

**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ**

**КЛИНИЧЕН ЦЕНТЪР ПО ЕНДОКРИНОЛОГИЯ И ГЕРОНТОЛОГИЯ**

**Честота и клиничко-лабораторни характеристики на гестационния захарен  
диабет сред рискова група от бременни**

Д-р Мария Вескова Бояджиева – Владимирова

Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен  
„Доктор”

Научна специалност Ендокринология

Научни ръководители:

Проф. Д-р Сабина Захаријева Захаријева, дмн

Доц. Д-р Илияна Атанасова Борисова, дм

София, 2013

# **I. СЪДЪРЖАНИЕ**

Използвани съкращения.....	3
Въведение.....	5
Литературен обзор.....	6
<b>Цел, задачи, материал и методи</b>	
- Цел.....	49
- Основни задачи.....	49
- Материал.....	50
- Методи.....	51
Резултати.....	55
Обсъждане.....	88
Стратегия за скрининг и подход при гестационен захарен диабет.....	122
Основни изводи.....	124
Приноси.....	126
Библиография.....	128
Публикации и участия в научни прояви във връзка с дисертационния труд.....	156
Научни проекти във връзка с дисертационния труд.....	160

## II. ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ADA – Американска диабетна асоциация

ADIPS – Австралоазиатска асоциация по изучаване на диабет и бременност

ГЗД – гестационен захарен диабет

EASD – Европейска асоциация по изучаване на захарен диабет

GAD-65 - антителата към декарбоксилазата на глутаминовата киселина

HAPO study – Hyperglycemia and adverse pregnancy outcome

HbA1c – гликиран хемоглобин

hPGH – човешки плацентарен растежен хормон

HOMA – homeostatic model assessment

hsCRP – високочувствителен С – реактивен протеин

IA-2 - антителата към тирозин фосфатазата

IADPSG – Международна асоциация по изучаване на диабет и бременност

ICSI – интра цитоплазмено инжектиране на сперматозоид в яйцеклетката

IRI – имуно-реактивен инсулин

IRS-1 – инсулинов рецепторен субстрат

IVF – in-vitro оплождане

ИТМ – индекс на телесна маса

ИУРП – интраутеринна ретардация на плода

NZZSD – Ново Зеландска асоциация по изучаване на диабет

НГГ – нарушена гликемия на гладно

НГТ – нарушен глюкозен толеранс

НЗД – новооткрит захарен диабет

OR /odds ratio/ - отношение на шансовете

ОГТТ – орален глюкозо толерансен тест

PAPP-A – pregnancy-associated protein A

ROC крива – receiver operating characteristics крива

САН – средно артериално налягане

СПКЯ – синдром на поликистозни яйчници

ССЗ – сърдечно-съдови заболявания

ЗД – захарен диабет

WHO – Световна здравна организация

### III. ВЪВЕДЕНИЕ

Гестационният захарен диабет е актуален проблем в наше време, пораждащ научен и медико-обществен интерес. Той е свързан с редица рискове за плода, новороденото - неговото развитие, както и рискове за майката. Честотата му варира и нараства в световен мащаб паралелно с тази на захарния диабет тип 2. Въпреки голямото му социално значение, все още съществуват редица нерешени проблеми. Няма данни за честотата на ГЗД в България. С въвеждането на новите критерии на Международната асоциация по изучаване на проблемите на диабет и бременност, дялът на ГЗД се покачва значително. От друга страна, тези критерии все още не са въведени рутинно в редица държави по света, включително и у нас.

Неясен остава въпроса дали всички бременни трябва да бъдат изследвани за ГЗД или само при наличие на риск за развитие на състоянието. Липсата на национална програма за скрининг налага търсенето на максимално надеждни, евтини и достъпни методи за откриването на бременните жени с повишен риск за ГЗД. Обсъжда се мястото на кръвната захар на гладно и гликирания хемоглобин в диагностичния алгоритъм. Налице са противоречиви данни по отношение на ролята на адипоцитокините по време на бременност.

Разгадаването на човешкия геном и в частност откриването на гените, генните полиморфизми или мутации, които се установяват в най-висок процент при пациентите със захарен диабет, насочва вниманието и към търсенето на съответните гени отговорни за развитието на ГЗД. Значението им остава противоречиво.

Изясняването на различните метаболитни и генетични рискови фактори ще позволи изграждането на диференциран подход към бременните жени и изработването на стратегия за превенция и поведение при ГЗД.

## **IV. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР**

### **I. СЪЩНОСТ, ОСНОВНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ЗНАЧЕНИЕ НА ГЕСТАЦИОННИЯ ЗАХАРЕН ДИАБЕТ (ГЗД)**

#### **1. Определение**

Гестационният захарен диабет е едно от най-честите усложнения по време на бременността. Определя се като всяко нарушение във въглехидратния метаболизъм възникнало или за първи път установено по време на бременността [73, 74, 204]. Определението се прилага, независимо от нуждата от използване на инсулин за лечение и независимо дали състоянието продължава след приключване на бременността. Възможно е част от жените с ГЗД да са с неразпознат ЗД (тип 1 или 2), предшестващ бременността [227]. Тъй като ГЗД е нарушение, което се развива през по-късните гестационни седмици, то установяването на хипергликемия през първи триместър от бременността насочва към предшестващ ЗД.

#### **2. Терминология**

Диагнозата захарен диабет в миналото е била поставяна въз основа на установяването на глюкоза в урината. Още преди 2500 години е било установено, че мравките били привлечени от урината на някои индивиди. През 18-ти и 19-ти век сладкия вкус на урината е била използвана за диагностика още преди въвеждането на химичните методи за откриване на глюкоза в урината. Тестове за измерване на глюкоза в кръвта са разработени преди повече от 100 години, а хипергликемията впоследствие става единствения критерий за диагностициране на ЗД.

