

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS-JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR-JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

ja

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND  
BIO-JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

***TCF7L2* geeni polümorfism rs7903146 ja gestatsioonidiabeet**

Magistritöö

30 EAP

Evelin Kumpel

Juhendajad Aili Tagoma, PhD

Priit Adler, PhD

TARTU 2021

# INFOLEHT

## ***TCF7L2* geeni polümorfism rs7903146 ja gestatsioonidiabeet**

Gestatsioonidiabeet on süsivesikute ainevahetuse häire, mis tekib ainult raseduse käigus. *TCF7L2* on valku kodeeriv geen, mis on peamiselt seotud  $\beta$ -rakkude proliferatsiooniga ja proinsuliini sünteesi reguleerimisega. *TCF7L2* polümorfismi rs7903146 on kõige rohkem seostatud teist tüüpi diabeediga, kuid kuna teist tüüpi diabeet ja gestatsioonidiabeet on patofüsioloogiliselt sarnased, on seda polümorfismi uuritud ka gestatsioonidiabeedi patsientide seas. Selle uurimistöö eesmärgiks oli määrata *TCF7L2* polümorfismi rs7903146 genotüübid gestatsioonidiabeedi riskirühma kuuluvatel rasedatel ning analüüsida polümorfismi mõju genotüübiti nii gestatsioonidiabeedi kujunemisele kui ka sellega seotud tulemitele. Uuritavate rühma moodustasid 473 naist, kellest gestatsioonidiabeedi diagnoosiga oli 181. Tulemustest selgus, et *TCF7L2* riskigenotüüp T/T polnud seotud gestatsioonidiabeedi diagnoosi, veresuhkru ega C-peptiidi väärtustega, kuid suurendas insuliinravi vajaduse šanssi raseduse lõpus.

**Märksõnad:** gestatsioonidiabeet, polümorfism, *TCF7L2*, rs7903146

**CERCS:** B500 immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

## ***TCF7L2* gene polymorphism rs7903146 and gestational diabetes mellitus**

Gestational diabetes mellitus is a carbohydrate metabolic disorder, which occurs only during pregnancy. *TCF7L2* is a protein encoding gene and it regulates  $\beta$ -cell proliferation and the synthesis of proinsulin. *TCF7L2* gene polymorphism rs7903146 is mostly associated with type 2 diabetes, but has also been studied in women with gestational diabetes, since the two metabolic disorders share similarities in their pathophysiology. The aim of this study was to genotype the *TCF7L2* polymorphism rs7903146 in pregnant women at risk for gestational diabetes and analyze the effect of the polymorphism on gestational diabetes development and related outcomes. The study group consisted of 473 women, 181 of whom were diagnosed with gestational diabetes. The results showed that the *TCF7L2* risk genotype T/T was not associated with gestational diabetes diagnosis, blood glucose, or C-peptide values, but increased the odds for insulin therapy requirement in the end of pregnancy.

**Keywords:** gestational diabetes mellitus, polymorphism, *TCF7L2*, rs7903146

**CERCS:** B500 immunology, serology, transplantation

# SISUKORD

<b>INFOLEHT</b> .....	<b>2</b>
<b>KASUTATUD LÜHENDID</b> .....	<b>4</b>
<b>SISSEJUHATUS</b> .....	<b>5</b>
<b>1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b> .....	<b>6</b>
1.1 Gestatsioonidiabeet .....	6
1.1.1 Gestatsioonidiabeedi patofüsioloogia.....	7
1.1.2 Diagnoosimine ja ravi.....	9
1.1.3 Esimest tüüpi diabeediga seotud autoantikehad gestatsioonidiabeedi korral .....	11
1.1.4 Riskid emale ja lapsele .....	13
1.2 Gestatsioonidiabeedi geneetika.....	13
1.2.1 <i>TCF7L2</i> .....	14
1.2.2 Struktuur .....	15
1.2.3 Funktsioon .....	16
1.2.4 Polümorfismid .....	16
<b>2 EKSPERIMENTAALNE OSA</b> .....	<b>18</b>
2.1 Uurimistöö eesmärgid.....	18
2.2 Materjal ja meetodika .....	18
2.2.1 Valimi ja taustaandmete kirjeldus .....	18
2.2.2 DNA puhastamine soolamise meetodil ja kontsentratsiooni mõõtmine.....	19
2.2.3 DNA lahjendused ja genotüpiseerimine .....	20
2.2.4 Andmete analüüs .....	22
2.3 Tulemused.....	23
2.4 Arutelu .....	29
<b>JÄRELDUSED</b> .....	<b>32</b>
<b>KOKKUVÕTE</b> .....	<b>33</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>34</b>
<b>TÄNUAVALDUSED</b> .....	<b>35</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS</b> .....	<b>36</b>
Artiklid .....	36
<b>LISA 1. Töös kasutatud lahused</b> .....	<b>44</b>
<b>LIHTLITSENTS</b> .....	<b>46</b>

## KASUTATUD LÜHENDID

**EDTA** – etüleendiamiintetraädikhape (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

**GABA** –  $\gamma$ -aminovõihape (*gamma-amino-butyric acid*)

**GADA** – glutamaadi dekarboksülaas 65 vastased autoantikehad (*glutamic acid decarboxylase 65 autoantibodies*)

**GDM** – gestatsioonidiabeet (*gestational diabetes mellitus*)

**GTT** – glükoositolerantsustest (*glucose tolerance test*)

**HDL** – suure tihedusega lipoproteiinid (*high density lipoproteins*)

**IA-2A** – insulinoomiga seotud valk 2-e vastased autoantikehad (*insulinoma-associated protein 2 autoantibodies*)

**IADPSG** – (*International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups*)

**KMI** – kehamassiindeks

**LDL** – väikese tihedusega lipoproteiinid (*low density lipoproteins*)

**MODY** – noorte küpsuseas algav diabeet (*maturity onset diabetes of the young*)

**OR** – šansside suhe (*odds ratio*)

**SNP** – ühenukleotiidne polümorfism (*Single Nucleotide Polymorphism*)

**ZnT8-A** – tsingi transporter 8 vastased autoantikehad (*Zinc transporter 8 autoantibodies*)

**T1DM** – esimest tüüpi diabeet (*type 1 diabetes mellitus*)

**T2DM** – teist tüüpi diabeet (*type 2 diabetes mellitus*)

**TCF7L2** – (*transcription factor 7-like 2*)

**UV** – usaldusvahemik

# SISSEJUHATUS

Süsivesikute ainevahetuse häire, mis tekib ainult raseduse ajal ja taandub selle järgselt nimetatakse gestatsioonidiabeediks (GDM). Maailmas on GDM-i levik erinev, mis võib suuresti tuleneda sellest, et kasutusel on erinevad diagnoosimise kriteeriumid. GDM võib raseduse ajal ja sünnitusel ohtu panna nii ema kui ka lapse tervise ning hilisemas elus kujuneb neil naistel sagedamini teist tüüpi diabeet (T2DM). Lisaks on leitud, et GDM diagnoosi saanud naistel on suurem risk ka autoimmuunse diabeedi ehk esimest tüüpi diabeedi (T1DM) kujunemiseks. T1DM tunnuseks on diabeediga seotud autoantikehade esinemine.

GDM-i olemus sarnaneb T2DM-ga. Üheks sarnaseks tunnuseks on insuliinresistentsus, mis tekib, kui kõhunäärmes insuliini tootvad  $\beta$ -rakud ei tooda seda enam piisavalt või on mingil põhjusel häirunud nende rakkude töö. Seetõttu on mitmeid T2DM-ga seotud geneetilisi faktoreid uuritud ka GDM-i puhul. Enim on uuritud geene, mis on seotud just  $\beta$ -rakkude funktsiooniga. Kõige tugevam seos T2DM-ga on leitud *TCF7L2* geeni polümorfismil rs7903146. Sellest lähtuvalt oli käesoleva töö eesmärgiks määrata *TCF7L2* geeni polümorfismi rs7903146 genotüübid GDM-riskirühma kuuluvatel rasedatel.

Magistritöö viidi läbi SA TÜ Kliinikumi naistekliiniku ja Tartu Ülikooli bio-ja siirdemeditsiini instituudi immunoloogia osakonna koostöös „Autoimmuunsuse molekulaarsed ja rakulised mehhanismid: autoimmuunse diabeedi ja kaasnevate haiguste uuring“ raames. Uuritav materjal saadi naistekliinikust ning praktiline töö viidi läbi immunoloogia osakonnas. Töö autor osales eksperimentaalses osas DNA eraldamisel ja viis läbi kõik RT-qPCR eksperimendid ning andmeanalüüsi.

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Gestatsioonidiabeet

Süsivesikute ainevahetuse häiret, mis tekib raseduse ajal ja taandub pärast seda, nimetatakse gestatsioonidiabeediks (GDM – *gestational diabetes mellitus*). GDM-i esinemissagedus maailmas varieerub 1% kuni 28% (Franzago et al., 2019). 2012.–2013. aastal Eestis läbiviidud Tartu Ülikooli Kliinikumi uuringus diagnoositi GDM 6% uuritavatel (Kirss et al., 2015). Lisaks sellele, et GDM on seotud mitmete terviseriskidega nii emale kui ka lapsele, on neil naistel hilisemas elus 7 korda suurem risk haigestuda teist tüüpi diabeeti (T2DM – *type 2 diabetes mellitus*) (Francaite-Daugeliene et al., 2021). Samuti on neil suurem risk esimest tüüpi diabeedi (T1DM – *type 1 diabetes mellitus*) tekkeks (Rosik et al., 2020), kuid selle esinemistõenäosus on oluliselt väiksem (Francaite-Daugeliene et al., 2021). GDM-i riskiteguriteks on ülekaalulisus, ema vanus, geneetilised faktorid (näiteks ühenukleotiidsed polümorfismid), diabeedi levimus perekonnas, emal olevad insuliinresistentsusega seotud haigused (näiteks polütsüstiliste munasarjade sündroom), ema toitumine ja muud elustiiliga seotud tegurid ning keskkonnafaktorid (Plows et al., 2018).

GDM moodustab ühe rühma koos teiste veresuhkru ainevahetushäirega haigustega, mille üheks põhitunnusjooneks on hüperglükeemia ehk veresuhkru kõrgenenud tase. Selles grupis olevaid metaboolseid haigusi saab jagada nelja erinevasse rühma (Maraschin et al., 2010):

- a) T1DM
- b) T2DM
- c) Rasedusaegne diabeet
- d) Muudel põhjustel tekkinud diabeedi tüübid

T1DM puhul on tegemist autoimmuunhaigusega, mille korral kõhunäärmes insuliini tootvad  $\beta$ -rakud on hävinenud autoreaktiivsete immuunrakkude rünnaku tõttu (Katsarou et al., 2017; Rosik et al., 2020). T1DM erijuht, LADA (*latent autoimmune diabetes of adults*), on sarnase tekkemehhanismiga nagu T1DM, kuid kujuneb palju aeglasemalt ja üldjuhul üle 30-aasta vanustel isikutel (Maraschin et al., 2010). T1DM esinemissagedus on 5-10% kõikidest diabeedijuhtudest (American Diabetes Association, 2021). T1DM vastandiks on T2DM, mille iseloomustavaks tunnuseks on insuliinresistentsus (Rosik et al., 2020). Selles osas sarnaneb GDM T2DM-ga, kuid GDM-i puhul on kirjeldatud ka autoimmuunse patogeneesiga haiguse vormi (Haller-Kikkatalo &

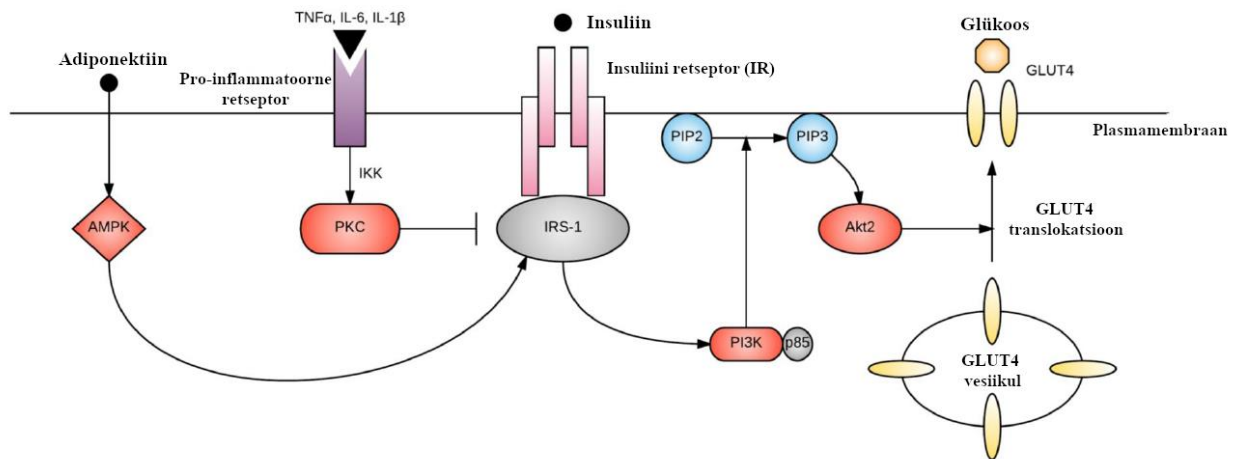
Uibo, 2016). T2DM levimus diabeedijuhtude hulgas on 90-95% (American Diabetes Association, 2021).

