

ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMANE



INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ

„NICOLAE SIMIONESCU”

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE ”CAROL DAVILA” BUCUREȘTI

REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT ÎN COTUTELĂ
ANALIZA PROTEOMICĂ A EXOZOMILOR SERICI IZOLAȚI DIN
SÂNGELE GRAVIDELOR DIAGNOSTICATE CU DIABET
GESTAȚIONAL

CONDUCĂTORI DE DOCTORAT

Conducător 1: Dr. FELICIA ANTOHE

Conducător 2: Prof. Univ. Dr. CONSTANTIN IONESCU-TÎRGOVIȘTE

STUDENT -DOCTORAND

Drd. BERNEA-DAVID (BERNEA) ELENA-GEORGIANA

București 2024

CUPRINS

INTRODUCERE	6
-------------------	---

PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTINȚELOR.....	8
--	----------

1. ASPECTE GENERALE CU PRIVIRE LA DIABETUL GESTAȚIONAL

1.1 Definiția diabetului gestațional.....	8
1.2 Diagnosticul și screening-ul diabetului gestațional.....	8
1.3 Factorii de risc pentru diabetul gestațional	8
1.3.1 Factorii genetici de risc pentru dezvoltarea diabetului gestațional	8
1.3.2 Factorii nongenetici de risc pentru dezvoltarea diabetului gestațional	8
1.4 Fiziopatologia diabetului gestațional.....	8
1.4.1 Disfuncția beta pancreatică.....	9
1.4.2 Insulinorezistența cronică.....	9
1.4.3 Rolul leptinei în fiziopatologia diabetului gestațional.....	9
1.4.4 Rolul adiponectinei în fiziopatologia diabetului gestațional.....	9
1.4.5 Rolul placentei în fiziopatologia diabetului gestațional.....	9
1.5 Diabetul gestațional și complicațiile materno-fetale.....	10
1.5.1 Diabetul gestațional și complicațiile materne pe termen scurt.....	10
1.5.2 Diabetul gestațional și complicațiile materne pe termen lung.....	10
1.5.3 Diabetul gestațional și complicațiile fetale pe termen scurt.....	10
1.5.4 Diabetul gestațional și complicațiile fetale pe termen lung	10
1.6 Monitorizarea sarcinii complicată cu diabet gestațional	10
1.7 Tratatamentul diabetului gestațional	10
1.7.1 Terapia nutrițională a diabetului gestațional.....	10
1.7.2 Terapia farmacologică a diabetului gestațional.....	11
1.7.2.1 Insulinoterapia.....	11
1.7.2.2 Terapia farmacologică orală.....	11
1.8 Pospartum follow-up.....	11

DIABETUL GESTAȚIONAL – STARE DE INFLAMAȚIE CRONICĂ, COMPLICAȚII METABOLICE

2.1 Diabetul gestațional- stare de inflamație cronică.....	11
--	----

2.2 Diabetul gestațional și sistemul complement.....	11
2.3 Diabetul gestațional- stare protrombotică.....	12
2.4 Diabetul gestațional și metabolismul lipidic.....	12

3. EXOZOMII- BIOGENEZA, CARACTERIZARE, METODE DE IZOLARE

3.1 Biogeneza exozomilor.....	12
3.2 Caracterizarea exozomilor.....	12
3.3 Metode de izolare a exozomilor.....	12
3.3.1 Diferite metode de izolare a exozomilor.....	13
3.3.2 Metode de izolare a exozomilor cu ajutorul kiturilor.....	13
3.4 Metode de caracterizare a exozomilor.....	13
3.5 Exozomii și diabetul gestațional.....	13

4. ANALIZA PROTEOMICĂ BAZATĂ PE SPECTROMETRIE DE MASĂ

4.1 Importanța metodelor OMICE de analiză cantitativă si calitativă.....	13
4.2 Spectrometria de masă.....	14
4.2.1 Principiul metodei.....	14
4.2.2 Performanțele metodei.....	14
4.2.3 Analiza proteomică bazată pe spectrometria de masă.....	14
4.2.4 Analiza bioinformatică.....	14
4.2.5 Utilizarea metodei în cercetarea fundamentală și în clinică.....	14

5. CONCLUZII.....

PARTEA A II-A - CONTRIBUȚII ORIGINALE.....

MOTIVAREA ALEGERII TEMEI ȘI OBIECTIVELE TEZEI.....

1. ANALIZA BIOCLINICĂ A GRAVIDELOR CU DIABET GESTAȚIONAL ȘI COPII MACROSOMI

1.1 Introducere și obiective parțiale.....	77
--	----

1.2 Materiale și metode.....	18
1.2.1 Obținerea loturilor de paciente gravide.....	18
1.2.2 Măsurarea parametrilor plasmatici și antropometrici.....	18
1.2.3 Analiza parametrilor antropometrici și paraclinici.....	18
1.2.4 Analiza statistică.....	21
1.3 Rezultate.....	21
1.3.1 Evaluarea disfuncției beta celulare în diabetul gestațional.....	23
1.3.2 Evaluarea rezistenței la insulină în diabetul gestațional.....	23
1.3.3 Corelații semnificative statistic între factorii antropometrici și clinici în diabetul gestațional.....	24
1.3.4 Gravidele cu copii macrosomi.....	24
1.4 Discuții.....	24
1.5 Concluzii parțiale.....	24
 2. DETERMINAREA CONȚINUTULUI PROTEIC AL EXOZOMILOR DIN SÂNGELE GRAVIDELOR CU DIABET GESTAȚIONAL. CĂI DE SEMNALIZARE IMPLICATE ÎN PATOLOGIA DIABETICĂ	
2.1 Introducere și obiective.....	25
2.2 Materiale și metode.....	25
2.2.1 Obținerea loturilor de gravide.....	25
2.2.2 Măsurarea parametrilor plasmatici.....	25
2.2.3 Izolarea, concentrarea și caracterizarea exozomilor.....	26
2.2.3.1 Prepararea probelor și nano-cromatografia lichidă- Analiza prin spectrometrie de masă.....	26
2.2.3.2 Analiza proteomică prin spectrometrie de masă.....	26
2.2.3.3 Caracterizarea fracțiilor exozomale serice.....	26
2.2.3.4 Evaluarea expresiei proteice prin tehnica spectrometrie de masă.....	26
2.2.3.5 Studii alternative de validare.....	26
2.3 Analiza statistică.....	27
2.4 Rezultate.....	27
2.4.1 Analiza parametrilor bioclinici ai cohorței de studiu.....	27
2.4.2 Analiza proteomică a exozomilor izolați din serul cohorței de studiu.....	27
2.4.2.1 Abundența proteinelor implicate în sistemul complement.....	27
2.4.2.2 Abundența proteinelor implicate în cascada de coagulare.....	28
2.4.2.3 Abundența proteinelor implicate în degranularea trombocitelor.....	28

2.4.2.4 Diabetul gestațional reglează proteinele implicate în sindromul posttrombotic și metabolismul colesterolului.....	28
2.5 Discuții.....	28
2.6 Beneficiile utilizării kiturilor pentru izolarea exozomilor.....	29
2.7 Concluzii parțiale.....	29
3. ANALIZA PROTEOMICĂ A EXOZOMILOR DIN DIABETUL GESTAȚIONAL RELEVĂ DEREGLĂRI ALE SISTEMELOR DE COAGULARE, COMPLEMENT ȘI METABOLISM LIPIDIC	
3.1 Introducere și obiective.....	29
3.2 Materiale și metode.....	29
3.3 Analiza statistică.....	30
3.4 Rezultate.....	30
3.4.1 Analiza sistemului de coagulare.....	30
3.4.2 Analiza sistemului complement.....	30
3.4.3 Analiza metabolismului lipidic.....	30
3.5 Discuții.....	32
3.6 Concluzii parțiale.....	32
4. CONCLUZII	34
BIBLIOGRAFIE	35

INTRODUCERE

În ultimele decenii s-a evidențiat la nivel mondial o creștere a prevalenței obezității în rândul femeilor aflate la vârsta reproductivă. Consecutiv, cazurile de diabet gestațional (GDM) s-au exacerbat.

De-a lungul timpului s-a încercat identificarea de biomarkeri de diagnostic precoce dar costul acestora și metoda de implementare dificilă au redus utilitatea lor practică. Sunt multe date lipsa cu privire la efectele exozomilor la nivel matern și fetal, dar din cercetările efectuate până în prezent se sugerează că exosomii pot modula homeostazia metabolismului glucidic.

Teza de față a avut ca obiectiv principal analiza exozomilor serici din GDM. Ipoteza de lucru a fost susținută de faptul că GDM induce modificări semnificative structurale și funcționale în organismul gravidei, afectând diferite sisteme: metabolismul glucidic, lipidic, proteidic, sistemul de coagulare și inflamator.

Teza este formată din două părți, respectiv prima parte care abordează ***Stadiul actual al cunoștințelor*** și partea a doua care conține ***Contribuții originale***.

Cuvinte cheie: *diabet gestational, diabet, exozomi, proteomica, sistemul complement, sistemul de coagulare, sistemul inflamator*

PARTEA I

STADIUL ACTUAL

AL

CUNOSTINTELOR

PARTEA I - STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTINTELOR

1. ASPECTE GENERALE CU PRIVIRE LA DIABETUL GESTAȚIONAL

1.1 Definiția diabetului gestațional

Diabetul gestațional este definit ca alterarea metabolismului glucidic care apare sau este evidențiată după săptămâna 24 de gestație [15, 16].

1.2. Diagnosticul și screening-ul diabetului gestațional

Testul de toleranță la glucoză orală (TTGO) cu 75 g glucoză anhidră este utilizat pentru diagnosticul GDM. Totodată este folosit ca metodă de diagnostic al diabetului zaharat și a toleranței alterate la glucoză pentru persoanele adulte [17-20]. Criteriile de diagnostic al GDM sunt încă un subiect de dezbateri.

1.3 Factorii de risc pentru diabetul gestațional

1.3.1 Factorii genetici de risc pentru dezvoltarea diabetului gestațional

GDM are o agregare familială determinată de factori genetici de susceptibilitate și factori de mediu predispozanți [22,23]. În studii efectuate pe populația caucaziană și asiatică care au evaluat asocieri de gene candidate, s-a constatat o legătură între GDM și 14 variante genetice descoperite în studiile GWAs ca fiind asociate cu DZ tip 2.

1.3.2. Factorii nongenetici de risc pentru diabetul gestațional

Varsta maternelă înaintată, ereditatea diabetică, istoricul de macrosomie, supraponderia/ obezitatea anterioară sarcinii, câștigul ponderal excesiv, sunt printre factorii de risc nongenetici ai diabetului gestațional.

1.4 Fiziopatologia diabetului gestațional

În cursul sarcinii, solicitarea insulinosecreției crește progresiv iar incapacitatea celulelor beta-pancreatice de a se adapta solicitărilor crescute determină diabetul gestațional.

1.4.1 Disfuncția celulelor β pancreatice

GDM este rezultatul disfuncției celulelor β pancreatice pe un fond de insulinorezistență (IR) în sarcină. În sarcină apare o creștere a secreției de insulină în paralel cu creșterea IR [55]. În GDM celule beta pancreatice nu pot compensa cererile de insulină din sarcină și în condiții de insulinosensibilitate scăzută, apare hiperglicemia.

1.4.2 Insulinorezistența cronică

Insulinorezistența apare atunci când celulele nu mai răspund adecvat la insulină. În cursul sarcinii are loc o creștere fiziologică a insulinorezistenței periferice la insulină. Această creștere este mediată de o serie de factori precum creșterea nivelurilor de: hPL (hormon lactogen placentar), cortizol, prolactină, estrogen și progesteron.

1.4.3 Rolul leptinei în fiziopatologia diabetului gestațional

Leptina este hormonul sațietății și este secretat de adipocite ca răspuns la nivelurile adecvate de combustibil energetic. Hiperleptinemia favorizează transferul transplacentar de aminoacizi, contribuind la macrosomia fetală [66]. La nivel periferic crește oxidarea acizilor grași și insulinosensibilitatea și scade secreția insulinei.

1.4.4 Rolul adiponectinei în fiziopatologia diabetului gestațional

Adiponectina, similar leptinei, este un hormon secretat de adipocite. GDM este asociat cu nivele scăzute de adiponectină [67]. Ea intensifică semnalizarea insulinică, prin activarea AMPK din celulele insulinosensibile, favorizând acțiunea IRS1, oxidarea acizilor grași și inhibarea gluconeogenezei.

1.4.5 Rolul placentei în fiziopatologia diabetului gestațional

Placenta contribuie la insulinorezistență prin secreția de hormoni și citokine. Are rol de barieră între mediul matern și fetal și este expusă la hiperglicemie și consecințele complicațiilor GDM. Acest lucru poate influența transportul transplacentar de glucoză, aminoacizi și lipide.

1.5 Diabetul gestațional și complicațiile materno-fetale

Diabetul gestațional se asociază cu consecințe materne și fetale imediate sau la distanță post-partum.

1.5.1 Complicații materne pe termen scurt ale diabetului gestațional

Dintre complicațiile materne imediate ale GDM menționăm riscul crescut de avort, hipertensiunea arterială, preeclampsia, hidramniosul, ruptura prematură de membrane, nașterea prematură.

1.5.2 Complicații materne pe termen lung în diabetul gestațional

Studiile au arătat că GDM crește riscul matern de a dezvolta ulterior diabet zaharat tip 2, boli cardiovasculare, sindrom metabolic.

1.5.3 Complicațiile fetale pe termen scurt în diabetul gestațional

Un control deficitar al glicemiei materne în sarcina complicată cu GDM poate determina o evoluție nefavorabilă a dezvoltării fetale. Mentionam macrosomia, hiperbilirubinemia, distocia de umar, policitemia, hipocalcemia neonatal etc.

1.5.4 Complicațiile fetale pe termen lung în diabetul gestațional

Nou-născutul cu mama diagnosticată cu GDM are un risc mai mare de a dezvolta hipertensiune arterială și tulburări metabolice precum obezitate, diabet zaharat, dislipidemie [90].

1.6 Monitorizarea sarcinii complicată cu diabet gestațional

Gravidele diagnosticate cu GDM necesită o monitorizare pluridisciplinară de către medicul obstetrician și diabetolog. Această monitorizare presupune un control metabolic, educație specifică cu privire la noțiunile legate de diabetul gestațional, dietoterapie, tratament și monitorizare fetală.

1.7 Tratamentul diabetului gestațional

1.7.1 Terapia nutrițională a diabetului gestațional

Terapia medical nutrițională reprezintă cea mai importantă parte a tratamentului GDM. În 75-80 % din cazurile de GDM terapia nutrițională și creșterea activității fizice este eficientă pentru limitarea creșterii ponderale în cursul sarcinii [96, 97].

1.7.2 Terapia farmacologică a diabetului gestațional

Dacă controlul glicemic matern nu se poate fi obținut prin terapie medicală nutrițională, este necesară introducerea terapiei farmacologice. Momentul inițierii terapiei farmacologice propus de IDF este atunci când glicemia a jeun depășește în mod repetat > 100 mg/dl, glicemia postprandială la 1 h > 140 mg/dl, glicemia postprandială la 2h > 120 mg/dl.

1.7.2.1 Insulinoterapia

Dacă optimizarea stilului de viață nu menține controlul glicemic, linia următoare de tratament pentru GDM o reprezintă insulinoterapia. Regimul de insulinoterapie trebuie adaptat continuu pentru obținerea controlului glicemic țintă.

1.8. Pospartum *follow-up*

În majoritatea cazurilor de GDM, după naștere tulburările glucidice se remit [113]. Screening-ul pentru diabet zaharat după sarcină rămâne deosebit de important, deoarece unele cazuri de GDM pot fi de fapt DZ tip 2 preexistent sarcinii, dar nediagnosticat.

