Preeclampsia is associated with changes in the composition and dysfunction of high-density lipoproteins. *Arch Cardiovasc Dis Supplements.* 2019; 11(3):e354.
183. Wilkerson BA, Grass GD, Wing SB, Argraves WS, Argraves KM. Sphingosine 1-phosphate (S1P) carrier-dependent regulation of endothelial barrier: high density lipoprotein (HDL)-S1P prolongs endothelial barrier enhancement as compared with albumin-S1P via effects on levels, trafficking, and signaling of S1P1. *J Biol Chem.* 2012; 287(53):44645-53.
184. Patanapirunhakit P, Karlsson H, Mulder M, Ljunggren S, Graham D, Freeman D. Sphingolipids in HDL—Potential markers for adaptation to pregnancy?. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2021; 1866(8):158955.
185. Levkau B. HDL-S1P: cardiovascular functions, disease-associated alterations, and therapeutic applications. *Front Pharmacol.* 2015; 6:243.
186. Diarte-Añazco EM, Méndez-Lara KA, Pérez A, Alonso N, Blanco-Vaca F, Julve J. Novel insights into the role of HDL-associated sphingosine-1-phosphate in cardiometabolic diseases. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(24):6273.
187. Amraoui F, Lahsinoui HH, Spijkers LJ, Vogt L, Peters SL, Wijesinghe DS, Warncke UO, Chalfant CE, Ris-Stalpers C, van den Born BJ, Afink GB. Plasma ceramide is increased and associated with proteinuria in women with pre-eclampsia and HELLP syndrome. *Pregnancy Hypertens.* 2020; 19:100-5.

188. Korkes HA, Sass N, Moron AF, Câmara NO, Bonetti T, Cerdeira AS, Da Silva ID, De Oliveira L. Lipidomic assessment of plasma and placenta of women with early-onset preeclampsia. *PLoS One*. 2014; 9(10):e110747.
189. Woollett LA, Catov JM, Jones HN. Roles of maternal HDL during pregnancy. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2022; 1867(3):159106.
190. Melchior JT, Swertfeger DK, Morris J, Street SE, Warshak CR, Welge JA, Remaley AT, Catov JM, Davidson WS, Woollett LA. Pregnancy is accompanied by larger high density lipoprotein particles and compositionally distinct subspecies. *J Lipid Res*. 2021; 62:100107.
191. Niesor EJ, Chaput E, Staempfli A, Blum D, Derks M, Kallend D. Effect of dalcetrapib, a CETP modulator, on non-cholesterol sterol markers of cholesterol homeostasis in healthy subjects. *Atherosclerosis*. 2011; 219(2):761-7.
192. Iqbal J, Boutjdir M, Rudel LL, Hussain MM. Intestine-specific MTP and global ACAT2 deficiency lowers acute cholesterol absorption with chylomicrons and HDLs. *J Lipid Res*. 2014; 55(11):2261-75.
193. Niesor EJ. Will lipidation of ApoA1 through interaction with ABCA1 at the intestinal level affect the protective functions of HDL?. *Biology (Basel)*. 2015; 4(1):17-38.
194. Asztalos BF, Schaefer EJ, Horvath KV, Yamashita S, Miller M, Franceschini G, Calabresi L. Role of LCAT in HDL remodeling: investigation of LCAT deficiency states. *J Lipid Res*. 2007; 48(3):592-9.
195. Melhem H, Kallol S, Huang X, Lüthi M, Ontsouka CE, Keogh A, Stroka D, Thormann W, Schneider H, Albrecht C. Placental secretion of apolipoprotein A1 and E: the anti-atherogenic impact of the placenta. *Sci Rep*. 2019; 9(1):6225.
196. Uzun H, Benian A, Madazlı R, Topçuoğlu MA, Aydın S, Albayrak M. Circulating oxidized low-density lipoprotein and paraoxonase activity in preeclampsia. *Gynecol Obstet Invest*. 2005; 60(4):195-200.
197. Demir BU, Demir S, Atamer Y, Guven S, Atamer A, Kocyigit Y, Hekimoglu A, Toprak G. Serum levels of lipids, lipoproteins and paraoxonase activity in pre-eclampsia. *J Int Med Res*. 2011; 39(4):1427-31.
198. Genc H, Uzun H, Benian A, Simsek G, Gelisgen R, Madazli R, Güralp O. Evaluation of oxidative stress markers in first trimester for assessment of preeclampsia risk. *Arch Gynecol Obstet*. 2011; 284(6):1367-73.
199. Baker AM, Klein RL, Haeri S, Moss KL, Boggess KA. Association of midgestational paraoxonase 1 activity with pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Perinatol*. 2010; 27(3):205-10.
200. Yaghmaei M, Hashemi M, Azarian A, Moazeni-Roodi A, Mokhtari M, Naghavai A, Salimi S, Mohammadi M, Taheri M, Ghavami S. Association of L55M and Q192R polymorphisms of paraoxonase-1 gene with preeclampsia. *Arch Med Res*. 2011; 42(4):324-8.

