

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# Factori biochimici, genetici și ultrasonografici de diagnostic precoce al Diabetului gestațional

---

Doctorand **Andreea Roxana Peter (Florian)**

---

Conducător de doctorat **Prof.dr. Florin Stamatian**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCERE</b>   | <b>4</b>  |
| <b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>   |           |
| <b>1. DIABETUL ZAHARAT GESTAȚIONAL</b>   | <b>19</b> |
| <b>1.1. Definiție, prevalență și clasificare</b>   | <b>19</b> |
| 1.1.1. Definiție   | 19        |
| 1.1.2 Prevalență   | 21        |
| 1.1.3 Clasificare  | 21        |
| <b>1.2 Screening și diagnostic</b>   | <b>22</b> |
| 1.2.1 Criteriile O'Sullivan  | 22        |
| 1.2.2 Criteriile WHO (World Health Organization)   | 22        |
| 1.2.3 Criteriile IADPSG  | 22        |
| 1.2.4 Criteriile ADA (Asociația Americană de diabet)   | 23        |
| <b>1.3 Etiologia și fiziopatologia diabetului zaharat gestațional</b>  | <b>25</b> |
| 1.3.1. Insulinorezistența, statusul inflamator și disfuncția celulelor $\beta$ -pancreatice  | 25        |
| 1.3.2 Factorii de creștere angiogenici și funcția endoteliului   | 27        |
| 1.3.3 Hormonii placentari diabetogeni  | 28        |
| <b>2. FACTORI DE PREDICȚIE ÎN DIABETUL GESTAȚIONAL</b>   | <b>28</b> |
| <b>2.1 Factori biochimici</b>  | <b>28</b> |
| 2.1.1 Leptina  | 29        |
| 2.1.2 Adiponectina   | 30        |
| 2.1.3 CMPF   | 30        |
| <b>2.2 Factori genetici</b>  | <b>31</b> |
| <b>2.3 Factori ultrasonografici</b>  | <b>33</b> |
| <b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>   |           |
| <b>1. IPOTEZA DE LUCRU/OBIECTIVE</b>   | <b>39</b> |
| <b>2. METODOLOGIE GENERALĂ</b>   | <b>41</b> |
| <b>3. STUDIU 1. ROLUL PREDICTIV AL ALTERĂRII SECREȚIEI LEPTINEI, ADIPONECTINEI ȘI ACIDULUI 3-CARBOXI-4-METIL-5-PROPIL-2-FURANPROPANOIC ÎN DIABETUL ZAHARAT GESTAȚIONAL.</b>            | <b>43</b> |
| 3.1. Introducere   | 43        |
| 3.2. Ipoteza de lucru  | 45        |
| 3.3. Material și metodă  | 45        |
| 3.4. Rezultate   | 47        |
| 3.5. Discuții  | 51        |
| 3.6. Concluzii   | 54        |
| <b>4. STUDIU 2. ROLUL POLIMORFISMULUI GENEI TCF7L2 RS7903146 ÎN APARIȚIA DIABETULUI GESTAȚIONAL ȘI INFLUENȚA ACESTUIA ASUPRA COMPLICAȚIILOR MATERNO-FETALE LA FEMEILE DIN ROMÂNIA.</b> | <b>55</b> |
| 4.1 Introducere  | 55        |
| 4.2 Ipoteza de lucru   | 56        |
| 4.3 Material și metodă   | 56        |
| 4.4 Rezultate  | 59        |

---

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 4.5       | Discuții  | 67         |
| 4.6       | Concluzii   | 71         |
| <b>5.</b> | <b>STUDIUL 3: BIOMETRIA CORDONULUI OMBILICAL ȘI EVALUAREA PLIULUI ABDOMINAL SUBCUTANAT FETAL CA POTENȚIALI MARKERI PENTRU MACROSOMIA FETALA ÎN DIABET GESTAȚIONAL</b> | <b>7</b>   |
| 5.1       | Introducere   | 73         |
| 5.2       | Ipoteza de lucru  | 74         |
| 5.3       | Material și metoda  | 74         |
| 5.4       | Rezultate   | 79         |
| 5.5       | Discuții  | 84         |
| 5.6       | Concluzii   | 88         |
| <b>6.</b> | <b>DISCUȚII GENERALE</b>  | <b>89</b>  |
| <b>7.</b> | <b>CONCLUZII GENERALE</b>   | <b>9</b>   |
| <b>8.</b> | <b>ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI</b>  | <b>9</b>   |
|           | <b>REFERINȚE</b>  | <b>95</b>  |
|           | <b>ANEXE</b>  | <b>108</b> |
|           | ANEXA 1- FIȘA DE CULEGERE A DATELOR   | 108        |
|           | ANEXA 2-FORMULAR DE CONȘIMȚĂMÂNT INFORMAT AL PARTICIPANTELOR LA STUDIUL   | 113        |

**Cuvinte cheie:** Diabet zaharat gestațional, Leptina, Adiponectina, CMPF, gena TCF7L2, gelatina Wharton, aria cordonului ombilical, pliul abdominal subcutanat fetal

---

## INTRODUCERE

Evoluția favorabilă materno-fetală, pe întreg parcursul sarcinii, reprezintă o prioritate globală de sănătate publică. Occidentalizarea modului de viață, urbanizarea și îmbătrânirea populației, au dus la modificarea comportamentului alimentar și predominanța stilului de viață sedentar ce au generat o adevărată pandemie de diabet zaharat de tip 2 (DZT2) dar și o creștere pe scară largă a obezității. Aceste consecințe observate, au dus la augmentarea prevalenței Diabetului zaharat gestațional (DZG). În ciuda progreselor științifice realizate în domeniul clinic dar și în cel al cercetării medicale aproximativ 810 femei mor zilnic din motive asociate sarcinii și nașterii care pot fi prevenite iar pe plan internațional, peste 20 de milioane de nașteri pe an, sunt asociate cu diabetul zaharat în timpul sarcinii. Se cunoaște că pacientele cu DZG au probabilitate mult mai mare de a dezvolta DZT2 pe parcursul vieții și această patologie ocupă locul al 7-lea ca și cauză de mortalitate în lume, implicând totodată numeroase resurse pentru tratament ei. În ultimele două decenii prevalența DZG, a crescut cu mai mult de 30%, în mai multe țări, inclusiv în țările în curs de dezvoltare.

