

نقش نشانگرهای متابولیک، التهابی و مولکولی در پیشگویی و تشخیص دیابت بارداری

● فاطمه سیف

کارشناس علوم آزمایشگاهی، گروه علوم
آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه
علوم پزشکی شیراز

fatemehseif2778@gmail.com



● دکتر فاطمه اسدیان

استادیار پاتولوژی، گروه علوم آزمایشگاهی،
دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی
شیراز

asadian@sums.ac.ir



● دکتر محمد علی تخشید

استاد تمام بیوشیمی بالینی، گروه علوم
آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه
علوم پزشکی شیراز

takhshidma@sums.ac.ir



● محدثه جعفرپور

کارشناس علوم آزمایشگاهی، گروه علوم
آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه
علوم پزشکی شیراز

m.jafarpour8010@gmail.com



□ خلاصه

دیابت بارداری (gestational diabetes mellitus; GDM) نوعی دیابت شیرین است که اولین بار در دوره بارداری شروع و یا شناسایی می‌گردد. دیابت بارداری حدود پنج درصد موارد بارداری را تشکیل می‌دهد و شیوع آن به موازات افزایش شیوع دیابت و چاقی در جهان رو به افزایش است. دیابت بارداری همراه با عوارض کوتاه مدت و بلند مدت برای مادر و جنین می‌باشد. از این رو تشخیص زود هنگام و درمان آن مورد تاکید می‌باشد. آزمون تحمل گلوکز (OGTT) که در هفته ۲۴ تا ۲۸ بارداری انجام می‌گیرد روش استاندارد تشخیص GDM می‌باشد. از آنجایی که برخی تغییرات پاتوفیزیولوژیک که موجب ایجاد دیابت بارداری می‌شوند مدت‌ها قبل از بروز بیماری رخ می‌دهند، تشخیص زود

هنگام این بیماری به کمک نشانگرهای زیستی نقش مهمی در پیشگیری از عوارض آن دارد. در این مقاله مروری ابتدا روش‌های مختلف تشخیص دیابت بارداری معرفی و مقایسه می‌شوند. سپس نقش نشانگرهای مرتبط با تنظیم گلوکز خون، ترکیبات آدیپوکینی، نشانگرهای التهابی، یافته‌های متابولومیک و نشانگرهای مولکولی در پیش بینی دیابت بارداری پرداخته می‌شود.

کلمات کلیدی: دیابت بارداری، نشانگر، متابولومیک، التهابی، ژنتیک

□ مقدمه

مقاومت به انسولین و افزایش سطح گلوکز خون که اولین بار در دوره بارداری شروع و یا تشخیص داده می‌شود، دیابت

بارداری (gestational diabetes mellitus; GDM) نامیده می‌شود (۱). شیوع این بیماری بسته به جمعیت مورد مطالعه و نوع آزمون تشخیصی از ۱ تا ۱۴ درصد گزارش شده است. مقاومت به انسولین و عدم ترشح کافی انسولین جهت جبران افزایش مواد غذایی، تولید هورمون‌های ضد انسولین مانند هورمون جفتی انسان، پرولاکتین، کورتیزول و پروژسترون در ایجاد دیابت بارداری موثرند. در دیابت بارداری میزان پاسخ انسولین به هیپرگلیسمی نصف بارداری طبیعی است. همچنین در بارداری طبیعی حساسیت سلول‌های بتا به گلوکز و اسیدهای آمینه افزایش می‌یابد در حالی که این پاسخ در خانم‌های دارای دیابت بارداری به طور واضحی پایین‌تر است. چاقی، وجود سابقه دیابت نوع دو در خویشاوندان درجه اول، سابقه قبلی دیابت بارداری، گلوکزآوری، سابقه تولد نوزاد با وزن بیش از ۴ کیلوگرم، تولد نوزاد مرد، سن بیشتر از ۲۵ سال و تعلق به برخی گروه‌های نژادی مانند بومیان آمریکایی، اسپانیایی، آسیایی و آفریقایی از عوامل خطر ساز دیابت بارداری محسوب می‌شوند (۲). دیابت بارداری همراه با ایجاد مشکلاتی برای مادر باردار و نوزادان این مادران می‌باشد. نوزادان مادران دارای دیابت بارداری دچار هیپوگلیسمی، هیپربیلی روبینمی و ماکروزومی هستند. همچنین شانس ابتلا مادران با دیابت بارداری به دیابت نوع دو در سال‌های بعد زیاد است. از این رو وجود نشانگرهای دقیق که بتوانند دیابت بارداری را به صورت دقیق و سریع پیشگویی و یا تشخیص دهند ضروری می‌باشد.

نشانگرهای زیستی شاخص‌هایی از فرآیندهای بیولوژیکی طبیعی هستند که می‌توانند برای تشخیص بیماری، نظارت بر پاسخ‌های دارویی و مداخله درمانی و پیش بینی نتیجه بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرند. پیشرفت‌های اخیر در حوزه‌های مختلف آزمایشگاهی منجر به توسعه بیومارکرهای مختلف شده است که در مایعات بیولوژیکی مانند خون کامل، پلاسما و سرم اندازه‌گیری می‌شوند. یک بیومارکر ایده آل دارای ویژگی‌های متعددی است. از جمله اینکه دارای روش اندازه‌گیری مقرون به صرفه، قابل تکرار و دقیق در نمونه‌های زیستی است، این نمونه‌ها به راحتی و از طریق روش‌های غیرتهاجمی قابل دسترس هستند،

به طور پایدار در مایعات بیولوژیکی بیان شود، به تغییرات مربوطه در وضعیت بیماری حساس باشد و تشخیص زود هنگام بیماری را قبل از ظهور علائم بالینی فراهم می‌کند (۳). روش متداول تشخیص GDM آزمون تحمل گلوکز (OGTT) با ۷۵ گرم گلوکز می‌باشد که در هفته‌های ۲۴-۲۸ بارداری انجام می‌شود (۴). با این وجود این زمان برای مداخله و پیشگیری کمی دیر به نظر می‌رسد. از این رو، نشانگرهای زیستی که بتوانند GDM را در سه ماهه اول و قبل از بروز ناهنجاری گلوکز را شناسایی کنند از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشند (۵).