201. Quehenberger O, Armando AM, Brown AH, Milne SB, Myers DS, Merrill AH, Bandyopadhyay S, Jones KN, Kelly S, Shaner RL, Sullards CM. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res.* 2010; 51(11):3299-305.
202. Hammad SM, Al Gadban MM, Semler AJ, Klein RL. Sphingosine 1-phosphate distribution in human plasma: associations with lipid profiles. *J Lipids.* 2012; 2012:180705.
203. Hammad SM, Pierce JS, Soodavar F, Smith KJ, Al Gadban MM, Rembiesa B, Klein RL, Hannun YA, Bielawski J, Bielawska A. Blood sphingolipidomics in healthy humans: impact of sample collection methodology. *J Lipid Res.* 2010; 51(10):3074-87.
204. Borodzicz S, Czarzasta K, Kuch M, Cudnoch-Jedrzejewska A. Sphingolipids in cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Lipids Health Dis.* 2015; 14:55.
205. Sasset L, Zhang Y, Dunn TM, Di Lorenzo A. Sphingolipid de novo biosynthesis: a rheostat of cardiovascular homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 2016; 27(11):807-19.
206. Jiang XC, Paultre F, Pearson TA, Reed RG, Francis CK, Lin M, Berglund L, Tall AR. Plasma sphingomyelin level as a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20(12):2614-8.
207. Kang SC, Kim BR, Lee SY, Park TS. Sphingolipid metabolism and obesity-induced inflammation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013; 4:67.
208. Iqbal J, Walsh MT, Hammad SM, Hussain MM. Sphingolipids and lipoproteins in health and metabolic disorders. *Trends Endocrinol Metab.* 2017; 28(7):506-18.
209. Kasumov T, Li L, Li M, Gulshan K, Kirwan JP, Liu X, Previs S, Willard B, Smith JD, McCullough A. Ceramide as a mediator of non-alcoholic fatty liver disease and associated atherosclerosis. *PloS one.* 2015; 10(5):e0126910.
210. Zhang T, Chen J, Tang X, Luo Q, Xu D, Yu B. Interaction between adipocytes and high-density lipoprotein: new insights into the mechanism of obesity-induced dyslipidemia and atherosclerosis. *Lipids Health Dis.* 2019; 18(1):223.
211. Alahakoon TI, Medbury HJ, Williams H, Lee VW. Lipid profiling in maternal and fetal circulations in preeclampsia and fetal growth restriction-a prospective case control observational study. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2020; 20(1):61.
212. Serrano NC, Guio-Mahecha E, Quintero-Lesmes DC, Becerra-Bayona S, Paez MC, Beltran M, Herrera VM, Leon LJ, Williams D, Casas JP. Lipid profile, plasma apolipoproteins, and pre-eclampsia risk in the GenPE case-control study. *Atherosclerosis.* 2018; 276:189-94.

BIOGRAFIJA

Tamara Antonić Krejović je rođena 6.6.1993. u Palama, gdje je završila osnovnu i srednju školu (gimnaziju) kao nosilac Vukove diplome. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, smjer magistar farmacije – medicinski biohemičar, upisala je 2012, a završila 2017. godine sa prosječnom ocjenom 9,85. Tokom studija bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, Fonda za mlade talente Republike Srbije – Dositeja, Fonda “Dr Milan Jelić” i Zadužbine Dragoljub Marinković. Dobitnik je godišnje nagrade najboljim studentima Farmaceutskog fakulteta u toku školske 2012/2013, 2013/2014, 2015/2016. i 2016/2017. godine. Nakon završetka studija dobila je priznanje “Profesor Ivan Berkeš” za vrhunski doprinos u oblastima farmacije i medicinske biohemije i Povelju za izuzetan uspeh tokom studiranja, kao najbolji student generacije Farmaceutskog fakulteta koji je diplomirao u školskoj 2016/2017. godini. Po završetku fakulteta, završila je pripravnički staž i položila stručni ispit za magistre farmacije – medicinske biohemičare u Ministarstvu zdravlja Republike Srbije.

Doktorske akademske studije – modul Medicinska biohemija upisala je školske 2017/2018. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu i uspješno je položila sve predmete predviđene planom i programom doktorskih akademskih studija sa prosječnom ocjenom 10,00. Specijalističke akademske studije, studijski program Biohemijska dijagnostika, je upisala 2019, a završila 2021. godine sa prosječnom ocjenom 10,00.

Od novembra 2017. do maja 2023. godine je bila zaposlena na Katedri za medicinsku biohemiju Farmaceutskog fakulteta, prvo kao saradnik u izvođenju praktične nastave, a potom i kao asistent za užu naučnu oblast Medicinska biohemija i istraživač pripravnik. Od maja 2023. godine je zaposlena u *PPD by Thermo Fisher Scientific Inc.* Srbija d.o.o.

Kao autor i koautor je objavila 15 naučnih radova u međunarodnim časopisima i četiri rada u domaćim časopisima. Učestvovala je sa većim brojem saopštenja na nacionalnim i međunarodnim skupovima. Rezultate doktorske disertacije je publikovala u tri rada u međunarodnim časopisima kategorije M21.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Тамара Антонић Крејовић

Број индекса 10/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Маркери синтезе и апсорпције холестерола и сфинголипидни профил

у прееклампсији

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Тамара Антонић Крејовић

Број индекса 10/2017

Студијски програм Фармацеутске науке, модул - Медицинска биохемија

Наслов рада Маркери синтезе и апсорпције холестерола и сфинголипидни профил у прееклампсији

Ментор Проф. др Александра Стефановић

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Маркери синтезе и апсорпције холестерола и сфинголипидни профил
у прееклампсији

која је моје ауторско дело.

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

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

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

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

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

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

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

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

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