2. DIABETUL GESTAȚIONAL – STARE DE INFLEMAȚIE CRONICĂ, COMPLICAȚII METABOLICE

2.1 Diabetul gestațional- stare de inflamație cronică

Sarcina este caracterizată printr-o stare de inflamație cu grad redus și printr-o reacție imună care pot conduce la apariția GDM [117,118]. Citokinele pro-inflamatorii afectează atât semnalizarea insulinei cât și eliberarea de insulină din celulele β .

2.2 Diabetul gestațional și sistemul complement

Sistemul complement joacă un rol important în tulburările metabolice și este esențial pentru răspunsul imun adaptativ, procesele fiziologice din sarcină (homeostazia celulelor gazdă și îndepărtarea celulelor apoptotice). În sarcinile complicate cu GDM, cascada sistemului complement poate fi dereglată. Hiperglicemia determină activarea complementului și leziuni tisulare directe.

2.3 Diabetul gestațional se asociază cu evenimente (pro)-trombotice

Hiperglicemia afectează negativ funcția de coagulare și metabolismul lipidic [183, 184]. GDM este o stare hipercoagulabilă asociată cu inflamație cronică și cu nivel ridicat a evenimentelor trombotice.

2.4 Diabetul gestațional și metabolismul lipidic

GDM este asociat cu modificări ale profilului lipidic în sarcină. În condiții de hiperglicemie, se stimulează lipogeneza placentară care duce la sinteza grăsimilor. Metabolismul dezechilibrat al grăsimilor de la nivel placentar și modificările fetale induse pot provoca complicații metabolice la făt precum; macrosomia, obezitatea și diabetul zaharat de tip 2.

3. EXOZOMII: BIOGENEZA, CARACTERIZARE, METODE DE IZOLARE

3.1. Biogeneza exozomilor

Exozomii sunt microvezicule membranare endozomale descoperiți în 1983 de Harding și Pan în spațiul extracelular fiind considerați inițial reziduuri celulare [125,126,127].

3.2. Caracterizarea exozomilor

Exozomii sunt nano-vezicule, cu diametru de 30-100 nm, care prezintă o membrană bistratificată lipidică, bogată în colesterol, sfingomielină, ceramide și *lipid rafts*. Acesta reflectă statusul fiziologic și funcția celulei de origine și secreția conținutului lor este afectat de mediul extracelular [156]. S-au identificat o gamă largă de elemente constitutive [157, 158]: 4400 proteine, 194 lipide, 1639 mRNAs, 764 miRNA.

3.3 Metode de izolare ale exozomilor

Majoritatea tehnologiilor actuale de izolare au puritate exozomală este scăzută. O metodă standardizată și reproductibilă de izolare a acestora ar reduce incertitudinile și consecvențele în cercetarea exozomală și totodată ar ajuta la evaluarea funcțiilor lor biologice, stabilirea de noi biomarkeri de diagnostic cu aplicabilitate în conduita terapeutică.

3.3.1 Izolarea exozomilor prin diferite metode

În funcție de obiectivul propus sunt selectate diferite metode de izolare, printre care *ultracentrifugarea, tehnicile de izolare bazate pe dimensiune, precipitarea polimerilor, tehnicile de captare a imunoafinității.*

3.3.2 Izolarea exosomilor cu ajutorul kiturilor

Este o metodă inovatoare de izolare rapidă și reproductibilă cu un randament și puritate ridicată. Kitul permite izolarea exozomilor și a altor vezicule extracelulare printr-un protocol simplu, care nu necesită etape de ultracentrifugare.

3.4 Metode de caracterizare a exozomilor

Caracterizarea exozomilor presupune analiza proprietăților fizico-chimice precum dimensiunea, forma, densitatea și porozitatea, necesară pentru a determina interacțiunile lor biologice.

3.5 Exozomii și diabetul gestațional

Studiul exozomilor a arătat potențialul lor în identificarea de mecanisme moleculare implicate în comunicarea intercelulară, homeostazie și diferite patologii, inclusiv diabetul gestational.

4. Analiza proteomică bazată pe spectrometrie de masă

Proteomica este utilizată tot mai des în cercetarea bio-medicală și de asemenea în stabilirea diagnosticului clinic prin utilizarea markerilor cu relevanță clinică. Utilitatea practică rezidă din capacitatea sa de a analiza, caracteriza și clasifica proteinele dintr-un proteom.

4.1 Importanța metodelor OMICE de analiză calitativă și cantitativă

Tehnologiile omice oferă o metodă de screening ale bolilor umane în mod eficient și rapid. Există multe metode OMICE de analiză cantitativă și calitativă: genomica, proteomica, metabolomica, transcriptomica, lipidomica.

4.2 Spectrometria de masă

Spectrometria de masă este o metodă analitică de măsurare a raportului masa/concentrație (m/z) a uneia sau a mai multor molecule dintr-o probă, de identificare a componentelor necunoscute prin determinarea greutății moleculare și totodată de cuantificare și determinare a proprietăților structurale și chimice a moleculelor.

4.2.1 Principiul metodei

Fiecare spectrometru de masă conține o *sursă de ionizare*, *analizor de masă* și *sistem de detectare a ionilor*.

4.2.2 Performanțele metodei

Performanța unui spectrometru de masă este definită de: *rezoluția sa de masă* și *sensibilitatea* exprimată prin : **raportul semnal-zgomot, limita de detecție (LOD), limita de cuantificare (LOQ).**

4.2.3 Analiza proteomică bazată pe spectrometrie de masă

Spectrometria de masă are aplicabilitate în multe domenii; biologie, chimie, fizică și medicină clinică. Această tehnică este indispensabilă pentru caracterizarea și secvențierea diferitelor proteine.

4.2.4 Analiza bioinformatică

Rolul bioinformaticii este esențial pentru a îmbunătăți identificarea proteinelor, caracterizarea acestora și procesarea într-un mod eficient a informațiilor.

4.2.5 Utilizarea metodei în cercetarea fundamentală și în clinică

„Revoluția omică” recentă pentru descoperirea biomarkerilor este influențată de performanța tehnicilor SM de ionizare. În ultimele decenii spectrometria de masă biologică și clinică s-a evidențiat în medicina.

5. CONCLUZII

- GDM este o complicație a sarcinii cu impact asupra sănătății materno-fetale. Există și alți factori de risc implicați în apariția macrosomiei, în afară de diabetul preexistent și GDM necontrolat.
- GDM induce modificări în diferite sisteme: metabolismul glucidic, lipidic, proteic, sistemul de coagulare și inflamator. Identificarea unor markeri serici de diagnostic precoce ai GDM printr-o metodă simplă, ieftină, reproductibilă și cu acuratețe ridicată ar reduce complicațiile pe termen lung și ar avea utilitate practică.

PARTEA A II-A

CONTRIBUTII
ORIGINALA

PARTEA a-II-a- CONTRIBUȚII ORIGINALE

MOTIVAREA ALEGERII TEMEI ȘI OBIECTIVELE TEZEI

O femeie cu antecedente personale de GDM și copilul ei au un risc crescut de a dezvolta diabet de tip 2, obezitate, boli cardiovasculare și sindrom metabolic. Mecanismele moleculare și sistemele implicate în patogeneza diabetului gestațional rămân în mare parte necunoscute.

Partea a II-a a acestei lucrări s-a axat pe următoarele obiective principale:

1. Analiza comparativă a parametrilor bioclinici și antropometrici ai gravidelor cu GDM cu și fără copii macrosomi (greutate la naștere > 4000 g)
2. Izolarea exozomilor serici din sângele gravidelor cu GDM printr-o metodă reproductibilă, cu un grad de randament și puritate ridicat
3. Analiza proteomică a exozomilor izolați. Analiza diverselor proteine implicate în sistemul de coagulare și complement, metabolismul lipidic, activitatea pro-inflamatorie și pro-trombotică.
4. Corelații funcționale și analiza comparativă a datelor clinice și de cercetare fundamentală cu potențial predictiv pentru pacientele cu GDM

1. ANALIZA BIOCLINICĂ A GRAVIDELOR CU DIABET GESTAȚIONAL ȘI COPII MACROSOMI

1.1 Introducere și obiective parțiale

Pentru atingerea primului obiectiv ne-am propus următoarele activități:

- i) Stabilirea loturilor experimentale- lot de paciente gravide în trimestrul trei cu GDM complicat cu macrosomie, lot gravide cu GDM fără macrosomie și un lot control constând din gravide fără GDM
- ii) Identificarea factorilor biochimici, clinici implicați în fiziopatologia GDM cu sau fără macrosomie;
- iii) Stabilirea unor corelații între acești factori și parametrii antropometrici, clinici și paraclinici ai pacientelor incluse în studiu.

1.2 Materiale și metode

1.2.1 Obținerea loturilor de paciente gravide

Am realizat un studiu de tip caz-control, pe 36 de gravide care s-au prezentat la Secția II de Diabet „N. Paulescu” Institutul Național de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice, București, România între 2018 și 2021.

Pacientele cu GDM și subiecții fără diabet zaharat au fost împărțiți în 3 grupe: **grupul martor** – gravide control (GC, n=8), **grupul diabet zaharat gestațional (GDM) cu descendenți normali** (greutatea copilului la naștere <4000g, GDM-N, n=23), **grupul diabet zaharat gestațional (GDM) cu macrosomie** (greutatea copilului la naștere ≥ 4.000 g, GDM-M, n=5)

1.2.2 Măsurarea parametrilor plasmatici și antropometrici

Pentru fiecare gravidă s-a alcătuit ***Fișa Pacientului*** cu toate datele de identificare, cele sociodemografice și antropometrice. Au fost recoltate probe de sânge pentru a stabili diagnosticul de GDM în trimestrul al treilea de sarcină.

1.2.3 Analiza parametrilor antropometrici și paraclinici

*Tabelul 7. Caracteristicile materne ale gravidelor incluse în studiu. Datele sunt exprimate ca medie $\pm$ abaterea standard (SD). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ față de grupul GC.*

*Tabelul 8. Caracteristicile clinice ale pacienților înrolați. Datele sunt exprimate ca medii $\pm$ abaterea standard (SD); * $p \sim 0,05$, ** $p \sim 0,01$; *** $p < 0,05$*

Tabelul 7. Caracteristicile materne ale gravidelor incluse în studiu

Caracteristici	GC (n=8)	GDM-N (n=23)	GDM-M (n=5)
Vârsta mamei (ani)	26.00±2.33	31.52±3.80***	32.00±6.67*
BMI pre-sarcină (kg/m ²)	24.21±5.13	26.00±5.26	32.50±0.14
BMI la vârsta gestațională (kg/m ²)	27.69±5.29	29.41±5.56	32.45±2.00*
Vârsta gestațională la diagnostic (săptămâni)	25.88±1.55	29.29±2.77**	30.00±3.81**
Vârsta gestațională la naștere (săptămâni)	38.50±0.71	37.93±8.22	38.40±0.55
Paritatea (număr de sarcini)	1.13±1.13	1.31±1.25	1.80±2.05
TTGO 0h (mg/dL)	75.25±7.21	92.87±13.49**	99.70±13.30**
TTGO 1h (mg/dL)	115.17±19.86	185.70±36.23***	198.80±39.70***
TTGO 2h (mg/dL)	81.81±23.32	150.34±29.43***	168.98±36.84***
Creatinina (mg/dL)	0.45±0.14	0.47±0.08	0.47±0.08
Colesterol (mg/dL)	253.73±43.9	239.28±41.90	271.77±17.85
HDL (mg/dL)	75.83±23.67	72.08±18.27	77.90±17.95
Tg (mg/dL)	146.29±29.10	237.2±74.36*	207.66±84.97
Acid uric (mg/dL)	3.26±0.75	3.57±1.04	4.57±2.18
HbA1c (%)	5.2±0.17	5.49±0.41	5.42±0.37
Hemoglobina (g/dL)	11.13±0.82	11.12±1.02	10.7±0.66
ALT (Ui/L)	28.85±34.23	16.88±13.03	12.84±11.89
AST (Ui/L)	19.49±9.63	16.07±6.80	13.13±3.07

Tabelul 8. Caracteristicile clinice și parametrii biochimici ale pacienților înrolați.

Parametri materni	CG (n = 8)	GDM (n = 28)
Vârsta (ani)	26 ± 2.33	31.52 ± 4.24 ***
BMI pre-sarcină (kg/m ²)	24.21 ± 5.13	25.99 ± 5.25
BMI la vârsta gestațională (kg/m ²)	27.69 ± 5.28	29.93 ± 5.22
Adiponectina (ng/mL)	13.5 ± 5.78	9.17 ± 4.71 **
Insulina (mU/mL)	18.6 ± 12.05	12.99 ± 5.50 *
Peptid C (ng/mL)	9.70 ± 2.49	6.67 ± 4.64 *
Proinsulin (pmol/L)	3.09 ± 1.80	2.27 ± 0.60 *
Leptina (ng/mL)	14.30 ± 8.04	22.62 ± 10.74 *
Steady-state β-cell function (%B)	254.83 ± 98.68	145.56 ± 56.79 ***
Insulin sensitivity (%S)	55.5 ± 32.99	61.49 ± 25.59
HOMA-IR	2.43 ± 1.40	2.08 ± 1.33
TTGO 0 h (mg/dL)	75.25 ± 7.20	94.09 ± 13.48 ***
TTGO 1 h (mg/dL)	115.17 ± 19.86	188.04 ± 36.46 ***
TTGO 2 h (mg/dL)	81.81 ± 23.32	153.67 ± 30.98 ***
Creatinina (mg/dL)	0.42 ± 0.14	0.47 ± 0.08
Total colesterol (mg/dL)	253.73 ± 43.94	247.95 ± 39.29
HDL (mg/dL)	75.827 ± 23.67	73.75 ± 17.70
Tg (mg/dL)	146.29 ± 29.09	229.35 ± 75.37 *
Acid uric (mg/dL)	3.26 ± 0.75	3.76 ± 1.34
ALT (Ui/L)	15.176 ± 7.96	16.04 ± 12.66
AST (Ui/L)	19.49 ± 9.63	15.49 ± 6.29
HbA1c (%)	5.2 ± 0.17	5.453 ± 0.38
Hemoglobina (g/dL)	11.13 ± 0.82	11.02 ± 0.93
antiGAD (iE/mL)	0.21 ± 0.16	0.22 ± 0.19
MPV	10.76 ± 1.02	10.68 ± 1.50

1.2.4 Analiza statistică

Testul statistic Pearson R și matricele de corelație Pearson au fost utilizate pentru a măsura corelația dintre diferitele caracteristici ale femeilor din grupul GDM-N. Totodată s-au realizat matricele de corelație dintre parametrii clinici și paraclinici dintre femeilor din grupul GDM-M care au născut copii cu macrosomie comparativ cu GDM-N.

1.2 Rezultate

	Rezultatele sarcinii	GDM-N (n=23) n (%)	GDM-M (n=5) n (%)	p-value
Copil	Greutatea la naștere			
	Copii < 4000 g	23 (100%)	0 (0%)	0.0001
	Copii > 4000 g	0 (0%)	5 (100%)	
	Hipoglicemie neonatală	1 (4.34 %)	1 (20%)	0.07
	Icter	2 (8.69%)	0	0.2560
	Scor Apgar			
Mama	≤8	4 (17.39%)	1 (20%)	0.24
	>8	19 (82.6%)	4 (80%)	
	Hipertensiune în sarcină	3 (13.04%)	0 (0%)	0.33
	Edeme	2 (8.69%)	1 (20%)	0.24
	Naștere			
	Naturală	7 (30.43%)	0	0.08
	Cezariană	16 (69.56%)	5 (100%)	

În grupul GDM-M au fost identificați 5 nou-născuți cu o greutate mai mare de 4.000 g (macrosomie). S-au realizat corelații între diferitele caracteristici ale femeilor GDM-N (*Figura*

44 A.) și corelații între parametrii clinici și paraclinici ai femeilor GDM-M care au născut copii cu macrosomie comparativ cu GDM-N (Figura 44 B.)