Идеята за субклинични нива на кръвната захар по време на бременност, които засягат плода и майката, са били обсъждани преди много години. Хаден, в един от своите доклади, представя данни от медицинска литература от 1823 година, в която се споменава за състояние, подобно на диабет по време на бременността, което след приключването ѝ изчезва [113, 114]. По-голямо внимание на концепцията за негативното

отражение на ниските нива на хипергликемия върху бременността, започват да се обсъждат между 1940-1950г. При проведените изследвания става ясно, че жените, които са развили ЗД на по-късен етап от живота, са били с анамнеза за по-висока честота на перинатална смъртност. Тогава за първи път е въведен термина „предиабет по време на бременност“. През 1954 г. Ноет публикува проучване „Въглехидратен метаболизъм по време на бременност“, в което се споменава за първи път термина „метагестационен диабет“. Това поражда серия от други проучвания между 1950-1960г. Jorgen Pedersen въвежда модерния термин „гестационен захарен диабет“.

Първото голямо проспективно скринингово проучване е проведено през 1954 г. в Бостън – ОГТТ с 50 гр. глюкоза в рамките на 1 час. Резултатите са публикувани през 1964 г. от O'Sullivan и Mahan [223] и с малки изменения, тогава въведените критерии могат да се използват и днес [66]. Първоначално тези критерии са били създадени, за да идентифицират жените, които ще развият ЗД след приключване на бременността [203] и са били сходни с критериите, прилагани при всички индивиди [329], без непременно да се взема под внимание изхода от бременността. O'Sullivan е смятан за основоположник на бъдещите изследвания за ролята на глюкозния метаболизъм по време на бременност. Проучвания в следващите декади сочат повишена честота на перинаталната смъртност, корелираща с данните за хипергликемия на майката.

През 1979 г, д-р Norbert Freinkel (представител на ADA) и д-р John Josimovich (представител на Американския колеж по Акушерство и Гинекология), събират световни експерти с клиничен и научен опит, организирайки Първата международна работна среща – конференция по гестационен захарен диабет. Тогава официално се възприема термина „гестационен захарен диабет“ и се дава определение на състоянието, което е общовалидно и днес. До момента са проведени пет международни работни срещи-конференции по ГЗД, чиято цел е създаване на международен консенсус и единодушие по проблемите на състоянието.

### **3. Диагностични критерии за ГЗД**

Първите критерии за поставяне на диагноза ГЗД са били създадени с цел идентифициране на жените с висок риск за развитие на ЗД, но не и с цел идентифициране на риска от неблагоприятен изход за плода [223]. С напредването на изследванията в сферата на диабета по време на бременност се постига единодушие, че изявения ЗД, независимо от симптомите и белезите на метаболитна декомпенсация, е свързан със значим риск от неблагоприятен перинатален изход за новороденото. Рискът от подобен неблагоприятен изход при хипергликемия по-малка от тази при изявен ЗД е противоречив. Налице са редица критерии за поставяне на диагноза ГЗД според различните организации и държави (табл. 1). Най-масово използваните са критериите на ADA[282], CDA[179], WHO [14], EASD [39], ADIPS[280] и NZSSD.[60] Agarwal и колектив провеждат сравнителен анализ на изброените критерии за поставяне на диагноза ГЗД. Те анализират основните различия между тях по отношение на честота, степен на съгласуваност (карпа) и изход от бременността [12]. Липсата на международното единство в подхода за установяване и диагностика на ГЗД е основна пречка, поради което на петата международна работна среща-конференция по ГЗД е взето решение за създаване на проучването Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcomes [204]. Целта на HAPO проучването е да изясни връзката между риска от неблагоприятен изход за плода с нивото на майчината хипергликемия, по-ниска от тази при изявен ЗД, по време на бременността [139, 206]. Оценка на глюкозния толеранс чрез 2-часов орален глюкозотолерантен тест със 75 гр. глюкоза, разтворена в 300мл вода, е проведена сред 25 505 бременни жени между 24 – 32 гестационна седмица в 15 мултинационални, с различна етническа и културна принадлежност международни центрове. Първични цели на проучването са били тегло на новороденото >90ти персентил за гестационната възраст, цезарово сечение, клинично установена неонатално хипогликемия, нива на серумния С-пептид от пъпна връв >90ти персентил. Вторични цели са били предтерминно раждане (преди 37 г.с.), раменна дистокия и травма при раждането, нужда от интензивно неонатално лечение, хипербилирубинемия и пreeклампсия. В хода на проучването се е наблюдавало непрекъсната корелация между високата майчина кръвна захар, независимо дали е била на гладно, на 60 минута или 120 минута, и честотата на основните

търсени цели от проучването, независимо от другите рискови фактори [140, 206]. Тази асоциация се е наблюдавала във всички центрове, което е дало основание да се приеме, че новите критерии ще бъдат приложими за различните популации и държави. Връзка между майчината хипергликемия и настъпилите усложнения при плода и новороденото се описват и от други автори. Pettit и колектив, още през 1980г, установяват наличието на връзка между нивото на кръвната захар, измерена на 2-ри час в хода на ОГТТ, и раждането на плод, по-голям за гестационната възраст, както и нуждата от провеждане на Цезарово сечение [238]. При проучване в Дания сред жени с леко завишени стойности на кръвната захар, но без ГЗД, изследователите установяват същата линейна зависимост между нивото на кръвната захар на 2-рия час и честотата на преждевременно раждане, раменна дистокия, макрозомия и проведено Цезарово сечение [149]. Друг анализ на същата кохорта доказва и линейна зависимост между кръвната захар на гладно и макрозомията на плода [148]. В проучването Торонто TriHospital също се установява връзка между майчината гликемия и неблагоприятния изход от бременността.[273] Sacks и колектив откриват връзка, както между кръвната захар на гладно, така и на 2-рия час в хода на ОГТТ и макрозомията на плода при смесена етническа кохорта (61% Европейска раса) [257]. В Американска популация, състояща се от различни етноси, Ferrara и колектив [94] установяват връзката между изразената макрозомия, неонатална хипогликемия и хипербилирубинемия с нарастване на броя на завишените стойности на кръвната захар над прага в хода на ОГТТ спрямо актуалните тогава критерии [203, 204]. Други автори търсят дълготрайните последствия за децата, родени от жени с ГЗД [130, 237].