Diabetul zaharat gestațional este o patologie metabolică multifactorială, considerată una dintre cele mai frecvente complicații ale sarcinii, cu importante consecințe atât pentru mamă cât și pentru produsul de concepție. Diabetul gestațional este definit ca intoleranță la glucoză ce se observă prima dată sau se detectează în timpul sarcinii și care nu este evident diagnosticată înainte de sarcină ca diabet zaharat.

Prevalența DZG este dificil de stabilit, în primul rând datorită metodelor de screening și de diagnostic diferite și datorită particularităților populaționale ale diferitelor rase. A fost raportat că 7-14% sau chiar până la 25% dintre femeile gravide au dezvoltat DZG.

Se cunoaște că DZG acționează negativ din primul trimestru de sarcină și frecvența malformațiilor este de 4 ori mai mare, la pacientele cu DZG decât în populația generală, prin urmare un diagnostic precoce al acestei patologii ar însemna un real câștig pentru obstetrica modernă, cu îmbunătățirea prognosticului pentru mamă și nou-născut. Pe de altă parte hiperglicemia din ultimul trimestru de sarcină se pare că se asociază cu macrosomia, hipoglicemia, dar poate, de asemenea, apărea și hiperbilirubinemia sau hipocalcemia neonatală. Datele prezentate în literatură au arătat că până și creșteri ușoare peste valoarea normală a glicemiei parturitei cresc riscul pentru macrosomia fetală și consecințele peripartum legate de aceasta dar fără a se preciza o limită-prag a glicemiei pentru acest risc.

Diagnosticarea precoce, corectă și managementul integrat al diabetului gestațional cât și identificarea pacientelor din categoria de risc crescut, reprezintă o necesitate și o prioritate pentru obstetrica modernă. Pornind de la rădăcinile etiopatogene ale acestei afecțiuni, ținta cercetătorilor este să caracterizeze prototipul pacientei susceptibile de a dezvolta DZG.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Diabetul zaharat este un sindrom heterogen, caracteristica sa fiind hiperglicemia cronică, de regulă à jeun sau postprandială, care se poate asocia cu alterări ale metabolismului

---

proteinelor, lipidelor dar și cel hidro-electrolitic și energetic. Diabetul gestațional este o variantă a diabetului care apare în timpul sarcinii. Acesta dispare de obicei după sarcină, dar femeile și copiii acestora prezintă pe viitor un risc crescut de a dezvolta diabet zaharat de tip II pe parcursul vieții.

Starea de graviditate reprezintă un ansamblu de modificări fiziologice și metabolice care se pot manifesta ca un test de toleranță biologic care are abilitatea de a detecta încă de la debutul sarcinii insulino-rezistentă. Secreția de insulină și sensibilitatea la insulină sunt crescute în primele 24 de săptămâni de sarcină, astfel necesarul de insulină este mai mic, datorită valorilor glicemice scăzute. Studiile actuale privind DZG cuprind mai multe ramuri de cercetare cum ar fi ramura clinică, genetică, metabolomică, proteomică, ultrasonografică, în încercarea de a găsi un algoritm pentru depistarea precoce a acestei afecțiuni și a unor mijloace terapeutice care să poată îmbunătăți prognosticul materno-fetal imediat dar și pe termen lung.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Această cercetare doctorală a avut ca și obiectiv general găsirea unor metode de diagnostic precoce și de predicție al DZG care să îmbunătățească modalitatea de selecție a pacienților aflate la risc de a dezvolta această patologie și să ajute la implementarea unui protocol de diagnostic, supraveghere și tratament rapid, în funcție de caracteristicile specifice ale fiecărei paciente.

Obiectivul principal al primului studiului a fost reprezentat de investigarea rolului predictiv al factorilor biochimici reprezentați de Leptină, Adiponectină și CMPF în cazul pacienților cu DZG.

Al doilea studiu a avut ca obiectiv, găsirea unei asocieri semnificative între prezența polimorfismului genei TCF7L2 rs7903146 și riscul de apariție a DZG, în populația din România și studierea interacțiunii dintre acest polimorfism și efectul asupra rezultatelor materno-fetale.

Al treilea studiu a avut ca obiectiv principal stabilirea unei legături între parametrii antropometrici ai cordonului ombilical măsurați ecografic și respectiv pliul abdominal subcutanat fetal și diagnosticul sau prognosticul macrosomiei fetale într-o populație selectată de paciente din România.

### **Studiu 1. Rolul predictiv al alterării secreției leptinei, adiponectinei și acidului 3-carboxi-4-metil-5-propil-2-furanpropanoic în Diabetul zaharat gestațional.**

**Introducere și obiective:** Plecând de la ipoteza că declanșarea DZG este precoce, chiar din primele săptămâni de sarcină, obiectivul propus în acest studiu a fost să determine dacă valorile serice ale markerilor biologici reprezentați de Adiponectină, Leptină, raportul AN/L și CMPF, se pot asocia cu apariția DZG.

**Material și metodă:** Studiul actual a fost unul de tip longitudinal prospectiv desfășurat în perioada Ianuarie 2018- Martie 2019 și a inclus un număr de 111 paciente însărcinate, aflate în primul trimestru de sarcină, la care s-au recoltat probe pentru determinarea nivelurilor de AN, L și CMPF cu ocazia efectuării screening-ului de prim trimestru reprezentat de Dublu test. Grupul de control a fost reprezentat de 47 de paciente, cu sarcină

---

monofetală fiziologică care au acceptat condițiile protocolului de cercetare și la care s-au determinat, de asemenea în perioada 11-13 săptămâni+6 zile nivelurile de leptină, adiponectină și CMPF și care au efectuat TTGO și au avut rezultat normal. Pacientele înrolate în studiu au născut în cadrul SCJU secția Obstetrică-Ginecologie I din Cluj-Napoca.