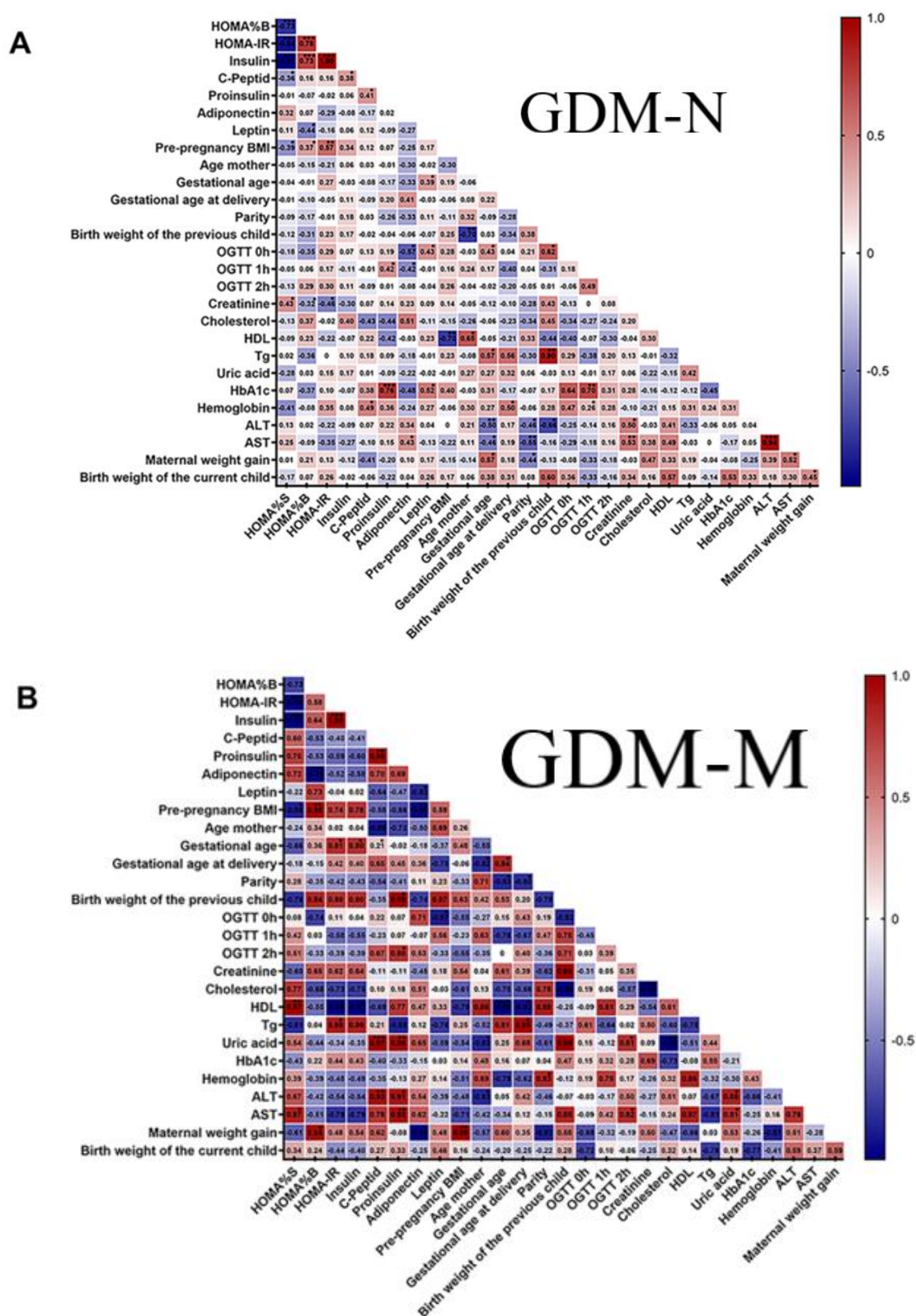


Figura 45. Reprezentarea grafică a analizelor de corelație Pearson

1.2.1 Evaluarea disfuncției celulelor beta în diabetul gestațional

Perturbarea homeostaziei celulelor β este o componentă esențială în patogeneza GDM.

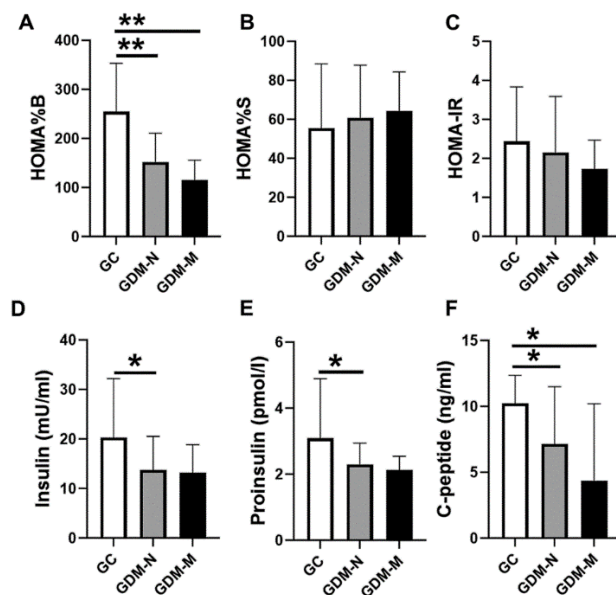


Figura 46 A-F.

1.3.2 Evaluarea rezistenței la insulină în diabetul gestațional

În sarcinile cu diabet zaharat gestațional, rezistența la insulină a fost asociată cu următorii factori: *nivelurile serice ale adiponectinei, leptinei și creșterea în greutate a mamei.*

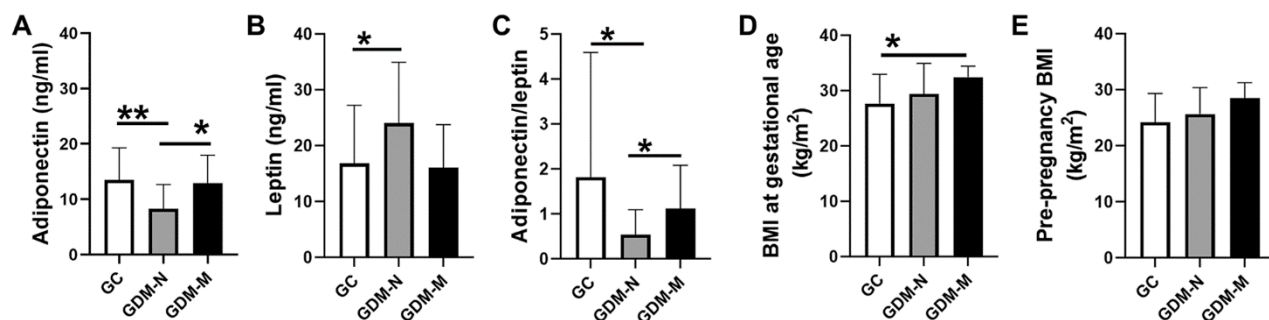


Figura 47. A-E

1.3.3 Corelații semnificative statistic între factorii antropometrici și clinici în GDM

Am observat că **vârsta pacientei**, un factor de risc bine cunoscut pentru dezvoltarea diabetului gestațional, **a fost semnificativ mai mare ($p<0,01$) în rândul femeilor GDM-N** de 1,21 ori și în GDM-M de 1,23 ori în comparație cu femeile GC. **Femeile cu GDM-M au avut IMC mai mare la momentul diagnosticului** de 1,17 ori în comparație cu femeile GC ($p<0,05$).

1.3.4 Gravidele cu copii macrosomi

În cadrul studiului au fost 5 urmași cu o greutate mai mare de 4.000 g (macrosomie), născuți de femei cu diabet gestațional controlat prin dieta. Nu au existat diferențe statistice semnificative privind hipoglicemia neonatală, icterul, scorul Apgar, hipertensiunea arterială, edemul și tipul de naștere (naturală sau cezariană) între grupul cu GDM și copii cu greutate normală și cel cu copii macrosomi.

1.4 Discuții

Studiul de față susține ipoteza că există și alți factori de risc pentru macrosomie în afară de diabetul matern preexistent și GDM necontrolat. Datele noastre au arătat că: **nivelul de insulină** a scăzut în GDM comparativ cu GC, **nivelurile peptidului C** au scăzut în ambele grupuri GDM, cu diferențe semnificative față de GC, pacienții cu GDM-M au avut o corelație pozitivă puternică între nivelurile peptidului C și nivelurile ALT, care nu a fost observată în GDM-N. Nu am identificat diferențe semnificative ale nivelurilor de proinsulină între GDM și grupul control. Am observat că numai în GDM-N **nivelul adiponectinei** a scăzut în comparație cu GC.

1.5 Concluzii parțiale

Am realizat o analiză a diabetului gestațional prin studiu comparativ a sarcinilor cu și fără macrosomie. Putem spune că: este primul studiu care a identificat o asocieră între nivelul plasmatic al HDL și macrosomie în sarcinile complicate cu diabet gestațional. Am realizat prima analiză comparativă a nivelului plasmatic de proinsulină în diabetul gestațional fără sau complicat cu macrosomie. Este prima analiză a corelației dintre nivelurile de adiponectină și AST în GDM.

2. DETERMINAREA CONȚINUTULUI PROTEIC AL EXOZOMILOR DIN SÂNGELE GRAVIDELOR CU DIABET GESTAȚIONAL. CĂI DE SEMNALIZARE IMPLICATE ÎN PATOLOGIA DIABETICĂ

2.1 Introducere și obiective

Pentru atingerea celui de al doilea obiectiv ne-am propus următoarele **activități**:

1. Obținerea loturilor de gravide
2. Măsurarea parametrilor plasmatici
3. Izolarea, concentrarea și caracterizarea exozomilor din serul gravidelor cu GDM, în trimestrul 2-3 de sarcină;
4. Analiza proteomică a exozomilor. Determinarea conținutului proteic calitativ și cantitativ al exozomilor izolați din serul gravidelor cu diabet gestațional prin spectrometrie de masă
5. Analiza statistică a datelor obținute.
6. Validarea rezultatelor prin *Western Blot*

2.2 Materiale și metode

2.2.1. Obținerea loturilor de gravide

În cadrul studiului de izolare a exozomilor din serul gravidelor cu diabet gestațional, am inclus 18 gravide: 8 formând grupul de control (CG)- nediabetice și 10 paciente au prezentat diabet zaharat gestațional (GDM).

2.2.2 Măsurarea parametrilor plasmatici

S-a alcătuit pentru fiecare pacient înrolat ***Fișa Pacientului*** cu toate datele de identificare, cele socio-demografice, antropometrice și clinice.

Pentru a stabili diagnosticul de GDM, în trimestrul al treilea de sarcină au fost recoltate probe de sânge. Probele au fost recoltate după cel puțin 8 ore de post, centrifugate la $1.000 \times g$ timp de 15 minute și depozitate la $-80^\circ C$ până la analizele ulterioare.

2.2.3 Izolarea, concentrarea și caracterizarea exozomilor

Exozomii au fost izolați din 500 uL de ser colectat de la cele două grupuri experimentale. Concentrarea exozomilor a fost efectuată conform instrucțiunilor producătorului din kitul *miRCURY Exosome Serum/Plasma* (Qiagen, Hilden, Germania).

2.2.3.1 Prepararea probelor și nanocromatografie lichidă—Analiza prin spectrometrie de masă

S-a respectat protocolul.

2.2.3.2 Analiza proteomică prin spectrometrie de masă

Datorită sensibilității ridicate și volumelor inițiale mici de probă necesare pentru MS, analiza proteomică bazată pe MS a permis identificarea conținutului proteic exozomal.

2.2.3.3 Caracterizarea fracțiilor exozomale serice

Au fost efectuate teste de împrăștiere dinamică a luminii pentru caracterizarea dimensiunii și stabilității veziculelor exozomale.

2.2.3.4 Evaluarea expresiei proteice prin tehnica Western Blot

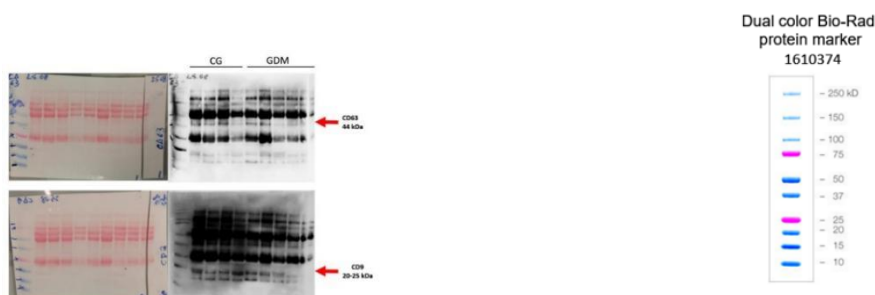


Figura 51. Imagini originale nealterate (nedecupate și neajustate) pentru CD63 (set de imagini de sus) și CD9 (set de imagini inferioare).

2.2.3.5 Studii alternative de validare

Datele de spectrometrie de masă au fost validate în continuare prin tehnici alternative de imunodectie (*Western blot*) folosind anticorpi specifici. Modificarea abundenței spectrale a A1BG (creștere de 1,7 ori, $p < 0,05$) și HPR (creștere de 1,3 ori, $p < 0,05$) au fost confirmate

prin analiza densitometrică a lizatelor de exozomi serici izolați din grupurile GDM și respectiv CG, (Figura 54).

2.3 Analiza statistică

Analiza bioinformatică a presupus algoritmi statistici pentru corectarea valorilor p obținute prin analiza ANOVA; folosirea algoritmului Benjamini-Hochberg bazat pe rata de excludere a rezultatelor fals pozitive (FDR). Datele au fost exprimate ca medie $\pm$ abaterea standard (SD). Analiza de corelație Pearson a fost efectuată pe caracteristicile pacienților cu GDM și parametrii serici. Analiza statistică a fost efectuată prin testul t ; $p < 0,05$ a fost considerată o diferență semnificativă.

2.4 Rezultate

2.4.1 Analiza parametrilor bioclinici a cohorței de studiu

Nivelurile serice ale (HOMA-IR), HbA1c, creatinină, colesterol total, lipoproteine de înaltă densitate (HDL), acid uric, ALT, AST, hemoglobină și anticorp anti decarboxilază acid glutamic (antiGAD) nu au fost semnificativ diferite.

2.4.2 Analiza proteomică a exozomilor izolați din serul cohorței de studiu

Analiza proteomică a evidențiat 78 de proteine cu abundență diferită în grupul GDM comparativ cu grupul CG, asociate cu: sistemul complement, cascade de coagulare (CCC, codul căii HSA04610, 24 de proteine), căile de degranulare a trombocitelor (PD, cod de cale HSA-114608, 14 proteine), metabolismul colesterolului (CM, cod de cale HSA04979, patru proteine), factori de asociere boli trombotice-gene (TF, DOID:2364 și DOID:10772, patru proteine).

2.4.2.1 Abundența proteinelor implicate în sistemul complement

În cazul exozomilor GDM, datele noastre reflectă o abundență spectrală modificată pentru douăzeci și patru de proteine corelând cu calea de semnalizare CCC (cascada de coagulare și cascada complementului) cu statistici de încredere ridicată (FDR valoarea $p = 1,44e-33$).

2.4.2.2 Abundența proteinelor implicate în cascada de coagulare

Nouă **proteine implicate în calea de semnalizare CCC** s-au dovedit a fi semnificativ supra-reglate în toate probele GDM în comparație cu controalele.

2.4.2.3 Abundența proteinelor implicate în degranularea trombocitelor

În exozomii proveniți de la grupul GDM, am detectat o abundență spectrală alterată pentru paisprezece proteine, care se **corelează puternic cu calea de semnalizare a degranulării trombocitelor** (PD, FDR valoarea $p = 1,7e-14$).