Резултатите от НАРО проучването сочат строга линейна зависимост между риска от неблагоприятен перинатален изход (новородено с тегло >90-ти перцентил, ниво на С-пептид от пъпна връв, % на мастна тъкан) и всяка една от трите измерени стойности (кръвна захар на гладно, на 1-ви и 2-ри час в хода на ОГТТ) [205]. Асоциацията между кръвната захар и посочените като първични и вторични цели са дали основата за избор на прагови стойности на кръвната захар за диагнозата ГЗД. Феталната макрозомия е в най-голяма степен в резултат на хипергликемията по време на бременността [143, 175, 335].

На базата на установените честоти на отделните първични и вторични крайни цели спрямо отделните нива на кръвната захар е изчислено отношението на шансовете (OR-odds ratio) [139]. Праговете стойности за поставяне на диагноза според критериите на IADPSG са представени в Таблица 1. Те са избрани на базата на нивото на кръвната захар, при което OR е >1.75 за тегло на плода, нивото на С-пептид и % на мастна тъкан на новородено, надминават >90 перцентил. Тези изчисления са направени на базата на логистичен регресионен анализ.

Поради факта, че определението за ГЗД включва всяко ниво на хипергликемия установено или за първи път диагностицирано по време на бременността, IADPSG определя част от жените като такива със ЗД преди бременността [205]. Те трябва да отговарят на критериите за поставяне на диагноза ЗД (кръвна захар на гладно >7.0 ммол/л и 2-ри час в хода на ОГТТ >11.1 ммол/л)[14].

Таблица 1. Диагностични критерии и прагови стойности за поставяне на диагноза ГЗД според различните международни консенсуси и препоръки.

<b>Критерии</b>	<b>Брой критерии на диагноза ГЗД</b>	<b>КЗ на гладно ммол/л</b>	<b>КЗ ОГТТ – 60 минута ммол/л</b>	<b>КЗ ОГТТ – 120 минута ммол/л</b>
IADPSG	≥ 1	5.1	10.0	8.5
ADA	≥ 2	5.3	10.0	8.6
WHO	≥ 1	7		7.8
EASD	≥ 1	6		9
CDA	≥ 2	5.3	10.6	8.9
ADIPS	≥ 1	5.5		8
NZSSD	≥ 1	5.5		9

Критериите на IADPSG обединяват мнението на отделните членове на асоциацията, но не се отнасят за организациите, които те представляват. Очаква се обаче, така представените резултати да послужат на диabetолози, ендокринолози и акушер-гинеколози и други организации за въвеждането на единни международни критерии за диагноза и класификация на ГЗД [205]. Американската диabetна асоциация през месец

януари 2011г прие критерии на IADPSG.[286] Световната здравна организация също е в процес на адаптиране на тези критерии.

#### **4. Епидемиологични данни**

Приблизително 1-17% от всички бременни жени развиват ГЗД [107, 151, 268]. Този процент е дори по-голям в страните, в които честотата на ЗД тип 2 е по-голяма [72]. Честотата на ГЗД варира значимо в различните части на света според и зависи от изследваните раси и етнически групи. Разлики в честотата са налице дори и в границите на една държава [27, 75, 223]. Първите данни за честотата на ГЗД от 2.5% в Бостън са представени от O'Sullivan и Mahan през 1964г [223]. През 1980г Mestman и колектив установяват честота на ГЗД 12.3% в Калифорния, като драстичното увеличение обясняват с изследването на голям брой бременни жени с наднормено телесно тегло/ затлъстяване [202]. Подобно, в Австралия е проведено проучване сред приблизително 35 000 бременни жени родени в различни крайща на света. Данните убедително сочат, че честотата зависи и от етническата група, към която принадлежи индивида (честота 4.3% в Австралия и Нова Зеландия, 15% в Индийския субконтинент, 9.4% в Африка, 7.3% в Средиземноморие и т.н.) [27].

В допълнение на популационните разлики, честотата на ГЗД зависи и от използвания диагностичен метод [12, 14, 60, 73, 205]. В Северна Америка, методът, препоръчван от the National Diabetes Data Group се базира на резултатите на O'Sullivan и Mahan [204, 223]. Диагностичните критерии на WHO са базирани на праговете стойности на кръвната захар при небременни индивиди [14]. И двата подхода са критикувани, тъй като се базират на риска от развитие на ЗД, а не на риска от неблагоприятен изход от бременността, който е ключов момент в медицината, базирана на доказателствата [153, 236]. Резултатите от проучването HAPO, което се фокусира изцяло върху рисковете от неблагоприятен изход от бременността, честотата на ГЗД е 17.8% [205]. С адаптирането на критериите на IADPSG, базирани на резултатите от проучването HAPO, честотата на ГЗД се увеличава приблизително с 50% [154]. Това снижение е резултат от снижените прагови стойности на кръвната захар, необходими за поставяне на диагнозата ГЗД.

## **5. Значение на ГЗД**

Поради високият риск от майчини и фетални усложнения остава спорен въпроса дали е необходимо провеждането на масов скрининг или само сред селектирана рискова група бременни. Според критериите на IADSPG се препоръчва провеждане на скрининг за ГЗД сред всички бременни жени [205]. Американската диабетна асоциация препоръчва провеждане на скрининг сред високо-рисковите бременни жени веднага след установяването на бременност при наличие на наднормено телесно тегло/ затлъстяване, фамилна обремененост от ЗД, глюкозурия, анамнеза за ГЗД при предходна бременност, последван от нормален глюкозен толеранс, установена завишена стойност на кръвната захар в хода на рутинни изследвания, анамнеза за репродуктивни неудачи, СПКЯ [73]. При данни за нормален глюкозен толеранс и при всички останали бременни се препоръчва изследването да се проведе между 24-28 гестационна седмица [73].

### **- Риск за плода/ новороденото**

Вътреутробното програмиране е процес, при който различни стимули или стрес, явяващи се в критични и чувствителни периоди за феталното развитие, перманентно променят структурата, физиологията и метаболизма, предразполагайки индивида към определени заболявания в хода на неговия живот [317]. Диагнозата ГЗД поставя жената и нейното дете в групата с увеличен риск за развитие на нарушения във въглехидратната обмяна и затлъстяване.