Protocolul de realizare a temei doctorale a fost aprobat, conform cu declarația de la Helsinki, de către Comisia de Etică a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" Cluj Napoca (numărul 247/08.06.2017). Înainte de a fi incluse în grupurile de studiu, toate pacientele și-au exprimat acordul și au semnat consimțământul scris în cunoștință de cauză.

**Rezultate:** Pacientele care au dezvoltat diabet gestațional au avut niveluri mai mari ale leptinei cu înaltă semnificație statistică, comparativ cu cele care nu au dezvoltat diabet. Nivelurile adiponectinei nu au diferit semnificativ între grupurile de paciente studiate. Raportul AN/L a fost semnificativ mai mic la pacientele cu DZG. Peste valoarea-limită de 16 (ng/ml) a leptinei, pacientele au prezentat o probabilitate mai mare de a dezvolta diabet gestațional. În cadrul pacientelor diagnosticate cu DZG, rata complicațiilor obstetricale, cum ar fi nașterea prematură, RPM, hidramniosul, distocia de umeri, lacerările de col sau perineale, a fost mai mare comparativ cu lotul martor.

**Concluzii:** Rezultatele obținute în urma cercetării, în ceea ce privește L sunt încurajatoare și prezic apariția diabetului gestațional încă din primul trimestru de sarcină. Cel mai important este că acest parametru este independent de IMC-ul pacientelor, contrar multor altor studii. Valoarea scăzută a raportului AN/L prezice apariția DZG și se asociază cu macrosomia fetală, acest marker fiind cel mai bun predictor al insulino-rezistenței la gravide. Sunt necesare studii pe loturi mult mai mari pentru a putea demonstra rolul de predictor al CMPF și AN.

## **Studiu 2. Rolul polimorfismului genei TCF7L2 rs7903146 în apariția diabetului gestațional și influența acestuia asupra complicațiilor materno-fetale la femeile din România.**

**Introducere și obiective:** Diabetul zaharat gestațional este una dintre cele mai frecvente complicații care apar în sarcină, fiind însoțită de multiple riscuri materne dar și fetale. Deși nu se cunoaște exact mecanismul fiziopatologic, se incriminează ca factor comun modificările multigenice ce duc la modificările metabolice caracteristice, cum ar fi insulino-rezistența și disfuncția celulelor  $\beta$ -pancreatice. Scopul principal al acestei cercetări este de a investiga rolul polimorfismului genei TCF7L2 rs7903146 în apariția DZG, dar și de a evalua influența acestei modificări genetice asupra rezultatelor materno-fetale la femeile din România.

**Material și metodă:** Pentru atingerea obiectivelor propuse, a fost realizat un studiul prospectiv de tip caz-martor ce a cuprins paciente urmărite la Clinica de Obstetrică-Ginecologie I din Cluj-Napoca, Spitalul Clinic Județean de Urgență din Cluj-Napoca, România, în perioada ianuarie 2018-iulie 2020. Acesta a inclus un total de 116 paciente aflate în trimestrul al doilea de sarcină. DZG a fost diagnosticat prin screening-ul efectuat în perioada 24-28 săptămâni de sarcină, conform recomandărilor internaționale ale IADPSG, prin TTGO cu 75 mg glucoză administrată oral. Au rezultat astfel cele două grupuri: grupul caz a inclus 61 de paciente

---

diagnosticate cu DZG după TTGO respectiv grupul de control 55 de paciente cu sarcină fiziologică care au acceptat înrolarea în studiu și care au avut un TTGO cu rezultat normal.

**Rezultate:** Analiza distribuției genotipului rs7903146 TCF7L2 în grupurile studiate a arătat că, dintre pacientele cu diabet 37,7% aveau genotipul CC și CT iar 24,6% aveau genotipul TT. Pe de altă parte, în grupul de control 50,9% aveau genotipul CC, 40% CT și 9,1% aveau genotipul TT. Prezența alelei T a fost mai mare în grupul pacientelor cu DZG (43,3%), spre deosebire de alela C a cărei frecvență a fost mai mare în grupul de control (70,9%). Analizând riscul relativ, alela T minoră a fost asociată cu un risc ridicat de a dezvolta diabet gestațional cu un OR de 1.71 dacă au fost luate în considerare atât tipurile heterozigote, cât și cele de homozigot și un OR de 3.26 dacă s-a luat în considerare numai genotipul homozigot. S-a observat o diferență semnificativă statistic între purtătorii alelei T din grupurile studiate dar și în cazul modelului recesiv.

Prezența alelei T minore, atât în tipurile heterozigote, cât și în cele homozigote, a fost asociată cu un risc ridicat de macrosomie fetală cu un OR de 1,13 dar fără semnificație statistică ( $p > 0,05$ ). În cazul în care numai tipul homozigot a fost luat în considerare, OR a crescut la 2.12, ceea ce demonstrează un risc și mai crescut de macrosomie, dar fără semnificație statistică. Analiza statistică a greutateii la naștere  $\geq$  percentila 95 a nou-născuților, a arătat o relație semnificativă statistic între genotipul homozigot TT și macrosomia fetală. O altă parte importantă a acestei cercetări a fost reprezentată de analiza statistică din punct de vedere al tratamentului necesitat, în grupul pacientelor cu DZG inclus în studiu. Studiul a găsit o asociere cu înaltă semnificație statistică între tipul de diabet și genotipurile studiate. Pacientele cu genotipul homozigot TT prezent, au fost mai predispuse să necesite terapie cu insulina (45,5%) comparativ cu restul pacientelor care au prezentat celelalte două genotipuri (22,7% - genotipul CC, 31,8% - genotipul CT).

**Concluzii:** Acest studiu demonstrează că prezența alelei T a polimorfismului rs7903146-TCF7L2 influențează apariția DZG, iar pacientele cu genotipul TT prezintă un risc crescut de a dezvolta această patologie. Mai mult decât atât prezența genotipului TT se însoțește de o probabilitate ridicată de a dezvolta o formă mai gravă și anume DG insulinonecesitant, în comparație cu genotipurile CC și CT. O altă concluzie importantă a studiului este reprezentată de prezența alelei T minore care se asociază cu un risc ridicat de macrosomie fetală.