از آنجایی که برخی تغییرات پاتوفیزیولوژیک مدت‌ها قبل از افزایش گلوکز خون اتفاق می‌افتند، می‌توان آزمایش دقیق‌تر و قابل قبول‌تری بر اساس نشانگرهای زیستی برای پیش بینی GDM ایجاد کرد (۶). نقش برخی از تغییرات بیوشیمیایی و مولکولی در بیماری زایی GDM نشان داده شده است. این تغییرات می‌توانند انتخاب مناسبی برای تشخیص زود هنگام GDM باشند. در این مقاله مروری به معرفی این نشانگرها و بررسی مزایا و معایب آن‌ها در تشخیص و پیش بینی دیابت بارداری پرداخته شده است.

■ معیارهای تشخیص دیابت بارداری

تشخیص GDM عمدتاً بر اساس دستورالعمل‌های انجمن بین‌المللی مطالعات دیابت و بارداری (IADSPG) و از طریق آزمون تحمل گلوکز خوراکی (OGTT) ۷۵ گرم گلوکز و بین هفته‌های ۲۴ تا ۲۸ بارداری انجام می‌شود. که بر اساس آن مقدار مساوی و یا بزرگ‌تر از حد برش در یکی از زمان‌های ناشتا، یک و یا دو ساعته به عنوان معیار تشخیص در نظر گرفته می‌شود. این مقادیر عبارتند از ۵/۱ میلی مول در لیتر (۹۲ میلی گرم در دسی لیتر) برای گلوکز پلاسمایی ناشتا، ۱۰ میلی مول در لیتر (۱۸۰ میلی گرم در دسی لیتر) برای گلوکز پلاسمای یک ساعته و ۸/۵ میلی مول در لیتر (۱۵۳ میلی گرم در دسی لیتر) برای نمونه دو ساعته. سازمان بهداشت جهانی (WHO) این معیارها را پذیرفته است (۷).

موسسه ملی بهداشت (NIH) یک تست تشخیصی دو مرحله‌ای بین هفته ۲۴ و ۲۸ بارداری را پیشنهاد می‌کند.



در آزمون دو مرحله‌ای ابتدا آزمون چالش گلوکز (GCT) انجام می‌گیرد. برای انجام این آزمایش نیازی به ناشتا بودن فرد نیست. ۵۰ گرم گلوکز در آب حل شده و در طی ۵ دقیقه به آرامی به خانم باردار داده می‌شود دقیقاً یک ساعت پس از شروع مصرف محلول گلوکز نمونه خون وریدی جهت اندازه‌گیری قند گرفته می‌شود. اگر پس از یک ساعت قند خون بالاتر یا مساوی ۱۴۰ میلی گرم در دسی لیتر بود جهت تأیید دیابت بارداری از آزمایش OGTT استفاده می‌گردد. به این صورت که ابتدا یک نمونه ناشتا گرفته می‌شود و سپس ۱۰۰ گرم گلوکز در آب حل شده و در طی ۵ دقیقه به آرامی به خانم باردار داده می‌شود. دقیقاً یک ساعت، ۲ ساعت و ۳ ساعت پس از شروع مصرف محلول گلوکز نمونه خون وریدی جهت اندازه‌گیری قند گرفته می‌شود. در صورتی که مقدار گلوکز در دو نمونه از چهار نمونه مساوی یا بیشتر از مقادیر مرجع باشد دیابت بارداری قطعی است. استفاده از IADPSG منجر به افزایش شیوع GDM به ۳۵/۵٪ می‌گردد در صورتی که براساس روش دو مرحله‌ای ۱۰/۶٪ تخمین زده شده است. بهبود قابل توجه در نتیجه بارداری و همچنین هزینه کمتر از محاسن دیگر این روش می‌باشد. از اشکالات معیارهای IADPSG نسبت به آزمون دو مرحله‌ای این است که چون مبنای این روش در تشخیص دیابت بارداری وجود یک مقدار گلوکز بالاتر از حد cutoff و در روش دو مرحله‌ای وجود دو مقدار بیشتر از حد cutoff است استفاده از این روش تک مرحله‌ای باعث افزایش تعداد موارد مثبت کاذب GDM می‌گردد (۸).

اگر چه OGTT به عنوان تست تشخیصی GDM توسط سازمان‌های بین‌المللی پذیرفته شده است، اما انجام این آزمون به حداقل ۸ ساعت ناشتایی نیاز دارد. از مشکلات دیگر آن نیاز به آماده‌سازی بیمار، تکرارپذیری کم، زمان زیاد انجام آزمون و ناخوشایندی آن برای زنان باردار است. با توجه به این مشکلات محققان به دنبال یافتن روش‌های جایگزین بوده‌اند. از جمله این روش‌ها به تشخیص دیابت بارداری بر مبنای اندازه‌گیری هموگلوبین گلیکوزیله (HbA1c) می‌باشد. مقدار HbA1c نشان دهنده میانگین غلظت گلوکز خون در دو سه ماه گذشته یک بیمار دیابتی است. پزشکان به طور متداول از سنجش HbA1c برای