2.4.2.4 Diabetul gestațional reglează proteinele implicate în sindromul post-trombotic și metabolismul colesterolului

Analiza proteomică a evidențiat **patru factori protrombotici modificați** în fracțiile exozomilor serici din pacientele cu diabet în comparație cu probele de control. Proteinele implicate în metabolismul colesterolului au fost: APOC2 Apolipoprotein C-II; APOH Be-ta-2-glicoproteina 1; APOB Apolipoproteină B-100; Apolipoproteina LPA (a) (*Figura 56b*).

2.5 Discuții

Analiza noastră proteomică a evidențiat **78 de proteine cu abundență diferită în grupul GDM comparativ cu grupul CG**. Proteinele au fost asociate în principal cu **cascadele complement și coagulare, activarea trombocitelor, factorii protrombotici și metabolizarea colesterolului**. Am identificat în exozomii concentrați din grupul GDM, **douăzeci și patru de proteine abundente diferențial care au fost corelate cu calea de semnalizare CCC** cu încredere statistică ridicată. În studiul nostru, în exozomii concentrați din sarcină complicată cu GDM, am găsit niveluri scăzute de Complement C3 (C3), Complement C5 (C5), C4-B (C4B), lanțul beta al proteinei care leagă C4b (C4BPB) și C4b-lanțul alfa al proteinei de legare (C4BPA).

2.6 Beneficiile utilizării kiturilor pentru izolarea exosomilor

În cadrul studiului am utilizat o metodă inovatoare de izolare din sânge a exosomilor, care este rapidă și reproductibilă și facilitează izolarea exosomilor cu un randament ridicat și puritate ridicată. Kitul permite izolarea exosomilor și a altor vezicule extracelulare printr-un protocol simplu, care nu necesită etape de ultracentrifugare.

2.7 Concluzii parțiale

Analiza noastră proteomică a evidențiat **78 de proteine cu abundență diferită** în grupul GDM comparativ cu grupul cu CG. Proteinele au fost asociate în principal cu **cascadele complement și coagulare, activarea trombocitelor, factorii protrombotici și metabolizarea colesterolului**. Am identificat **douăzeci și patru de proteine abundente diferențiale** care au fost corelate cu **calea de semnalizare CCC** cu încredere statistică ridicată. Am realizat primul studiu asupra modificării căii de semnalizare a CCC **în exozomii serici ai pacienților** cu GDM.

3. ANALIZA PROTEOMICĂ A EXOZOMILOR DIN DIABETUL GESTAȚIONAL RELEVĂ DEREGLĂRI ALE SISTEMELOR DE COAGULARE, COMPLEMENT ȘI METABOLISM LIPIDIC

3.1 Introducere și obiective

Ne-am propus analiza exosomilor serici din GDM pentru a înțelege mai bine mecanismele ce stau la baza patogenezei acestei afecțiuni, având următoarele obiective: Analiza sistemului de coagulare, sistemului complement și a metabolismului lipidic în GDM.

3.2 Materiale și metode

După analiza proteomică cantitativă și calitativă a exosomilor serici izolați din sângele CG și al gravidelor cu GDM am realizat corelații între parametrii biochimici, antropometrici și proteinele exozomale. Analiza corelației Pearson a fost efectuată asupra parametrilor serici și proteinelor exozomale identificate prin spectrometrie de masă.

3.3 Analiza statistică

S-a realizat prin analiza bioinformatica.

3.4 Rezultate

3.4.1 Analiza sistemului de coagulare

În grupul GDM, abundența spectrală a alfa-1-antitripsinei (**SERPINA1**) a fost corelată pozitiv cu glucoza serică la momentul 0 (GTT 0 h) ($r = 0,8$, $p < 0,05$) și negativ cu HOMA-IR ($r = -0,4$, $p < 0,05$) (Figura 57a).

3.4.2 Analiza sistemului complement

Am constatat că **C3** s-a corelat pozitiv cu IMC ($r = 0,8$, $p < 0,05$), HOMA-IR ($r = 0,6$, $p < 0,04$), AT III ($r = 0,7$, $p < 0,05$) și negativ cu MPV ($r = -0,6$, $p < 0,02$) și adiponectină ($r = -0,4$, $p < 0,05$). **C4BP** a prezentat o corelație pozitivă cu F12 ($r = 0,8$, $p < 0,05$).

3.4.3 Analiza metabolismului lipidic

Apo-CII este corelat pozitiv cu adiponectina ($r = 0,5$, $p = 0,05$), glucoza serică la momentul 0 (GTT 0h), ($r = 0,5$, $p = 0,04$), apo B100 ($r = 0,7$, $p = 0,01$). Am identificat, de asemenea, corelații Pearson semnificative între apo-CII și alfa 1 antitripsină ($r = 0,8$, $p = 0,002$), alfa 2 antiplasmină ($r = -0,6$, $p = 0,01$), F12 ($r = -0,8$, $p = 0,0009$), C1q subunitatea A ($r = 0,5$, $p = 0,04$), C1s ($r = -0,73$, $p = 0,0074$), C6 ($r = -0,56$, $p = 0,043$), C9 ($r = -0,6$, $p = 0,02$), factorul complement I (CFI) ($r = -0,7$, $p = 0,01$). Apo B100 este corelat pozitiv cu glucoza serică la momentul 0 (GTT 0h), ($r = 0,7$, $p = 0,004$).

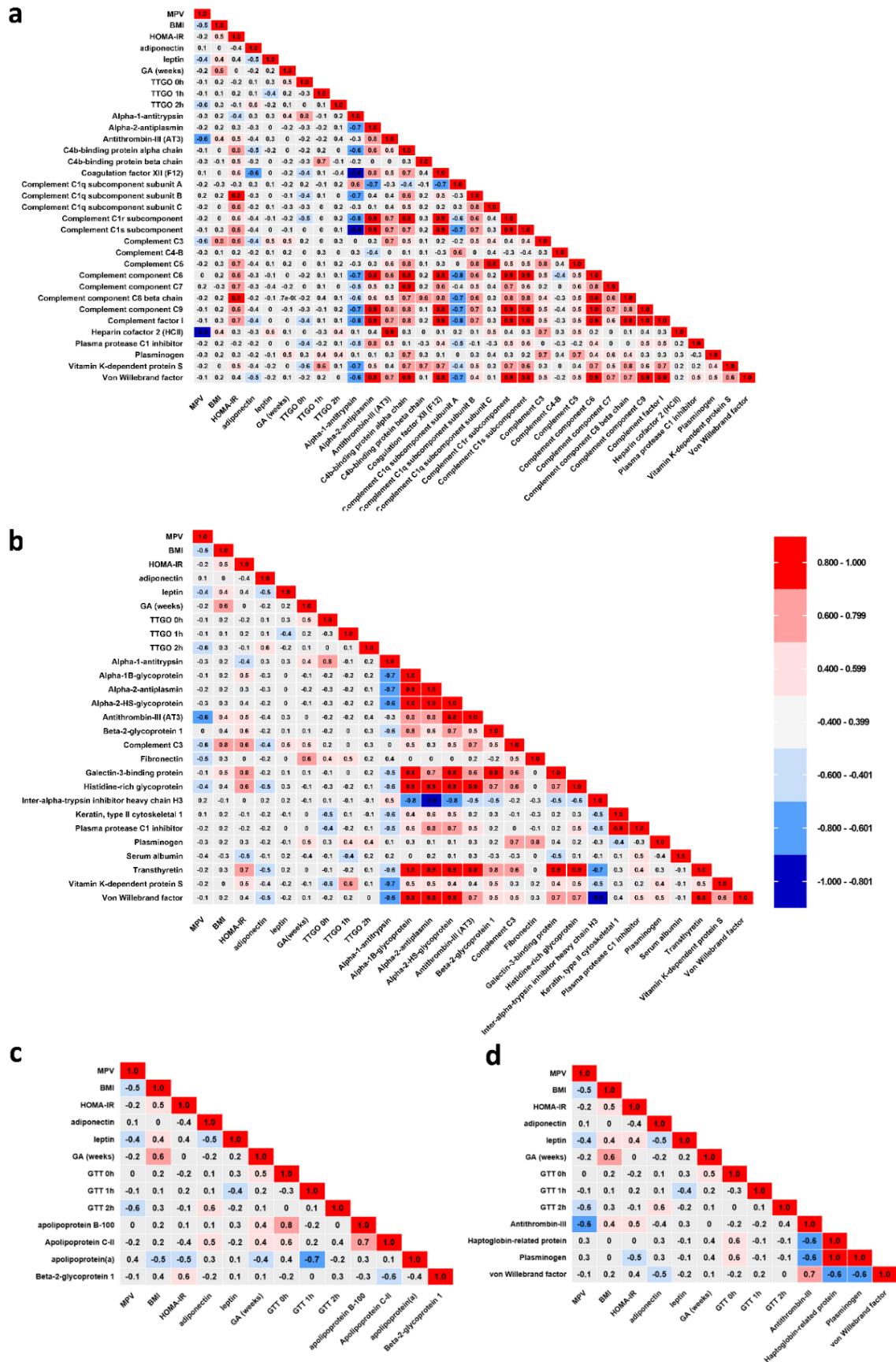


Figura 57.

3.5 Discuții

Am analizat Complementul C3 din exozomii serici ai gravidelor cu GDM. Am obținut o corelație statistică negativă între Complementul C3 și MPV și, de asemenea, între Complementul C3 și adiponectină. Mai mult, am observat o corelație puternică și pozitivă cu IMC, HOMA-IR și AT III. Studiul nostru este primul care dezvăluie dereglarea complementului C3 în exozomii serului matern cu GDM. Datele noastre arată că F12 este suprareglat și confirmă rezultatele anterioare [265]. Femeile cu GDM au niveluri exozomale serice mai mari de F12 în comparație cu femeile cu sarcini sănătoase. Analiza noastră proteomică a evidențiat patru factori protrombotici care au fost modificați de GDM în fracțiile exozomale serice: antitrombina-III, plasminogenul, haptoglobina și factorul von Willebrand. Am observat că nivelurile exosomale serice ale apoC-II sunt puternic și pozitiv corelate cu ApoB100, care mediază clearance-ul colesterolului, transportul LDL și, de asemenea, exocitoza proteinelor lizozomale și peroxizomale [297].

3.6 Concluzii parțiale

Studiul nostru se diferențiază de alte studii prin următoarele rezultate:

- Acesta este **primul studiu care analizează calea de semnalizare a CCC în exozomii serici în sarcinile GDM. Studiul nostru este primul care dezvăluie dereglarea complementului C3 în exozomii serului matern GDM.** Am examinat în detaliu la pacienții cu GDM asocierea dintre nivelurile C3 din exozomii serici materni și obezitate și rezistența la insulină. Rezultatele noastre sunt susținute de datele publicate. **Am realizat primul studiu caz-control de analiză a biomarkerilor din exozomii serici la femeile cu și fără GDM.** În studiul nostru am detectat că în exozomii serici concentrați de la subiecții GDM, C4BPA, C6 și C8B sunt reglați în jos (rezultate similare raportului de mai sus), dar, în contrast, am constatat că C7 și C9 sunt supra-regulate. **Am realizat primul studiu asupra nivelurilor exozomale serice care să raporteze alterarea nivelurilor F12 în GDM. Studiul nostru este primul raport care analizează SERPINA1 în exozomii serici ai pacienților cu GDM.** Rezultatele noastre demonstrează că alfa-1-antitripsina este suprareglată în GDM și este corelată pozitiv cu glucoza serică la momentul 0 (GTT Oh). În studiul nostru, nivelurile exosomale serice ale VWF au fost crescute în sarcinile GDM în comparație cu sarcinile normale. Rezultatele noastre

indică o **corelație negativă a MPV cu markerii CCC identificați în exozomii serici ai sarcinilor GDM (antitrombina III și complement C3). Este prima dată când aceste corelații au fost efectuate. Studiul nostru este primul care analizează apoC-II în exozomii serici ai subiecților GDM.** Am documentat că nivelurile exosomale serice ale apoC-II au fost mai mari în sarcinile GDM comparativ cu sarcinile normale și sunt corelate pozitiv cu adiponectina și glicemia a jeun. În paralel cu datele contradictorii din literatură privind asocierea statistică a diferiților parametri clinici și GDM, am identificat corelații interesante care pot ajuta studiile viitoare să clarifice fiziopatologia GDM.

4. CONCLUZII

Înțelegerea fiziopatologiei GDM este de mare importanță, având în vedere riscul ridicat atât pentru mamă, cât și pentru copil de a dezvolta diabet de tip 2 și boli cardiovasculare mai târziu în viață. Am realizat primul studiu care a identificat o asociere între nivelul plasmatic HDL și macrosomie în sarcinile complicate cu diabet gestațional. Totodată este prima investigație a relației dintre ALT în trimestrul trei, proinsulină și macrosomie și analiză a corelației dintre nivelurile de adiponectină și AST în GDM. Am izolat exozomii serici din sângele cohortei de studiu utilizând kituri moderne. Am comparat performanțele diferitelor metode, inclusiv ultracentrifugarea (UC) iar metoda prezentă a furnizat cea mai mare rată de recuperare (~ 20 de ori mai mare decât UC) și raportul de puritate (3,5 ori mai mare decât UC) a EV într-o perioadă scurtă de timp (< 20). min). S-au obținut corelații statistice între parametrii clinici și paraclinici și proteomul exozomal care îmbunătățesc înțelegerea patogenezei și evoluției diabetului zaharat gestațional. Analiza noastră proteomică a evidențiat 78 de proteine asociate în principal cu cascadele complement și coagulare, activarea trombocitelor, factorii protrombotici și metabolizarea colesterolului. În studiul nostru am identificat în exozomii concentrați din grupul GDM, douăzeci și patru de proteine abundente diferențial care au fost corelate cu calea de semnalizare CCC cu încredere statistică ridicată. Am realizat primul studiu asupra modificării căii de semnalizare a CCC în exozomii serici ai pacienților cu GDM și care dezvăluie dereglarea complementului C3 în exozomii serului matern cu GDM. Am realizat primul studiu caz-control de analiză a biomarkerilor din exozomii serici la femeile cu și fără GDM. Studiul nostru este primul raport care analizează SERPINA1 și apoC-II în exozomii serici ai subiecților GDM.

În acest studiu s-au identificat corelații interesante care pot ajuta studiile viitoare să clarifice fiziopatologia GDM.

Principala limitare a studiului este numărul relativ mic de replici biologice pentru cele două condiții, care ar fi putut afecta robustețea rezultatelor. Cu toate acestea, concluziile studiului se bazează pe tendințele biologice susținute de o supra-reglare, respectiv sub-reglare consecventă a mai multor proteine implicate în aceleași procese și sunt în conformitate cu datele publicate anterior în literatura de specialitate. Validarea pe cohorte mai mari de pacienți este necesară pentru a crește puterea statistică a rezultatelor noastre.