Muude põhjuste tõttu tekkinud diabeedi tüübiga haigusrühma kuulub näiteks noorte küpsuseas algav diabeet (MODY – *maturity onset of diabetes*). Tegemist on monogeense haigusvormiga, millel on kuus erinevat alatüüpi (sulgudes on kirjas, millise geenimutatsiooniga vastav haigusvorm on seotud): (1) MODY1 (hepaatiline transkriptsiooni faktor, HNF-4 $\alpha$  – *hepatocyte nuclear factor-4-alpha*); (2) MODY2 (glükokinaas, GCK - *glycokinase*); (3) MODY3 (HNF-1 $\alpha$  – *hepatocyte nuclear factor-1-alpha*); (4) MODY4 (insuliini promootori faktor, IPF – *insulin promoter factor*); (5) MODY5 (HNF-1 $\beta$  – *hepatocyte nuclear factor-1-beta*); ja (6) MODY6 (neuro-D1 ehk *neurogenic differentiation factor-1*). Kõige rohkem esineb MODY2 ja MODY3 vormi (vastavalt 15-20% ja 30-50% kõikidest MODY juhtudest), ülejäänud on väga haruldased (Maraschin et al., 2010). Kõikidest diabeedijuhtudest on MODY osakaal väike, jäädes 1-5% juurde (Urakami, 2019). Lisaks MODY-le võib diabeet olla seotud endokrinopaatiatega (Cushingi sündroom, akromegaalia) ja eksokriinsete pankrease haigustega (pankreatiit, hemokromatoos) (Maraschin et al., 2010).

### **1.1.1 Gestatsioonidiabeedi patofüsioloogia**

Rasedusaegse diabeedi üheks teguriks on insuliinresistentsuse teke, millel võib oma osa olla ülekaalulisusel, adipotsütokiinidel ja rasedusaegsel füsioloogilisel insuliini toime vähenemisel (Mirghani Dirar & Doupis, 2017). Selles protsessis on omavahel seotud mitu erinevat organit – rasvkude, maks, lihased, platsenta ja aju (Plows et al., 2018).

Insuliin on peptiidhormoon, mida toodavad kõhunäärmes olevad  $\beta$ -rakud. Insuliini vabastamise kaudu reguleeritakse organismi glükoositaset. Glükoos on rakkude esmane energiaallikas. Insuliinresistentsus tekib, kui insuliini vajadus organismis suureneb, kuid  $\beta$ -rakud ei tooda piisavas koguses insuliini või on rakkude vastuvõtlikkus insuliinile vähenenud. Mõlemal juhul on tulemuseks veresuhkru taseme suurenemine ehk hüperglükeemia. Molekulaarsel tasandil on selle protsessi peamiseks põhjuseks häired insuliini signalisatsioonikaskaadi töös. Glükoosi transporter 4 (GLUT4) funktsiooniks on aidata glükoosil rakkudeni jõuda (joonis 1) (Plows et al., 2018).



**Joonis 1.** Insuliini toimemehhanism. Insuliin seondub vastava retseptoriga (IR – *insulin receptor*), mille tulemusena aktiveeritakse IRS-1. Sellele aktivatsioonile aitab kaasa adiponektiin ja AMP-aktiveeritud proteiinkinaas (AMPK). Seejärel IRS-1 aktiveerib fosfatidüülinositol-3-kinaasi (PI3K), mis fosforüleerib fosfatidüülinositol-4, 5-bisfosfaadi (PIP2) fosfatidüülinositol-3, 4, 5-fosfaadiks (PIP3). PIP3 omakorda aktiveerib Akt2, mis on vajalik GLUT4 translokatsiooniks ja seeläbi glükoosi sisenemiseks rakkudesse. Põletikutsütokiinidel (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) on aga vastupidine roll selles signalisatsiooni kaskaadis – nad aktiveerivad proteiinkinaas C (PKC) I $\kappa$ B kinaasi (IKK) abil. Selle mehhanismi läbiviimisel takistatakse IRS-1 aktivatsiooni (kohandatud Plows et al., 2018 järgi).

Rasvkude on endokriinne organ, mille ülesandeks on ainevahetuse käigus tekkiva energia salvestamine ning erinevate signaal-ja mediaatorvalkude, täpsemalt adipokiinide (leptiin ja adiponektiin) ja tsütokiinide (TNF- $\alpha$ , IL-6 ja IL-1 $\beta$ ) sekreteerimine (Plows et al., 2018). On näidatud, et need faktorid osalevad ka insuliini tundlikkuse vähenemisel (Buchanan et al., 2007).

Diabeedi korral võivad  $\beta$ -rakkudes tekkida häired mitmes insuliini produktsiooni etapis, näiteks proinsuliini sünteesil või insuliini sekretoorsete graanulite eksotsütoosil. Samuti võivad mõju avaldada ka insuliini post-translatsioonilised modifikatsioonid. Lisaks on leitud, et ka  $\beta$ -rakkude arv võib mõjutada glükoosi ainevahetust. Näiteks  $\beta$ -rakkude vähenemise korral võib selline kadu allesjäänud  $\beta$ -rakke ülekoormata. Väheneb insuliini sekretsioon ja seeläbi ammenduvad vähehaaval insuliini sekretoorsetes graanulites olevad varud. T2DM-patsientidel on leitud  $\beta$ -rakkude hulga vähenemine 40-60% ulatuses. Ka rasedus ise on  $\beta$ -rakkudele koormav, mistõttu see võib olla üheks insuliinresistentsuse kujunemist vallandavaks põhjuseks. Seetõttu on naistel, kellel on olnud rohkem rasedusi, suurem risk GDM-i kujunemiseks (Plows et al., 2018).

Raseduse alguses suureneb ema organismis insuliintundlikkus. Seda eelkõige selleks, et tagada raseduse kulgedes piisav energiavarude hulk emale ja kasvavale lootele. Ilma insuliinita glükoos

rakkudesse ei pääse, samuti pole võimalik tagada energiavarude salvestamine rasvkoesse. Platsenta kaudu toimub glükoosi, aminohapete ja rasvade transport lootele. Platsentas toodetakse mitmeid hormone (östrogeeni, progesterooni, kortisooli ning platsentaspetsiifilist laktogeeni ja platsenta kasvuhormooni) ja ka immuunmediaatoreid (leptiini, tsütokiine). Nende ülesandeks on raseduse teises pooles suurendada insuliinresistentsuse teket, et vere glükoosi sisaldus suureneks ja hoiaks seeläbi optimaalsel tasemel loote ja platsenta energiavarud. Insuliini tundlikkuse ja resistentsuse vahel tasakaalu hoidmiseks toimub ema pankrease  $\beta$ -rakkudes hüpertroofia ja hüperplaasia. Rasedusejärgselt taandub ema insuliintundlikkus tagasi normaalsele tasemele (Plows et al., 2018).

### 1.1.2 Diagnoosimine ja ravi

Glükoositolerantsustest (GTT) on GDM-i diagnoosimise aluseks. Maailmas on hetkel kasutusel mitu diagnoosimise kriteeriumit (WHO, ADA – *American Diabetes Association*, IADPSG – *International Association of Diabetes in Pregnancy Groups*), mistõttu puudub ühtne ülevaade GDM-i levimusest (Kirss et al., 2015; Mirghani Dirar & Doupis, 2017). Eestis kasutatakse 2011. aastast uut juhendit, milles on järgitud IADPSG soovitusi (Metzger et al., 2010). Selle juhendi järgi hinnatakse raseduse I trimestril GDM-i haigestumise riski suurust (madal, mõõdukas, kõrge risk – tabel 1) anamnestiliste tegurite ja objektiivse leiu põhjal (Kirss et al., 2015).

**Tabel 1.** Gestatsioonidiabeeti haigestumise risk ja vastavad riskitegurid (Kirss et al., 2015)

Kõrge risk	Mõõdukas risk	Madal risk
GTT tehakse I ja II trimestril	GTT tehakse II trimestril	GTT-d ei ole teha vaja
<ul style="list-style-type: none"> <li>Raseduseelne KMI &gt; 30 kg/m<sup>2</sup></li> <li>GDM eelneva raseduse ajal</li> <li>Anamneesis glükoositaluvushäire</li> <li>Diabeedi esinemine lähisugulastel (ema, isa, õde, vend)</li> <li>Anamneesis üle 4,5 kg kaaluv vastündinu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Raseduseelne KMI 25,0-29,9</li> <li>Vanus <math>\geq</math> 40 aasta</li> <li>Glükosuuria</li> <li>Liigne kaaluive</li> <li>Polühüdramnion</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Raseduseelne KMI &lt; 25 kg/m<sup>2</sup></li> </ul>

**Tabel 1 (jätk)**

Kõrge risk	Mõõdukas risk
<ul style="list-style-type: none"> <li>Anamneesis ebaselge põhjusega lootesurm</li> <li>Paastuglükoosi tase 5,2-6,9 mmol/L</li> <li>Juhuslik veresuhkru tase 7,0-10,9 mmol/L</li> <li>Polütsüstiliste munasarjade sündroom</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Loote oletatav makrosoomia</li> </ul>

KMI - kehamassiindeks

Kõigil rasedatel mõõdetakse esmalt veresuhkru väärtus esimesel trimestril. Kõrge GDM riskiga rühma kuuluvatele rasedatele teostatakse GTT juba esimesel rasedustrimestril ning korratakse teisel trimestril. Kahe tunni GTT 75 g glükoosiga teostatakse kõrge ja madala GDM riskiga rasedatele 24.-28. rasedusnädalal. GTT alusel GDM-i diagnoosikriteeriumid on välja toodud tabelis 2. Rasedusaegne diabeet diagnoositakse, kui vähemalt üks glükoositaseme väärtustest on normist kõrgem. GTT-d ei ole vaja teha, kui tühja kõhu veresuhkru tase on  $\geq 7,0$  mmol/L, juhuslik veresuhkru tase on  $\geq 11,0$  mmol/L või enne rasedust esineb T1DM või T2DM, kuna tegemist on juba välja kujunenud diabeediga (Kirss et al., 2015).

**Tabel 2.** Gestatsioonidiabeedi diagnostilised kriteeriumid 2-tunni glükoositolerantsustesti teostamisel 75 g glükoosiga (Kirss et al., 2015)

Mõõtmise ajapunkt	Veresuhkru referentsväärtus (mmol/L)
Tühja kõhu veresuhkur	$\leq 5,1$
1 tund pärast koormust	$\leq 10,0$
2 tundi pärast koormust	$\leq 8,5$
Gestatsioonidiabeedi diagnoos	Üks väärtustest on üle referentsväärtuse

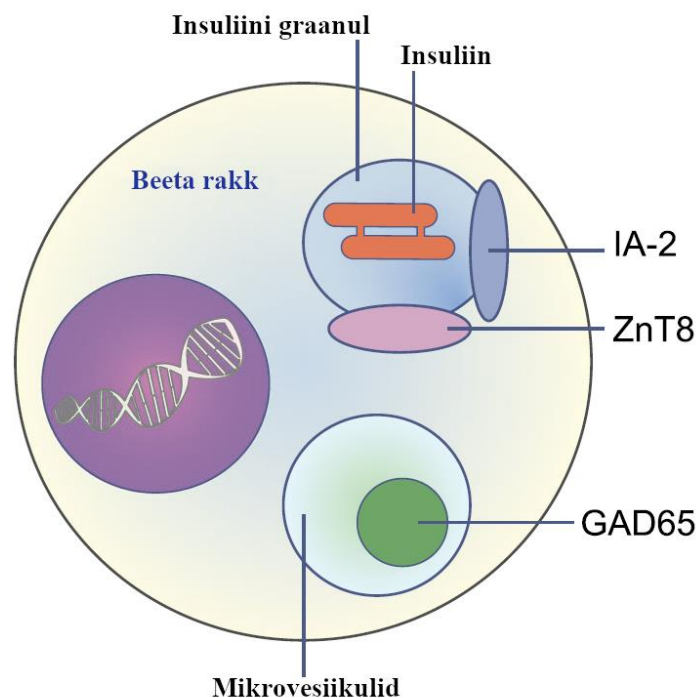
GDM-i korral on peamine raviviis tervisliku mitmekesine toitumise järgimine. Umbes 70-85% juhtudest piisab dieetravist ja füüsilisest aktiivsusest, kuid 15-30% juhtudel on lisaks vaja kasutada

medikamentoosset ravi. Neid on vaja raviplaani lisada juhul, kui veresuhkru väärtused on normist kõrgemad. Kasutatakse kas insuliini või suukaudselt manustatavat ravimit metformiini või glüburiiidi (Lende & Rijhsinghani, 2020).