پایش وضعیت کنترل قند خون، پاسخ به درمان و خطر ایجاد عوارض دیابت استفاده می‌کنند (۹). اندازه‌گیری HbA1c در هر زمانی از روز امکان پذیر است، در مقایسه با اندازه‌گیری‌های گلوکز، تنوع بیولوژیکی کمتر، تکرارپذیری بالاتر و پایداری تحلیلی بهتری دارد (۱۰). علاوه بر این، آزمایش HbA1c نیازی به ناشتایی ندارد از این رو انجام آن برای برای زنان باردار راحت‌تر از OGTT است. بر اساس نتایج مطالعات مختلف میانگین مقدار HbA1c زنان باردار بدون GDM، بین ۴/۹ تا ۵/۵ درصد گزارش شده است (۱۱). در مطالعات مختلفی میزان کارایی اندازه‌گیری HbA1c در تشخیص دیابت بارداری مورد بررسی قرار گرفته است. نتیجه این مطالعات نشان می‌دهد که میزان HbA1c در دیابت بارداری نسبت به بارداری طبیعی افزایش می‌یابد (۱۴-۱۲). در یکی از این مطالعات نشان داده شده است که میزان ۵/۳٪ HbA1c به عنوان cutoff دارای حساسیت ۹۵/۶٪ و ویژگی ۵۱/۶٪ برای تشخیص GDM می‌باشد به این ترتیب پیشنهاد شده است که در زنانی که میزان HbA1c کمتر از ۵/۳ باشد نیازی به انجام آزمون OGTT نیست با این حال، افرادی که HbA1c غیرطبیعی دارند، به یک OGTT تأییدی نیاز خواهند داشت، زیرا ۵۰ درصد از زنان دارای قند خون با این روش به اشتباه به عنوان مبتلا به GDM طبقه بندی می‌شوند (۱۴). به طور کلی نتایج مطالعات مختلف نشان داده است که اندازه‌گیری HbA1c از حساسیت و ویژگی لازم برای جایگزینی آزمون OGTT برخوردار نیست ولی می‌تواند در کنار انجام این آزمون به تشخیص دیابت بارداری کمک کند. علاوه بر تشخیص دیابت بارداری کاربرد دیگر اندازه‌گیری HbA1c، اندازه‌گیری در سه ماه اول بارداری در زنان جهت پیشگویی ایجاد دیابت بارداری است. مطالعات مختلفی که با این هدف انجام شده است نشان داده است که زنان بارداری که مقدار HbA1c در سه ماهه اول بارداری از حد برش بالاتر باشد احتمال ابتلا آن‌ها به دیابت بارداری بیشتر است (۱۵،۱۶). نتیجه دیگری که از اندازه‌گیری HbA1c در دوران بارداری به دست آمده است این است که مقدار HbA1c به طور قابل توجهی با ناهنجاری گلوکز پس از زایمان مرتبط می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک نشانگر به

پیش بینی خطر ناهنجاری گلوکز پس از زایمان کمک کند (۱۷-۱۹).

■ نشانگرهای پیش بینی کننده دیابت بارداری

علاوه بر نشانگرهایی که در تشخیص دیابت بارداری مورد بررسی قرار می گیرند نشانگرهای زیستی که اندازه گیری آن ها در سه ماهه اول بتواند به پیشگویی ایجاد دیابت بارداری در سه ماه دوم و سوم کمک کند از اهمیت بالایی برخوردار هستند در ادامه به معرفی این نشانگرها پرداخته شده است.

■ نشانگرهای تنظیم گلوکز

یکی از بیومارکرهایی پیش بینی کننده دیابت بارداری غلظت گلوکز ناشتا می باشد. لی و همکاران در مطالعه ای شامل ۲۱۱۲ زن باردار و به این نتیجه رسید که یک گلوکز ناشتا غلظت بیش از ۴/۵ میلی مول در لیتر در طول سه ماهه اول ویژگی و حساسیت بالایی برای پیش بینی GDM دارد (۲۰). نتایج مطالعات مختلف نشان داده است که گلوکز پلاسمایی ناشتا از دقت بیشتری نسبت به سایر عوامل خطر مانند BMI و سن در پیش بینی GDM دارد اما از دقت کمتری نسبت به آزمون OGTT برخوردار است (۲۱). شواهدی وجود دارد که نشان می دهد مقادیر انسولین و پپتید C در حالت ناشتا از حساسیت و ویژگی خوبی برای پیش بینی GDM برخوردار هستند. غلظت انسولین ناشتا و پپتید C در زنان باردار مبتلا به GDM به طور قابل توجهی بالاتر از بارداری طبیعی است (۲۲). ارزیابی مدل هموستاتیک برای مقاومت به انسولین (HOMA-IR) که از مقادیر گلوکز ناشتا و انسولین ناشتا یا پپتید C محاسبه می شود (۲۳) در دیابت بارداری بیش از بارداری طبیعی است و پیش بینی کننده خوبی برای GDM است (۲۴). پروتئین اتصال به هورمون جنسی (SHBG) یک گلیکوپروتئین است که توسط کبد تولید می شود. تولید و غلظت پلاسمایی این پروتئین توسط انسولین، استروژن و پروژسترون کنترل می شود، پروتئین اتصال به هورمون جنسی رابطه معکوس با مقاومت به انسولین دارد و کاهش آن نشانگر و پیش بینی کننده خوبی برای افزایش خطر GDM است (۲۵).

■ نشانگرهای آدیپوکی

لپتین هورمونی است که توسط سلول های چربی، تخمدان ها و جفت تولید می شود و مصرف انرژی را تنظیم می کند در نتیجه تولید توسط جفت میزان لپتین در دوران بارداری افزایش می یابد. میزان این افزایش در دیابت بارداری به طور قابل ملاحظه ای بیش از بارداری طبیعی است و می تواند به پیشگویی دیابت بارداری کمک کند. آدیپونکتین پروتئین دیگری است که توسط سلول های چربی تولید می شود و خاصیت ضد التهابی، تنظیم متابولیسم گلوکز و اسیدهای چرب دارد (۲۶). بر خلاف لپتین، توسط آن تخمدان ها و جفت، تولید نمی شود. مطالعات قبلی نشان داده اند که غلظت آدیپونکتین در دیابت بارداری کاهش می یابد و میزان آن در سه ماهه اول و دوم بارداری در بین زنان مبتلا به GDM کمتر است و می تواند به پیشگویی بروز دیابت بارداری در سه ماهه سوم کمک کند (۵،۲۵).

■ نشانگرهای متابولیک

متابولومیک (metabolomic) که به صورت اندازه گیری متابولیت های موجود در یک نمونه بیولوژیکی تعریف می شود، یک فناوری نوظهور و نویدبخش در تشخیص آزمایشگاهی می باشد. از لحاظ تاریخی، از اندازه گیری متابولیت ها برای تشخیص بیماری های متابولیک و اختلالات تک ژنی مانند خطاهای ذاتی متابولیسم استفاده شده است. ولی فناوری های متابولومیک کنونی قادر به اندازه گیری دقیق صدها متابولیت هستند. در نتیجه، متابولومیک توسعه گسترده ای پیدا نموده است و اهمیت ویژه ای در کشف نشانگرهای زیستی جدید برای تشخیص، پایش و درمان بیماری ها پیدا کرده است. بررسی پروفایل اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب جایگاه مهمی در مطالعات متابولومیک دارد (۲۷). نشان داده است که میزان اسیدهای آمینه شاخه دار شامل والین، لوسین و ایزولوسین در سه ماهه دوم و سوم بارداری در زنان مبتلا به GDM بیش از زنان باردار سالم می باشد. در مورد اسیدهای آمینه آروماتیک شامل تیروزین و فنیل آلانین هم نیز نتایج مشابهی وجود دارد. در بین اسیدهای آمینه سولفوردار گزارش شده است که غلظت سیستمین در GDM بالاتر در حالی که غلظت متیونین



کمتر از مقدار بارداری طبیعی است. اسیدهای چرب آزاد از دیگر متابولیت هایی است که اندازه گیری آن در بررسی متابولومیک بیماری ها از جمله دیابت بارداری مهم است. نشان داده شده است که سطح سرمی اسید چرب آزاد در زنان مبتلا به GDM بیش از دو برابر زنان باردار سالم است (۲۷).