Рисковете за плода, по време на вътреутробното развитие са свързани с нивото на майчината хипергликемия, която води до фетална хипергликемия. По този начин се стимулира феталния панкреас да произвежда по-голямо количество инсулин, а от там и изразено по-бързите темпове на растеж и несъответствието между размерите на плода и гестационната седмица (до степен на макрозомия) с натрупване на повече мастна тъкан [138, 145, 284]. Неконтролираната майчина хипергликемия и развилата се фетална хиперинсулинемия водят до хипогликемия на новороденото [61]. Макрозомията на плода води от своя страна до настъпването на травми по време на раждането и раменна дистокия, като често е и показание за Цезарово сечение като метод на родоразрешение

[132]. Гестационният захарен диабет е свързан с повишен риск за новороденото от респираторен дистрес, ретардация или макрозомия, полицитемия, вродени малформации, хипокалциемия, хипомагнезиемия, по-тежко протичаща жълтеница [68]. Лошият гликемичен контрол е отговорен за 49.2% от перинаталната смъртност при новороденото [93]. Нарушената глюкозна хомеостаза по време на бременност има своето дълготрайно отражение върху новороденото. На по-късен етап от живота, децата на майки, имали ГЗД, имат повишен риск от затлъстяване, нарушения в глюкозния толеранс - предиабет, ЗД тип 2 и сърдечно-съдови заболявания [34, 68, 228, 266, 320]. При проучване в Америка, проследило 211 деца до 7 годишна възраст, родени от майки от мексикански произход, които са били с леко завишени стойности на кръвната захар, но без ГЗД или ЗД, авторите установяват значима връзка между повишената кръвна захар на майката и повишеното систолното и диастолното артериално налягане при децата [81]. Проучване в Канада върху мишки също сочи, че лошият гликемичен контрол на майката, дори първоначално да не се е отразил върху гликемичния контрол на новороденото, води до забавяне на костното развитие и растеж [339]. От друга страна, при изследване сред мишки, намаления с 30% дневен хранителен прием по време на бременността с цел лечение на ГЗД, води до намаляване на  $\beta$ -клетъчната маса на панкреаса на новороденото, предсказвайки също бъдещи въглехидратни нарушения [142]. Поради изброените причини, превенцията на повишената кръвна захар по време на бременност се е превърнала в цел за първична профилактика.

#### - **Риск за майката**

По време на бременността, жените с ГЗД имат увеличен риск за развитие на гестационна хипертония, прееклампсия и еклампсия [68]. След приключване на бременността, те имат 40-60% по-висок риск за развитие на ЗД тип 2 през следващите 5-15 години, спрямо 15% в общата популация [203, 222]. Между 10 и 50% от жените с ГЗД ще развият ЗД тип 2 през следващите 5 години [160]. Данните от мета-анализ на 675 455 бременни жени сочат, че относителният риск за развитие на ЗД тип 2 е 7.3 по-голям при жените с ГЗД спрямо тези с нормогликемия по време на бременността [28]. Майчиното

затлъстяване, завишената стойност на кръвната захар на гладно и установяването на ГЗД преди 24 г.с. са важни предиктори за нарушен глюкозен толеранс и ЗД тип 2 още в ранния постпартален период [76]. Лабилното протичане и честите колебания в нивата на кръвната захар са суспектни и за ЗД тип 1. В проучване, над 95% от жените, които са имали кръвна захар на гладно над 7ммол/л по време на скрининга за ГЗД, са останали с нарушение в глюкозната хомеостаза още през първата година след приключване на бременността [164]. Същото проучване сочи, че подобни нарушения се наблюдават и при 67% от всички жени с ГЗД, при които кръвната захар на гладно е била между 5.8-7.2 ммол/л. Поради високия риск за ЗД е необходимо мониториране на кръвната захар още след раждането [76]. Обикновено веднага след раждането глюкозните нива се възстановяват до нормата, но в някои случаи могат да останат леко завишени през първите 24-48 часа. Тези жени, които са имали ГЗД по време на бременност, имат 66% риск за развитие на ГЗД при следваща бременност [240]. Честотата на ЗД може да бъде намалена с 25%, ако тези жени спазват здравославен начин на живот [8, 25, 233].

#### - **Възможности за превенция**

Всички жени, които са имали ГЗД, трябва да проведат ОГТТ на 6-8 седмица след приключване на бременността, като резултатите по отношение на глюкозния толеранс се интерпретират по същия начин като при небременни индивиди [245]. Въпреки, че повечето жени с ГЗД се възстановяват до нормален глюкозен толеранс след приключване на бременността, има редица доказателства за повишен риск от настъпването на ЗД в бъдеще [160, 203, 222]. Жените, при които се установява ГЗД трябва да бъдат обучени за симптомите на ЗД и трябва да бъдат изследвани през определени интервали. В случай на установяване на ЗД, те трябва да бъдат насочени към ендокринолог за започване на съответното лечение и обучение по основните проблеми на заболяването с цел оптимален гликемичен контрол. Жените с данни за някое от предиабетните състояния - НГГ, НГТ или комбинация от двете също са с повишен риск от развитие на ЗД в бъдеще [299]. Според Танкова и колектив, най-значими рискови фактори за преминаване от предиабет в ЗД са нивото на HbA1c при установяване на въглехидратното нарушение,

предшестващи отклонения в нивото на кръвната захар, наднорменото телесно тегло/затлъстяване [4, 6]. Независимо от установеното въглехидратното нарушение след приключване на бременност с ГЗД, жените трябва да бъдат окуражавани да се консултират при планиране на следваща бременност [7, 270].