BIBLIOGRAFIE

1. Carrington ER, Shuman CR, Reardon HS. *Evaluation of the prediabetic state during pregnancy.* *Obstet Gynecol* 1967;9:664-669
2. Deputy NP, Kim SY, Conrey EJ, Bullard KM. *Prevalence and Changes in Preexisting Diabetes and Gestational Diabetes Among Women who had a Live Birth- United States, 2012-2016.* *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2018 Nov 2;67(43):1201-1207.
3. Abramowics JS. *Benefits and risks of ultrasound in pregnancy.* *Semin Perinatol* 2013; 37 (5): 295-300
4. Sutherland HW, Pritchard CW. *Increased incidence of spontaneous abortion in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus.* *Am J obstet Gynecol* 1987 Jan; 156 (1): 135-8
5. Miodovnik M, Skillman C, Holroyde JC, Butler JB. *Elevated maternal glycohemoglobin in early pregnancy and spontaneous abortion among insulin-dependent diabetic women.* *Am J Obstet Gynecol* 1985 Oct 15; 153 (4): 439-42
6. Alberti KGMM, Zimmet PZ, WHO Consultation: *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation.* *Diabet Med.* 1998, 15: 539-553.
7. Carlos Antonio Negrato, Marilia Brito Gomes. *Historical facts of screening and diagnosing diabetes in pregnancy* *Diabetology & Metabolic Syndrome* volume 5, Article number: 22 (2013)
8. Metzger BE, Gabbe SG, Persson B et al. *International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel. International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy.* *Diabetes Care.* 2010; 33: 676-682
9. Johnstone RM, Adam M, *Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes).* *J biol Chem* 1987, 9412-20
10. Simpson RJ, Lim JW, *Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential.* *Expert Rev Proteomic,* 2009, 267-83
11. Dai, X. Q., Plummer, G., Casimir, M., Kang, Y., Hajmrle, C., Gaisano, H. Y. *SUMOylation regulates insulin exocytosis downstream of secretory granule docking in rodents and humans.* *Diabetes* 2011 Mar; 60(3): 838-847
12. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S *Exosomes: composition, biogenesis and function.* *Nat Rev Immunol* 2002 Aug;2(8):569-79

13. Sokolova V, Ludwig AK, Hornung S, Rotan O, Horn PA. *Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy*. Colloids Surf B Biointerfaces 2011 Oct 1;87(1):146-50
14. Simpson RJ, Jensen SS, Lim JWE: *Proteomic profiling of exosomes: current perspectives*. Proteomics 2008 Oct;8(19):4083-99
15. Carpenter MW, Coustan DR: *Criteria for screening tests for gestational diabetes*. Am J Obstet Gynecol. 1982, 144 (7): 768-773.
16. Alberti KGMM, Zimmet PZ, *WHO Consultation: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation*. Diabet Med. 1998, 15: 539-553.
17. American Diabetes Association - *Standards of Medical Care in Diabetes -2015*. Diabetes Care 2015; 38 (Suppl. 1): S77–S79.
18. ADA. *Standards of Medical Care in Diabetes – 2011*. Diabetes Care. 2011; 34 (1):S11-S61
19. American Diabetes Association - *Standards of Medical Care in Diabetes -2015*. Diabetes Care 2015; 38 (Suppl. 1): S77–S79.
20. American Diabetes Association. *Position Statement. Gestational diabetes mellitus*. Diabetes Care 2004; 27: S88-S90.
21. Thangaratinam S, Rogozinska E, *Interventions to reduce or prevent obesity in pregnant women: a systematic review*. Health Techn Assessment 2012 Jul;16(31):iii-iv, 1-191
22. Robitaille J, Grant A.M. *The genetics of gestational diabetes mellitus:evidence for relationship with type 2 diabetes mellitus* Genet Med 2008; 240-50
23. Lapolla A, Dalfrà M.G *Diabetes related autoimmunity in gestational diabetes mellitus: is it important?* Nutr Metab Cardiovasc Dis 2009:674-82
24. Petry C.J-*Genetic risk factors for gestational diabetes, Gestational Diabetes-Origins, Complication and treatment*, Press Taylor&Francis Group 2014:64-81
25. Fajans S.S, Bell G.I-*Diagnosis and management of maturity onset diabetes of the young (MODY)*, Diabetes Care, 2011; 34:1878-84
26. Lauenborg J, Grarup N, Damm, P; *Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes*, J Clin Endocrinol Metab, 2009: 145-50
27. Petry C.J-*Gestational diabetes; risk factors and recent advances in its genetics and treatment*, Br, J.Nutr, 2010: 775-87
28. Mao H, Li Q, Gao, S-*Metaanalysis of the relationship between common type 2 diabetes risk gene variants with gestational diabetes*, PloS One 2012;7(9):e45882

29. Sheiner E, Levy A *Gender does matter in perinatal medicine*, Fetal Diagn, Ther, 2004;366-69
30. Petry CJ, Seer R.V *Association between paternally transmitted fetal IGF2 variants and maternal circulating glucose in pregnancy*, Diabetes, 2011; 3090-96
31. IDF *Clinical Guideliness Task Force*. Global Guidelines on Pregnancy and Diabetes, Bruxelles: international diabetes federation 2009
32. Xiong X, Saunders L.D *Gestational diabetes mellitus: prevalence, risk factors, maternal and infant outcomes* Int J Gynaecol Obstet, 2001;221-28
33. Bo S, Menato G, Lenzo A *Dietary fat and gestational hyperglycemia*, Diabetologia 2001, 972-78
34. Jolly M, Sebire N, Harris J, *The risk associated with pregnancy in women aged 35 years or older*, HumReprod 2000, 2433-37
35. Hedderson M, Xu F, Ferrara A *Prepregnancy SHBG concentrations and risk for subsequently developing gestational diabetes mellitus*, Diabetes Care May 2014;1296-1303
36. Solomon C.G, Willet W.C, Carey V.J *A prospective study of pregravid determinants of gestational diabetes mellitus*, JAMA 1997;1078-83
37. Sebire N.J, Jolly M, Harris J.P *Maternal obesity and pregnancy outcome: a study of 287213 pregnancies in London*, Int J, Obes, Realt metab, Disord, 2001, 1175-82
38. Weiss J.L, Malone F.D, Emig D *Obesity, obstetric complications and cesarean delivery rate- a population based screening study*, AmJ Obstet Gynecol, 2004, 1091-97
39. Schrauwers C, Dekker G, *Maternal and perinatal outcome in obese pregnant patients* J MaternFetal Neonatal Med, 2009;218-26
40. Chu S.Y, Callaghan W.M *Maternal obesity and risk of gestational diabetes mellitus*, Diabetes Care, 2007, 2070-76
41. American College of obstetricians and Gynecologists. *CommiteeOpinion*, No 548, Obstet Gynecol, 2013, 210-2
42. Jiemenz-Moleon, Bueno-Cavanillas A *Predictive value of a screen for gestational diabetes mellitus:influence of associated risk factors*, Acta Obstet Gynecol Scand, 2000, 991-98
43. Laine MK, Kautiainen H, Gissler M, Raina M, Aahos I, Järvinen K, *Gestational diabetes in primiparous women–impact of age and adiposity: a register-based cohort study*. Acta Obstet Gynecol Scand. 2018;97(2):187–94.

44. Lambrinoudaki I, Vlachou SA, Creatsas G. *Genetics in gestational diabetes mellitus: association with incidence, severity, pregnancy outcome and response to treatment*. Curr Diabetes Rev. 2010;6(6):393–9.
45. Zhang C, Bao W, Rong Y, Yang H, Bowers K, Yeung E *Genetic variants and the risk of gestational diabetes mellitus: a systematic review*. Hum Reprod Update. 2013;19(4):376–90.
46. Kwak SH, Jang HC, Park KS. *Finding genetic risk factors of gestational diabetes*. Genomics Inform. 2012;10(4):239–43.
47. Moosazadeh M, Asemi Z, Lankarani KB, Tabrizi R, Maharlouei N, Naghibzadeh-Tahami A, *Family history of diabetes and the risk of gestational diabetes mellitus in Iran: a systematic review and meta-analysis*. Diabetes Metab Syndr. 2017;11:S99–S104.
48. Kim C. Berger D.K *Recurrence of Gestational Diabetes Mellitus: A systematic review*, Diabetes Care, 2007:1314-1319
49. Amarish Kumar Sharma, Sanjeev Singh, *Deep Insight of the Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus*, Cells. 2022
50. Rojas-Rodriguez R, Lifshitz L.M, Bellve K.D, Min S.Y., Pires J., Leung K., Boeras C., Sert A, Draper J.T, Corvera S., *Human adipose tissue expansion in pregnancy is impaired in gestational diabetes mellitus*. Diabetologia. 2015;58:2106–2114.
51. Lappas M. *Effect of pre-existing maternal obesity, gestational diabetes and adipokines on the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue*. Metabolism 2014 Feb;63(2):250-62
52. Forbes S., Taylor-Robinson S.D., Patel N., Allan P., Walker B.R., Johnston D.G. *Increased prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in European women with a history of gestational diabetes*. Diabetologia. 2011 Mar;54(3):641-7
53. Forbes S., Taylor-Robinson S.D., Patel N., Allan P., Walker B.R., Johnston D.G. *Increased prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in European women with a history of gestational diabetes*. Diabetologia. 2011 Mar;54(3):641-7
54. Jasmine F Plows, Joanna L Stanley, *The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus*, Int J Mol Sci. 2018 Nov; 19(11): 3342.
55. Garvey W.T, Maianu L, Zhu J.H *Multiple defects in the adypocyte glucose transport system cause cellular insulin resistance in gestational diabetes*, Diabetes, 1993: 1773-1785

56. Honnorat D., Disse E., Millot L., Mathiotte E., Claret M., Charrie A., Draï J., Garnier L., Maurice C., Durand E., *Are third-trimester adipokines associated with higher metabolic risk among women with gestational diabetes?* Diabetes Metab. 2015;41:393–400
57. Barbour L.A., McCurdy C.E., Hernandez T.L., Kirwan J.P., Catalano P.M., Friedman J.E. *Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes.* Diabetes Care. 2007;30(Suppl. 2):S112–S119.
58. Honnorat D., Disse E., Millot L., Mathiotte E., Claret M., Charrie A., Draï J., Garnier L., Maurice C., Durand E., *Are third-trimester adipokines associated with higher metabolic risk among women with gestational diabetes?* Diabetes Metab. 2015;41:393–400
59. Catalano P, Kirwan J, *Gestational diabetes and insulin resistance: role in short and long term implications for mother and fetus.* J Nutr 2003; 133: 1674S-83 S
60. Kc K, Shakya S and Zhang H: *Gestational diabetes mellitus and macrosomia: A literature review.* Ann Nutr Metab. 66 (Suppl 2):S14–S20. 2015
61. Herath RP, Siriwardana SR, Ekanayake CD, Abeysekara V, Kodithuwakku SUA and Herath HP: *Non-alcoholic fatty liver disease and pregnancy complications among Sri Lankan women: A cross sectional analytical study.* PLoS One. 2019 Apr 12;14(4):e0215326
62. Sarkar M, Grab J, DoGDMe JL, Gunderson EP, Rubin J, Irani RA, *Non-alcoholic fatty liver disease in pregnancy is associated with adverse maternal and perinatal outcomes.* J Hepatol 2020;73(3):516-522
63. Yarrington CD, Cantonwine DE, Seely EW, McElrath TF and Zera CA: *The association of early unexplained elevated alanine aminotransferase with large-for-gestational-age birthweight.* Am J Obstet Gynecol. 2016 Oct;215(4):474.e1-5
64. Crowther CA, Hiller JE, Moss JR, McPhee AJ, Jeffries WS and Robinson JS: *Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes.* N Engl J Med. 352:2477–2486. 2005
65. Pérez-Pérez A., Maymó J.L., Gambino Y.P., Guadix P., Dueñas J.L., Varone C.L., Sánchez-Margalet V. *Activated translation signaling in placenta from pregnant women with gestational diabetes mellitus: Possible role of leptin.* Horm. Metab. Res. 2013;45:436–442.
66. Williams M.A., Qiu C., Muiy-Rivera M., Vadachkoria S., Song T., Luthy D.A. *Plasma adiponectin concentrations in early pregnancy and subsequent risk of gestational diabetes mellitus.* J. Clin. Endocrinol. Metab. 2004;89:2306–2311

67. Roverso M., Brioschi M., Banfi C., Visentin S., Burlina S., Seraglia R., Traldi P., Lapolla A. *A preliminary study on human placental tissue impaired by gestational diabetes: A comparison of gel-based versus gel-free proteomics approaches.* Eur. J. Mass Spectrom. 2016;22:71–82.
68. Williams M.A., Qiu C., Muy-Rivera M., Vadachkoria S., Song T., Luthy D.A. *Plasma adiponectin concentrations in early pregnancy and subsequent risk of gestational diabetes mellitus.* J. Clin. Endocrinol. MeTable. 2004;89:2306–2311
69. National Institute for Health and Clinical Excellence, *Diabetes in pregnancy, Management of diabetes and its complication from pre-conception to the postnatal period, clinical guideline*, 2008, 63
70. National High Blood Pressure Educational Program Working group report on high pressure in pregnancy, Am J Obstet Gynecol, 2000
71. National High Blood Pressure Educational Program Working group report on high pressure in pregnancy, Am J Obstet Gynecol, 2000
72. Phaloprakarn C, Tangjitgamol S. Risk assessment for preeclampsia in women with gestational diabetes mellitus. J Perinat Med. 2009;37(6):617–21.
73. Barquiel B, Herranz L, Grande C, Castro-Dufourny I, Llaro M, Parra P, *Body weight, weight gain and hyperglycaemia are associated with hypertensive disorders of pregnancy in women with gestational diabetes.* Diabetes & metabolism. 2014;40(3):204–10.
74. Harper LM, Tita A, Biggio JR. *The Institute of Medicine Guidelines for Gestational Weight Gain after a Diagnosis of Gestational Diabetes and Pregnancy Outcomes.* Am J Perinatol. 2014.
75. Griffin ME, Coffey M, Johnson H, Scanlon P, Foley M, Stronge J, O'Meara NM, Firth RG. *Universal vs. risk factor-based screening for gestational diabetes mellitus: detection rates, gestation at diagnosis and outcome.* Diabet Med. 2000;17(1):26–32.
76. Yu CK, Teoh TG, Robinson S. *Obesity in pregnancy.* BJOG. 2006;113(10):1117–1125.
77. Lauenborg J, Hansen T, Jensen DM, Vestergaard H, Mølsted-Pedersen L, Hornnes P, Loch H, Pedersen O, Damm P. *Increasing incidence of diabetes after gestational diabetes: a long-term follow-up in a Danish population.* Diabetes Care. 2004;27:1194–1199.
78. Kim C, Neston K, Knopp R. *Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review.* Diabetes Care. 2002;25:1862–1868.

79. Bo S, Valpreda S, Menato G, Bardelli C, Botto C, Gambino R, Rabbia C, Durazzo M, Cassader M, Massobrio M, Pagano G. *Should we consider gestational diabetes a vascular risk factor?* Atherosclerosis. 2007;194:E72–E79.
80. Kaaja RJ, Greer IA. *Manifestation of chronic disease during pregnancy.* JAMA. 2005;294(21):2751–2157.
81. Buchanan TA, Xiang AH. *Gestational diabetes mellitus.* J Clin Invest. 2005;115(3):485–491.
82. Hunter D.J Burrows R.F *Influence of maternal insulin-dependent diabetes mellitus on neonatal morbidity,* CMAJ, 1993, 47-52
83. Metzger B.E, Lowe L.P *HAPO Study comparative research group. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes,* Mew Engl J Med 2008, 1991-2002
84. Cunningham L, Bloom et al. Williams Obstetrics ed 23, 2010, 854-55
85. Morre R, Warshack C, Diabetes Mellitus and Pregnancy, e-Medicine 2012
86. Ornoy A, Zaken V, *Role of reactive oxygen species in the diabetes induced anomalies in rat embryos in vitro: reduction in antioxidant enzymes and low molecular weight antioxidants may be the causative factor for increased anomalies,* Teratology, 1999, 376-86
87. Bonnefont R, Bastard J.P *Consequence of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance,* Diabetes Metab, 200, 163-76
88. Ray J, Vermeleun M.J *Maternal and neonatal outcomes in pregestational and gestational diabetes mellitus and the influence of maternal obesity and weight gain: the deposit study,* OJM, 2001, 347-356
89. Barker D.F- *The development origins of adult disease,* J Am Coll. Nutr, 2004 Dec;23(6 Suppl):588S-595S
90. Stride A, Shepherd M., Fryling T.M- *Intrauterin hyperglycemia is associated with an earlier diagnosis of diabetes in HNF mutation carriers,* Diabetes Care, 2002 Dec;25(12):2287-91
91. Metzger BE, Buchanan TA, Coustan DR *Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus,* Diabetes Care 2007 Jul;30 Suppl 2:S251-60
92. Falavigna M, Schmidt MI, *Effectiveness of gestational diabetes treatment: a systematic review with quality of evidence assessment.* Diabetes Res Clin Pract 2012 Dec;98(3):396-405.