□ نشانگرهای التهابی

با توجه به اینکه پاسخ التهابی در ایجاد دیابت بارداری نقش دارند نشانگرهای التهابی می توانند به عنوان نشانگرهای پیش بینی کننده دیابت بارداری مورد استفاده قرار گیرند. در واقع، مطالعات متعدد نشان داده اند که نشانگرهای التهابی می توانند GDM را در اوایل سه ماهه اول بارداری پیش بینی کنند (۴۹). افزایش پروتئین واکنشی (CRP) در دیابت بارداری نسبت به بارداری طبیعی نشان داده شده است. اگر چه که به دلیل ویژگی کم، به عنوان یک نشانگر مستقل و اختصاصی GDM محسوب نمی گردد. فاکتور نکروز تومور آلفا ($TNF-\alpha$) و اینترلوکین-۶ (IL-6) از سیتوکین های التهابی هستند که در GDM افزایش می یابند. تعداد لکوسیت ها نشانگر زیستی التهاب سیستمیک می باشد. بسیاری از مطالعات گزارش داده اند که زنان مبتلا به GDM به طور قابل توجهی تعداد بالاتری از لکوسیت ها، نوتروفیل ها، لنفوسیت ها و مونوسیت ها را دارا هستند. علاوه بر این، بیشتر مطالعات بالینی گزارش کردند که نسبت این سلول ها به عنوان مثال افزایش نسبت نوتروفیل/لنفوسیت (NLR) مارکر خوبی برای دیابت بارداری هستند (۲۸). پلاکت های فعال شده، کموکاین ها و P-selectin را آزاد می کنند و انواع گیرنده های غشایی درگیر در التهاب را بیان می کنند. یانگ و همکاران گزارش نموده اند که در زنان مبتلا به GDM مقادیر بالاتر پلاکت و مقدار کمتر از میانگین حجم پلاکت (MPV) مشاهده می گردد (۲۹).

□ نشانگرهای مولکولی

از آنجایی که برخی تغییرات پاتوفیزیولوژیک مدت ها قبل از افزایش گلوکز خون اتفاق می افتد، می توان

آزمایش دقیق تر و قابل قبول تری بر اساس بیومولکول ها برای پیش بینی GDM ایجاد کرد (۶). نقش برخی از پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNPs) و همچنین تغییرات اپی ژنتیکی مانند متیلاسیون DNA و miRNA در بیماری زای GDM نشان داده شده است. این تغییرات می توانند انتخاب مناسبی برای تشخیص زود هنگام GDM باشند. در ادامه به معرفی برخی از این نشانگرها و بررسی مزایا و معایب آن ها در تشخیص دیابت بارداری پرداخته شده است.

پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی (SNPs) به تغییرات در توالی DNA در نوکلئوتیدهای خاص اشاره دارد. SNP ها از رایج ترین تنوع های ژنتیکی هستند. در بیشتر موارد SNP ها خاموش هستند و عملکرد یا بیان ژن ها را تغییر نمی دهند، در حالی که برخی از نظر بیولوژیکی عملکردی دارند و می توانند منجر به تغییر عملکرد پروتئین ها و بیماری شوند (۳۰). نقش واریانت های ژنتیکی به طور فزاینده ای در بیماری زای GDM در حال آشکار شدن است. شواهد نشان می دهد که تغییرات ژنتیکی در ژن های مسئول تغییرات متابولیک در دوران بارداری، فرد را مستعد ابتلا به GDM می کنند. در ادامه به SNP هایی که ارتباط آن ها با بروز دیابت بارداری در حداقل چند جمعیت مورد بررسی قرار گرفته اند اشاره خواهد شد.

فاکتور رونویسی ۷ مانند ۲ (TCF7L2) یک فاکتور رونویسی است که در سیگنال دهی Wnt نقش دارد، که مسیر مهمی در تنظیم هموستاز گلوکز به شمار می رود. در جمعیت های مختلف، چهار Snp

(rs1225537 و rs7903146، rs4506565، rs7901695) در TCF7L2 مورد بررسی قرار گرفته اند. چهار مطالعه از هشت مطالعه ای که rs7903146 را بررسی کردند، ارتباط بین آلل T و GDM را نشان دادند. مطالعات دیگر ارتباط بین rs7903146 و GDM را احتمالاً به دلیل حجم نمونه کوچک و فقدان قدرت آماری مشاهده نکردند. آلل T با کاهش تولید انسولین و تغییر گلوکونئوز کبدی همراه است و بنابراین، علیرغم نتایج متناقض به دست آمده در این مطالعات، کاندید خوبی برای تحقیقات بیشتر در گروه های بزرگ تر است (۳۱). آدیپونکتین، آدیپوکتینی است

که متابولیسم گلوکز و لیپید را تنظیم می‌کند و در بسیاری از مطالعات ارتباط آن با GDM نشان داده شده است (۳۲،۳۳). سه SNP در ژن آدیپونکتین (rs1501299، rs266729 و rs2241766) در هشت مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. به طور مشخص، هر شش مطالعه‌ای که rs266729 و rs2241766 را بررسی کردند، دریافتند که آلل G با GDM در جمعیت‌های مختلف مرتبط است (۳۱).