Жените, с данни за нормален въглехидратен толеранс в ранния постапартален период, трябва да бъдат обучени за риска от развитие на ГЗД при следваща бременност и съответно за риска от развитие на ЗД в бъдеще [159]. Кръвната захар на гладно трябва да бъде изследвана поне веднъж годишно, а ОГТТ веднъж на 3 години [205]. Провеждането на ОГТТ е финансово ефективно в превенцията на ЗД [159]. Танкова в своя дисертационен труд доказва, че за българската популация, HbA1c показва най-добро съчетание на оптимална чувствителност (86%) и специфичност (92%) като средство за установяване на недиагностициран ЗД при прагова стойност 6.1% [298]. По-възрастните жени със затлъстяване са с повишен риск от повторен ГЗД при следваща бременност [75]. Ако е налице затлъстяване, жените трябва да бъдат окуражени да намалят телесното си тегло, тъй като то представлява риск, както за развитие на ГЗД, така и за развитие на ЗД [41, 221, 260]. Жените със затлъстяване имат 50-75% по-висок риск за развитие на ЗД тип 2, докато жените с ГЗД и нормално телесно тегло имат 25% [76, 221, 222].

Необходимо е да се окуражава кърменето след раждането, както при жени с ГЗД, така и при всички жени със ЗД тип 1 или 2 [178]. Въпреки, че не всички жени отслабват по време на кърмене, е нормална да намалее телесното тегло във връзка с големия енергиен разход при кърменето [19]. Кърменето е изключително важно и за новороденото на майки със ГЗД, тъй като редица проучвания са доказали протективен ефект срещу затлъстяването и ЗД [164, 301].

Рискът от развитие на ЗД заедно с високата честота на ГЗД в популацията, определят значението на ГЗД в превенцията на водещи социално значими заболявания, каквото е ЗД тип 2. Според Американския център за контрол и превенция на заболяванията, около 27% от пациентите със ЗД тип 2 остават недиагностицирани [49]. Танкова сочи подобен процент (22.2% за мъжете и 16,3% за жените) на недиагностициран ЗД тип 2 при лица с поне един рисков фактор за заболяването сред българската популация

[4]. До момента, в превенцията на въглехидратните нарушения, най-ефективен е нефармакологичния подход – промяната в стила на живот, включващ хранителен режим и увеличена двигателна активност [5]. Според данните от големите проучвания – DPP (Diabetes Prevention Program) и Finish Diabetes Prevention Study, промяната в стила на живот води до намаление на риска от развитие на ЗД с 58% и е почти 2 пъти по ефективен от приложението на метформин, който снижава риска с 31% [167, 179, 183, 310].

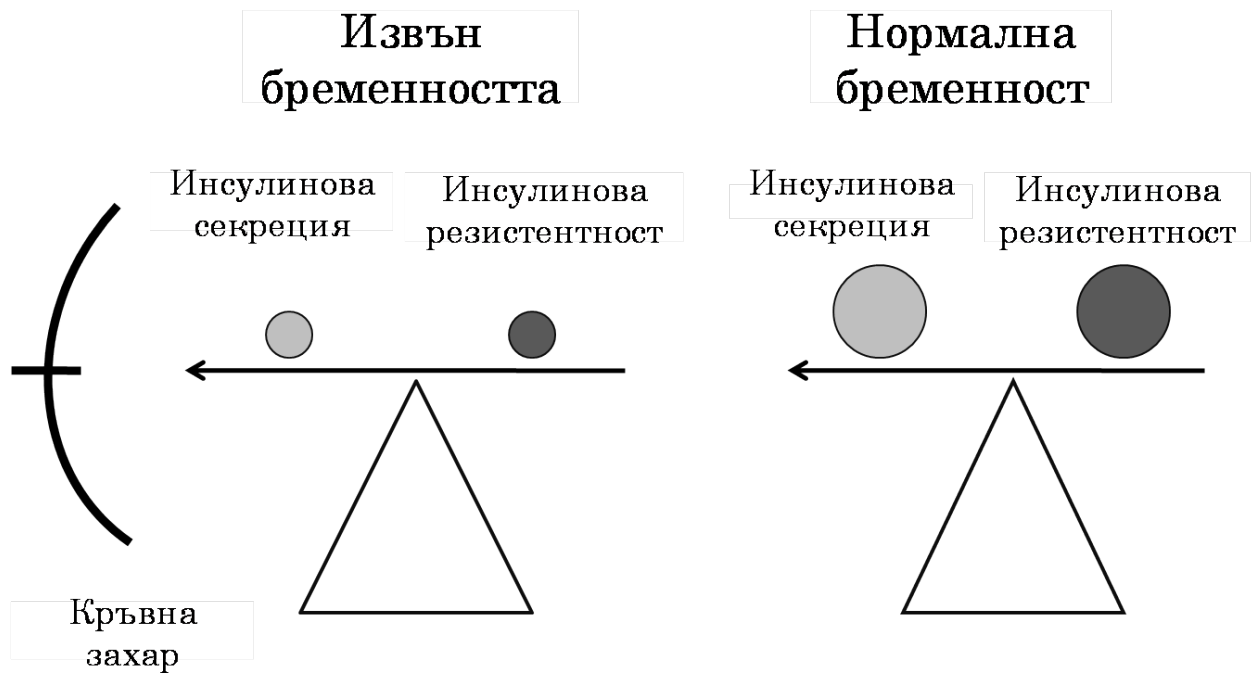
## **II. ПАТОФИЗИОЛОГИЧНИ МЕХАНИЗМИ ПРИ ГЗД**