93. Gibson KS, Waters TP, Catalano PM, *Maternal weight gain in women who develop gestational diabetes mellitus*, Obstet Gynecol 2012;560-565
94. Hartling L, Dryden DM *Benefits and harms of treating gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis for the US. Preventive Services Task Force and the National Institutes of Health Office of Medical Applications of Research*. Ann InternMed 2013, Jul 16;159(2):123-9.
95. Todd SE, Oliver MH *Periconceptional undernutrition of ewes impairs glucose tolerance in their adult offspring*. Ped Res 2012; 2012: 123610
96. Thangaratinam S, Rogozinska E, *Health interventions to reduce or prevent obesity in pregnant women: a systematic review*. Techn Assessment 2012 Jul;16(31):iii-iv, 1-191
97. Position of the American Dietetic Association; *Nutrition and Lifestyle for a Healthy pregnancy Outcome*. J Am Diet Assoc 2008, 553-61
98. Moreno Castilla, Hernandez M *Low carbohydrate diet for the treatment of gestational diabetes mellitus: a randomized controlled trial*. Diabetes Care 2013 Aug; 36(8): 2233–2238.
99. Thangaratinam S, Rogozinska E, *Health interventions to reduce or prevent obesity in pregnant women: a systematic review*. Techn Assessment 2012 Jul;16(31):iii-iv, 1-191
100. Position of the American Dietetic Association; *Nutrition and Lifestyle for a Healthy pregnancy Outcome*. J Am Diet Assoc 2008, 553-61
101. Ceysens G, Rouiller D *Exercise for diabetic pregnant women*, Cochrane Database Syst Rev, 2006
102. Clapp J.F *Effects of diet and exercise on insulin resistance during pregnancy* Metab Syndr Relat Disord. 2006 Summer;4(2):84-90
103. Torlone E, Di Cianni- *Insulin analogs and pregnancy: an update*, Acta Diabetologia, 2009: 163-172
104. Jovanovic L, Illic S *Metabolic and immunologic effects of insulin lispro in gestational diabetes*, Diabetes Care 1999, 1422-7
105. Bhattacharyya A. Brown S, *Insulin Lispro and regular insulin in pregnancy*, QJM. 2001 May;94(5):255-60
106. Wyatt J.W, Frias J.L, *Congenital anomaly rate in offspring of mothers with diabetes treated with insulin lispro during pregnancy*, Diabet. Med, 2005, 803-7
107. Plank J, Siebenhofer A, *Systematic review and metaanalysis of short acting insulin analogues in patients with diabetes mellitus*, Arch. Intern Med 2005, 347-44

108. Pettitt D, Ospina P, *Efficacy, safety and lack of immunogenicity of insulin aspart compared with regular human insulin for women with gestational diabetes mellitus*, Diabetes Med, 2007, 1129-35
109. Pollex E.K, Freig D.S, et al *Insulin glargin safety in pregnancy*, Diabetes Care 2010, 29-33
110. Mathiesen E.R, DammP, et al *Basal insulin analogues in diabetic pregnancy: a literature review and baseline results of a randomised, controlled trial in type 1 diabetes*, Diabetes Metab. Res REv 2011, 543-51
111. Simmons D., Thompson C.F, et al *Use of insulin pumps in pregnancies complicated by type 2 diabetes and gestational diabetes in a multiethnic community*, Diabetes Care, 2001, 2078-82
112. Buchanan TA, Xiang AH, et al. *Gestational Diabetes mellitus*, J Clin Invest 2005, 485-91
113. England LJ, Dietz PM et al *Preventing type 2 diabetes: public health implications for women with a history of gestational diabetes mellitus*: Am J Obstet Gynecol. 2009 Apr;200(4):365.e1-8
114. Tobias DK, Hu FB, et al *Healthful dietary patterns and type 2 diabetes mellitus risk among women with history of gestational diabetes mellitus*. Arch Intern Med 2012, 1566-72
115. Ratner RE, *Prevention of type 2 diabetes in women with previous gestational diabetes*. Diabetes Care. 2007 Jul;30 Suppl 2:S242-5
116. Catalano P.M. *Trying to understand gestational diabetes*. Diabet. Med. 2014;31:273–281.
117. Qiu C, Sorensen TK, Luthy DA *A prospective study of maternal serum C reactive protein (CRP) concentrations and risk of gestational diabetes mellitus*. Pediatr Perinat Epidemiol 2004; 18 (5): 377-384
118. Vrachnis N, Belitsos P, Sifakis S et al *Role of adipokines and other inflammatory mediators in gestational diabetes mellitus and previous gestational diabetes mellitus* Int J Endocrinol. 2012; 2012: 549748.
119. Hevey R, Pouw RB, *Sweet turning bitter: carbohydrate sensing of complement in host defence and disease*. Br J Pharmacol. 2021 Jul;178(14):2802-2822
120. Seyed Ahmad Rasoulinejad., *Is there an association between mean platelet volume and diabetic retinopathy? A case-control study*, Caspian J Intern Med. 2021 Mar; 12(2): 129–134
121. Wang J, Li Z, Lin L. *Maternal lipid profiles in women with and without gestational diabetes mellitus*. Medicine. 2019;98(16):15320.

122. Fatemeh Alsadat Rahnemaei *Effect of gestational diabetes mellitus on lipid profile: A systematic review and meta-analysis*. Open Med (Wars). 2022; 17(1): 70–86.
123. Anjum F, Zaini R, Shami A, Rehaili A, Kufia R. *Glycated hemoglobin and lipid profile association among pregnant women in Saudi Arabian population*. Int J Womens Health Reprod Sci. 2019;7(2):216–22.
124. Smith FR. *Hyperlipidemia and premature arteriosclerosis*. Lipids. 1978;13(5):375–7.
125. Valadi H, Ekstrom K, *Exosome mediated transfer of mRNA and microRNA is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Bio, 2007, 654-9
126. Waldenstrom A, Genneback N, *Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells*. Plos One, . 2012;7(4):e34653
127. Lasser C, O’Neil SE, *Exosomes in the nose induce immune cell trafficking and harbour an altered protein cargo in chronic airway inflammation*. J Transl Med, 2016, 181
128. Howitt J, Hill AF. *Exosomes in the pathology of neurodegenerative diseases*. J Biol Chem. 2016 Dec 23;291(52):26589-26597
129. Record M, POirot M, *Emerging concepts on the role of exosomes in lipid metabolic diseases*. Biochimie. 2014, 67-74
130. Castro BM, Prieto M, *Ceramide: a simple shingolipid with unique biophysical properties*. Prog lipid Res, 2014, 53-67
131. Perez- Hernandez D, Gutierrez Vasquez, *The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes*. J Biol Chem. 2013 Apr 26;288(17):11649-61
132. Van den Boorn JG, Dassler J, *Exosomes as nucleic acid nanocarriers*. Adv Drug Deliv Rev. 2013, 331-5
133. Henne WM, Buchkovich NJ, *The ESCRT pathway*. Dev Cell, 2011, 77-91
134. Villaroya C, Baixauli F, *Sorting it out: regulation of exosome loading*. Semin Cancer Biol. 2014, 3-13
135. Airola MV, Hannun YA, *Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases*. Handb Exp Pharmacol, 2013, 57-76
136. Gruenberg, J. & Stenmark, H. *The biogenesis of multivesicular endosomes*. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 5, 317–323 (2004).
137. Slagsvold, T., Pattni, K., Malerod, L. & Stenmark, H. *Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins*. Trends Cell Biol. 16, 317–326 (2006).
138. Woodman, P. G. & Futter, C. E. *Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity*. Curr. Opin. Cell Biol. 20, 408–414 (2008).

139. K. M. Mc Andrews, R Kalluri, *Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer*. Mol. Cancer 2019 Mar 30;18(1):52.
140. M. Matheiu, L Martin, C Thiery, *Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell- to- cell communication*. Nat Cell Biol, 21, 9-17, 2019
141. Street JM, Koritzinsky EH, Glispie DM, *Urine Exosomes: An Emerging Trove of Biomarkers*. Adv Clin Chem. 2017;78:103-122.
142. Machida T, Tomofuji T, Ekuni D *MicroRNAs in Salivary Exosome as Potential Biomarkers of Aging*. Int J Mol Sci. 2015 Sep 7;16(9):21294-309.
143. Qin W, Tsukasaki Y, Dasgupta S, *Exosomes in Human Breast Milk Promote EMT*. Clin Cancer Res. 2016 Sep 1;22(17):4517-24.
144. Yagi Y, Ohkubo T, *Next-generation sequencing-based small RNA profiling of cerebrospinal fluid exosomes*. Neurosci Lett. 2017 Jan 1;636:48-57.
145. Carlos Salomon ,Jennifer Ryan, *Exosomal Signaling during Hypoxia Mediates Microvascular Endothelial Cell Migration and Vasculogenesis*, PLoS One 2013 Jul 8;8(7):e68451
- 146.** Rice GE, Scholz-Romero K, Sweeney E, et al. *The effect of glucose on the release and bioactivity of exosomes from first trimester trophoblast cells*. J Clin Endocrinol Metab. 2015 Oct;100(10):E1280-8.
- 147.** Hamish W King, Michael Z Michael , *Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells* BMC Cancer. 2012 Sep 24;12:421
148. Salomon C, Torres MJ, Kobayashi M, et al. *A gestational profile of placental exosomes in maternal plasma and their effects on endothelial cell migration*. PLoS One. 2014; June 2014;9(6):e98667
149. Mukherjee S, Soe TT, Maxfield FR., *Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails*. J Cell Biol. 1999 Mar 22;144(6):1271-84
150. Mukherjee S, Maxfield FR. *Membrane domains*. Annu Rev Cell Dev Biol. 2004;20:839-66.
151. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Mittelbrunn M, Fernández-Delgado I, Torralba D, Moreno-Gonzalo O, Baldanta S, Enrich C, Guerra S, Sánchez-Madrid F. *ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins*. Nat Commun. 2016 Nov 24;7:13588
152. Gangoda L, Mathivanan S. *Cortactin enhances exosome secretion without altering cargo*. J Cell Biol. 2016 Jul 18;214(2):129-31..

153. Nina Pettersen Hessvik, Alicia Llorente, *Current knowledge on exosome biogenesis and release*, Cellular and Molecular Life Sciences CMLS July 2017, 75(3)
154. L. Blanc, M., Vidal, *New insights into the function of Rab Gtp-ases in the context of exosomal secretion*, Small GTPases. 2018 Mar 4;9(1-2):95-106
155. Hsu C, Morohashi Y, Yoshimura S, *Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C*, J Cell Biol. 2010 Apr 19;189(2):223-32.
156. C. Salomon, G.E. Rice, *Role of Exosomes in Placental Homeostasis and Pregnancy Disorders*, Prog Mol Biol Transl Sci. 2017;145:163-179
157. Carlos Salomon, Sarah Yee *Extravillous trophoblast cells-derived exosomes promote vascular smooth muscle cell migration* Front Pharmacol. 2014 Aug 11;5:175
158. Carlos Salomon¹, Mihar Kobayashi, Keith Ashman, *Hypoxia-Induced Changes in the Bioactivity of Cytotrophoblast-Derived Exosomes*. PLoS One. 2013 Nov 11;8(11):e79636.
159. Yuan Zhang, Yunfeng Liu, Haiying Liu, Wai Ho Tang *Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential*, Cell & Bioscience volume 9, Article number: 19 (2019)
160. Honnorat D., Disse E., Millot L., Mathiotte E., Claret M., Charrie A., Draï J., Garnier L., Maurice C., Durand E., et al. *Are third-trimester adipokines associated with higher metabolic risk among women with gestational diabetes?* Diabetes Metab. 2015;41:393–400
161. Pérez-Pérez A., Maymó J.L., Gambino Y.P., Guadix P., Dueñas J.L., Varone C.L., Sánchez-Margalet V. *Activated translation signaling in placenta from pregnant women with gestational diabetes mellitus: Possible role of leptin*. Horm. Metab. Res. 2013;45:436–442.
162. Williams M.A., Qiu C., Muiy-Rivera M., Vadachkoria S., Song T., Luthy D.A. *Plasma adiponectin concentrations in early pregnancy and subsequent risk of gestational diabetes mellitus*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2004;89:2306–2311
163. Roverso M., Brioschi M., Banfi C., Visentin S., Burlina S., Seraglia R., Traldi P., Lapolla A. *A preliminary study on human placental tissue impaired by gestational diabetes: A comparison of gel-based versus gel-free proteomics approaches*. Eur. J. Mass Spectrom. 2016;22:71–82.
164. Li J., Song L., Zhou L., Wu J., Sheng C., Chen H., Liu Y., Gao S., Huang W. *A MicroRNA Signature in Gestational Diabetes Mellitus Associated with Risk of Macrosomia*. Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. 2015;37:243–252.

165. Zhao C., Dong J., Jiang T., Shi Z., Yu B., Zhu Y., Chen D., Xu J., Huo R., Dai J., et al. *Early Second-Trimester Serum MiRNA Profiling Predicts Gestational Diabetes Mellitus*. PLoS ONE. 2011;6:e23925.
166. Johnstone RM, Adam M, *Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)*. J biol Chem 1987, 9412-20
167. Simpson RJ, Lim JW, *Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential*. Expert Rev Proteomic, 2009, 267-83
168. Vidal M, Sainte- Marie J, *Asymmetric distribution of phospholipids in the membran of vesicles released during in vitro maturation of guinea pig reticulocytes: evidence precluding a role for „aminophospholipid trasnlocase’’* J Cell Physiol, 1989, 455-62
169. Valadi H, Ekstrom K, *Exosome mediated transfer of mRNA and microRNA is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Bio, 2007, 654-9
170. Zhao G., Yang C., Yang J., si colaboratorii *Placental exosome-mediated Bta-miR-499-Lin28B/let-7 axis regulates inflammatory bias during early pregnancy*. Cell Death Dis. 2018 Jun 13;9(6):704
171. Mitchell M. D., Peiris H. N., Kobayashi M., si colaboratorii *Placental exosomes in normal and complicated pregnancy*. American Journal of Obstetrics and Gynecology . Am J Obstet Gynecol. 2015 Oct;213(4 Suppl):S173-81
172. Sheller-Miller S., Choi K., Choi C., Menon R. *Cyclic-recombinase-reporter mouse model to determine exosome communication and function during pregnancy*. American Journal of Obstetrics and Gynecology . Am J Obstet Gynecol. 2019 Nov;221(5):502.e1-502.e12
173. Salomon, C.; Scholz-Romero, K.; Sarker, S.; Sweeney, E.; Kobayashi, M.; Correa, P.; Longo, S.; Duncombe, G.; Mitchell, M.D.; Rice, G.E.; si colaboratorii *Gestational diabetes mellitus is associated with changes in the concentration and bioactivity of placenta-derived exosomes in maternal circulation across gestation*. Diabetes 2016
174. Nakahara, A.; Elfeky, O.; Garvey, C.; Guanzon, D.; Longo, S.A.; Salmon, C. *Exosome Profiles for Normal and Complicated Pregnancies—A Longitudinal Study* Obstet. Gynecol. 2019,
175. Salomon, C.; Sobrevia, L.; Ashman, K.; Illanes S., Mitchell M.D., Rice G.E. *The Role of Placental Exosomes in Gestational Diabetes Mellitus. In Gestational Diabetes-Causes, Diagnosis and Treatment*; InTech, 2013
176. Rice, G.E.; Scholz-Romero, K.; Sweeney, E.; Peiris, H.; Kobayashi, M.; Duncombe, G.; Mitchell, M.D.; Salomon, C. *The effect of glucose on the release and bioactivity of*