ژن گیرنده ملاتونین-1B (MTNR1B) یکی از گیرنده‌های ملاتونین را رمز گذاری می‌کند. ملاتونین هورمونی که در تنظیم ریتم‌های شبانه روزی، سیگنال‌دهی انسولین و متابولیسم گلوکز و غیره نقش دارد. دو SNP rs10830963 و rs1387153 در ژن MTNR1B مورد بررسی قرار گرفتند. هشت مطالعه از ۹ مطالعه‌ای که rs10830963 را بررسی کرده‌اند، نشان دادند که آلل G با افزایش خطر ابتلا به GDM مرتبط است. سه مطالعه‌ای که rs1387153 را بررسی کردند، ارتباط بین آلل T و GDM را گزارش کردند. پلی مورفیسم موجود در MTNR1B، به ویژه آلل G در rs10830963، با افزایش غلظت گلوکز ناشتا و کاهش عملکرد سلول‌های بتا در قفقازی‌ها مرتبط است (۳۱).

گلوکوکیناز (GCK) نقش مهمی در پردازش گلوکز در کبد دارد. دو نوع پلی مورفیسم این ژن (rs1799884 و rs4607517) در مطالعات GDM مورد مطالعه قرار گرفتند. برای rs1799884، در دو مطالعه ارتباط آلل مینور با افزایش خطر GDM نشان داده شده است با این حال، یک مطالعه بزرگ در یک جمعیت فنلاندی هیچ ارتباطی بین این پلی مورفیسم و GDM نشان نداده است. هیچ ارتباطی بین rs4607517 و GDM مشاهده نشده است. (۳۱)

محدودیت‌های ذاتی در مطالعات ارتباط ژنتیکی، به ویژه در مورد بیماری‌های چند ژنی و چند عاملی مانند GDM وجود دارد. این محدودیت‌ها شامل حجم نمونه ناکافی برای تشخیص ارتباط آماری معنی دار، تفاوت در فراوانی آلل‌ها و تفاوت در علت بیماری بین قومیت‌های مختلف است، که نشان می‌دهد چرا بسیاری از ارتباطات ژنتیکی در بین

جمعیت‌ها قابل تکرار نیستند. علاوه بر این، اختلاف در معیارهای تشخیصی GDM نیز می‌تواند به نتایج ناسازگار مشاهده شده بین مطالعات مرتبط باشد. نکته مهم این است که در ایجاد بیماری‌های پیچیده صرفاً تنوع ژنتیکی نقش ندارد و بیماری به دلیل تعامل استعداد ژنتیکی و عوامل محیطی ایجاد می‌شود. بنابراین، برای ارزیابی دقیق خطر GDM، عوامل بیولوژیکی و محیطی، مانند سن مادر و رژیم غذایی به همراه تنوع ژنتیکی در نظر گرفته شوند. (۳۱).

متیلاسیون DNA، از شناخته شده ترین مکانیسم‌های کنترل بیان ژن در سطح اپی ژنتیک می‌باشد که از طریق متیلاسیون سیتوزین در ردیف‌های دی نوکلئوتیدی سیتوزین-گوانین (CpG) رخ می‌دهد. این فرآیند توسط آنزیم DNA متیل ترانسفراز و با انتقال گروه متیل از آدنوزیل متیونین انجام می‌شود. جزایر CpG (مناطق با سطوح بالای دی نوکلئوتیدهای CpG) عمدتاً در ناحیه پروموتور ژن‌ها دیده می‌شوند و متیلاسیون این مناطق به دلیل تغییر در اتصال پروتئین‌ها، موجب سرکوب رونویسی از روی ژن‌ها می‌گردد. متیلاسیون DNA یک فرآیند برگشت پذیر است. آنزیم‌های متیل سیتوزین دی‌اکسیژنازها (TET) با اکسیداسیون و تبدیل متیل سیتوزین به ۵-هیدروکسی متیل سیتوزین موجب فعال شدن بیان ژن‌ها می‌گردند. متیلاسیون DNA نقش مهمی در کنترل بیان ژن‌ها در دوران بارداری دارد و به علاوه ارتباط آن با GDM نشان داده شده است. چندین مطالعه تغییر در وضعیت متیلاسیون DNA در نمونه‌های جفت و خون بند ناف زنان مبتلا به GDM در مقایسه با بارداری طبیعی را نشان داده‌اند (۳۱،۳۴). این تغییرات می‌تواند در سلامت فرزندان تأثیر گذار باشد و خطر ابتلای آن‌ها به برخی بیماری‌ها را در آینده افزایش دهد. نشان داده شده است که تغییراتی که به صورت فیزیولوژیک در متیلاسیون DNA در دوران حاملگی رخ می‌دهد در خون کامل انعکاس پیدا می‌کند (۳۵)، از این رو غربالگری خون مادر برای نشانگرهای زیستی GDM مورد توجه قرار گرفته است. با این وجود بررسی متیلاسیون DNA در GDM، یک زمینه تحقیقاتی نسبتاً جدید است و مطالعات محدودی در این زمینه انجام شده است. متیلاسیون کل DNA تخمینی

از متیلاسیون کل ژنوم را ارائه می‌دهد و اندازه‌گیری آن نسبتاً آسان و مقرون به صرفه است (۳۵) در مطالعه‌ای که به این روش و در جمعیت آفریقای جنوبی انجام شده است نشان داده شد که متیلاسیون کلی DNA با GDM همراه نبوده و برای تشخیص GDM نامناسب می‌باشد (۳۶). از این رو پیشنهاد بررسی متیلاسیون ژن‌های خاص با استفاده از bead chip arrays مطرح گردید. با این روش می‌توان بین ۲۷۰۰۰ تا ۸۵۰۰۰ منطقه CpG در سراسر ژنوم را با وضوح تک نوکلئوتیدی مورد بررسی قرار داد. در یکی از اولین مطالعات با استفاده از این روش گزارش شده است که تغییرات متیلاسیون DNA در اوایل بارداری در زنان مبتلا به GDM رخ می‌دهد (۳۷). آن‌ها تغییر در متیلاسیون بخش‌هایی از DNA که ژن‌های مرتبط با چرخه سلولی، مورفولوژی سلول و سازماندهی سلولی در آن نواحی مشاهده می‌شوند را نشان دادند. پس از آن، با استفاده از یک bead chip arrays جدیدتر حاوی نواحی CpG بیشتر، کانگ و همکاران اختلاف در متیلاسیون برخی از ژن‌ها در زنان مبتلا به GDM در مقایسه با گروه کنترل را نشان دادند که از جمله می‌توان به ژن‌های سازنده اینترلوکین-۶ (IL-6) به عنوان عامل اصلی پیش التهابی و اینترلوکین-۱۰ (IL-10) به عنوان یک سیتوکین ضد التهابی اشاره نمود (۳۷). یک مطالعه متفاوت توسط کانگ و همکاران نشان داد که کاهش متیلاسیون IL-10 در GDM با افزایش غلظت سرمی این فاکتور در پایان بارداری همراه است (۳۸) که نشان می‌دهد این سیتوکین نقش مهمی در توسعه GDM دارد. اگرچه مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که متیلاسیون DNA به عنوان یک بیومارکر دارای پتانسیل تشخیصی و پیش‌آگهی است، با این حال این روش محدودیت‌هایی نیز دارد. حجم کم نمونه، فقدان اعتبار سنجی، تفاوت‌های نژادی، روش کمی سازی و زمان بندی تجزیه و تحلیل متیلاسیون در دوران بارداری از جمله مشکلاتی هستند که مانع تکرارپذیری یافته‌ها در مطالعات می‌شود. یکی دیگر از محدودیت‌های مطالعات در این بررسی استفاده از خون کامل است که مخلوطی از انواع سلول‌ها مانند لنفوسیت‌ها، گلبول‌های قرمز و پلاکت‌ها بوده و ممکن است تجزیه و تحلیل متیلاسیون را مخدوش