### **1. Инсулинова чувствителност и инсулинова резистентност**

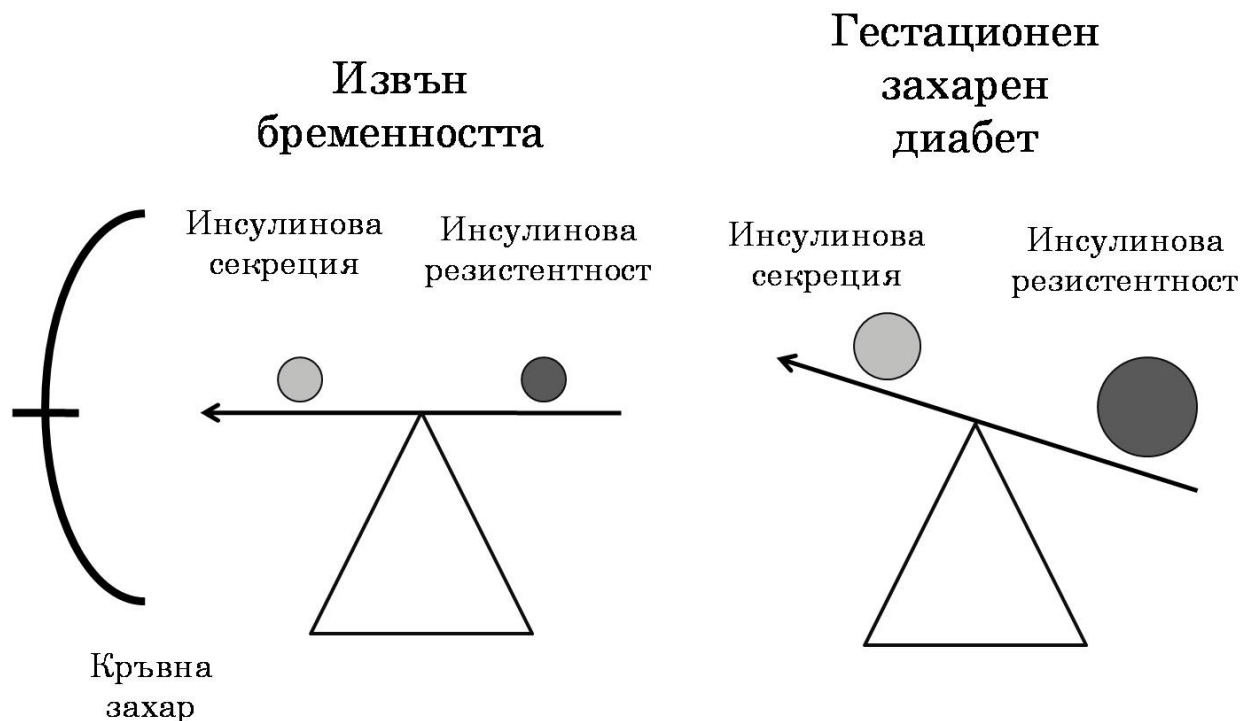
Бременността при хората се характеризира с редица ендокринни и метаболитни промени, обезпечавщи енергийните и хранителни нужди на фетуса. През ранната гестационна възраст, инсулиновата секреция се увеличава, докато инсулиновата чувствителност остава непроменена, намалена или дори увеличена. Наблюдава се нарастване на майчините мастни запаси и намаляване концентрацията на свободните мастни киселини. От средата до края на бременността, инсулиновата чувствителност прогресивно намалява до нива сходни на инсулиновата резистентност при пациенти със ЗД тип 2 [207]. Тази асоциация и данните за множеството рискови фактори сочат, че двете заболявания най-вероятно имат обща етиология [28]. В тази връзка, често метаболитните нарушения, които се установяват при пациентки с ГЗД, са сходни като при пациентите със ЗД тип 2.

За да се постигне нормогликемия е необходимо инсулиновата секреция да нарастне 2 до 2.5 пъти, за да преодолее нарастналата ИР. През късната бременност, майчината мастна тъкан намалява, докато постпрандиалните нива на свободни мастни киселини се увеличават. Нивото на инсулин-медираното глюкозно освобождаване намалява с 40-60% спрямо нивото му преди бременността [45]. В допълнение, намалява и способността на инсулина да потиска липолизата [22]. Нарушената регулация на тези процеси допринася за развитието на ГЗД. Той се развива, когато  $\beta$ -клетъчните резерви на панкреаса са недостатъчни, за да компенсират намалялата инсулинова секреция. По този

начин инсулиновата секреция не е достатъчна, за да компенсира нарастналата инсулинова резистентност. В резултат, постпрандиално нарастват значимо свободните мастни киселини, нараства чернодробната глюкозна продукция, изразената инсулинова резистентност и съответно нивата на кръвната захар в кръвта.



Фигура 1. При нормално протичаща бременност нарастналата инсулинова резистентност се компенсира от увеличената инсулинова секреция , като по този начин се поддържа нормогликемия и нормална въглехидратна хомеостаза.



Фигура 2. При ГЗД балансът е нарушен, като въпреки увеличаващата се инсулинова секреция, инсулиновата резистентност не може да бъде преодоляна.

Скелетните мускули са основното място, в което се доставя глюкоза и заедно с мастната тъкан са местата, в които в най-голям процент се наблюдава ИР. Нормалната бременност се характеризира с приблизително 50% намаляване на инсулин-медираното глюкозно доставяне и 200-250% нарастване в инсулиновата секреция, за да се постигне нормогликемия [45, 171]. Смята се, че плацентарните хормони имат основна роля за развитието на ИР по време на бременност. Човешкият плацентарен лактоген увеличава своята концентрация до 30 пъти в хода на бременността като индуцира инсулиновото освобождаване от панкреаса [37]. Макар че проучванията са противоречиви, някои автори сочат че hPL извън бременността води до периферна ИР [26]. Друг хормон, чиято роля в ИР по време на бременността се обсъжда е човешкият плацентарен растежен хормон. Той се различава от хипофизарния растежен хормон по 13 аминокиселини. Концентрацията на hPGH нараства 6-8 пъти по време на бременността и заменя хипофизарния растежен хормон в майчината циркулация до 20 гестационна седмица [118]. Подобно на добре описаните ефекти на излишъка на хипофизарен растежен хормон

върху инсулиновата чувствителност, свързването на hPGH при мишки, чиито нива на hPGH са сравними с нивата на хормона през третия триместър от бременността, водят до тежка периферна ИР [23].

Способността на инсулина да увеличава усвояването на глюкозата се контролира от транспорта на глюкозата през клетъчната мембрана. Процес, който се обезпечават от глюкозните транспортери. Varbour и колеги изследват ефектите на бременността и ГЗД върху способността на инсулина да стимулира глюкозния транспорт във фибрите на скелетния мускул *in vitro*. В подбора участват затлъстели бременни жени с ГЗД, затлъстели бременни жени без ГЗД (по време на раждане) и затлъстели жени, при които са взети биопсия от скелетен мускул и са сравнени механизмите на ИР [22]. Авторите установяват, че бременността сама по себе си е свързана със значима редукция (40%) в инсулин-стимулирания глюкозен транспорт. От друга страна, при бременните с ГЗД този механизъм е допълнително нарушен и редукцията достига до 65% спрямо бременните без ГЗД [101]. Намалването на глюкозния транспорт се наблюдава без да има значима промяна в нивото на GLUT4 в скелетните мускули сред бременните жени [106].