### **Studiu 3: Biometria cordonului ombilical și evaluarea pliului abdominal subcutanat fetal ca potențiali markeri pentru macrosomia fetală în Diabet gestațional**

**Introducere și obiective:** Diabetul gestațional este definit ca intoleranța la glucoză diagnosticată pentru prima dată în sarcină și prezintă o creștere dramatică a prevalenței la nivel mondial în ultima perioadă, împreună cu creșterea prevalenței în ceea ce privește DZT2 și DZT1 în rândul femeilor de vârstă reproductivă. Macrosomia fetală are impact atât asupra rezultatelor obstetricale fetale, cât și asupra celor materne, având un risc crescut de deces perinatal, traumatisme la naștere datorate nașterilor instrumentale.

Obiectivul principal al studiului a fost de a determina dacă măsurarea ultrasonografică a parametrilor antropometrici ai cordonului ombilical (aria cordonului ombilical, aria vaselor

---

cordonusului ombilical și a cantității de gelatina Wharton) și măsurarea pliului abdominal subcutanat fetal, poate fi folosită ca metoda de diagnostic și predicție al DZG. În al doilea rând, am urmărit dacă acești parametri menționați, pot fi utilizați ca factori de prognostic sau prezic apariția macrosomiei fetale, într-o populație selectată de paciente din România.

**Material și metodă:** Studiul efectuat a fost unul de tip prospectiv caz-martor realizat între ianuarie 2021- iunie 2021 și a inclus un număr de 51 de paciente, dispensarizate în cadrul ambulatorului Clinicii Obstetrică-Ginecologie I al SCJU Cluj-Napoca. Pacientele au fost înrolate în perioada 24-28 săptămâni gestaționale dacă au întrunit criteriile de includere. Toate pacientele au fost evaluate și examinate la vizita de urmărire a sarcinii la 24-28 săptămâni de sarcină. La prezentare, ele au fost consiliate cu privire la protocolul de control și implicațiile studiului și au acceptat/refuzat înscrierea. Screening-ul pentru DZG prin testul de toleranță orală la glucoză (TTGO) a fost efectuat dimineața, urmat de examenul ecografic ca a doua etapă de evaluare.

Biometria fetală, estimarea greutateii fetale au fost efectuate la toți pacienții înscriși în studiu, pe baza formulei Hadlock și s-a măsurat aria cordonului ombilical și circumferința, ariile venei și arterelor ombilicale, aria GW și măsurătorile grosimii pliului abdominal subcutanat. Pacientele au fost urmărite pe perioada sarcinii până la naștere iar datele despre travaliu și naștere, complicațiile materne în post-partum, parametrii neonatali au fost colectate din documentele medicale.

**Rezultate:** Lotul inclus în studiu a fost format din 51 de paciente gravide care s-au prezentat pentru monitorizarea sarcinii la 24-28 săptămâni de sarcină și au acceptat să ia parte la studiu. Conform rezultatelor testelor TTGO, pacientele au fost împărțiți în două grupe, grupul de paciente cu DZG (26 de pacienți) și grupul fără-DZG care a fost format din 25 de paciente.

Comparând măsurătorile antropometrice ale feteșilor am constatat că nu au existat diferențe cu importanță statistică între cele două grupuri studiate pentru majoritatea parametrilor ( $p > 0,05$ ). Excepția a reprezentat-o valoarea pliului abdominal subcutanat măsurat în trimestrul al doilea, care a fost cu înaltă semnificație statistică, mai mare la feteșii pacientelor din grupul cu DZG în comparație cu pacientele din grupul martor. Când am comparat valorile obținute la măsurătorile ariei cordonului ombilical și ariei gelatinei Wharton am ajuns la concluzia că există o corelație pozitivă puternică între ele.

În grupul pacientelor cu DZG a existat o corelație semnificativă statistic între greutatea fetală estimată din al doilea trimestru și greutatea la naștere, în timp ce nu s-a putut stabili o astfel de corelație în grupul martorilor. Aria cordonului ombilical și a GW nu au putut fi stabilite ca predictor ai macrosomiei fetale.

Cu toate acestea, a existat o diferență importantă cu semnificație din punct de vedere statistic între măsurarea pliului abdominal subcutanat în timpul celui de-al doilea trimestru între nou-născuții macrosomici și cei cu greutate normală din grupul de paciente cu DZG. Acest lucru confirmă că măsurarea pliului abdominal subcutanat în timpul evaluării ecografice de trimestrul al doilea poate reprezenta un potențial predictor al macrosomiei fetale la termen în sarcinile cu DZG. De asemenea, a existat o diferență semnificativă statistic între greutatea fetală estimată în al doilea trimestru și macrosomia fetală la termen în grupul pacientelor cu DZG. S-a constatat existența unei diferențe semnificative statistic între creșterea ponderală maternă exagerată în timpul sarcinii și macrosomia fetală la termen atunci când s-a calculat pentru ambele grupuri de paciente.



---

**Concluzii:** În studiul actual, măsurarea cordonului ombilical și a GW nu reprezintă parametrii predictorii ai macrosomiei fetale și nici nu au prezentat diferențe semnificative între sarcinile cu și fără diabet gestațional. Pe de altă parte, măsurarea pliului abdominal subcutanat, circumferința abdominală fetală, greutatea fetală estimată în al doilea trimestru și creșterea în greutate a mamei în timpul sarcinii pot fi markeri importanți ai statusului metabolic fetal în sarcinile complicate cu diabet zaharat gestațional.