### 1.1.3 Esimest tüüpi diabeediga seotud autoantikehad gestatsioonidiabeedi korral

GDM-diagnoosiga naiste hulgas on ka neid, kellel tekivad autoimmuunsele diabeedile omased autoantikehad. T1DM-spetsiifilised autoantikehad on need, mille sihtmärgiks on insuliin või  $\beta$ -rakud (joonis 2):

- a) Pankrease saarekese vastased autoantikehad (ICA – *islet-cell antibodies*).
- b) Insuliini vastased autoantikehad (IAA – *insulin autoantibodies*).
- c) Glutamaatdekarboksülaas 65 vastased autoantikehad (GADA – *glutamic acid decarboxylase 65 autoantibodies*).
- d) Türosiini fosfataasi vastased autoantikehad (IA-2A – *protein tyrosine phosphatase autoantibodies*, nimetatakse ka *insulinoma-associated antigen-2 autoantibodies*).
- e) Tsink transporter 8 vastased autoantikehad (ZnT8-A – *Zinc transporter 8 autoantibodies*) (Dereke et al., 2016; Incani et al., 2019; Rudland et al., 2015).



**Joonis 2.** Põhiliste antigeenide asukohad pankrease  $\beta$ -rakus, mida autoantikehad ära tunnevad: IA-2 ja ZnT8 asuvad insuliini sekretoorsetes graanulites ja GAD65 leidub mikrovesiikulites (kohandatud Williams & Long, (2019) järgi).

Neuroendokriinne molekul IA-2 on transmembraane glükoproteiin, mille funktsiooniks on kodeerida 979-aminohappest koosnevat valku. IA-2 kuulub türosiini fosfataasi-laadsete proteiinide perekonda ja asub pankrease  $\beta$ -rakkudes (Acevedo-Calado et al., 2019). On leitud, et IA-2A esineb 32-75% isikutel, kel T1DM teke on algusjärgus (Niechciał et al., 2018).

Glutamaatdekarboksülaas on ensüüm, millel eristatakse kahte isovormi – GAD65 ja GAD67 ning nende nime taga olev number viitab molekulaarmassile kilodaltonites (kDa). GAD-i ekspresseeritakse peamiselt kesknärvisüsteemi presünaptilistes  $\gamma$ -aminovõihappe (GABA - *gamma-amino-butyric acid*)-ergilistes neuronites ja pankrease  $\beta$ -rakkudes. GAD65 leidub närviraku aksoni terminaalil, kuid GAD67 asub tsütoplasmas. Mõlema isovormi ülesandeks on L-glutamaadist GABA sünteesimine, kus kofaktorina osaleb püridoksaal-5'-fosfaat (PLP – *pyridoxal-5'-phosphate*) (Graus et al., 2020; McKeon & Tracy, 2017). GABA on inhibitoorne neurotransmitter, mis on GABA<sub>A</sub> ja GABA<sub>B</sub>-retseptorite ligandiks (McKeon & Tracy, 2017). GADA esineb 50-80% T1DM juhtudel, olles levinuim autoantikeha diabeedi korral (Niechciał et al., 2018).

ZnT8 on 369-st aminohappest koosnev transmembraanne valk, mida kodeeritakse *SLC30A8* geeni poolt kromosoomi piirkonnas 8q14.11 (Niechciał et al., 2018). See valk koosneb N- ja C-terminaalsest sabast (Williams & Long, 2019). Tsink on insuliini biosünteesi struktuurne komponent, mis viiakse ZnT8 abil tsütoplasmast insuliini sekreteerivatesse graanulitesse (Rudland et al., 2015). ZnT8-A sihtmärgiks on vastava transportervalgu C-terminaalne epitoop (Dereke et al., 2012). Seni on kirjeldatud ZnT8-A epitoobi kolme varianti, mille erinevus sõltub 325. positsioonis asuva aminohappe esinemisest – ZnT8R (arginiin, R325), ZnT8W (trüptofaan, W325) ja ZnT8Q (glutamiin, Q325) (Dereke et al., 2012; Rogowicz-Frontczak et al., 2018).

Autoantikehade olemasolu GDM-patsientidel võib viidata aja jooksul toimuvale  $\beta$ -rakkude kahjustusele autoimmuunsete protsesside tõttu (Incani et al., 2019). Veelgi enam, on näidatud, et autoantikeha positiivsetel naistel on raseduse ajal tõusnud insuliinravi vajadus (Dereke et al., 2012). Seetõttu on oluline uurida  $\beta$ -rakkudega seotud autoantikehade teket ka GDM-patsientidel. Dereke et al., (2012) leidsid, et 19-l GDM-diagnoosiga rasedal 193-st oli vähemalt üks T1DM spetsiifiline autoantikeha – GADA 52,6%, ZnT8-A 21,1% ja IA-2A 15,8%. Väga väikese osa moodustas kahe või enama autoantikeha esinemine, mida leiti vaid 10,5% juhtudest. Samuti leiti, et ZnT8-A ilmesid GDM-i puhul ka siis, kui teised autoantikehad puudusid. Üldjuhul esinevad GDM-naistel peamiselt kaks autoantikeha (GADA ja IA-2A), mille korral võib suurenda T1DM

haigestumine tulevikus (Dereke et al., 2016). Ühes uuringus leiti, et 96% GDM-naistel, kel oli vähemalt üks positiivne autoantikeha (kas GADA või IA-2A) kujunes T1DM 8 aasta jooksul peale rasedust. Lisaks on täheldatud, et kui GDM-naistel esinesid T1DM-omased autoantikehad, oli neil 2,65 korda suurem risk glükoositaluvuse häire tekkeks (Incani et al., 2019).

#### **1.1.4 Riskid emale ja lapsele**

Diagnoosimata GDM või normist kõrgemad veresuhkruväärtused raseduse ajal ohustavad nii ema kui ka last. Emal on peamised GDM-st tulenevad riskid preeklampsia, enneaegne sünnitus ja rasedusaegse hüpertensiooni kujunemine (Rosik et al., 2020). Kõrge KMI korral on GDM-naistel 8 korda suurem tõenäosus preeklampsia tekkeks (Mirghani Dirar & Doupis, 2017). GDM-diagnoosiga naistel on ka kõrgem risk haigestuda diabeeti hilisemas elus. On leitud, et 10% juhtudel ilmneb diabeet sünnitusjärgselt. Kusjuures 20-60% juhtudel kujuneb diabeet 5-10 aasta jooksul peale sünnitust (Buchanan et al., 2012).

Vastsündinuid ohustab GDM-i tõttu polühüdrarnion ja enneaegne sündimine (Lende & Rijhsinghani, 2020). GDM-i ühe tunnuse, hüperglükeemia, korral võib vastsündinut ohustada hoopiski hüpopglükeemia ehk madal veresuhkru tase. See on tingitud hüperinsulineemiast, mis tekib, kui loote organism toodab ema kõrgema veresuhkru normaliseerimiseks rohkem insuliini. Sünnitusjärgselt ei ole vastsündinu enam seotud ema vereringega, mistõttu ei vaja ta ka enam nii palju insuliini (Mirghani Dirar & Doupis, 2017). Makrosoomiaks nimetatakse seda, kui vastsündinu kaalub rohkem kui 4,5 kg. See on üks põhilisi GDM-ga seotud komplikatsioone ning sellega on seotud sünnitusel tekkida võiv õlgade düstokia, hüpoksia ning hüperbilirubineemia. On täheldatud, et suurema kehakaaluga lapsi võib hilisemas elus ohustada ülekaalulisus, T2DM ja erinevad kardiovaskulaarsed haigused (Li et al., 2015). GDM-rasedustest sündinud lastel on täiskasvanueas (19-27 aasta vanuses) 8 korda suurem risk haigestuda diabeeti (Mirghani Dirar & Doupis, 2017).

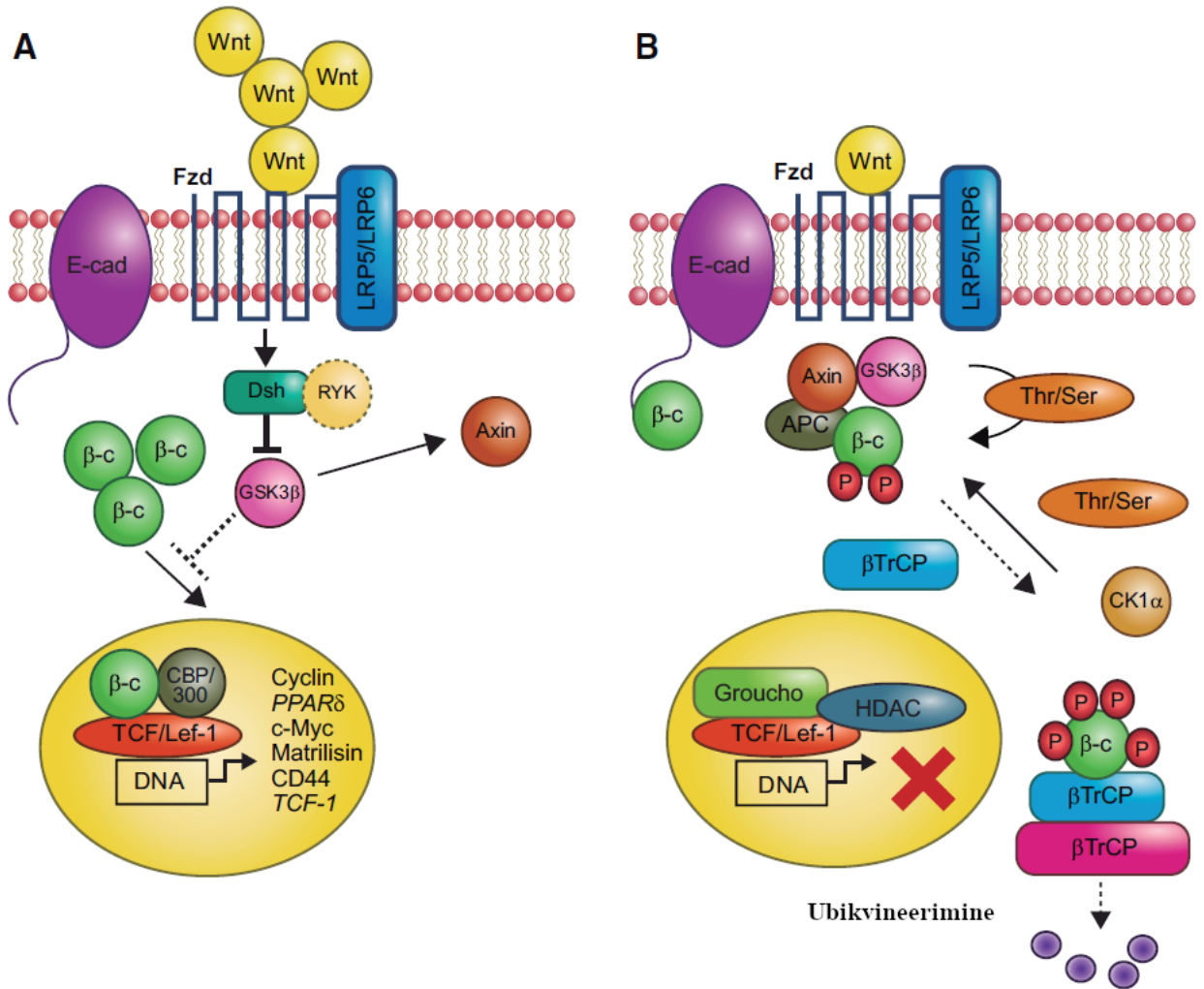
## **1.2 Gestatsioonidiabeedi geneetika**

On teada, et GDM kujuneb geneetiliste ja keskkonnafaktorite koostoimel, mistõttu on tegemist heterogeense haigusega. Enim on uuritud  $\beta$ -rakkude funktsiooniga ja insuliini sekretsiooniga seotud gene, näiteks *TCF7L2*, *HNF4a* (*hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$* ), glükokinaasi (GCK – *glycokinase*), glükokinaasi reguleerivat valku (GCKR – *glucokinase regulatory protein*) ja nende polümorfisme (Rosik et al., 2020). Lisaks nendele on uuritud insuliini retseptorite ning energia ainevahetusega seotud geenide, samuti inimese leukotsüüdi antigeeni (HLA – *human leukocyte*

*antigen*) serotüüpide ja alleelide seost GDM-iga (Mirghani Dirar & Doupis, 2017). *SLC30A8* (*Solute carrier family 30, member 8*) kodeerib  $\beta$ -rakkudes insuliini sünteesi ja sekretsiooni lõppstaadiumis osalevat tsink transporterit. On teada, et tsink transporterit vähenenud aktiivsus suurendab T2DM-i haigestumise riski, kuid üleekspressioon stimuleerib insuliini sekretsiooni. Näiteks on leitud, et *SLC30A8* geeni introni piirkonnas asuv polümorfism rs13266634 omab kaitsvat mõju GDM-i kujunemise suhtes (Rosik et al., 2020). Näiteks *IRS1* (*insulin receptor substrate 1*) kodeerib valku, mis on vajalik insuliini ja insuliini kasvufaktori (IGF-1 – *insulin growth factor 1*) retseptori omavahelises signaali ülekandes, samuti ka GLUT4 translokatsioonil (Rosik et al., 2020).