کنند (۳۹) بنابراین، در مطالعات آینده باید به جدا سازی جمعیت‌های سلول‌های خونی توجه گردد.

miRNA ها، RNA های کوچک غیر کدکننده و تقریباً ۲۲ نوکلئوتیدی هستند که وظیفه آن‌ها تنظیم بیان ژن از طریق مکانیسم‌های پس از رونویسی است. این مولکول‌ها با اتصال به ناحیه 3'UTR مولکول‌های mRNA سبب خاموشی بیان آن‌ها از طریق سرکوب ترجمه یا تخریب mRNA می‌گردند (۳۹). miRNA ها تنظیم‌کننده‌های مهم متابولیسم و رشد در دوران بارداری هستند و در ایجاد GDM نقش دارند. جفت نقش مهمی در سازگاری متابولیک مادر با بارداری دارد. بررسی‌ها نشان داده است که بیش از ۶۰۰ miRNA در جفت بیان می‌شود. miRNA های جفت در گردش خون مادر آزاد می‌شوند (۴۰). بنابراین، این miRNA ها به عنوان نشانگرهای زیستی در بررسی اختلال عملکرد جفت و GDM مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. مطالعات مختلفی در زمینه تغییرات بیان miR-17، miR-16، miR-222، miR-29a، miR-132، miR-20a و miR-20a در زنان مبتلا به GDM در مقایسه با گروه کنترل انجام شده که نشان دهنده کاهش یا افزایش این مارکر ها بوده است. ناسازگاری بین نتایج احتمالاً به دلیل تفاوت نمونه، سن حاملگی و روش‌های تجزیه و تحلیل مورد استفاده می‌باشد. تفاوت در بیان miRNA در نمونه سرم در مقایسه با پلاسما گزارش شده است که نشان می‌دهد که برخی عوامل در طول فرآیند انعقاد می‌توانند بر بیان آن‌ها تأثیر بگذارند. همچنین روش‌های مختلف کمی سازی از نظر حساسیت و ویژگی متفاوت هستند که ممکن است بر دقت و تفسیر داده‌ها تأثیر بگذارد. علاوه بر این، نرمال سازی داده‌ها یک چالش مهم برای تجزیه و تحلیل شناسایی miRNA گردش خون است (۳۱).

اگزوزوم‌ها (Exosome) وزیکول‌های کوچک غشایی با ۳۰ تا ۱۰۰ نانومتر هستند که به دنبال همجوشی اگزوسیتوز اجسام چند وزیکولی با غشای سلولی به محیط خارج سلولی آزاد می‌شوند. اگزوزوم‌ها در خون، ادرار، بزاق و سایر مایعات بدن یافت می‌شوند و حاوی مواد ژنتیکی مانند mRNA، miRNA، مقادیر کم DNA و پروتئین‌هایی مختلفی از جمله فاکتورهای رونویسی و فاکتورهای رشد

می‌باشند. اگزوزوم‌ها به‌خاطر اندازه کوچک، توانایی عبور از غشاهای سلولی و انتقال ترکیبات مختلف به سلول دارند. اگزوزوم‌ها در فعالیت‌های زیستی متنوعی شامل رگ زایی، بارداری، انعقاد خون و التهاب نقش دارند. در دوران بارداری اگزوزوم‌ها از جفت آزاد می‌شوند و غلظت اگزوزوم‌ها در پلاسمای مادر در طول بارداری طبیعی افزایش می‌یابد. اگزوزوم‌ها جفت حاوی پروتئین‌های اختصاصی جفت و miRNA هستند که آن‌ها را از اگزوزوم‌های مشتق شده از مادر متمایز می‌کند. گزارش شده است که غلظت اگزوزوم‌ها در اختلالات بارداری مانند پره اکلامپسی افزایش می‌یابد. در سال‌های اخیر نقش اگزوزوم‌ها در توسعه و پیشرفت GDM نیز مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج مطالعات نشان داده است که غلظت اگزوزوم‌ها در پلاسما با افزایش سن حاملگی در بارداری طبیعی و همچنین GDM، افزایش معنی‌داری پیدا می‌کند اما مقدار آن‌ها در پلاسمای زنان باردار مبتلا به GDM حدود دو برابر باردار طبیعی است. بعلاوه محتویات اگزوزوم‌ها از نظر نوع مواد ژنتیکی مانند mRNA، miRNA و نوع پروتئین‌های موجود در آن در بارداری طبیعی و بارداری همراه با GDM متفاوت است که می‌تواند به تشخیص زود هنگام دیابت بارداری کمک کند. با این وجود استفاده از اگزوزوم‌ها در تشخیص دیابت بارداری هنوز علم نوپایی است و نیاز به تحقیقات بیشتری در مورد نقش آن‌ها در تشخیص و درمان این بیماری دارد (۲۲).