## CONCLUZII GENERALE

În urma realizării acestui studiu doctoral, am obținut o serie de rezultate care ne-au condus la formularea următoarelor concluzii:

1. Valorile serologice obținute în studiu doctoral, în ceea ce privește Leptina sunt valoroase și prezic apariția DZG încă din primul trimestru de sarcină, independent de valoarea IMC.
2. Valoarea scăzută a raportului AN/L determinat în primul trimestru de sarcină reprezintă un factor de predicție pentru apariția DZG și se asociază cu macrosomia fetală, acest marker fiind cel mai bun predictor al insulino-rezistenței la gravide.
3. Valorile serologice ale AN și CMPF determinate în primul trimestru de sarcină nu au putut demonstra rolul de predictorii al DZG în cercetarea realizată.
4. În ceea ce privește implicarea polimorfismului rs7903146 al genei TCF7L2, acest studiu demonstrează ca prezența alelei T este asociată cu apariția DZG, iar pacientele cu genotipul TT prezintă un risc crescut de a dezvolta această patologie.
5. De asemenea, o concluzie și mai importantă este aceea că prezența genotipului TT al polimorfismului rs7903146 genei TCF7L2, se însoțește de o probabilitate ridicată de a dezvolta Diabet gestațional insulino-necesar în comparație cu genotipurile CC și CT.
6. În ceea ce privește ultrasonografia ca instrument de predicție a riscului de a dezvolta DZG dar și riscul de apariție al macrosomiei fetale, măsurarea cordonului ombilical și a GW nu reprezintă parametrii predictorii ai acestora și nici nu au prezentat diferențe semnificative între sarcinile cu și fără DZG.
7. Măsurarea pliului abdominal subcutanat, circumferința abdominală fetală, greutatea fetală estimată în al doilea trimestru și creșterea în greutate a mamei în timpul sarcinii s-au dovedit a fi markeri importanți ai statusului metabolic glicemic fetal alterat în sarcinile complicate cu DZG.

## ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Acest studiu doctoral abordează un subiect de actualitate în obstetrica modernă, o problemă majoră de sănătate publică, cu un impact semnificativ atât pe termen scurt și pe termen lung asupra sănătății materno-fetale.

Cercetarea actuală este prima evaluare care își propune identificarea rolului predictiv al unor biomarkeri, a modificărilor genetice și a anexelor fetale evaluate ecografic, în cazul pacientelor cu diabet gestațional din țara noastră. Implementarea în practica clinică a acestor tehnici de diagnostic ar putea îmbunătăți performanțele obstetricale, atât cele de supraveghere cât și de tratament al acestei categorii de paciente.

---

Elementul de originalitate al studiului doctoral este reprezentat de combinația realizată dintre biomarkerii proteici, metabolomică, analiza genetică și studiul ultrasonografic al anexelor fetale constituită după un tipar unic și în același timp individualizat, în vederea stabilirii unui fenotip matern la risc pentru a dezvolta DZG și implicit pentru a diagnostica precoce această afecțiune.

Tema de cercetare propusă aduce informații importante în fiziopatologia acestei boli, cu aplicabilitate directă în diagnosticul DZG și ceea ce va duce la un tratament precoce al bolii.

Rezultatele acestei cercetări doctorale pot sta la baza creării unui model caracteristic pentru un anumit grup populațional și pot duce la dezvoltarea unor programe de screening sau a unor scoruri de risc ce să includă studiul factorilor epidemiologici, biomarkerilor proteici și metaboliților, a factorilor genetici dar și a modificărilor ecografice fetale.

---

ABSTRACT OF DOCTORAL THESIS

# Biochemical, genetic and ultrasonographic factors for early diagnosis of gestational diabetes

---

PhD Student **Andreea Roxana Peter (Florian)**

---

PhD Scientific Coordinator **Prof.dr. Florin Stamatian**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# TABLE OF CONTENTS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INTRODUCTION</b>  | <b>4</b>  |
| <b>CURRENT STATE OF THE ART</b>  |           |
| <b>1.GESTATIONAL DIABETES MELLITUS</b>   | <b>19</b> |
| <b>1.1. Definition, prevalence and classification</b>  | <b>19</b> |
| 1.1.1. Definition  | 19        |
| 1.1.2 Prevalence   | 21        |
| 1.1.3 Classification   | 21        |
| <b>1.2 Screening and diagnostic</b>  | <b>22</b> |
| 1.2.1 O’Sullivan criteria  | 22        |
| 1.2.2 WHO (World Health Organization) criteria   | 22        |
| 1.2.3 IADPSG criteria  | 22        |
| 1.2.4 ADA (American Diabetes Association) criteria   | 23        |
| <b>1.3 Etiology and pathophysiology of gestational diabetes</b>  | <b>25</b> |
| 1.3.1. Insulin resistance, inflammatory status and pancreatic $\beta$ -cell dysfunction  | 25        |
| 1.3.2 Angiogenic growth factors and endothelial function   | 27        |
| 1.3.3 Diabetogenic placental hormones  | 28        |
| <b>2. PREDICTION FACTORS IN GESTATIONAL DIABETES</b>   | <b>28</b> |
| <b>2.1 Biochemical factors</b>   | <b>28</b> |
| 2.1.1 Leptin   | 29        |
| 2.1.2 Adiponectin  | 30        |
| 2.1.3 CMPF   | 30        |
| <b>2.2 Genetic factors</b>   | <b>31</b> |
| <b>2.3 Ultrasonographic factors</b>  | <b>33</b> |
| <b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>   |           |
| <b>1. WORK HYPOTHESIS AND OBJECTIVES</b>   | <b>39</b> |
| <b>2. GENERAL METHODOLOGY</b>  | <b>41</b> |
| <b>3. STUDY 1. PREDICTIVE ROLE OF ALTERED LEPTIN, ADIPONECTIN AND 3-CARBOXY-4-METHYL-5-PROPYL-2-FURANPROPANOIC ACID SECRETION IN GESTATIONAL DIABETES MELLITUS</b>           | <b>43</b> |
| 3.1. Introduction  | 43        |
| 3.2. Work hypothesis   | 45        |
| 3.3. Material and method   | 45        |
| 3.4. Results   | 47        |
| 3.5. Discussion  | 51        |
| 3.6. Conclusions   | 54        |
| <b>4. STUDY 2. ROLE OF TCF7L2 RS7903146 GENE POLYMORPHISM IN THE DEVELOPMENT OF GESTATIONAL DIABETES AND ITS INFLUENCE ON MATERNAL-FETAL COMPLICATIONS IN ROMANIAN WOMEN</b> | <b>55</b> |
| 4.1 Introduction   | 55        |
| 4.2 Work hypothesis  | 56        |