- exosomes from first trimester trophoblast cells*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2015, Oct;100(10):E1280-8
177. Jayabalan, N.; Lai, A.; Nair, S.; Guanzon, D.; Scholz-Romero, K.; Palma, C.; McIntyre, H.D.; Lappas, M.; Salomon, C. *Quantitative Proteomics by SWATH-MS Suggest an Association Between Circulating Exosomes and Maternal Metabolic Changes in Gestational Diabetes Mellitus*. Proteomics 2019 Jan;19(1-2):e1800164
 178. N.; Nair, S.; Nuzhat, Z.; Rice, G.E.; Zuñiga, F.A.; Sobrevia, L.; Leiva, A.; Sanhueza, C.; Gutiérrez, J.A.; Lappas, M.; si colaboratorii *Cross talk between adipose tissue and placenta in obese and gestational diabetes mellitus pregnancies via exosomes*. Front. Endocrinol. 2017 Sep 27;8:239.
 179. Mitchell MD, Peiris HN, Kobayashi M, et al. *Placental exosomes in normal and complicated pregnancy*. Am J Obstet Gynecol. 2015;213:S173-S181.
 180. van der Pol E, Boing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. Pharmacol Rev. 2012;64:676-705.
 181. Gercel-Taylor C, O'Connor SM, Lam GK, Taylor DD. Shed membrane fragment modulation of CD3-zeta during pregnancy: link with induction of apoptosis. J Reprod Immunol. 2002;56:29-44.
 182. Mincheva-Nilsson L, Baranov V. *The role of placental exosomes in reproduction*. Am J Reprod Immunol. 2010;63:520-533.
 183. Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. *Adiponectin: Action, regulation and association to insulin sensitivity*. Obes Rev. 2005;6:13–21..
 184. Zavalza-Gómez AB, Anaya-Prado R, Rincón-Sánchez AR, Mora-Martínez JM. *Adipokines and insulin resistance during pregnancy*. Diabetes Res Clin Pract. 2008;80:8–15.
 185. Catalano PM. *Trying to understand gestational diabetes*. Diabet Med. 2014;31:273–281.
 186. Van Assche FA, Aerts L, De Prins F. *A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy*. Br J Obstet Gynaecol. 1978;85:818–820.
 187. Paganoti CF, da Costa RA, Oliveira AMDSS, Hoshida MS, Francisco RPV. *Adiponectin does not improve the prediction of insulin need in pregnant women with gestational diabetes mellitus*. Endocrine and Metabolic Science. 2021;3(100095)
 188. Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. *Adiponectin: Action, regulation and association to insulin sensitivity*. Obes Rev. 2005;6:13–21.

189. Zavalza-Gómez AB, Anaya-Prado R, Rincón-Sánchez AR, Mora-Martínez JM. *Adipokines and insulin resistance during pregnancy*. Diabetes Res Clin Pract. 2008;80:8–15.
190. Powe CE, Allard C, Battista MC, Doyon M, Bouchard L, Ecker JL, Perron P, Florez JC, Thadhani R, Hivert MF. *Heterogeneous contribution of insulin sensitivity and secretion defects to gestational diabetes mellitus*. Diabetes Care. 2016;39:1052–1055
191. Herath RP, Siriwardana SR, Ekanayake CD, Abeysekara V, Kodithuwakku SUA, Herath HP. *Non-alcoholic fatty liver disease and pregnancy complications among Sri Lankan women: A cross sectional analytical study*. PLoS One. 2019;14(e0215326)
192. Yarrington CD, Cantonwine DE, Seely EW, McElrath TF, Zera CA. *The association of early unexplained elevated alanine aminotransferase with large-for-gestational-age birthweight*. Am J Obstet Gynecol. 2016;215:e471–e475.
193. Hoegsberg B, Gruppuso PA, Coustan DR. *Hyperinsulinemia in macrosomic infants of nondiabetic mothers*. Diabetes Care. 1993;16:32–36.
194. Institute of Medicine (US) and National Research Council (US) Committee to Reexamine IOM Pregnancy Weight Guidelines: Weight gain during pregnancy: Reexamining the guidelines. Rasmussen KM and Yaktine AL (eds). National Academies Press (US), Washington, DC, 2009.
195. Catalano PM, Shankar K. *Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child*. BMJ. 2017;8(356)
196. Jingya Wang, Songying Shen, Malcolm James Price, Xiu Qiu, Kar Keung Cheng, Krishnarajah Nirantharakumar, *Glucose, Insulin, and Lipids in Cord Blood of Neonates and Their Association with Birthweight: Differential Metabolic Risk of Large for Gestational Age and Small for Gestational Age Babies*, VOLUME 220, P64-72.E2, MAY 2020. The Journal of Pediatrics.
197. APGAR V. *A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant*. Curr Res Anesth Analg. 1953;32:260–267.
198. National Institute for Health and Care Excellence: Guidelines. National Institute for Health and Care Excellence (NICE), London, 2003.
199. Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. *Use and abuse of HOMA modelling*. Diabetes Care. 2004;27:1487–1495.
200. Ezenwaka CE, Kalloo R, Uhlig M, Schwenk R, Eckel J. *Serum adiponectin levels and enzyme markers of liver dysfunction in diabetic and non-diabetic caribbean subjects*. Br J Biomed Sci. 2006;63:117–122.

201. Antwi J, Proulx W, Sullivan S, Lavin R, Bellavia M. *Serum Leptin is associated with fasting plasma glucose and serum insulin levels independent of PI in Haitian Americans with type 2 diabetes*. FASEB J. 2018;32(670.9)
202. Jin WY, Lin SL, Hou RL, Chen XY, Han T, Jin Y, Tang L, Zhu ZW, Zhao ZY. *Associations between maternal lipid profile and pregnancy complications and perinatal outcomes: A population-based study from China*. BMC Pregnancy Childbirth. 2016;16(60)
203. Retnakaran R, Ye C, Hanley AJ, Connelly PW, Sermer M, Zinman B, Hamilton JK. *Effect of maternal weight, adipokines, glucose intolerance and lipids on infant birth weight among women without gestational diabetes mellitus*. CMAJ. 2012;184:1353–1360.
204. Wang J, Li Z, Lin L. *Maternal lipid profiles in women with and without gestational diabetes mellitus*. Medicine (Baltimore) 2019;98(e15320)
205. Liu D, Wu L, Gao X. *Changes of insulin and C-peptide in pregnancy of gestational diabetes mellitus*. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 1999;34:717–719.
206. Sarkar M, Grab J, Dodge JL, Gunderson EP, Rubin J, Irani RA, Cedars M, Terrault N. *Non-alcoholic fatty liver disease in pregnancy is associated with adverse maternal and perinatal outcomes*. J Hepatol. 2020;73:516–522.
207. Atsawarungruangkit A, Chenbhanich J, Dickstein C. *C-peptide as a key risk factor for non-alcoholic fatty liver disease in the United States population*. World J Gastroenterol. 2018;24:3663–3670.
208. Festa A, Shnawa N, Schernthaner G, Haffner SM. *Proinsulin in pregnant women with normal glucose tolerance or mild gestational diabetes mellitus*. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 1999;107:447–452.
209. Ardigo D, Numeroso F, Valtuena S, Franzini L, Piatti PM, Monti L, Delsignore R, Reaven GM, Zavaroni I. *Hyperinsulinemia predicts hepatic fat content in healthy individuals with normal transaminase concentrations*. Metabolism. 2005;54:1566–1570.
210. Caballeria L, Pera G, Auladell MA, Toran P, Munoz L, Miranda D, Aluma A, Casas JD, Sanchez C, Gil D, et al. *Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population in Spain*. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2010;22:24–32.
211. Bajaj S, Nigam P, Luthra A, Pandey RM, Kondal D, Bhatt SP, Wasir JS, Misra A. *A case-control study on insulin resistance, metabolic co-variates & prediction score in non-alcoholic fatty liver disease*. Indian J Med Res. 2009;129:285–292.

212. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. *Central nervous system control of food intake and body weight*. Nature. 2006;443:289–295.
213. Thorens B, Guillam MT, Beermann F, Burcelin R, Jaquet M. *Transgenic reexpression of GLUT1 or GLUT2 in pancreatic β cells rescues GLUT2-null mice from early death and restores normal glucose-stimulated insulin secretion*. J Biol Chem. 2000;275:23751–23758.
214. Tsai PJ, Yu CH, Hsu SP, Lee YH, Huang IT, Ho SC, Chu CH. *Maternal plasma adiponectin concentrations at 24 to 31 weeks of gestation: Negative association with gestational diabetes mellitus*. Nutrition. 2005;21:1095–1099.
215. Cseh K, Baranyi E, Melczer Z, Kaszás E, Palik E, Winkler G. *Plasma adiponectin and pregnancy-induced insulin resistance*. Diabetes Care. 2004;27:274–275.
216. Zhu Y, Hedderson MM, Quesenberry CP, Feng J, Ferrara A. *Liver enzymes in early to mid-pregnancy, insulin resistance, and gestational diabetes risk: A longitudinal analysis*. Front Endocrinol (Lausanne) 2018;9(581)
217. Fraser A, Harris R, Sattar N, Ebrahim S, Smith GD, Lawlor DA. *Alanine aminotransferase, gamma-glutamyltransferase and incident diabetes: The british Women's heart and health study and meta-analysis*. Diabetes Care. 2009;32:741–750.
218. Ruhl CE, Everhart JE. *Elevated serum alanine aminotransferase and gamma-glutamyltransferase and mortality in the United States population*. Gastroenterology. 2009;136:477–485.e11.
219. Kunutsor SK, Apekey TA, Walley J. *Liver aminotransferases and risk of incident type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis*. Am J Epidemiol. 2013;178:159–171.
220. Bacq Y. *The liver in normal pregnancy*. Madame Curie Bioscience Database. Landes Bioscience, Austin, TX, 2000-2013.
221. Song S, Zhang Y, Qiao X, Duo Y, Xu J, Peng Z, Zhang J, Chen Y, Nie X, Sun Q, et al. *ALT/AST as an independent risk factor of gestational diabetes mellitus compared with TG/HDL-C*. Int J Gen Med. 2022;15:115–121
222. APGAR V. *A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant*. Curr Res Anesth Analg. 1953;32:260–267
223. Wiznitzer A, Furman B, Zuili I, Shany S, Reece EA, Mazor M. *Cord leptin level and fetal macrosomia*. Obstet Gynecol. 2000;96:707–713.
224. Lee YS, Cho YK, Pae JC, Oh SY, Kang MS, Park JH, Kim HJ, Park DI, Sohn CI, Jeon WK, et al. *The relationship between serum adiponectin level and serum alanine*

- aminotransferase elevation in Korean male with nonalcoholic fatty liver disease. Korean J Hepatol.* 2006;12:221–229.
225. Kazumi T, Kawaguchi A, Hirano T, Yoshino G. *Serum alanine aminotransferase is associated with serum adiponectin, C-reactive protein and apolipoprotein B in young healthy men.* *Horm Metab Res.* 2006;38:119–124.
226. Vitoratos N, Salamalekis E, Kassanos D, Loghis C, Panayotopoulos N, Kouskouni E, Creatsas G. *Maternal plasma leptin levels and their relationship to insulin and glucose in gestational-onset diabetes.* *Gynecol Obstet Invest.* 2001;51:17–21.
227. Thagaard IN, Krebs L, Holm JC, Lange T, Larsen T, Christiansen M. *Adiponectin and leptin as first trimester markers for gestational diabetes mellitus: A cohort study.* *Clin Chem Lab Med.* 2017;55:1805–1812.
228. Kautzky-Willer A, Pacini G, Tura A, Biegelmayer C, Schneider B, Ludvik B, Prager R, Waldhäusl W. *Increased plasma leptin in gestational diabetes.* *Diabetologia.* 2001;44:164–172.
229. Sacks DA. *Etiology, detection and management of fetal macrosomia in pregnancies complicated by diabetes mellitus.* *Clin Obstet Gynecol.* 2007;50:980–989.
230. Miao M, Dai M, Zhang Y, Sun F, Guo X, Sun G. *Influence of maternal overweight, obesity and gestational weight gain on the perinatal outcomes in women with gestational diabetes mellitus.* *Sci Rep.* 2017;7(305)
231. Hill B, Bergmeier H, McPhie S, Fuller-Tyszkiewicz M, Teede H, Forster D, Spiliotis BE, Hills AP, Skouteris H. *Is parity a risk factor for excessive weight gain during pregnancy and postpartum weight retention? A systematic review and meta-analysis.* *Obes Rev.* 2017;18:755–764.
232. VanWiden K, Montoro M, Korst LM, Ouzounian JG. *A homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) relates to gestational diabetes, glycemic control.* *Obstet Gynecol.* 2017;129(112S)
233. Lin J, Jin H, Chen L. *Associations between insulin resistance and adverse pregnancy outcomes in women with gestational diabetes mellitus: A retrospective study.* *BMC Pregnancy Childbirth.* 2021;21(526)
234. Harris HE, Ellison GT, Holliday M. *Is there an independent association between parity and maternal weight gain?* *Ann Hum Biol.* 1997;24:507–519.
235. Catalano PM, Kirwan JP, Haugel-de Mouzon S, King J. *Gestational diabetes and insulin resistance: Role in short- and long-term implications for mother and fetus.* *J Nutr.* 2003;133 (5 Suppl 2):1674S–1683S.

236. M Ekelund , N Shaat, P Almgren, L Groop, K Berntorp, *Prediction of postpartum diabetes in women with gestational diabetes mellitus*, Diabetologia 2010 Mar;53(3):452-7.
237. Jimena Pereda, Isabel Bove, Maria M. Pineyro *Excessive Maternal Weight and Diabetes Are Risk Factors for Macrosomia: A Cross-Sectional Study of 42,663 Pregnancies in Uruguay*, Front Endocrinol (Lausanne). 2020; 11: 588443.
238. Naishi Li , Jingyuan Fu , Debby P Koonen Jan Albert Kuivenhoven , Harold Snieder , Marten H Hofker *Are hypertriglyceridemia and low HDL causal factors in the development of insulin resistance?*, Atherosclerosis, 2014 Mar;233(1):130-8.
239. Malin Hedlund, Olga Nagaeva, *Thermal- and Oxidative Stress Causes Enhanced Release of NKG2D Ligand-Bearing Immunosuppressive Exosomes in Leukemia/Lymphoma T and B Cells*, PLoS One. 2011 Feb 25;6(2):e16899
240. Jayabalan N, Lai A, Nair S, et al. *Quantitative Proteomics by SWATH-MS suggest an association between circulating exosomes and maternal metabolic changes in gestational diabetes mellitus*. Proteomics 2019;
241. Carlos Salomon, Katherin Scholz-Romero, Suchismita Sarker, Emma Sweeney , Miharu Kobayashi, Paula Correa, Sherri Longo „*Gestational Diabetes Mellitus Is Associated With Changes in the Concentration and Bioactivity of Placenta-Derived Exosomes in Maternal Circulation Across Gestation*” Carlos Salomon, Diabetes, 2016 Mar;65(3):598-609.
242. Nawaz M., Camussi G., Valadi H., Nazarenko I., Ekstrom K., Wang X., Principe S., Shah N., Ashraf N.M., Fatima F., et al. *The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers*. Nat Rev Urol. 2014 Dec;11(12):688-701
243. Cunnane, E.M, Weinbaum, J.S.; O'Brien, F.J.; Vorp, D.A. *Future Perspectives on the Role of Stem Cells and Extracellular Vesicles in Vascular Tissue Regeneration*. Front. Cardiovasc. Med. 2018, 5, 86.
244. Willms, E. Cabañas, C.; Mäger, I.; Wood, M.J.A.; Vader, P. *Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression*. Front. Immunol. 2018, 9, 738.
245. Jayabalan, N.; Lai, A.; Nair, S.; Guanzon, D.; Scholz-Romero, K.; Palma, C.; McIntyre, H.D.; Lappas, M.; Salomon, C. *Quantitative Proteomics by SWATH-MS Suggest an*

Association Between Circulating Exosomes and Maternal Metabolic Changes in Gestational Diabetes Mellitus. Proteomics 2019, 19, e1800164.