### **1.2.1 *TCF7L2***

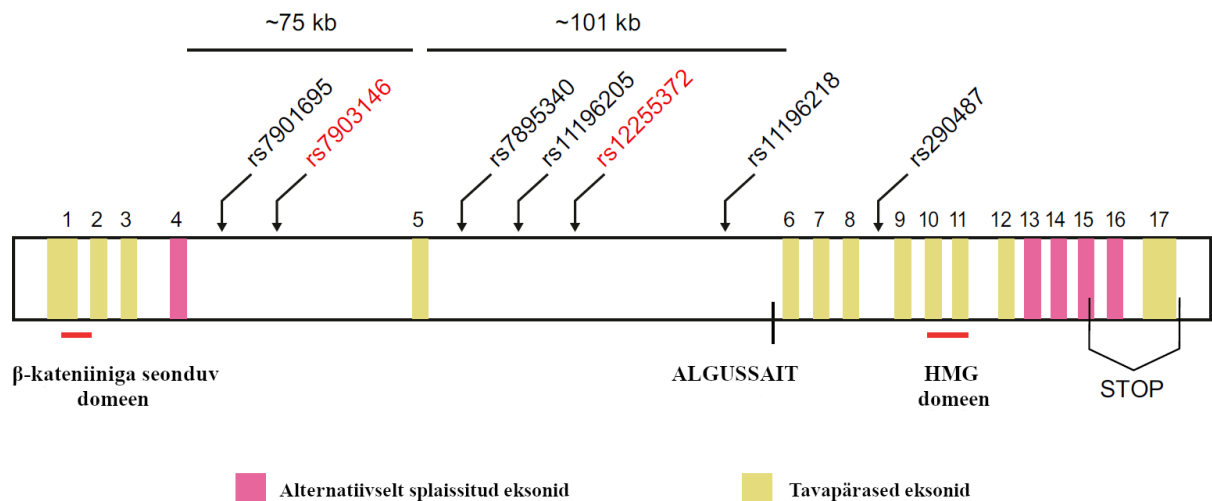
*TCF7L2* on kõrge afiinsusega transkriptsioonifaktorite gruppi kuuluv valku kodeeriv geen, mis asub kromosoomi piirkonnas 10q25.3 ja osaleb Wnt-signaaliraja regulatsioonis (joonis 3) (Del Bosque-Plata et al., 2021). *TCF7L2* geeni ekspresseeritakse rasv- ja maksakoes, Langerhansi saarekestes ja ka ajus (Zhou et al., 2014). Selle geeni olemasolu on kõige rohkem seostatud T2DM-iga, aga ka GDM-iga (Chang et al., 2017; Francaite-Daugeliene et al., 2021). *TCF7L2* reguleerib  $\beta$ -rakkude proliferatsiooni ja osaleb inkretiini hormoonide, glükagooni-laadse peptiidi 1 (GLP-1) ja glükoosist-sõltuva insulintroopse peptiidi sünteesis. Samuti on leitud, et *TCF7L2* mõjutab glükoosi metabolismi (Francaite-Daugeliene et al., 2021).



**Joonis 3.** Kanooniline Wnt-signaalarada. A tähistab aktiveeritud Wnt signaalirada ning B on inaktiveeritud Wnt signaalirada (kohandatud Del Bosque-Plata et al., (2021) järgi).

### 1.2.2 Struktuur

*TCF7L2* kuulub T-raku ja lümfoidse võimendaja faktori (TCF/LEF – *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) transkriptsioonifaktorite perekonda, millega seondub β-kateniin (Locke et al., 2011). *TCF7L2* koosneb 18-st eksonist (Del Bosque-Plata et al., 2021), polümorfism rs7903146 asub 3. intronis (Mitchell et al., 2015). Sellel geenil on mitu kõrgelt konserveerunud regiooni koos funktsioneerivate domeenidega. β-kateniiniga seonduv domeen asub 1. eksonis ja HMG-box seonduv domeen vastavalt 10. ja 11. eksonis (joonis 4) (Del Bosque-Plata et al., 2021).



**Joonis 4.** TCF7L2 geeni struktuur (tõlgitud Del Bosque-Plata et al., (2021) järgi).

### 1.2.3 Funktsioon

*TCF7L2* geenil on keskne roll proinsuliini sünteesi reguleerimises. Proinsuliini produktsioon on mõjutatud mitmete transkriptsioonifaktorite (näiteks MAFA, PDX1 ja NEUROD1) poolt, mille reguleerijaks on peamine *TCF7L2* sihtmärk insuliini geeni võimendav valk 1 (ISL1 – *insulin gene enhancer protein 1*). Lisaks sellele on ISL1 vajalik ka teiste pankrease hormoonide (näiteks glükagooni ja somatostatiini) ekspressioonis (Zhou et al., 2014). Geoghegan et al., (2019) töid oma uuringus välja, et *TCF7L2* on adipogeneesis keskne transkriptsiooni regulaator, mis mõjutab lipiidide ja glükoosi metabolismiga seotud geenide ekspressiooni.

### 1.2.4 Polümorfismid

Ühenukleotiidne polümorfism (SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*) on inimese genoomses DNA-s esineva üksiku aluspaari varieeruvus populatsiooni indiviidide hulgas. Kogu populatsiooni SNP-de üldine esinemissagedus on üks iga 200-600 aluspaari kohta (Tsalenko et al., 2002), kuid keskmiselt leidub üks SNP iga 250 aluspaari kohta (Ramírez-Bello & Jiménez-Morales, 2017). DNA-järjestuse variatsiooni loetakse SNP-ks, kui selle sagedus populatsioonis on üle 1% (Tsalenko et al., 2002). SNP-id asuvad genoomi intrageensetel ja ekstrageensetel aladel, on enamasti bialleelsed ning neid on lihtne genotüpiseerida (Ramírez-Bello & Jiménez-Morales, 2017).

*TCF7L2* ühenukleotiidseid polümorfisme on seostatud T2DM-ga, neist kõige tugevamat seost on näidanud rs7903146, genotüübiga CT/TT. On teada, et selle SNP-i puhul on riskialleeliks T, mida on seostatud näiteks insuliini sekretsiooni toime halvenemisega (Lyssenko et al., 2007). Chang et al., (2017) viisid läbi meta-analüüsi, uurimaks kaheksat erinevat *TCF7L2* polümorfismi GDM-

patsientide hulgas: rs7903146, rs12255372, rs7901695, rs290487, rs11196205, rs11196218, rs12243326 ja rs4506565 (Chang et al., 2017). Nad leidsid, et kuuel SNP-il kaheksast on seos GDM-iga. Samuti leiti, et kõige tugevam seos on kolmel *TCF7L2* geeni SNP-il – rs7903146 [C/T], rs12255372 [G/T] ja rs7901695 [T/C], kuid samas esines teatud iseärasusi etniliste rühmade vahel. Francaite-Daugeliene et al., (2021) leidsid samuti, et kõige suurem seos GDM-patsientide hulgas on SNP-del rs7901695 [C/C ja C/T], rs7903146 [C/T ja T/T] ja rs12255372 [G/T ja T/T]. Nende GDM-diagnoosiga rasedate etnilise rühma moodustasid ainult europiidid.

## 2 EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Uurimistöö eesmärgid

Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli hinnata *TCF7L2* geeni polümorfismi rs7903146 esinemissagedust ja mõju gestatsioonidiabeedi riskirühma kuuluvate rasedate hulgas.

### 2.2 Materjal ja meetodika

#### 2.2.1 Valimi ja taustaandmete kirjeldus

Uuringus osales 473 üksikrasedusega naist vanuses 19–45 aastat, kes kuulusid GDM riskirühma (tabel 1) ja suunati seetõttu raseduse II poolel (rasedusnädalatel 21–33) SA TÜ Kliinikumi (TÜK) naistekliinikus GTT-le ajavahemikul 2013–2019. GTT on glükoosi ainevahetuse häirete tuvastamise standardiseeritud koormustest. Selle testi käigus mõõdeti naiste veresuhkur pärast 8–16 tunnist paastumist, seejärel 1 h ja 2 h pärast 75 g glükoosist valmistatud lahuse joomist. Vastavalt *IADPSG* GDM-i diagnoosimise kriteeriumitele (Metzger et al., 2010) (tabel 2), diagnoosis SA TÜK naistekliiniku sisehaiguste arst 181-l naisel GDM-i. Ülejäänud 292 naist moodustasid käesolevas uurimuses GDM-i võrdlusrühma. Uuringust jäid välja rasedad, kellel oli juba varasemalt esinenud glükoositalumatus või diagnoositud diabeet ning rasedad, kes olid viimase nädala jooksul haigestunud mõnda infektsioonhaigusesse. Antud töös kitsendati uuringukriteeriume seetõttu, et sooviti uurida ja vaadelda ainult neid, kellel varasemalt veresuhkru ainevahetuse kõrvalekaldeid täheldatud pole.

Uuringu käigus kohtusid uuritavad SA TÜK naistekliiniku ämmaemandaga kahel korral:

- 1) uuringusse astumise hetkel GTT läbiviimise päeval;
- 2) sünnitusjärgse visiidi käigus alates 6. sünnitusjärgsest nädalast kuni 1. aasta pärast sünnitust.

Ämmaemand võttis uuritavatelt vereproovi ja kogus nende terviseandmed vastavalt uuringu küsimustikule. DNA eraldamiseks koguti patsientide tühja kõhu venoosne veri etüleendiamiintetraädikhappe (EDTA) katsutitesse, mida tsentrifuugiti vereplasma eraldamiseks toatemperatuuril kiirusel 805 g 15 minutit (Centrifuge 5810R, Eppendorf AG, Saksamaa). Pärast plasma eraldamist säilitati alles jäänud rakkude mass  $-80^{\circ}\text{C}$  juures.

Täisvere glükoosisisaldus ja kliinilise vere analüüsid (C-peptiid, kolesteroolid, triglütseriidid) olid määratud Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlaboris vastavalt Cobas p 501 (Roche) ja Cobas e 601 analüsaatoritel. Kõigil uuritavatel olid vereseerumist eelnevalt bio- ja siirdemeditsiini instituudi

immunoloogia osakonna spetsialistide poolt määratud T1DM-ga seotud autoantikehad: GADA, IA-2 ja ZnT8-A, kasutades kommertsiaalseid immunosorptsioonmeetodil põhinevaid kitte (RSR Ltd., Cardiff, UK) vastavalt tootja juhistele. Piirväärtused olid GADA puhul > 5 U/mL, IA-2A puhul > 7,5 U/mL ja ZnT8-A puhul > 10 U/mL. Kõik selles uuringus kasutatud autoantikehade testid osalesid autoantikehade standardiseerimise programmis (*Islet Autoantibody Standardization Program – IASP*).

## 2.2.2 DNA puhastamine soolamise meetodil ja kontsentratsiooni mõõtmine

Külmutatud rakkude mass EDTA katsutis sulatati jääl. Kõigepealt lisati rakkude massile lüüsisegu 1 (tabel 3) ning tsentrifugeeriti erütrotsüütide mass põhja 10 minutit kiirusel 1258 g ilma piduri ja kiirendajata (Centrifuge 5810R, Eppendorf AG, Saksamaa).

**Tabel 3.** 1x erütrotsüütide lüüsiipuhver ehk lüüsisegu 1 komponendid ühe proovi jaoks

Komponent	Kogus (ml) ühe proovi kohta
dH <sub>2</sub> O	4,75
20x erütrotsüütide lüüsiipuhver <sup>1</sup>	0,25
<b>Kokku (ml):</b>	<b>5</b>

<sup>1</sup> 20x erütrotsüütide lüüsiipuhvri info komponentide kohta on välja toodud lisas 1.

Edasi eemaldati supernatant ja sademele lisati 1 ml dH<sub>2</sub>O (Milli-Q Millipore Synthesis A10, poori suurus 0,22 µm, DNAasi ja RNAasi vaba) ning loksutati põhjas olev sade lahti. Järgmisena kallati proov mikrokatsutisse, raputati tugevalt ning tsentrifugeeriti kiirusel 13 000 g 2 minutit piduri ja kiirendajaga 7 (Centrifuge 5410R, Eppendorf AG, Saksamaa). Supernatant eemaldati ning korrati pesu etappi, kuni supernatant muutus heledaks ja selgeks. Pärast viimast pesu etappi eemaldati supernatant ja lisati sademele 740 µl lüüsisegu 2 (tabel 4). Proove inkubeeriti soojendusblokil 55°C juures seni, kuni kogu sade oli lahustunud.

**Tabel 4.** Lüüsisegu 2 komponendid ühe proovi jaoks

Komponent	Kogus (µl) ühe proovi kohta
Proteinaas-K puhver <sup>1</sup>	160
Proteinaas-K (1 mg/ml) <sup>1</sup>	65
20% SDS <sup>1</sup>	40
dH <sub>2</sub> O	480
<b>Kokku (µl):</b>	<b>745</b>

<sup>1</sup> Proteinaas-K puhvri, Proteinaas-K (1 mg/ml) ja 20% SDS lahuste komponendid on välja toodud lisas 1.