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>4.3 Material and method</b>  | <b>56</b>  |
| <b>4.4 Results</b>  | <b>59</b>  |
| <b>4.5 Discussion</b>   | <b>67</b>  |
| <b>4.6 Conclusions</b>  | <b>71</b>  |
| <b>5. STUDY 3: UMBILICAL CORD BIOMETRY AND FETAL SUBCUTANEOUS ABDOMINAL FOLD ASSESSMENT AS POTENTIAL MARKERS FOR FETAL MACROSOMIA IN GESTATIONAL DIABETES</b> | <b>7</b>   |
| <b>5.1 Introduction</b>   | <b>73</b>  |
| <b>5.2 Work hypothesis</b>  | <b>74</b>  |
| <b>5.3 Material and method</b>  | <b>74</b>  |
| <b>5.4 Results</b>  | <b>79</b>  |
| <b>5.5 Discussion</b>   | <b>84</b>  |
| <b>5.6 Conclusions</b>  | <b>88</b>  |
| <b>6. GENERAL DISCUSSION</b>  | <b>89</b>  |
| <b>7. GENERAL CONCLUSIONS</b>   | <b>9</b>   |
| <b>8. ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS</b>  | <b>9</b>   |
| <b>REFERENCES</b>   | <b>95</b>  |
| <b>ANNEXES</b>  | <b>108</b> |
| <b>APPENDIX 1- DATA COLLECTION FORM</b>   | <b>108</b> |
| <b>APPENDIX 2-INFORMED CONSENT FORM</b>   | <b>113</b> |

**Keywords:** Gestational diabetes mellitus, Leptin, Adiponectin, CMPF, TCF7L2 gene, Wharton jelly, umbilical cord area, fetal subcutaneous abdominal fold

---

## INTRODUCTION

Good maternal and fetal outcomes throughout pregnancy are a global public health priority. Westernisation of lifestyles, urbanisation and an ageing population have led to changes in dietary behaviour and the prevalence of sedentary lifestyles that have resulted in a pandemic of type 2 diabetes mellitus (T2DM) and a widespread increase in obesity. These observed consequences have led to an increase in the prevalence of gestational diabetes mellitus (GDM). Despite scientific advances in clinical and medical research, approximately 810 women die every day from preventable pregnancy and childbirth-related causes, and internationally, more than 20 million births per year are associated with diabetes mellitus during pregnancy. It is known that patients with GDM are much more likely to develop T2DM during their lifetime and the disease is the 7th leading cause of death worldwide, while requiring significant resources for its treatment. In the last two decades the prevalence of GDM has increased by more than 30% in several countries, including developing countries.

Gestational diabetes mellitus is a multifactorial metabolic pathology, considered one of the most common complications of pregnancy, with important consequences for both mother and child. Gestational diabetes is defined as glucose intolerance that is first observed or detected during pregnancy and not obviously diagnosed before pregnancy as diabetes mellitus.

The prevalence of GDM is difficult to establish, primarily due to different screening and diagnostic methods and due to the population characteristics of different peoples. It has been reported that 7-14% or even up to 25% of pregnant women have developed GDM.

It is known that GDM acts negatively from the first trimester of pregnancy and the frequency of malformations is 4 times higher in patients with GDM than in the general population, therefore an early diagnosis of this pathology would mean a real gain for modern obstetrics, with improved prognosis for mother and new-born. On the other hand, hyperglycaemia in the last trimester of pregnancy seems to be associated with macrosomia, hypoglycaemia, but hyperbilirubinemia or neonatal hypocalcaemia may also occur. Data presented in the literature have shown that even slight increases above normal parturition blood glucose increase the risk for fetal macrosomia and related peripartum consequences, but without specifying a blood glucose threshold for this risk.

Early, accurate diagnosis and integrated management of gestational diabetes, as well as identification of patients in the high-risk category, is a necessity and a priority for modern obstetrics. Starting from the roots of the etiopathogenesis of this condition, the researchers' goal is to characterize the prototype of the patient likely to develop GDM.

---

## CURRENT STATE OF THE ART

Diabetes mellitus is a heterogeneous syndrome, characterized by chronic hyperglycaemia, usually fasting or postprandial, which may be associated with alterations in protein, lipid, hydro-electrolyte, and energy metabolism. Gestational diabetes is a variant of diabetes that occurs during pregnancy. It usually disappears after pregnancy, but women and their children are at increased risk of developing type II diabetes in later life.

Pregnancy is a set of physiological and metabolic changes that can manifest themselves as a biological tolerance test that could detect, from the onset of pregnancy, insulin resistance. Insulin secretion and insulin sensitivity are increased in the first 24 weeks of pregnancy, so insulin requirements are lower due to lower glycaemic values. Current studies on GDM include several branches of research, such as clinical, genetic, metabolomic, proteomic, ultrasonographic, to find an algorithm for the early detection of this condition and therapeutic means that can improve the maternal-fetal prognosis immediately but also in the long term.

## PERSONAL CONTRIBUTION

The overall objective of this PhD research was to find methods for the early diagnosis and prediction of GDM that would improve the screening of patients at risk of developing this pathology and help to implement a rapid diagnostic, surveillance, and treatment protocol according to the specific characteristics of each patient.

The main objective of the first study was to investigate the predictive role of the biochemical factors Leptin, Adiponectin and CMPF in patients with GDM.

The second study aimed to find a significant association between the presence of the TCF7L2 rs7903146 gene polymorphism and the risk of developing GDM in the Romanian population and to study the interaction between this polymorphism and the effect on maternal-fetal outcomes.