246. Ramanjaneya, M.; Butler, A.E.; Alkasem, M.; Bashir, M.; Jerobin, J.; Godwin, A.; Moin, A.S.M.; Ahmed, L.; Elrayess, M.A.; Hunt, S.C.; et al. *Association of Complement-Related Proteins in Subjects with and Without Second Trimester Gestational Diabetes.* Front. Endocrinol. 2021, 12, 641361.
247. Richani, K.; Soto, E.; Romero, R.; Espinoza, J.; Chaiworapongsa, T.; Nien, J.K.; Edwin, S.; Kim, Y.M.; Hong, J.S.; Mazor, M. *Normal Pregnancy Is Characterized by Systemic Activation of the Complement System.* J. Matern. Fetal. Neonatal Med. 2005, 17, 239–245.
248. Copenhaver, M.; Yu, C.-Y.; Hoffman, R.P. *Complement Components, C3 and C4, and the Metabolic Syndrome.* Curr. Diabetes Rev. 2019, 15, 44–48.
249. Ghosh, P.; Sahoo, R.; Vaidya, A.; Chorev, M.; Halperin, J.A. *Role of Complement and Complement Regulatory Proteins in the Complications of Diabetes.* Endocr. Rev. 2015, 36, 272–288.
250. Brenner B. *Haemostatic changes in pregnancy.* Thromb Res. 2004;114:409–414.
251. Kim, J.A.; Kim, J.E.; Song, S.H.; Kim, H.K. *Influence of Blood Lipids on Global Coagulation Test Results.* Ann. Lab. Med. 2015, 35, 15–21
252. Teliga-Czajkowska, J.; Sienko, J.; Zareba-Szczudlik, J.; Malinowska-Polubiec, A.; Romejko-Wolniewicz, E.; Czajkowski, K. *Influence of Glycemic Control on Coagulation and Lipid Metabolism in Pregnancies Complicated by Pregestational and Gestational Diabetes Mellitus.* Adv. Exp. Med. Biol. 2019, 1176, 81–88.
253. Chang G, Mouillet JF, Mishima T, et al. *Expression and trafficking of placental microRNAs at the feto-maternal interface..* FASEB J. 2017 Jul;31(7):2760-2770
254. van der Pol E, Boing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. *Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles.* Pharmacol Rev. 2012;64:676-705.
255. Gercel-Taylor C, O'Connor SM, Lam GK, Taylor DD. *Shed membrane fragment modulation of CD3-zeta during pregnancy: link with induction of apoptosis.* J Reprod Immunol. 2002;56:29-44.
256. Hevey R, Pouw RB, Harris C, Ricklin D (2020) *Sweet turning bitter: carbohydrate sensing of complement in host defence and disease.* Br J Pharmacol. 2021 Jul;178(14):2802-2822

257. Wang J, Li Z, Lin L. *Maternal lipid profiles in women with and without gestational diabetes mellitus*. Medicine. 2019;98(16):15320.
258. Anjum F, Zaini R, Shami A, Rehaili A, Kufia R. *Glycated hemoglobin and lipid profile association among pregnant women in Saudi Arabian population*. Int J Womens Health Reprod Sci. 2019;7(2):216–22.
259. Smith FR. *Hyperlipidemia and premature arteriosclerosis*. Lipids. 1978;13(5):375–7.
260. Engström, G. Hedblad, B. Eriksson, K.F, Janzon, L. Lindgärde, F. *Complement C3 Is a Risk Factor for the Development of Diabetes: A Population-Based Cohort Study*. Diabetes 2005, 54, 570–575.
261. Engström, G. Hedblad, B. Berglund, G. Janzon, L. Lindgärde, F. *Plasma Levels of Complement C3 Is Associated with Development of Hypertension: A Longitudinal Cohort Study*. J. Hum. Hypertens. 2007, 21, 276–282.
262. Muscari, A, Bozzoli, C. Puddu, G.M. Sangiorgi, Z, Dormi, A. Rovinetti, C. Descovich, G.C.; Puddu, P. *Association of Serum C3 Levels with the Risk of Myocardial Infarction*. Am. J. Med. 1995, 98, 357–364.
263. Weyer, C.; Tataranni, P.A.; Pratley, R.E. *Insulin Action and Insulinemia Are Closely Related to the Fasting Complement C3, but Not Acylation Stimulating Protein Concentration*. Diabetes Care 2000, 23, 779–785.
264. Wlazlo, N, Van Greevenbroek, M.M.J, Ferreira, I., Feskens, E.J.M, Van Der Kallen, C.J.H.; Schalkwijk, C.G.; Bravenboer, B.; Stehouwer, C.D.A. *Complement Factor 3 Is Associated with Insulin Resistance and with Incident Type 2 Diabetes over a 7-Year Follow-up Period: The CODAM Study*. Diabetes Care 2014, 37, 1900–1909.
265. Sriboonvorakul, N, Tan, B.K, Hu, J, Boriboonhirunsarn, D.; Ng, L.L. *Proteomics Studies in Gestational Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis*. J. Clin. Med. 2022, 11, 2737.
266. Ghosh, P. Sahoo, R. Vaidya, A. Chorev, M. Halperin, J.A. *Role of Complement and Complement Regulatory Proteins in the Complications of Diabetes*. Endocr. Rev. 2015, 36, 272–288.
267. O’Riordan, M.N.; Higgins, J.R. *Haemostasis in Normal and Abnormal Pregnancy*. Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 2003, 17, 385–396.
268. Ozbasli, E. Takmaz, O. Karabuk, E, Gungor, M. *Comparison of Factor XII Levels in Gestational Diabetes, Fetal Macrosomia, and Healthy Pregnancies*. BMC Pregnancy Childbirth 2020, 20, 752.

269. Kennelly, M.A.; Killeen, S.L.; Phillips, C.M.; Alberdi, G.; Lindsay, K.L.; Mehegan, J.; Cronin, M.; McAuliffe, F.M. *Maternal C3 Complement and C-Reactive Protein and Pregnancy and Fetal Outcomes: A Secondary Analysis of the PEARS RCT-An MHealth-Supported, Lifestyle Intervention among Pregnant Women with Overweight and Obesity*. *Cytokine* 2022, 149, 155748.
270. Onat, A, Hergenç, G, Can, G.; Kaya, Z.; Yüksel, H. *Serum Complement C3: A Determinant of Cardiometabolic Risk, Additive to the Metabolic Syndrome, in Middle-Aged Population*. *Metabolism* 2010, 59, 628–634.
271. Schmeidler-Sapiro, K.T, Ratnoff, O.D, Gordon, E.M. *Mitogenic Effects of Coagulation Factor XII and Factor XIIa on HepG2 Cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991, 88, 4382–4385.
272. Janciauskiene, S.M, Bals, R. Koczulla, R. Vogelmeier, C. Köhnlein, T. Welte, T. *The Discovery of A1-Antitrypsin and Its Role in Health and Disease*. *Respir. Med.* 2011, 105, 1129–1139.
273. Ganrot, P.O.; Gydell, K.; Ekelund, H. *Serum Concentration of Alpha-2-Macroglobulin, Haptoglobin and Alpha-1-Antitrypsin in Diabetes Mellitus*. *Acta Endocrinol.* 1967, 55, 537–544.
274. Lisowska-Myjak, B. Sygitowicz, G. Wolf, B.; Pachecka, J. *Serum Alpha-1-Antitrypsin Concentration during Normal and Diabetic Pregnancy*. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2001, 99, 53–56
275. Yaghmaei, M. Hashemi, M. Shikhzadeh, A, Mokhtari, M, Niazi, A. Ghavami, S. *Serum Trypsin Inhibitory Capacity in Normal Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus*. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2009, 84, 201–204.
276. Guttman, O, Yossef, R. Freixo-Lima, G. Rider, P. Porgador, A. Lewis, E.C. *A1-Antitrypsin Modifies General NK Cell Interactions with Dendritic Cells and Specific Interactions with Islet β -Cells in Favor of Protection from Autoimmune Diabetes*. *Immunology* 2014, 144, 530–539.
277. Gottlieb, P.A.; Alkanani, A.K.; Michels, A.W.; Lewis, E.C.; Shapiro, L.; Dinarello, C.A.; Zipris, D. *A1-Antitrypsin Therapy Downregulates Toll-like Receptor-Induced IL-1 β Responses in Monocytes and Myeloid Dendritic Cells and May Improve Islet Function in Recently Diagnosed Patients with Type 1 Diabetes*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2014, 99, E1418–E1426.

278. Zhang, B. Lu, Y. Campbell-Thompson, M. Spencer, T., Wasserfall, C.; Atkinson, M.; Song, S. *Alpha1-Antitrypsin Protects Beta-Cells from Apoptosis*. Diabetes 2007, 56, 1316–1323.
279. Sharpe, P.C.; Trinick, T. *Mean Platelet Volume in Diabetes Mellitus*. Q J. Med. 1993, 86, 739–742.
280. Rao, A.K.; Golberg, R.E.; Walsh, P.N. *Platelet Coagulant Activities in Diabetes Mellitus. Evidence for Relationship between Platelet Coagulant Hyperactivity and Platelet Volume*. J. Lab. Clin. Med. 1984, 1, 82–92
281. Bath, P.M.; Butterworth, R. *Platelet Size: Measurement, Physiology and Vascular Disease*. Blood Coagul. Fibrinolysis 1996, 2, 157–161.
282. Bozkurt, N.; Yılmaz, E.; Biri, A.; Taner, Z.; Himmetoğlu, Ö. *The Mean Platelet Volume in Gestational Diabetes*. J. Thromb. Thrombolysis. 2006, 22, 51–54
283. Erikçi, A.A.; Muhçu, M.; Dünder, Ö.; Öztürk, A. *Could Mean Platelet Volume Be a Predictive Marker for Gestational Diabetes Mellitus?* Hematology 2008, 13, 46–48.
284. Yin, S.; Li, Y.; Xie, S.; Ma, L.; Wu, Y.; Nie, D.; Feng, J.; Xu, L. *Study on the Variation of Platelet Function in Pregnancy Induced Hypertension and Gestational Diabetes Mellitus*. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2005, 40, 25–28.
285. Nadar, S.K.; Blann, A.D.; Kamath, S.; Beevers, D.G.; Lip, G.Y.H. *Platelet Indexes in Relation to Target Organ Damage in High-Risk Hypertensive Patients: A Substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial (ASCOT)*. J. Am. Coll. Cardiol. 2004, 44, 415–422.
286. Furman-Niedziejko, A.; Rostoff, P.; Rychlak, R.; Golinska-Grzybala, K.; Wilczynska-Golonka, M.; Golonka, M.; Nessler, J. *Relationship between Abdominal Obesity, Platelet Blood Count and Mean Platelet Volume in Patients with Metabolic Syndrome*. Folia. Med. Cracov. 2014, 2, 55–64.
287. Osinski, M.; Mantaj, U.; Kędzia, M.; Gutaj, P.; Wender-Ożegowska, E. *Poor Glycaemic Control Contributes to a Shift towards Prothrombotic and Antifibrinolytic State in Pregnant Women with Type 1 Diabetes Mellitus*. PLoS ONE 2020, 15, e0237843.
288. Ishii, M.; Kameyama, M.; Inokuchi, T.; Isogai, S. *Plasma Fibrinopeptide A Levels during Insulin-Induced Plasma Glucose Falls in Diabetics*. Diabetes Res. Clin. Pract. 1987, 4, 45–50.
289. Ajjan, R.A.; Gamlen, T.; Standeven, K.F.; Mughal, S.; Hess, K.; Smith, K.A.; Dunn, E.J.; Maqsood Anwar, M.; Rabbani, N.; Thornalley, P.J.; et al. *Diabetes Is Associated with*

- Posttranslational Modifications in Plasminogen Resulting in Reduced Plasmin Generation and Enzyme-Specific Activity.* Blood 2013, 122, 134–142.
290. Ramanjaneya, M.; Butler, A.E.; Alkasem, M.; Bashir, M.; Jerobin, J.; Godwin, A.; Moin, A.S.M.; Ahmed, L.; Elrayess, M.A.; Hunt, S.C.; et al. *Association of Complement-Related Proteins in Subjects with and Without Second Trimester Gestational Diabetes.* Front. Endocrinol. 2021, 12, 641361.
 291. Gang, L.; Yanyan, Z.; Zhongwei, Z.; Juan, D. *Association between Mean Platelet Volume and Hypertension Incidence.* Hypertens. Res. 2017, 40, 779–784.
 292. Osiński, M.; Mantaj, U.; Kędzia, M.; Gutaj, P.; Wender-Ożegowska, E. *Poor Glycaemic Control Contributes to a Shift towards Prothrombotic and Antifibrinolytic State in Pregnant Women with Type 1 Diabetes Mellitus.* PLoS ONE 2020, 15, e0237843.
 293. Kebapcilar, L.; Kebapcilar, A.G.; Ilhan, T.T.; Ipekci, S.H.; Baldane, S.; Pekin, A.; Kulaksizoglu, M.; Celik, C. *Is the Mean Platelet Volume a Predictive Marker of a Low Apgar Score and Insulin Resistance in Gestational Diabetes Mellitus? A Retrospective Case-Control Study.* J. Clin. Diagn. Res. 2016, 10, OC06–OC10.
 294. Lenting, P.; Denis, C.; Wohner, N. *Von Willebrand Factor and Thrombosis: Risk Factor, Actor and Pharmacological Target.* Curr. Vasc. Pharmacol. 2013, 11, 448–456.
 295. Béliard, S.; Nogueira, J.P.; Maraninchi, M.; Lairon, D.; Nicolay, A.; Giral, P.; Portugal, H.; Vialettes, B.; Valéro, R. *Parallel Increase of Plasma Apoproteins C-II and C-III in Type 2 Diabetic Patients.* Diabet. Med. 2009, 26, 736–739.
 296. Kopylov, A.T.; Papysheva, O.; Gribova, I.; Kotaysch, G.; Kharitonova, L.; Mayatskaya, T.; Sokerina, E.; Kaysheva, A.L.; Morozov, S.G. *Molecular Pathophysiology of Diabetes Mellitus during Pregnancy with Antenatal Complications.* Sci. Rep. 2020, 10, 19641.
 297. Tanaka, Y.; Chambers, J.K.; Matsuwaki, T.; Yamanouchi, K.; Nishihara, M. *Possible Involvement of Lysosomal Dysfunction in Pathological Changes of the Brain in Aged Progranulin-Deficient Mice.* Acta Neuropathol. Commun. 2014, 2, 78.
 298. Phieler, J.; Garcia-Martin, R.; Lambris, J.D.; Chavakis, T. *The Role of the Complement System in Metabolic Organs and Metabolic Diseases.* Semin. Immunol. 2013, 25, 47–53.
 299. Klop, B.; Van Der Pol, P.; Van Bruggen, R.; Wang, Y.; De Vries, M.A.; Van Santen, S.; O'Flynn, J.; Van De Geijn, G.J.M.; Njo, T.L.; Janssen, H.W.; et al. *Differential Complement Activation Pathways Promote C3b Deposition on Native and Acetylated LDL Thereby Inducing Lipoprotein Binding to the Complement Receptor 1.* J. Biol. Chem. 2014, 289, 35421–35430.