Преди свързването с инсулиновия рецептор, инсулина стимулира тирозиновата фосфорилация на  $\beta$ -субединицата на рецептора на поне шест тирозинови участъка [328]. Установен е дефект в първоначалната стъпка в инсулин рецепторното сигнализиране при жените с ГЗД, които имат значимо не толкова изразена тирозинова фосфорилация на инсулиновия рецептор спрямо бременните с нормален глюкозен толеранс, без да е налице промяна в рецепторното свързване или броя на рецепторите [101, 276]. Тези данни сочат, че жените с ГЗД имат дефект в инсулин рецепторната тирозинова фосфорилация, която може да е резултат от ендогенно потискане на рецепторното сигнализиране.

Нивото на IRS-1 е ключово за регулацията на глюкозното усвояване в инсулин-чувствителните клетки. Проучвания сочат, че нивото на IRS-1 в скелетните мускули на бременни със и без ГЗД е намалено с 30-50% спрямо небременни индивиди, определяйки важното му значение по време на бременност [101]. Смята се, че нивото му в скелетните

мускули се възстановява до нормата 6 седмици след раждането при жени с ГЗД и до една година след раждането при затлъстели жени без ГЗД [22].

Проведени са редица проучвания върху инсулиновата секреция и чувствителност при ГЗД, като резултатите често са нееднозначни, най-вече в резултат на използваните методики. При изследване на големи популации, от практическа гледна точка, най-лесни за използване са индиректните методи за оценка на инсулинова резистентност и  $\beta$ -клетъчна функция НОМА индекс (homeostasis model assessment) (НОМА-IR и НОМА-%В) [115]. Според тях, на базата на кръвната захар на гладно и инсулина би могла да се направи оценка на ИР и  $\beta$ -клетъчната функция.

Catalano и колектив провеждат венозен глюкозо-толерансен тест на 7 жени с ГЗД и 8 контроли - преди бременността, 12-14 гестационна седмица и 34-36 гестационна седмица. И при двете групи жени са установили покачване на инсулиновия отговор през първата и втората фаза с напредване на гестационната възраст. Нарастването на втората фаза е било значимо по-голямо в групата с ГЗД. Инсулиновата чувствителност е намаляла и при двете групи с напредване на гестационната възраст, но значимо повече в групата с ГЗД [45]. Тези метаболитни промени във въглехидратния метаболизъм са характерни и за ЗД тип 2, като допълнително потвърждават връзката между тях. Като цяло, директните методи за оценка на инсулиновата секреция и чувствителност (венозния глюкозо-толерансен тест и кламп методиката) са по-трудни и неподходящи за популационни проучвания.

## **2. Автоимунни механизми**

Гестационният захарен диабет е състояние на нарушение в инсулиновото действие и секреция, дефекти, които са характерни също и за ЗД тип 2 [256]. Жените с ГЗД имат значимо по-висок риск за развитие на ЗД тип 2 в бъдеще, но риска за развитие на ЗД тип 1 е също относително висок [47, 67, 340].

Наличието на циркулиращи автоантитела, насочени срещу  $\beta$ -клетката на панкреаса е един от най-старателно проучените феномени, характеризиращи ЗД тип 1 [230]. Те са маркер за съществуването на деструктивен процес в островната клетка на панкреаса и

установяването идентифицира индивидите, които имат риск за развитието на заболяването в бъдеще. Диабет-асоциираните автоантитела имат голямо предиктивно значение за родствениците на пациентите със ЗД тип 1. Проучвания сочат, че установяването на автоантитела при ГЗД също има голяма предиктивна стойност [103]. Повечето изследователи са установили висока честота и висок титър на автоантитела, макар че наличието на автоантитела може да варира спрямо гестационната седмица, наличното лечение на състоянието и използваните методики за изследване [146]. Установяването на повече от едно антитяло увеличава риска за изява на заболяването в по-кратък период [103]. Същите автори сочат, че 61% от жените с ГЗД, които са били с висок титър на две антитела, са развили клиничната картина на ЗД тип 1 до 2 години след приключване на бременността [103]. Честотата на антителата към декарбоксилазата на глутаминовата киселина (GAD-65) варира от 0 до 10% [77, 311], на анти островно-клетъчните антитела (ICA) от 0 до 15% [67, 77, 194], на инсулиновите антитела (IAA) от 0 до 18% [21, 197, 340] и на антителата към тирозин фосфатазата (IA-2) от 0 до 6,2% [77, 103]. Поради технически причини, ICA антителата все по-малко се изследват. Установяването на GAD-65 и IA-2 антитела има 85-90% чувствителност за развитието на захарен диабет тип 1 [73]. Анти-инсулиновите антитела (IAA) по-рядко се срачат при възрастни хора [242]. Все повече автори се насочват към изследване на автоантитела, насочени срещу цинковия транспортер (ZnT8). Резултатите убедително сочат, че те са свързани с развитието на ЗД тип 1 [33]. Въпреки редицата проучвания в световен мащаб, не са публикувани резултати от изследване на автоантителата сред бременни жени с ГЗД до момента в България. Липсват данни за честотата на  $\beta$ -клетъчни антитела и изявен автоимунния захарен диабет при бременни жени в България.