The third study aimed to establish a link between ultrasonographically measured umbilical cord anthropometric parameters and fetal subcutaneous abdominal fold and the diagnosis or prognosis of fetal macrosomia in a selected population of Romanian patients.

### **Study 1. Predictive role of altered leptin, adiponectin and 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid secretion in gestational diabetes mellitus.**

**Introduction and Aims:** Based on the hypothesis that the onset of GDM is early, even in the first weeks of pregnancy, the objective of this study was to determine whether serum values of biological markers represented by Adiponectin, Leptin, AN/L ratio and CMPF, can be associated with the onset of GDM.

**Material and method:** The current study was a prospective longitudinal study conducted from January 2018 to March 2019 and included a total of 111 pregnant patients in the first trimester of pregnancy who were sampled for AN, L and CMPF levels during the first

---

trimester screening represented by the Double Test. The control group consisted of 47 patients with physiological singleton pregnancy who accepted the conditions of the research protocol and who also had their leptin, adiponectin and CMPF levels determined during the period 11-13 weeks + 6 days and who underwent OGTT and had a normal result. The patients enrolled in the study gave birth in the CEH Obstetrics-Gynaecology Department I in Cluj-Napoca.

The protocol for the doctoral thesis was approved, in accordance with the Declaration of Helsinki, by the Ethics Committee of the University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" Cluj Napoca (number 247/08.06.2017). Before being included in the study groups, all patients expressed their consent and signed written informed consent.

**Results:** Patients who developed gestational diabetes had higher leptin levels with high statistical significance compared to those who did not develop diabetes. Adiponectin levels did not differ significantly between the groups of patients studied. The AN/L ratio was significantly lower in patients with GDM. Above the leptin cut-off value of 16 (ng/ml), patients were more likely to develop gestational diabetes. In patients diagnosed with GDM, the rate of obstetric complications such as preterm birth, PMR, hydramnios, shoulder dystocia, cervical or perineal lacerations was higher compared to the control group.

**Conclusions:** The results obtained from the research in terms of L are encouraging and predict the onset of gestational diabetes as early as the first trimester of pregnancy. Most importantly, this parameter is independent of patient BMI, contrary to many other studies. Low AN/L predicts the occurrence of GDM and is associated with fetal macrosomia, this marker being the best predictor of insulin resistance in pregnant women. Studies in much larger groups are needed to demonstrate the predictive role of FMPC and AN.

## **Study 2. Role of TCF7L2 rs7903146 gene polymorphism in the development of gestational diabetes and its influence on maternal-fetal complications in Romanian women.**

**Introduction and objectives:** Gestational diabetes mellitus is one of the most common complications of pregnancy, with multiple maternal and fetal risks. Although the exact pathophysiological mechanism is not known, multigenic changes leading to characteristic metabolic changes such as insulin resistance and  $\beta$ -pancreatic cell dysfunction are incriminated as a common factor. The main aim of this research is to investigate the role of TCF7L2 rs7903146 gene polymorphism in the occurrence of GDM, and to evaluate the influence of this genetic alteration on maternal-fetal outcomes in Romanian women.

**Material and method:** To achieve the proposed objectives, a prospective case-control study was carried out, including patients followed up at the Obstetrics-Gynecology Clinic I in Cluj-Napoca, Emergency County Hospital in Cluj-Napoca, Romania, from January 2018 to July 2020, including a total of 116 patients in the second trimester of pregnancy. GDM was diagnosed by screening performed between 24 and 28 weeks of pregnancy, according to IADPSG international recommendations, by OGTT with 75 mg glucose orally administered. This resulted in the two groups: the case group included 61 patients diagnosed with GDM after OGTT, and the control group, 55 patients with physiological pregnancy who accepted enrolment in the study and who had a OGTT with a normal result.

**Results:** Analysis of rs7903146 TCF7L2 genotype distribution in the studied groups showed that 37.7% of patients with diabetes had the CC and CT genotype and 24.6% had the



---

TT genotype. On the other hand, in the control group 50.9% had the CC genotype, 40% CT and 9.1% had the TT genotype. The presence of the T allele was higher in the group of patients with GDM (43.3%) as opposed to the C allele whose frequency was higher in the control group (70.9%). Analysing the relative risk, the minor T allele was associated with a high risk of developing gestational diabetes with an OR of 1.71 if both heterozygous and homozygous types were considered and an OR of 3.26 if only the homozygous genotype was considered. A statistically significant difference was observed between T allele carriers in the studied groups, but also in the recessive model.

The presence of the minor T allele in both heterozygous and homozygous types was associated with an increased risk of fetal macrosomia, with an OR of 1.13, but without statistical significance ( $p > 0.05$ ). When only the homozygous type was considered, the OR increased to 2.12, demonstrating an even higher risk of macrosomia, but without statistical significance. Statistical analysis of birth weight  $\geq$  95th percentile of new-borns showed a statistically significant relationship between TT homozygous genotype and fetal macrosomia. Another important part of this research was the statistical analysis in terms of treatment required in the group of patients with GDM included in the study. The study found a highly statistically significant association between the type of diabetes and the genotypes studied. Patients with the homozygous TT genotype present were more likely to require insulin therapy (45.5%) compared to the rest of the patients with the other two genotypes (22.7% - CC genotype, 31.8% - CT genotype).

**Conclusions:** This study demonstrates that the presence of the T allele of the rs7903146-TCF7L2 polymorphism influences the development of GDM, and patients with the TT genotype are at increased risk of developing this pathology. Moreover, the presence of the TT genotype is accompanied by a high probability of developing a more severe form, namely insulin dependent GDM, compared to the CC and CT genotypes. Another important finding of the study is that the presence of the minor T allele is associated with a high risk of fetal macrosomia.

### **Study 3: Umbilical cord biometry and fetal subcutaneous abdominal fold assessment as potential markers for fetal macrosomia in gestational diabetes**

**Introduction and Aims:** Gestational diabetes are defined as glucose intolerance diagnosed for the first time in pregnancy and shows a dramatic increase in prevalence worldwide in recent times, along with increasing prevalence of T2DM and T1DM among women of reproductive age. Fetal macrosomia impacts both fetal and maternal obstetric outcomes, with increased risk of perinatal death, birth trauma due to instrumental deliveries.