Kui sade oli lahustunud, lisati eppendorfi 300 µl +4°C juures hoitud 5M NaCl (lisa 1), segati ja tsentrifuugiti 13 000 g 5 minutit. Järgmisena valati mikrokatsuti sisu külma 96% etanooli, loksutati ettevaatlikult edasi-tagasi ja korjati tekkinud niidikogum klaasist Pasteuri pipetile. Seejärel viidi Pasteuri pipett 10 minutiks +37°C termokappi ja pärast seda pesti pipetti külma 70% etanooliga (hoitud -20°C juures). Pärast pesu viidi pipett uuesti 10 minutiks +37°C juurde. Seejärel asetati Pasteuri pipett 1x TE-lahusega (500 µl, lisa 1) eppendorfi, loksutati sademe lahtitulemiseks ja pandi +55°C soojendusblokkile inkubeerima. 24 tundi hiljem mõõdeti DNA kontsentratsioon NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga (Thermo Fisher Scientific, USA). DNA puhtust hinnati  $A_{260/280}$  väärtuse järgi. Eraldatud DNA proove säilitati -80°C juures.

### 2.2.3 DNA lahjendused ja genotüüpiseerimine

Kõik DNA proovid lahjendati kontsentratsioonile 20 ng/µl. *TCF7L2* introni polümorfism C > T (rs7903146) genotüüpiseerimiseks kasutati TaqMan (Thermo Fisher Scientific, USA) praimerit järjestusega, mis on kirjas tabelis 5. Kasutati kahte TaqMan PCR reaktsioonisegu: (1) TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems, USA) või (2) TaqMan Genotyping Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA). Lahjendatud DNA lisati reaktsioonisegusse (tabel 6), segati ja seejärel kanti 96-kaevukesega PCR-plaadile (Bioplastics BV, Holland). Proovide puhul, mida oli vaja korrata, lisati mõnda PCR reaktsioonisegu komponenti teises koguses, mis on välja toodud tabelis 7. RT-qPCR-i etapid ja tsüklite ehk korduste arv on välja toodud tabelis 8. RT-qPCR läbiviimiseks kasutati ABI PRISM 7000 Sequence Detection System masinat (Applied Biosystems, USA).

**Tabel 5.** Praimerid järjestus

RS-number	Järjestus
rs7903146	5'-TAGAGAGCTAAGCACTTTTATAGATA[C/T] TATATAATTTAATTGCCGTATGAGG-3'

**Tabel 6.** PCR reaktsioonisegu komponendid *TCF7L2* polümorfismi rs7903146 määramiseks

<b>A. TaqMan Universal Master Mix No AmpErase UNG</b>	
<b>Komponent</b>	<b>Kogus (ühe proovi kohta)</b>
DNA (20 ng/µl)	2 µl
Puhver (2X)	5 µl
TaqMan Probe (40X)	0,125 µl
dH <sub>2</sub> O	2,875 µl
<b>Kokku:</b>	10 µl

<b>B. TaqMan Genotyping Master Mix</b>	
<b>Komponent</b>	<b>Kogus (ühe proovi kohta)</b>
DNA (20 ng/µl)	2 µl
Puhver (2X)	5 µl
TaqMan Probe (40X)	0,25 µl
dH <sub>2</sub> O	2,75 µl
<b>Kokku:</b>	10 µl

**Tabel 7.** Kordusproovide PCR reaktsioonisegu komponendid *TCF7L2* polümorfismi rs7903146 määramiseks

<b>TaqMan Universal Master Mix No AmpErase UNG</b>	
<b>Komponent</b>	<b>Kogus (ühe proovi kohta)</b>
DNA (20 ng/µl)	1,5 µl
Puhver (2X)	5 µl
TaqMan Probe (40X)	0,25 µl
dH <sub>2</sub> O	3,25 µl
<b>Kokku:</b>	10 µl

**Tabel 8.** *TCF7L2* polümorfismi rs7903146 genotüpiseerimise RT-qPCR etapid

<b>Etapid</b>	<b>Temperatuur (°C)</b>	<b>Kestvus</b>	<b>Korduste arv</b>
Ensüümi aktivatsioon	95	10 minutit	1
Denaturatsioon <sup>1</sup>	92	15 sekundit	48
Pikendamine	60	1 minut	48

<sup>1</sup> TaqMan Genotyping Master Mix PCR reaktsioonisegu jaoks oli denaturatsiooni temperatuuriks 95°C.

#### **2.2.4 Andmete analüüs**

Hardy-Weinbergi tasakaalu kontrolliti  $\chi^2$ -testi abil. Parameetrilised tunnused esitati keskvaartuse ja standardhälvena ning võrreldi ANOVA dispersioonanalüüsil. Mitteparameetriliste tunnuste analüüsimisel kasutati Kruskal-Wallise testi ja tulemused esitati mediaanvaartusena koos miinimum ja maksimum vaartusega. Rühmitavad tunnused esitati absoluutarvuna ja kasutati  $\chi^2$ -testi, kui kõikide alleelide sagedused olid >5% või Fisheri testi, kui üks sagedustest oli <5%. KMI vaartused rühmitati järgmiselt: KMI < 25 – normaalkaal; KMI  $\geq$  25 – ülekaal; KMI > 30 – rasvumine. Arvutati šansisuhted ja 95% usaldusintervall genotüüpide seoste analüüsimiseks, milleks kasutati binoomilist logistilist regressiooni. Kuna omavahel võrreldi *TCF7L2* rs7903146 kolme genotüüpi, kasutati statistilisel analüüsil Bonferroni korrigeerimise ja statistiliselt oluliseks loeti, kui  $p < 0,017$ . Andmete analüüsil kasutati R-i programmeerimiskeelt (versioon 4.0.3) ja keskkonda koos RStudio tarkvaraga (versioon 1.4.1103).

### 2.3 Tulemused

Kõigil 473-l uuritaval määrati *TCF7L2* SNP-i (rs7903146) genotüübid. Genotüpiseerimine õnnestus 98,5% proovidest (n = 466). Tulemuste kinnitamiseks genotüpiseeriti 1,3% proovidest uuesti ning tulemused langesid kokku 100% juhtudest.

Genotüüpide sagedused kogu uuritavate seas olid: C/C 65%, C/T 31% ja T/T 4%. C-alleeli esinemissagedus oli 73,3% ja T-alleeli esinemissagedus 26,7%. Saadud genotüüpide sagedused vastasid Hardy-Weinbergi tasakaalule nii kogu grupis (p = 0,717) kui ka GDM-i ja võrdlusrühmas (vastavalt, p = 0,523; p = 0,326) ega erinenud rühmade vahel (p = 0,468) (tabel 9).

**Tabel 9.** *TCF7L2* rs7903146 genotüüpide jaotus

Genotüüp	Sagedus kogu rühmas		Sagedus GDM-rühmas		Sagedus võrdlusrühmas	
	Oodatav	Mõõdetud	Oodatav	Mõõdetud	Oodatav	Mõõdetud
C/C	0,64	0,65	0,63	0,63	0,67	0,66
C/T	0,31	0,31	0,34	0,33	0,29	0,31
T/T	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04	0,04

Tabelis 10 on välja toodud rasedusaegsete kliiniliste andmete võrdlus kolme genotüübi vahel, millest selgus, et T/T genotüübiga naiste KMI enne rasedust ja ka sünnituse ajal (tabel 11) oli suurem võrdlusrühmade KMI-väärtustest (p < 0,05 mõlemal juhul). Peale Bonferroni korrektsiooni muutus erinevus statistiliselt mitteoluliseks. Lineaarsel regressioonianalüüsil selgus, et T/T genotüüp oli positiivselt seotud KMI-väärtustega kõigis kolmes ajapunktis (vastavalt,  $\beta = 3.150$ , p = 0.009;  $\beta = 3.218$ , p = 0.015 ja  $\beta = 2,876$ , p = 0.025). Seoste statistiline olulisus säilis mudelite kohandamisel ema vanusele ja kaasuvate haiguste esinemisele. KMI jaotamisel vahemikesse ilmnis, et T/T genotüüp suurendas šanssi, et naine oli raseduseelselt rasvunud KMI > 30 (OR = 2,95; 95% UV 1,1 – 7,6; p = 0,026). Peale Bonferroni korrektsiooni statistiline erinevus kadus. Analüüsides eraldi ka T-alleeli mõju, selgus, et T-alleel eraldi ei olnud seotud KMI pidevate väärtustega ega suurendanud naistel rasvumise šanssi (p > 0,05 mõlemal korral).

Kuigi T/T genotüübiga uuritavatel olid kõige kõrgemad keskmised vererõhu väärtused ja neil esines 10% sagedamini hüpertooniatõbe, ei saavutanud need erinevused statistilist olulisust. Ka teiste vaadeldud parameetrite osas erinevusi genotüüpide vahel polnud, sealhulgas GTT-l

mõõdetud veresuhkru tulemused, C-peptiidi väärtused, GDM-i diagnoos ja autoantikehade esinemissagedus (tabel 10). Nii läbi viidud lineaarsel kui logistilisel regressioonil ei ilmnenu olulisi seoseid T/T genotüübi või T-alleeli ja loetletud tunnuste vahel.

Vajadus raseduse lõpus insuliini tarvitamiseks oli küll sagedasem T/T genotüübi korral (5,3% võrreldes 0,6% C/C ja 2,1% C/T genotüübi puhul), kuid seos polnud statistiliselt oluliselt erinev ( $p = 0,100$ ) (tabel 11). Kokku vajas raseduse lõpus insuliini 6 GDM rühma kuuluvat uuritavat. Logistilisel regressioonanalüüsil ilmnis suundumus, et T/T genotüüp suurendab insuliini tarvitamise vajadust OR = 8,36 korda (95% UV 0,7 – 96,6;  $p = 0,089$ ), mis ei kühündinud statistilise olulisuseni. Ka T-alleel eraldi ei suurendanud šanssi insuliini vajadusele ( $p > 0,05$ ). Mudeli kohandamisel naise vanusele, GTT paastuglühkoosi väärtusele ja rasedusnädale, ilmnis, et T/T genotüüp suurendas insuliinravi vajaduse riski OR = 19,06 korda (95% UV 1,2 – 300,2;  $p = 0,036$ ).

Teise ajapukti andmed olid olemas 389-l uuritaval. Võrreldud rühmad ei erinenud omavahel vaadeldud raseduskomplikatsioonide esinemise osas (tabel 10). Ainult ühel T/T genotüübiga uuritaval esines üks vaadeldud neljast rasedusaegsest komplikatsioonist, milleks oli rasedusaegne hüpertensioon. Vastsündinute sünniaegsed näitajad ei erinenud uuritavate rühmade vahel (tabel 12).

Sünnitusjärgsete kliiniliste andmete võrdlus on toodud tabelis 13. Kuigi T/T genotüübiga uuritavatel ei olnud üldkolesterooli ja kõrge tihedusega lipoproteiinide (HDL - *high density lipoproteins*)-kolesterooli väärtused võrdlusrühmadest statistiliselt oluliselt kõrgemad (vastavalt,  $p = 0,065$  ja  $p = 0,076$ ), ilmnis lineaarsel regressioonanalüüsil, et T/T genotüüp oli võrdeliselt seotud HDL-kolesterooli väärtustega ( $\beta = 1,44$ ,  $p = 6,86 \cdot e^{-8}$ ). Ka T-alleel eraldi oli võrdelises seoses HDL-kolesterooli väärtustega ( $\beta = 0,19$ ,  $p = 0,046$ ). Seoste olulisus säilis mudelite kohandamisel sünnitusjärgsele KMI-väärtusele ( $p = 0,001$  ja  $p = 0,034$ , vastavalt). Lisaks ilmnis logistilisel regressioonanalüüsil, et T/T genotüüp, kuid mitte T-alleel eraldi, suurendas emal šanssi, et tema sünnitusjärgne kolesterooli tase on üle referentsväärtuse ( $> 1,2$  mmol/L) OR = 5,74 korda (95% UV 1,6 – 20,1;  $p = 0,006$ ).