نتیجه‌گیری

GDM یک مشکل رو به رشد بهداشت عمومی در سراسر جهان است. تصور می‌شود که تغییرات سبک زندگی که بر تعادل کالری تأثیر نامطلوب دارد، عاملی مؤثر در این بیماری است از این رو به موازات افزایش جهانی چاقی و دیابت نوع II شیوع این بیماری نیز در حال افزایش است. پیامدهای کوتاه مدت و بلند مدت GDM تأثیر منفی فوری بر سیستم‌های بهداشتی خواهد داشت. بنابراین، غربالگری GDM به عنوان یک استراتژی برای جلوگیری از عواقب نامطلوب مورد توجه قرار گرفته است. استاندارد طلایی فعلی برای تشخیص GDM، تست تحمل گلوکز خوراکی در هفته‌های ۲۴-۸۴ بارداری است. هنگامی که GDM در اواخر سه ماهه دوم یا اوایل سه

ماهه سوم بارداری تشخیص داده می‌شود، آسیب ناشی از آن به احتمال زیاد تثبیت شده است و امکان معکوس یا کاهش اثرات نامطلوب آن محدود می‌گردد. بنابراین، تشخیص زود هنگام وجود استعداد ایجاد این بیماری و یا شروع GDM اولین گام در توسعه، ارزیابی و اجرای درمان مؤثر است. اگر چنین آزمایش‌های تشخیص زود هنگامی در دسترس باشند، پیشرفت و کمک بزرگی به این رشته می‌کردند و فرصتی برای ارزیابی درمان جایگزین و استراتژی‌های مدیریت بالینی برای بهبود پیامدهای سلامت مادر و نوزاد فراهم می‌کردند. شواهد متعددی وجود دارد که نشان می‌دهد استفاده از نشانگرهای مرتبط با تنظیم گلوکز خون، ترکیبات آدیپوکینی، نشانگرهای التهابی، یافته‌های متابولومیکو نشانگرهای مولکولی شامل تنوع‌های ژنتیکی و تغییرات اپی ژنتیکی می‌توانند به عنوان نشانگرهای زیستی به تشخیص زودهنگام GDM کمک کنند و به استراتژی‌های مداخله‌ای برای مدیریت بهتر GDM و بهبود نتایج سلامت منجر شوند. همانطور که بررسی گردید بسیاری از مطالعات شواهدی را برای حمایت از استفاده از این نشانگرها به عنوان نشانگرهای زیستی GDM ارائه نموده‌اند. با این حال، علی‌رغم این نتایج مطلوب، بیومارکرهای مولکولی با چالش‌های زیادی روبرو هستند که مانع استفاده از آن‌ها به عنوان نشانگرهای زیستی می‌شود و باید قبل از استفاده بالینی به آن‌ها پرداخت. همانطور که ذکر شد، برخی از نشانگرها از جمله انواع مولکولی تحت تأثیر قومیت و عوامل محیطی هستند. به علاوه، چالش‌های فنی در اندازه‌گیری نیز به عدم تکرارپذیری کمک می‌کند. بنابراین، استانداردسازی روش‌های اندازه‌گیری این نشانگرها حیاتی است. علاوه بر این، مطالعات کوهورت، برای شناسایی نشانگرهای قوی که تحت تأثیر عوامل قومیتی و محیطی نیستند، ضروری می‌باشد. بیومارکر ایده‌آل برای GDM به احتمال زیاد ترکیبی از چندین بیومارکر مولکولی برای غلبه بر عدم حساسیت و ویژگی است. پیشرفت‌های سریع فناوری‌های مولکولی این نوید را می‌دهد که در آینده بتوان با غلبه بر چالش‌ها به ایجاد آزمایش‌های سریع و مقرون به صرفه کمک نمود که به طور دقیق زنان در معرض خطر بالای GDM را در اوایل بارداری شناسایی کند. ایجاد یک نهاد بین‌المللی برای استاندارد کردن شرایط اندازه‌گیری این نشانگرهای زیستی مولکولی مورد نیاز است.



References:

- 1- Takhsid MA, Zahediannejad Z, Aboulizadeh F, Moezzi L, Ranjbaran R. G22A Polymorphism of Adenosine Deaminase and its Association with Biochemical Characteristics of Gestational Diabetes Mellitus in an Iranian Population. *Iranian journal of medical sciences*. 2015;40(2):170-4.
- 2- Kaaja R, Rönnemaa T. Gestational diabetes: pathogenesis and consequences to mother and offspring. *The review of diabetic studies: RDS*. 2008;5(4):194.
- 3- Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? Current opinion in HIV and AIDS. 6-463; (6):5,210.
- 4- Dhuski DF, Ruszala M, Rudziński G, Pożarowska K, Brzuszkiewicz K, Leszczyńska-Gorzelak B. Evolution of Gestational Diabetes Mellitus across Continents in 21st Century. *International journal of environmental research and public health*. (23)19; 2022.
- 5- Rodrigo N, Glasraas SJ. The emerging role of biomarkers in the diagnosis of gestational diabetes mellitus. *Journal of clinical medicine*. 2018;7(6):120.
- 6- Abu Samra N, Jelinek HF, Alsafar H, Asghar F, Seoud M, Hussein SM, et al. Genomics and Epigenomics of Gestational Diabetes Mellitus: Understanding the Molecular Pathways of the Disease Pathogenesis. *International journal of molecular sciences*. 2022;23 (7).
- 7- Rani PR, Begum J. Screening and diagnosis of gestational diabetes mellitus, where do we stand. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2016;10(4):QE01.
- 8- Duran A, Sáenz S, Torrejón MJ, Bordiú E, Del Valle L, Galindo M, et al. Introduction of IADPSG criteria for the screening and diagnosis of gestational diabetes mellitus results in improved pregnancy outcomes at a lower cost in a large cohort of pregnant women: the St. Carlos Gestational Diabetes Study. *Diabetes care*. 2014;37(9):2442-50.
- 9- Takhsid MA, Arabsofghar R. Hemoglobin A1c: Clinical applications and analytical considerations. *Laboratory & Diagnosis*. 2022;14(55):29-36.
- 10- Takhsid MA, Arabsofghar R. Serum biomarkers for assessing glycemic control in diabetes mellitus. *Laboratory & Diagnosis*. 2022;14(56):8-12.
- 11- O'Connor C, O'Shea PM, Owens LA, Carmody L, Avalos G, Neslor L, et al. Trimester-specific reference intervals for haemoglobin A1c (HbA1c) in pregnancy. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2012;50(5):905-9.
- 12- Renz PB, Cavagnoli G, Weinert LS, Silveiro SP, Camargo JL. HbA1c test as a tool in the diagnosis of gestational diabetes mellitus. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135989.
- 13- Sevketo O, Sevketo A, Ozel A, Dansuk R, Kelekci S. The use of HbA1c as an aid in the diagnosis of gestational diabetes mellitus. *Journal of obstetrics and gynaecology: the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*. 2014;34(8):690-2.
- 14- Soumya S, Rohilla M, Chopra S, Dutta S, Bhansali A, Parthian G, et al. HbA1c: A Useful Screening Test for Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Technol Ther*. 2015;17(12):899-904.
- 15- Valadan M, Bahramnezhad Z, Golshahi F, Feizabad E. The role of first-trimester HbA1c in the early detection of gestational diabetes. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2022;22(1):71.
- 16- Valadan M, Bahramnezhad Z, Golshahi F, Feizabad E. The role of first-trimester HbA1c in the early detection of gestational diabetes. *BMC pregnancy and childbirth*. 2022;22(1):71.
- 17- Bartáková V, Malíčková D, Mužík J, Bělobrádková J, Kaňková K. Possibility to predict early postpartum glucose abnormality following gestational diabetes mellitus based on the results of routine mid-gestational screening. *Biochemia medica*. 2015;25(3):460-8.
- 18- Duke A, Yap C, Bradbury R, Hng TM, Kim C, Wansbrough A, et al. The discordance between HbA1c and glucose tolerance testing for the postpartum exclusion of diabetes following gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2015;108(1):72-7.
- 19- Göbl CS, Bozkurt L, Yarragudi R, Tura A, Pacini G, Kautzky-Willer A. Is early postpartum HbA1c an appropriate risk predictor after pregnancy with gestational diabetes mellitus? *Acta diabetologica*. 2014;51(5):715-22.
- 20- Li P, Lin S, Li L, Cui J, Zhou S, Fan J. First-trimester fasting plasma glucose as a predictor of gestational diabetes mellitus and the association with adverse pregnancy outcomes. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 2019;35(1):95.
- 21- Donovan L, Hartling L, Muise M, Guthrie A, Vandermeer B, Dryden DM. Screening tests for gestational diabetes: a systematic review for the US Preventive Services Task Force. *Annals of internal medicine*. 2013;159(2):115-22.
- 22- Correa PJ, Vargas JF, Sen S, Illanes SE. Prediction of gestational diabetes early in pregnancy: Targeting the long-term complications. *Gynecologic and obstetric investigation*. 2014;77(3):145-9.
- 23- Takhsid MA, Ghasemi M. Methods for assessing insulin sensitivity and resistance. *Laboratory & Diagnosis*. 2014;6(23):8-13.
- 24- Omazić J, Vijić B, Ivić V, Kadivnik M, Zibar L, Müller A, et al. Early markers of gestational diabetes mellitus: what we know and which way forward? *Biochemia Medica*. 2021;31(3):0.
- 25- Kennelly M, McAuliffe F. Prediction and prevention of Gestational Diabetes: an update of recent literature. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2016;202:92-8.
- 26- Takhsid MA, Haem Z, Aboulizadeh F. The association of circulating adiponectin and + 45 T/G polymorphism of adiponectin gene with gestational diabetes mellitus in Iranian population. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 2015;14(1):1-7.
- 27- Alesi S, Ghelani D, Rassie K, Mousa A. Metabolomic biomarkers in gestational diabetes mellitus: A review of the evidence. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(11):5512.
- 28- Hessami K, Tabrizi R, Homayoon N, Hashemi A, Heydari ST, Pourhoseini SA. Gestational diabetes mellitus and inflammatory biomarkers of neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio: a systematic review and meta-analysis. *Biomarkers*. 2021;26(6):491-8.
- 29- Yang H, Zhu C, Ma Q, Long Y, Cheng Z. Variations of blood cells in prediction of gestational diabetes mellitus. *Journal of Perinatal Medicine*. 2015;43(1):89-93.
- 30- Sachidanandan R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD, Marth G, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 33-928: (6822)409;2001.
- 31- Dias S, Pfeiffer C, Abrahams Y, Rheeder P, Adam S. Molecular Biomarkers for Gestational Diabetes Mellitus. *International journal of molecular sciences*. 2018;19 (10).
- 32- Takhsid MA, Zare Z. Resistin - 420 C/G polymorphism and serum resistin level in Iranian patients with gestational diabetes mellitus. *Journal of diabetes and metabolic disorders*. 2015;14:37.
- 33- Takhsid MA, Haem Z, Aboulizadeh F. The association of circulating adiponectin and + 45 T/G polymorphism of adiponectin gene with gestational diabetes mellitus in Iranian population. *Journal of diabetes and metabolic disorders*. 2015;14:30.
- 34- Banik S, Bardhan M, Basak S. Genetic, Epigenetic, and Molecular Biology of Obesity: From Pathology to Therapeutics the Way Forward. *The Journal of the Association of Physicians of India*. 2022;70(9):11-2.
- 35- Kurdyukov S, Bullock M. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology*. 2016;5 (1).
- 36- Dias S, Adam S, Van Wyk N, Rheeder P, Louw J, Pfeiffer C. Global DNA methylation profiling in peripheral blood cells of South African women with gestational diabetes mellitus. *Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*. 2019;24(3):225-31.
- 37- Enquobahrie DA, Moore A, Muhie S, Tadesse MG, Lin S, Williams MA. Early Pregnancy Maternal Blood DNA Methylation in Repeat Pregnancies and Change in Gestational Diabetes Mellitus Status—A Pilot Study. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif)*. 2015;22(7):904-10.
- 38- Kang J, Lee CN, Li HY, Hsu KH, Wang SH, Lin SY. Association of Interleukin-10 Methylation Levels With Gestational Diabetes in a Taiwanese Population. *Frontiers in genetics*. 2018;9:222.
- 39- Reinius LE, Acevedo N, Joerink M, Pershagen G, Dahlén SE, Greco D, et al. Differential DNA methylation in purified human blood cells: implications for cell lineage and studies on disease susceptibility. *PLoS one*. 2012;7(7):e41361.
- 40- Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clinical chemistry*. 2008;54(3):482-90.