The main objective of the study was to determine whether ultrasonographic measurement of umbilical cord anthropometric parameters (umbilical cord area, umbilical cord vessel area and the amount of Wharton's jelly) and measurement of fetal subcutaneous abdominal fold can be used as a method of diagnosis and prediction of GDM. Secondly, we investigated whether these parameters can be used as prognostic factors or predict the occurrence of fetal macrosomia in a selected population of Romanian patients.

**Material and method:** The study was a prospective case-control study conducted between January 2021 and June 2021 and included a number of 51 patients, dispensed in the

---

outpatient department of the Obstetrics-Gynecology Clinic I of CEH Cluj-Napoca. Patients were enrolled between 24 and 28 gestational weeks if they met the inclusion criteria. All patients were evaluated and examined at the follow-up pregnancy visit at 24 - 28 weeks of pregnancy. At presentation, they were counselled about the control protocol and study implications and accepted/rejected enrolment. Screening for GDM by oral glucose tolerance test (OGTT) was performed in the morning, followed by ultrasound examination as the second stage of assessment.

Fetal biometry, fetal weight estimation was performed on all patients enrolled in the study based on the Hadlock formula and measured umbilical cord area and circumference, umbilical vein and artery areas, WJ area and subcutaneous abdominal fold thickness measurements. Patients were followed up during pregnancy until delivery and data on labour and delivery, maternal postpartum complications, neonatal parameters were collected from medical records.

**Results:** The group included in the study consisted of 51 pregnant patients who presented for pregnancy monitoring at 24 to 28 weeks of pregnancy and agreed to take part in the study. According to OGTT test results, patients were divided into two groups, the group of patients with GDM (26 patients) and the group without GDM which consisted of 25 patients.

Comparing the anthropometric measurements of the foetuses we found that there were no statistically significant differences between the two groups studied for most parameters ( $p>0.05$ ). The exception was the value of subcutaneous abdominal fold measured in the second trimester, which was with high statistical significance higher in the foetuses of the patients in the group with GDM compared to the patients in the control group. When we compared the values obtained from umbilical cord area and Wharton's jelly area measurements, we concluded that there was a strong positive correlation between them.

In the group of patients with GDM there was a statistically significant correlation between estimated second trimester fetal weight and birth weight, while no such correlation could be established in the control group. Umbilical cord area and WJ could not be established as predictors of fetal macrosomia.

However, there was a statistically significant difference in the measurement of the subcutaneous abdominal fold during the second trimester between macrosomic and normal-weight infants in the group of patients with GDM. This confirms that measurement of subcutaneous abdominal fold during second trimester ultrasound assessment may be a potential predictor of fetal macrosomia at term in pregnancies with GDM. There was also a statistically significant difference between estimated second trimester fetal weight and fetal macrosomia at term in the group of patients with GDM. There was a statistically significant difference between exaggerated maternal weight gain during pregnancy and fetal macrosomia at term when calculated for both groups of patients.

**Conclusions:** In the current study, umbilical cord measurement and WJ are not predictors of fetal macrosomia, nor did they show significant differences between pregnancies with and without gestational diabetes. On the other hand, measurement of subcutaneous abdominal fold, fetal abdominal circumference, estimated second trimester fetal weight and maternal weight gain during pregnancy may be important markers of fetal metabolic status in pregnancies complicated with gestational diabetes.

---

## General conclusions

Following this doctoral study, we obtained several results that led us to formulate the following conclusions:

8. The serological values obtained in the doctoral study, in terms of Leptin are valuable and predict the occurrence of GDM as early as the first trimester of pregnancy, independent of the BMI value.
9. The low AN/L ratio, determined in the first trimester of pregnancy, is a predictor for the development of GDM and is associated with fetal macrosomia, this marker being the best predictor of insulin resistance in pregnant women.
10. Serological values of AN and CMPF, determined in the first trimester of pregnancy, could not demonstrate the role of GDM as predictors in the research.
11. Regarding the involvement of the rs7903146 polymorphism of the TCF7L2 gene, this study demonstrates that the presence of the T allele is associated with the development of GDM, and patients with the TT genotype are at increased risk of developing this pathology.
12. Also, an even more important finding is that the presence of the TT genotype of the rs7903146 polymorphism of the TCF7L2 gene, is accompanied by a high probability of developing insulin-dependent gestational diabetes compared to the CC and CT genotypes.
13. Regarding ultrasonography as a predictor of the risk of developing GDM and the risk of developing fetal macrosomia, umbilical cord measurement and WJ are not predictive parameters and did not show significant differences between pregnancies with and without GDM.
14. Measurement of subcutaneous abdominal fold, fetal abdominal circumference, estimated second trimester fetal weight, and maternal weight gain during pregnancy have been shown to be important markers of altered fetal glycaemic metabolic status in pregnancies complicated with GDM.

## Originality and innovative contributions

This doctoral study addresses a topical issue in modern obstetrics, a major public health problem with significant short- and long-term impact on maternal and fetal health.

The current research is the first evaluation that aims to identify the predictive role of biomarkers, genetic changes and fetal appendages assessed ultrasonographically in patients with gestational diabetes in our country. The implementation of these diagnostic techniques in clinical practice could improve obstetric performance, both in surveillance and treatment of this category of patients.

The originality of the PhD study is represented by the combination of protein biomarkers, metabolomics, genetic analysis and ultrasonographic study of the fetal appendages, constituted according to a unique and at the same time individualized pattern, to establish a maternal phenotype at risk to develop GDM and implicitly to diagnose early this condition.

---

The proposed research topic provides important insights into the pathophysiology of this disease, with direct applicability to the diagnosis of GDM, which will lead to early treatment of the disease.

The results of this doctoral research may form the basis for creating a characteristic model for a particular population group and lead to the development of screening programmes or risk scores that include the study of epidemiological factors, protein biomarkers and metabolites, genetic factors, and fetal ultrasound changes.