**Tabel 10.** Rasedusaegsete kliiniliste andmete võrdlus

<b>TCF7L2</b>							
<b>(rs7903146)</b>	<b>C/C (n = 303)</b>		<b>C/T (n = 144)</b>		<b>T/T (n = 19)</b>		<b>P-väärtus</b>
GDM-uuritavad (n = 176)	110	62,5% (54,7-69,5%)	60	34,1% (27,2-41,7%)	6	3,4% (1,4-7,6%)	0,468
GDM-võrdlusrühm (n = 290)	193	66,6% (60,8-71,9%)	84	29,0% (23,9-34,6%)	13	4,5% (2,5-7,7%)	
Vanus (aastad)	31,0 ± 5,0		30,7 ± 5,4		30,2 ± 5,0		0,711
KMI (kg/m <sup>2</sup> )	25,9 ± 5,1		25,7 ± 4,8		29,1 ± 7,2		<b>0,023</b>
Rasedusnädal uuringu alguses	26,8 ± 1,7		26,7 ± 1,6		26,5 ± 1,1		0,685
<b>GTT tulemus</b>							
0 min (mmol/L)	4,7 ± 0,5		4,7 ± 0,4		4,6 ± 0,4		0,734
60 min (mmol/L)	7,8 ± 2,0		8,1 ± 2,0		7,3 ± 1,8		0,104
120 min (mmol/L)	6,3 ± 1,6		6,6 ± 1,6		5,9 ± 1,4		0,104
C-peptiid (nmol/L)	0,8 ± 0,3		0,8 ± 0,4		0,7 ± 0,3		0,602
Süstoolne vererõhk (mmHg)	120,5 ± 12,4		119,6 ± 11,5		125,5 ± 12,4		0,138
Diastoolne vererõhk (mmHg)	72,2 ± 8,2		71,5 ± 8,9		75,7 ± 8,9		0,127
Hüpertensioon	33	10,9% (7,7-15,1%)	14	9,7% (5,6-16,1%)	4	21,1% (7,0-46,1%)	0,331
<b>Esines vähemalt üks autoantikeha</b>	24	7,9% (5,2-11,7%)	7	4,9% (2,1-10,1%)	1	5,2% (0,3-28,1%)	0,464
IA-2A	3	1,0% (0,3-3,1%)	0	0,0% (0,0-3,2%)	0	0,0% (0,0-21,0%)	0,607
ZnT8-A	9	3,0% (1,5-5,8%)	2	1,4% (0,2-5,4%)	1	5,3% (0,3-28,1%)	0,313
GADA	12	4,0% (2,2-7,0%)	6	4,2% (1,7-9,2%)	0	0,0% (0,0-21,0%)	1

Pidevad tunnused on esitatud keskväärtusena ± standardhälve ning võrreldud ANOVA dispersioonanalüüsil. Rühmitavatel tunnustel on esitatud isikute arv ja veeruprotsent (95% usaldusvahemik)

ning võrreldud  $\chi^2$ -ruut või Fisheri testiga. Alagruppide vaheliseks võrdluseks kasutati proportsioonitesti. Statistiliselt olulised väärtused on märgitud rõhutatud kirjas.

**Tabel 11.** Sünnitusaegsete kliiniliste andmete võrdlus

<i>TCF7L2</i>							
(rs7903146)	C/C (n = 255)		C/T (n = 118)		T/T (n = 16)	P-väärtus	
KMI sünnitusel (kg/m <sup>2</sup> )	31,2 ± 5,0		31,2 ± 5,2		34,4 ± 6,4	<b>0,050</b>	
Kaaluiive	14,0 ± 6,7		14,4 ± 6,4		16,7 ± 6,5	0,278	
Rasedusnädal sünnitusel	39,7 ± 1,4		39,4 ± 1,8		40,0 ± 1,0	0,123	
<b>Rasedusaegsed komplikatsioonid</b>	66	25,7%	31	26,3%	1	6,3%	0,206
	(20,5-31,6%)		(18,8-35,3%)		(0,3-32,3%)		
Oht raseduse katkemisele	27	10,5%	10	8,5%	0	0	0,482
	(7,2-15,1%)		(4,4-15,4%)		(0,0-24,1%)		
Oht enneaegsele sünnitusele	19	7,4%	13	11,0%	0	0,0%	0,287
	(4,6-11,5%)		(6,2-18,4%)		(0,0-24,1%)		
Rasedusaegne hüpertensioon	29	11,3%	13	11,0%	1	6,3%	0,823
	(7,8-16,0%)		(6,2-18,4%)		(0,3-32,3%)		
Preeklampsia	6	2,3%	4	3,4%	0	0,0%	0,824
	(1,0-5,3%)		(1,1-9,0%)		(0,0-24,1%)		
Loomulik sünnitus	61	24,0%	29	24,6%	6	37,5%	0,474
	(19,0-30,0%)		(17,3-33,5%)		(16,3-64,1%)		
Metformiini vajadus	15	5,0%	9	6,3%	2	10,5%	0,413
	(2,9-8,2%)		(3,0-11,9%)		(1,8-34,5%)		
Insuliini vajadus	2	0,6%	3	2,1%	1	5,3%	0,100
	(0,1-2,6%)		(0,5-6,4%)		(0,3-28,1%)		

Pidevad tunnused on esitatud keskvaärtusena ± standardhälbena ning võrreldud ANOVA dispersioonanalüüsil. Rühmitavatel tunnustel on esitatud isikute arv ja veeruprotsent (95% usaldusvahemik) ning võrreldud  $\chi^2$ -ruut testi või Fisheri testiga. Alagruppide vaheliseks võrdluseks kasutati proportsioonitesti. Statistiliselt olulised väärtused on märgitud rõhutatud kirjas.

**Tabel 12.** Lapsega seotud tunnused

<i>TCF7L2</i>							
<b>(rs7903146)</b>	<b>C/C (n = 254)</b>		<b>C/T (n = 118)</b>		<b>T/T (n = 16)</b>	<b>P-väärtus</b>	
Lapse kaal	3631 ± 492,3		3583 ± 601,8		3713 ± 418,0	0,544	
1 eluminuti APGAR	8,3 ± 1,1		8,3 ± 1,1		8,3 ± 1,1	0,920	
5 eluminuti APGAR	8,9 ± 0,9		8,9 ± 0,8		9,1 ± 0,8	0,871	
1 eluminuti APGAR < 7	10	3,9% (2,0-7,3%)	7	5,9% (2,6-12,3%)	2	12,5% (2,2-39,6%)	0,175
5 eluminuti APGAR < 7	3	1,2% (0,3-3,7%)	1	0,8% (0,0-5,3%)	0	0,0% (0,0-24,1%)	1
Lapse diagnoos terve	197	50,8% (58,5-69,4%)	94	24,2% (25,5-36,2%)	16	4,1% (3,1-8,5%)	0,075

Pidevad tunnused on esitatud keskväärtusena ± standardhälbena ning võrreldud ANOVA dispersioonanalüüsil. Rühmitavatel tunnustel on esitatud isikute arv ja veeruprotsent (95% usaldusvahemik) ning võrreldud Fisheri testiga. Alagruppide vaheliseks võrdluseks kasutati proportsioonitesti.

**Tabel 13.** Sünnitusjärgsete kliiniliste andmete võrdlus

<i>TCF7L2</i> (rs7903146)	C/C (n = 255)	C/T (n = 118)	T/T (n = 16)	P- väärtus
KMI (kg/m <sup>2</sup> )	27,1 ± 5,0	27,1 ± 4,6	30,0 ± 6,2	0,075
Süstoolne vererõhk (mmHg)	121,6 ± 11,6	123,3 ± 11,4	122,5 ± 13,8	0,399
Diastoolne vererõhk (mmHg)	75,4 ± 7,8	76,4 ± 8,3	75,5 ± 9,0	0,529
Veresuhkur paastuplasmas (mmol/L)	4,8 ± 0,5	4,8 ± 0,5	4,7 ± 0,4	0,636
Sünnitusjärgne veresuhkur ≥ 6,1 (mmol/L)	10 4,0% (2,0-7,4%)	2 1,7% (0,3-6,7%)	1 6,3% (0,3-32,3%)	0,285
Paastu C-peptiid (nmol/L)	0,7 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,687
Üldkolesterool (mmol/L)	5,3 ± 0,9	5,1 ± 0,9	5,7 ± 1,6	0,065
LDL-kolesterool (mmol/L)	3,4 ± 0,8	3,2 ± 0,9	3,7 ± 1,5	0,113
HDL-kolesterool (mmol/L)	1,70 (0,67-2,82)	1,66 (0,76-3,12)	2,00 (1,26-20,7)	0,076
Triglütseriidid (mmol/L)	1,0 ± 0,5	0,9 ± 0,4	0,9 ± 0,4	0,560

Pidevad tunnused on esitatud keskvaertusena ±standardhälve ning võrreldud ANOVA dispersioonanalüüsil. Normaalsootusele mitte vastav pidev tunnus on esitatud mediaanina (miinimum – maksimum väärtus) ning võrreldud Kruskal-Wallise testiga. Rühmitavatel tunnusel on esitatud isikute arv ja veeruprotsent (95% usaldusvahemik) ning võrreldud Fisheri testiga. Alagruppide vaheliseks võrdluseks kasutati proportsioonitesti. LDL (*low density lipoproteins*) – madala tihedusega lipoproteiinid, HDL (*high density lipoproteins*) – kõrge tihedusega lipoproteiinid.

## 2.4 Arutelu

*TCF7L2* SNP-id on seotud hüperglükeemia ja T2DM-ga, kuna neil polümorfismidel on oluline roll  $\beta$ -rakkude funktsiooni vähenemises (Plows et al., 2018; Rosik et al., 2020). On teada, et *TCF7L2* SNP rs7903146 riskialleeliks on T-alleel. Mitmed tööd on näidanud, et see SNP võib olla seotud ka GDM-i kujunemisega. Eelnevast lähtuvalt oli selle töö eesmärgiks uurida *TCF7L2* SNP-i rs7903146 genotüüpide (C/C, C/T ja T/T) seoseid GDM-i diagnoosi ja sellega seotud faktorite ning raseduskomplikatsioonidega GDM riskirühma kuuluvate naiste seas. Antud töö põhitulemusena leiti, et T/T genotüüp tõstab insuliinravi vajaduse šanssi. Samas puudusid seosed GDM-diagnoosi, veresuhkru ja C-peptiidi väärtustega ning raseduskomplikatsioonidega.

Põhiliselt on GDM-i korral uuritud SNP-i rs7903146 seoseid GDM-i kujunemise riski ja rasedusaegsete veresuhkru väärtustega. Saadud tulemused on olnud vasturääkivad ja sõltuvad uuritavate etnilisest rühmast (Chang et al., 2017; Fritsche et al., 2018). Näiteks Freathy et al., (2010) töös leiti, et *TCF7L2* rs7903146 oli seotud paastuglükoosi ( $p = 0,03$ ), 1-h ( $p < 0,0001$ ) ja 2-h veresuhkruga GTT-l ( $p < 0,0001$ ), kuid need seosed ilmnesisid vaid europiidide hulgas, mitte aga asiaatidel ( $p > 0,05$ ). Seevastu hiljutises Francaite-Daugeliene et al., (2021) Leedus läbi viidud uuringus leiti küll kolme *TCF7L2* SNP-i (rs7901695 [C/C ja C/T], rs7903146 [C/T ja T/T] ja rs12255372 [G/T ja T/T]) kõrgem esinemissagedus GDM-diagnoosiga naiste hulgas, kuid nende uuringus ei ilmnenu olulist seost veresuhkru tasemega, kolesterooli ega ka KMI-ga.

Käesolevas töös ei eristanud rs7903146 polümorfism GDM riskirühma kuuluvate naiste seast neid, kellel diagnoositi GDM, mis võib tuleneda T/T genotüübiga uuritavate väikesest arvust ( $n = 19$ ). Lisaks võib varasemalt publitseeritud töödest teistsugune tulemus olla tingitud ka lahknevustest GDM diagnoosimise kriteeriumites, mis erinevad riigiti ning uuritavate rahvusest tulenevatest iseärasustest. Sarnaselt sellele tööle ei leidnud ka Venemaal hiljuti läbi viidud uuringus seost GDM diagnoosi ja *TCF7L2* genotüüpidega (Popova et al., 2021). Lisaks GDM diagnoosile ei leitud selles töös *TCF7L2* genotüüpide seoseid GTT veresuhkru väärtustega raseduse ajal. Erinevus varasemalt avaldatud töödega võib peale eelpool mainitud teguritele olla tingitud ka sellest, et tööd, mis on leidnud seose rs7903146 polümorfismi ja veresuhkruga, on uurinud mitte-rasedaid naisi, kelle glükoositaseme regulatsioon on erinev rasedusaegsest regulatsioonist (Plows et al., 2018).

Üksikud tööd on näidanud, et T-riskialleeliga GDM patsientidel on suurem vajadus insuliinravi järele raseduse viimasel trimestril. Potasso et al., (2020) leidis, et T/T genotüüp suurendas vajadust insuliinravi järele 3,46 korda, mis on kooskõlas käesoleva töö tulemustega, milles leiti, et T/T

genotüüp suurendas insuliinravi vajadust 19,06 korda, kui mudel oli kohandatud ema vanusele, GTT paastuglükoosi väärtusele ja rasedusnädalale.

*TCF7L2* rs7903146 on üks põhilisi T2DM-ga seotud geneetilisi faktoreid. On näidatud, et GDM-ga naistel, kellel on rs7903146 riskialleel, on hilisemas elus suurem risk T2DM kujunemiseks (Francaite-Daugeliene et al., 2021). Käesolevas töös uuriti, kas *TCF7L2* rs7903146 polümorfism on seotud GDM riskirühma kuuluvate naiste sünnitusjärgse paastuglükoosi ja C-peptiidi väärtustega. Läbi viidud analüüsil ilmnis, et rs7903146 polümorfismid ei mõjutanud sünnitusjärgseid tulemusi. Varasemad tööd on leidnud, et T-alleeli kandvatel isikutel võivad C-peptiidi väärtused olla nii kõrgemad kui ka madalamad. Erinevused tulemustes on mõjutatud sellest, kas on mõõdetud paastu- või stimuleeritud C-peptiidi ning missugune on olnud uuritava rühma valim (mõned uurimused on sisaldanud ka mehi või T2DM-ga patsiente) (Daniele et al., 2015; Mathiesen et al., 2020).

Selles töös leitud seosed rs7903146 T/T genotüübi ja KMI ning üldkolesterooli väärtustega langevad kokku Franzago et al., (2018) tulemustega. Samas, käesolevas töös ilmnenu võrdeline seos T/T genotüübi ja HDL-kolesterooli väärtustega oli üllatav, kuna just madalamaid HDL-kolesterooli väärtusi peetakse ennustavaks faktoriks T2DM-i kujunemisele (Barden et al., 2013; Göbl et al., 2011) ning vajab seetõttu edasist uurimist.

Raseduse ajal esinev hüperglükeemia on seotud mitmete komplikatsioonidega emal ja lapsel, mis võivad tekkida nii raseduse kui sünnituse ajal. Näiteks esineb GDM-rasedatel kõrgem risk rasedusaegse hüpertensiooni ja preeklampsia kujunemiseks (Lende & Rijhsinghani, 2020; Mirghani Dirar & Doupis, 2017; Plows et al., 2018). Töö autorile teadaolevalt uuriti käesolevas töös esmakordselt *TCF7L2* rs7903146 polümorfismi seoseid GDM-ga seotud raseduskomplikatsioonidega. Selle töö tulemused viitasid, et uuritud *TCF7L2* genotüübid pole seotud raseduse katkemise, enneaegse sünnituse, preeklampsia ega sünnitusviisiga GDM riskirühma kuuluvate naiste seas. Varasemalt on näidatud, et rs7903146 polümorfismi T-alleel suurendab loote sünnikaalu (Beaumont et al., 2018; Freathy et al., 2007), kuid käesoleva töö tulemused seda seost ei kinnitanud.

Selle töö üheks tugevuseks on, et vaadeldi mitmeid uusi aspekte, mida pole varem seoses *TCF7L2* rs7903146 polümorfismiga uuritud, mistõttu lisab töö uusi teadmisi GDM-i ja sellega seotud komplikatsioonide mõistmiseks. Lisaväärtuseks on andmete olemasolu mitmest ajapunktist, nii raseduse ajal kui selle järgselt, mis võimaldab hinnata raseduse mõju leitud seostele. Puudusena

võib välja tuua selle, et T/T genotüübiga isikuid oli vähe ( $n = 19$ ), mistõttu ei saavutanud mõned seosed statistilist olulisust vaid jäid piiripealseks.

## JÄRELDUSED

Vastavalt püstitatud eesmärkidele võib selle töö tulemustest järelada järgmist:

1. *TCF7L2* geeni polümorfismi rs7903146 genotüüpide esinemissagedused vastasid Hardy-Weinbergi tasakaalule GDM riskirühma kuuluvate naiste hulgas ning ei erinenud võrdlusrühmade vahel.
2. rs7903146 genotüübid ei suurendanud šanssi GDM-diagnoosile, kõrgematele veresuhkru väärtustele ega T1DM-ga seotud autoantikehade esinemisele.
3. T/T genotüübi korral olid suuremad KMI-väärtused nii enne rasedust kui ka raseduse ajal ning ilmnes ka, et T/T genotüüp suurendas šanssi raseduseelsele rasvumisele.
4. T/T genotüübi korral oli suurem šanss insuliinravi vajadusele.
5. rs7903146 genotüübid ei olnud seotud vaadeldud raseduskomplikatsioonide esinemisega.
6. rs7903146 genotüübid ei ole seotud sünnitusjärgse veresuhkru ja C-peptiidi väärtustega.

## KOKKUVÕTE

Gestatsioonidiabeet (GDM) on raseduse ajal tekkiv ja peale seda taanduv süsivesikute ainevahetuse häire, mida iseloomustab insuliinresistentsus ja hüperglükeemia. GDM-diagnoosiga naisi ohustavad mitmesugused raseduskomplikatsioonid. Lisaks sellele on neil naistel suurenenud risk haigestuda tulevikus esimest või teist tüüpi diabeeti. Glükoositolerantsustest on seni põhiline meetod diagnoosimaks GDM-i. Mitmed uuringud on eelnevalt näidanud, et kõige tugevamat seost T2DM-iga (sealhulgas ka GDM-iga) omab *TCF7L2* geeni polümorphism rs7903146.

Selle töö eesmärgiks oli hinnata *TCF7L2* geeni polümorfismi rs7903146 esinemissagedust genotüübiti GDM-i riskirühma kuuluvate rasedate hulgas ning vaadelda selle mõju erinevate kliiniliste parameetrite seas.

Uuringus osales 473 rasedat naist, kellest GDM-uuritavaid oli 181. Uuritavaks materjaliks oli soolamise meetodil puhastatud DNA. Lisaks kasutati statistilisel analüüsil uuritavatel kahe ajapunktis saadud anamnestilisi ja vereanalüüsise andmeid. Esimeseks ajapunktiks oli glükoositolerantsustestiga sama päev raseduse ajal ning teiseks ajapunktiks oli vahemikus 6 nädalat kuni 1 aasta peale sünnitust toimunud ämmaemanda kordusvisiit. SNP-i genotüüpiseerimiseks kasutati RT-qPCR-i ja andmete analüüsimiseks R-programmeerimiskeelt.

*TCF7L2* geeni SNP rs7903146 genotüüpiseerimistulemuste alusel moodustati uuritavatest kolm rühma: C/C (n = 303), C/T (n = 144) ja T/T (n = 19). Tulemustest selgus, et rs7903146 genotüüpide esinemissagedused ei erinenud võrdlusrühmade vahel. GDM riskirühma kuuluvate rasedate seas polnud T/T genotüüp seotud GDM-diagnoosiga, nii rasedusaegsete kui rasedusjärgsete veresuhkru ja C-peptiidi väärtustega ning raseduskomplikatsioonidega. Küll aga ilmnes, et T/T genotüüp suurendas ema šanssi raseduseelsele rasvumisele. GDM diagnoosiga naistel, kellel oli T/T genotüüp, oli oluliselt suurem insuliinravi vajaduse raseduse lõpus.

## ***TCF7L2* gene polymorphism rs7903146 and gestational diabetes mellitus**

Evelin Kumpel

### **SUMMARY**

Gestational diabetes mellitus (GDM) is a carbohydrate metabolic disease, which occurs only during pregnancy. It is characterized by insulin resistance and hyperglycemia. Glycose tolerance test is the primary diagnosis method for GDM. Women with GDM have a higher risk of developing type 1 (T1DM) and type 2 diabetes (T2DM) in the future. For instance, the risk of getting T2DM later in life is 7 times higher. In addition to that, both the mother and the child might be affected by pregnancy complications due to GDM. The transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene polymorphism rs7903146 shows the strongest association with T2DM. Since GDM and T2DM have similarities in their pathophysiology, T2DM associated SNPs have been studied also in GDM.

The purpose of this thesis was to determine the association of genetic variant rs7903146 of the *TCF7L2* gene and to evaluate its effect with clinical parameters in pregnant women at risk for GDM development.

The study involved 473 pregnant women, of whom 181 were diagnosed with GDM. The study material was DNA extracted from peripheral venous blood samples by the salting-out procedure. In addition, anamnestic and clinical chemistry blood analysis data obtained at two time points were used for statistical analysis. The first time point was the same day as the glucose tolerance test during gestational weeks 21-33 and the second time point was a repeat midwife visit between 6 weeks and 1 year after delivery. The ABI PRISM 7000 RT-qPCR system was used for DNA amplification and rs7903146 genotyping. For statistical analysis the R-programming language was used.

Based on the genotyping results of the *TCF7L2* gene SNP rs7903146, the study subjects were divided into three groups: C/C (n = 303), C/T (n = 144) and T/T (n = 19). The results showed that the rs7903146 genotype frequencies did not differ between the studied groups. The T/T risk genotype was not associated with GDM diagnosis, blood glucose or C-peptide values, both during pregnancy and postpartum, as well as pregnancy complications. However, the T/T genotype increased the mother's chance of pre-pregnancy obesity. Also, in women with GDM the risk genotype increased the need for insulin treatment in late pregnancy.

# TÄNUAVALDUSED

Käesolev magistritöö valmis Tartu Ülikooli bio-ja siirdemeditsiini instituudi immunoloogia osakonnas (IUT) 20-43 projekti „Diabeedi immuunmehhanismid“ ja PRG12 „Diabeedi immuunmehhanismid täiskasvanutel“ raames.

Soovin tänada:

- juhendajat Aili Tagomat kannatlikkuse, toetuse ja heade nõuannete eest.
- Kristi Alnekit abivalmiduse ja pühendumise eest laboratoorse töö juhendamisel.
- kaasjuhendajat Priit Adlerit asjakohaste märkuste eest.
- professor Raivo Uibot, kes andis mulle võimaluse teha lõputööd immunoloogia uurimisrühmas.
- SA TÜK naistekliiniku doktor Anne Kirssi ja ämmaemand Laura Laurenit patsientide kliinilise uurimise ning uuritava materjali kogumise eest.

# KASUTATUD KIRJANDUS

## Artiklid

- Acevedo-Calado, M. J., Pietropaolo, S. L., Morran, M. P., Schnell, S., Vonberg, A. D., Verge, C. F., Gianani, R., Becker, D. J., Huang, S., Greenbaum, C. J., Yu, L., Davidson, H. W., Michels, A. W., Rich, S. S., & Pietropaolo, M. (2019). Autoantibodies Directed Toward a Novel IA-2 Variant Protein Enhance Prediction of Type 1 Diabetes. *Diabetes*, *68*(9), 1819–1829. <https://doi.org/10.2337/db18-1351>
- American Diabetes Association. (2021). 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2021. *Diabetes Care*, *44*(Suppl 1), S15–S33. <https://doi.org/10.2337/dc21-S002>
- Barden, A., Singh, R., Walters, B., Phillips, M., & Beilin, L. J. (2013). A simple scoring method using cardiometabolic risk measurements in pregnancy to determine 10-year risk of type 2 diabetes in women with gestational diabetes. *Nutrition & Diabetes*, *3*(6), e72–e72. <https://doi.org/10.1038/nutd.2013.15>
- Beaumont, R. N., Warrington, N. M., Cavadino, A., Tyrrell, J., Nodzinski, M., Horikoshi, M., Geller, F., Myhre, R., Richmond, R. C., Paternoster, L., Bradfield, J. P., Kreiner-Møller, E., Huikari, V., Metrustry, S., Lunetta, K. L., Painter, J. N., Hottenga, J.-J., Allard, C., Barton, S. J., ... Freathy, R. M. (2018). Genome-wide association study of offspring birth weight in 86 577 women identifies five novel loci and highlights maternal genetic effects that are independent of fetal genetics. *Human Molecular Genetics*, *27*(4), 742–756. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx429>
- Buchanan, T. A., Xiang, A. H., & Page, K. A. (2012). Gestational diabetes mellitus: Risks and management during and after pregnancy. *Nature Reviews. Endocrinology*, *8*(11), 639–649. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.96>

- Buchanan, T. A., Xiang, A., Kjos, S. L., & Watanabe, R. (2007). What is gestational diabetes? *Diabetes Care*, *30 Suppl 2*, S105-111. <https://doi.org/10.2337/dc07-s201>
- Chang, S., Wang, Z., Wu, L., Lu, X., Shangguan, S., Xin, Y., Li, L., & Wang, L. (2017). Association between *TCF7L2* polymorphisms and gestational diabetes mellitus: A meta-analysis. *Journal of Diabetes Investigation*, *8*(4), 560–570. <https://doi.org/10.1111/jdi.12612>
- Daniele, G., Gaggini, M., Comassi, M., Bianchi, C., Basta, G., Dardano, A., Miccoli, R., Mari, A., Gastaldelli, A., & Del Prato, S. (2015). Glucose Metabolism in High-Risk Subjects for Type 2 Diabetes Carrying the rs7903146 *TCF7L2* Gene Variant. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *100*(8), E1160-1167. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-1172>
- Del Bosque-Plata, L., Martínez-Martínez, E., Espinoza-Camacho, M. Á., & Gragnoli, C. (2021). The Role of *TCF7L2* in Type 2 Diabetes. *Diabetes*. <https://doi.org/10.2337/db20-0573>
- Dereke, J., Nilsson, C., Landin-Olsson, M., & Hillman, M. (2012). Prevalence of zinc transporter 8 antibodies in gestational diabetes mellitus: ZnT8 antibodies in gestational diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, *29*(12), e436–e439. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2012.03766.x>
- Dereke, J., Nilsson, C., Strevens, H., Landin-Olsson, M., & Hillman, M. (2016). IgG4 subclass glutamic acid decarboxylase antibodies (GADA) are associated with a reduced risk of developing type 1 diabetes as well as increased C-peptide levels in GADA positive gestational diabetes. *Clinical Immunology*, *162*, 45–48. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.11.001>
- Francaite-Daugeliene, M., Lesauskaite, V., Tamosiunas, A., Jasukaitiene, A., & Velickienė, D. (2021). Genetic variants of *TCF7L2* gene and its coherence with metabolic parameters in

- Lithuanian (Kaunas district) women population with previously diagnosed gestational diabetes mellitus compared to general population. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 172, 108636. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2020.108636>
- Franzago, M., Fraticelli, F., Marchetti, D., Celentano, C., Liberati, M., Stuppia, L., & Vitacolonna, E. (2018). Nutrigenetic variants and cardio-metabolic risk in women with or without gestational diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 137, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.01.001>
- Franzago, M., Fraticelli, F., Stuppia, L., & Vitacolonna, E. (2019). Nutrigenetics, epigenetics and gestational diabetes: Consequences in mother and child. *Epigenetics*, 14(3), 215–235. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1582277>
- Freathy, R. M., Hayes, M. G., Urbanek, M., Lowe, L. P., Lee, H., Ackerman, C., Frayling, T. M., Cox, N. J., Dunger, D. B., Dyer, A. R., Hattersley, A. T., Metzger, B. E., Lowe, W. L., & HAPO Study Cooperative Research Group. (2010). Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study: Common genetic variants in GCK and TCF7L2 are associated with fasting and postchallenge glucose levels in pregnancy and with the new consensus definition of gestational diabetes mellitus from the International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups. *Diabetes*, 59(10), 2682–2689. <https://doi.org/10.2337/db10-0177>
- Freathy, R. M., Weedon, M. N., Bennett, A., Hyppönen, E., Relton, C. L., Knight, B., Shields, B., Parnell, K. S., Groves, C. J., Ring, S. M., Pembrey, M. E., Ben-Shlomo, Y., Strachan, D. P., Power, C., Jarvelin, M.-R., McCarthy, M. I., Davey Smith, G., Hattersley, A. T., & Frayling, T. M. (2007). Type 2 Diabetes TCF7L2 Risk Genotypes Alter Birth Weight: A Study of 24,053 Individuals. *The American Journal of Human Genetics*, 80(6), 1150–1161. <https://doi.org/10.1086/518517>

- Fritsche, L., Sarief, M., Wagner, R., Stefan, N., Lehmann, R., Häring, H.-U., Grallert, H., Fritsche, A., & Lechner, A. (2018). Genetic variation in TCF7L2 rs7903146 and history of GDM negatively and independently impact on diabetes-associated metabolic traits. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *146*, 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.11.003>
- Geoghegan, G., Simcox, J., Seldin, M. M., Parnell, T. J., Stubben, C., Just, S., Begaye, L., Lusic, A. J., & Villanueva, C. J. (2019). Targeted deletion of Tcf7l2 in adipocytes promotes adipocyte hypertrophy and impaired glucose metabolism. *Molecular Metabolism*, *24*, 44–63. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.03.003>
- Graus, F., Saiz, A., & Dalmau, J. (2020). GAD antibodies in neurological disorders—Insights and challenges. *Nature Reviews Neurology*, *16*(7), 353–365. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0359-x>
- Göbl, C. S., Bozkurt, L., Prikoszovich, T., Winzer, C., Pacini, G., & Kautzky-Willer, A. (2011). Early possible risk factors for overt diabetes after gestational diabetes mellitus. *Obstetrics and Gynecology*, *118*(1), 71–78. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e318220e18f>
- Haller-Kikkatalo, K., & Uibo, R. (2016). Clinical Recommendations for the Use of Islet Cell Autoantibodies to Distinguish Autoimmune and Non-Autoimmune Gestational Diabetes. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, *50*(1), 23–33. <https://doi.org/10.1007/s12016-014-8461-8>
- Inciani, M., Baroni, M. G., & Cossu, E. (2019). Testing for type 1 diabetes autoantibodies in gestational diabetes mellitus (GDM): Is it clinically useful? *BMC Endocrine Disorders*, *19*(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s12902-019-0373-4>

- Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Jacobsen, L. M., Schatz, D. A., & Lernmark, Å. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, 17016. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.16>
- Kirss, A., Lauren, L., Rohejärvi, M., & Rull, K. (2015). Gestatsioonidiabeet: Riskitegurid, esinemissagedus, perinataalne tulem ja söeluringu vastavus juhendile Tartu Ülikooli Kliinikumi naistekliinikus ajavahemikul 01.01.2012–19.06.2013. *Eesti Arst*, 94(2), 75–82.
- Lende, M., & Rijhsinghani, A. (2020). Gestational Diabetes: Overview with Emphasis on Medical Management. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(24). <https://doi.org/10.3390/ijerph17249573>
- Li, J., Song, L., Zhou, L., Wu, J., Sheng, C., Chen, H., Liu, Y., Gao, S., & Huang, W. (2015). A MicroRNA Signature in Gestational Diabetes Mellitus Associated with Risk of Macrosomia. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37(1), 243–252. <https://doi.org/10.1159/000430349>
- Locke, J. M., Da Silva Xavier, G., Rutter, G. A., & Harries, L. W. (2011). An alternative polyadenylation signal in TCF7L2 generates isoforms that inhibit T cell factor/lymphoid-enhancer factor (TCF/LEF)-dependent target genes. *Diabetologia*, 54(12), 3078–3082. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2290-6>
- Lyssenko, V., Lupi, R., Marchetti, P., Del Guerra, S., Orho-Melander, M., Almgren, P., Sjögren, M., Ling, C., Eriksson, K.-F., Lethagen, L., Tuomi, T., Mancarella, R., Berglund, G., Nilsson, P., Del Prato, S., & Groop, L. (2007). Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 117(8), 2155–2163. <https://doi.org/10.1172/JCI30706>

- Maraschin, J. de F., Murussi, N., Witter, V., & Silveiro, S. P. (2010). Diabetes mellitus classification. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*, 95(2), e40-46. <https://doi.org/10.1590/s0066-782x2010001200025>
- Mathiesen, D. S., Bagger, J. I., Hansen, K. B., Junker, A. E., Plamboeck, A., Haring, S., Idorn, T., Hornum, M., Holst, J. J., Jonsson, A. E., Hansen, T., Vilsbøll, T., Lund, A., & Knop, F. K. (2020). No detectable effect of a type 2 diabetes-associated TCF7L2 genotype on the incretin effect. *Endocrine Connections*, 9(12), 1221–1232. <https://doi.org/10.1530/EC-20-0471>
- McKeon, A., & Tracy, J. A. (2017). GAD65 neurological autoimmunity. *Muscle & Nerve*, 56(1), 15–27. <https://doi.org/10.1002/mus.25565>
- Metzger, B. E., Gabbe, S. G., Persson, B., Lowe, L. P., Dyer, A. R., Oats, J. J. N., & Buchanan, T. A. (2010). International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy: Response to Weinert. *Diabetes Care*, 33(7), e98–e98. <https://doi.org/10.2337/dc10-0719>
- Mirghani Dirar, A., & Doupis, J. (2017). Gestational diabetes from A to Z. *World Journal of Diabetes*, 8(12), 489–511. <https://doi.org/10.4239/wjd.v8.i12.489>
- Mitchell, R. K., Mondragon, A., Chen, L., Mccinty, J. A., French, P. M., Ferrer, J., Thorens, B., Hodson, D. J., Rutter, G. A., & Da Silva Xavier, G. (2015). Selective disruption of Tcf7l2 in the pancreatic  $\beta$  cell impairs secretory function and lowers  $\beta$  cell mass. *Human Molecular Genetics*, 24(5), 1390–1399. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu553>
- Niechciał, E., Rogowicz-Frontczak, A., Piłaciński, S., Fichna, M., Skowrońska, B., Fichna, P., & Zozulińska-Ziółkiewicz, D. (2018). Autoantibodies against zinc transporter 8 are related to age and metabolic state in patients with newly diagnosed autoimmune diabetes. *Acta Diabetologica*, 55(3), 287–294. <https://doi.org/10.1007/s00592-017-1091-x>

- Plows, J., Stanley, J., Baker, P., Reynolds, C., & Vickers, M. (2018). The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(11), 3342. <https://doi.org/10.3390/ijms19113342>
- Popova, P. V., Klyushina, A. A., Vasilyeva, L. B., Tkachuk, A. S., Vasukova, E. A., Anopova, A. D., Pustozarov, E. A., Gorelova, I. V., Kravchuk, E. N., Li, O., Pervunina, T. M., Kostareva, A. A., & Grineva, E. N. (2021). Association of Common Genetic Risk Variants With Gestational Diabetes Mellitus and Their Role in GDM Prediction. *Frontiers in Endocrinology*, *12*, 628582. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.628582>
- Potasso, L., Perakakis, N., Lamprinou, A., Polyzou, E., Kassanos, D., Peter, A., Páth, G., Seufert, J., & Laubner, K. (2020). Clinical Impact of the TCF7L2 Gene rs7903146 Type 2 Diabetes Mellitus Risk Polymorphism in Women with Gestational Diabetes Mellitus: Impaired Glycemic Control and Increased Need of Insulin Therapy. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, *128*(10), 663–666. <https://doi.org/10.1055/a-1008-9223>
- Ramírez-Bello, J., & Jiménez-Morales, M. (2017). [Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases]. *Gaceta Medica De Mexico*, *153*(2), 238–250.
- Rogowicz-Frontczak, A., Pilacinski, S., Wyka, K., Wierusz-Wysocka, B., & Zozulinska-Ziolkiewicz, D. (2018). Zinc transporter 8 autoantibodies (ZnT8-ab) are associated with higher prevalence of multiple diabetes-related autoantibodies in adults with type 1 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *146*, 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2018.11.007>
- Rosik, J., Szostak, B., Machaj, F., & Pawlik, A. (2020). The role of genetics and epigenetics in the pathogenesis of gestational diabetes mellitus. *Annals of Human Genetics*, *84*(2), 114–124. <https://doi.org/10.1111/ahg.12356>

- Rudland, V. L., Pech, C., Harding, A. J., Tan, K., Lee, K., Molyneaux, L., Yue, D. K., Wong, J., & Ross, G. P. (2015). Zinc transporter 8 autoantibodies: What is their clinical relevance in gestational diabetes? *Diabetic Medicine*, 32(3), 359–366. <https://doi.org/10.1111/dme.12629>
- Zhou, Y., Park, S.-Y., Su, J., Bailey, K., Ottosson-Laakso, E., Shcherbina, L., Oskolkov, N., Zhang, E., Thevenin, T., Fadista, J., Bennet, H., Vikman, P., Wierup, N., Fex, M., Rung, J., Wollheim, C., Nobrega, M., Renström, E., Groop, L., & Hansson, O. (2014). TCF7L2 is a master regulator of insulin production and processing. *Human Molecular Genetics*, 23(24), 6419–6431. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu359>
- Tsalenko, A., Ben-Dor, A., Cox, N., & Yakhini, Z. (2002). METHODS FOR ANALYSIS AND VISUALIZATION OF SNP GENOTYPE DATA FOR COMPLEX DISEASES. *Biocomputing 2003*, 548–561. [https://doi.org/10.1142/9789812776303\\_0051](https://doi.org/10.1142/9789812776303_0051)
- Urakami, T. (2019). Maturity-onset diabetes of the young (MODY): Current perspectives on diagnosis and treatment. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 12, 1047–1056. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S179793>
- Williams, C. L., & Long, A. E. (2019). What has zinc transporter 8 autoimmunity taught us about type 1 diabetes? *Diabetologia*, 62(11), 1969–1976. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-04975-x>

## LISA 1. Töös kasutatud lahused

---

<b>20x erütrotsüütide lüüsi puhver</b>	
<b>Komponendid</b>	<b>Kogus (ml)</b>
1M sahharoos	32
100% Triton-X	1
1M MgCl <sub>2</sub> (autoklaavida)	1,2
1M Tris-HCl (pH 7,5 ja autoklaavida)	0,5
dH <sub>2</sub> O	65,3
<b>Kokku (ml):</b>	<b>100</b>

---

---

<b>Proteinaas-K (1 mg/ml)</b>	
<b>Komponendid</b>	<b>Kogus (µl)</b>
Proteinaas-K (20 mg/ml)	65
dH <sub>2</sub> O	1064
<b>Kokku (µl):</b>	<b>1129</b>

---

---

<b>Proteinaas-K puhver</b>	
<b>Komponendid</b>	<b>Kogus (ml)</b>
5M NaCl	16,5
0,5M EDTA	52,8
dH <sub>2</sub> O	150,7
<b>Kokku (ml):</b>	<b>220</b>

---

---

<b>1x TE-puhver</b>	
<b>Komponendid</b>	<b>Kogus (ml)</b>
10x TE-puhver	1
dH <sub>2</sub> O	9
<b>Kokku (ml):</b>	<b>10</b>

---

---

**20% SDS (100 ml) toatemperatuuril**

---

**Komponendid****Kogus**

SDS

20 g

H<sub>2</sub>O100 ml

---

---

**5M NaCl (100 ml)**

---

**Komponendid****Kogus**

NaCl (M = 58,4 g/mol)

29,2 g

H<sub>2</sub>O100 ml

---

# LIHTLITSENTS

## Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Evelin Kumpel

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose „**TCF7L2 geeni polümorfism rs7903146 ja gestatsioonidiabeet**“, mille juhendaja on Aili Tagoma ja kaasjuhendaja Priit Adler,  
  
reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Evelin Kumpel

**03.06.2021**