### **III. КЛАСИЧЕСКИ РИСКОВИ ФАКТОРИ И МАРКЕРИ ПРИ ГЗД**

#### **1. Антропометрични показатели**

##### **1.1. ИТМ**

Наднорменото телесно тегло и затлъстяването са основни рискови фактори за развитието на предиабет, ЗД тип 2 и в частност ГЗД [205]. Рискът за развитие на ЗД се определя от процента и разпределението на мастната тъкан във вид на подкожна и висцерална мастна тъкан [141]. Двата вида се различават морфологично. Подкожната мастна тъкан се състои от инсулин-чувствителни адипоцити, които имат слаба липолитична активност и висок капацитет за поглъщане на свободни мастни киселини и триглицериди от циркулацията, като по този начин предотвратяват отлагането им в други тъкани и осъществяването на липотоксичен ефект. Висцералната мастна тъкан се състои от големи, инсулин-резистентни адипоцити, които имат висока метаболитна и липолитична активност, генерирайки свободни мастни киселини [141]. Повишената концентрация на свободни мастни киселини от своя страна допринася за двата основни патогенетични механизма при ЗД – индуцира ИР на ниво мускули и черен дроб и потиска инсулиновата секреция на ниво  $\beta$ -клетка [23]. Освен по този механизъм, мастната тъкан се разглежда и като ендокринен орган с висока активност, продуциращ редица молекули-адипоцитокени, които участват в липидния и въглехидратен метаболизъм [249].

Сравнително добре е проучена ролята на наднорменото телесно тегло и затлъстяването по време на бременност. Данни от проучване сред 6674 бременни жени установява по-висока честота на прееклампсия, гестационна хипертония, ГЗД и нужда от индукция на раждането при жени със затлъстяване. Процентът на настъпилите отклонения корелира със степента на затлъстяване [83]. Висок е процентът и на приложеното Цезарово сечение като метод на родоразрешение, като той е най-висок при жените с трета степен на затлъстяване. При жените със затлъстяване се наблюдава и по-висок процент на преждевременно раждане, мъртво раждане или нужда от интензивни грижи за новороденото [71]. Освен изходното тегло на жената, важен рисков фактор се явява и теглото, придобито по време на самата бременност. Данните от скоро проведени проучвания показват, че придобитото гестационно тегло е независим рисков фактор за общата мастна тъкан и нейното разпределение в организма на новороденото [71]. Метаанализ на проучвания с общ брой над 470 000 изследвани жени сочи, че хранителния режим е най-ефективния метод за редукция на телесното тегло по време на бременност и

води до намаляване на риска от гестационна хипертония, прееклампсия и раменна дистокия [304]. Резултатите от същия метаанализ показват, че няма неблагоприятни последици за плода или майката при спазването на хранителен режим.

## **2. Артериално налягане**

За да се подчертае ролята на ЗД като водещ рисков фактор за развитие на ССЗ, ADA, Националният институт за здраве и Американската сърдечна асоциация публикуват през 1999 година становище, според което ССЗ отчасти са резултат от ефектите на персистиращата хипергликемия и други метаболитни фактори [110]. Установено е, че веднъж установена хипертония при пациент с въглехидратни нарушения, неговата дългосрочната прогноза е неблагоприятна. Подобно, установяването на гестационна хипертония в голям процент се асоциира с неблагоприятен изход от бременността [308]. За разлика от микросъдовите усложнения, макросъдовата увреда, респективно сърдечно-съдовият риск, започва в ниския диапазон на гликемията, която често се наблюдава при пациентки с ГЗД.

Проследяване на връзката между гликемията и ССЗ в обратен ред – при жените с прееклампсия и гестационна хипертония по-често се установява ИР, независимо от степента на затлъстяване или наличието на глюкозен интолеранс. При проведено ретроспективно проучване сред 1 010 068 бременни с високо САН, се установява 2 пъти по-висок риск за развитие на ЗД след бременността, независимо дали жената е имала или не ГЗД. Наличието на ГЗД също само по себе си води до значимо покачване на този риск [91]. При проучване сред 309 бременни жени, 627 с ГЗД и 1245 нормално протичащи бременности, Niu и колектив установяват, че при някои жени с ПЕ и ГЗД има натрупване на множество метаболитни нарушения, включващи наднормено телесно тегло/затлъстяване, хипергликемия, високо артериално налягане [217].

По-високото систолно и диастолно артериално налягане в началото на бременността водят съответно до 2,7 и 1.7кратно увеличаване на риска от развитие на ПЕ и ГЗД [278]. Диастолното артериално налягане над 100 mmHg преди 20 г.с. е с най-висока предиктивна стойност за развитие на присадена ПЕ. Средно артериално налягане над 90

mmHg при регистриране на бременността се свързва със значително по-висока честота на тежка ПЕ. Според Duckitt и колектив тази стойност е по-ниска – 80 mmHg. В голям метаанализ на общо 60599 бременни жени, включени в 34 клинични проучвания, Spossen установява, че САН през първия и втория триместър е по-добър предиктор за развитие на ГЗД и ПЕ в сравнение със систолното и диастолното налягане поотделно или тяхното покачване в хода на бременността [57]. Средно артериално налягане  $\geq 90$  mmHg през втория триместър се свързва с 3.5 пъти по-висок от ПЕ. При високо-рискските пациентки артериалното налягане  $\geq 75$  mmHg между 13 и 20 г.с. е най-добрия прогностичен фактор за риска от развитие на ГЗД.

По време на бременност, хипертензивните състояния са едни от най-често наблюдаваните усложнения и заедно с хеморагиите и инфекциите, участват във формирането на „смъртоносна триада“. Седемдесет процента от хипертензивните усложнения на бременността се класифицират като ПЕ. В зависимост от използваните критерии и здравната помощ в различните страни, ПЕ се наблюдава в над 15% (средно 3-10 за развитите страни) от бременните, което я прави едно от най-честите усложнения и водеща причина за майчина и перинатална болестност и смъртност [308]. Установена е по-висока честота на преекламписия сред бременни жени с ГЗД. От друга страна, жените имали преекламписия по време на бременност имат по-висок относителен риск за развитие на ЗД тип 2 в бъдеще [308]. В САЩ еклампсията засяга годишно около 0.05% от бременните. От тях 70% са първескини и 30% са мултипара. Между 15 и 25% от ПЕ е присадена. Хипертензивните усложнения на бременността са причина за над 40% от предтерминните раждания и над 15% от перинаталната детска смъртност.

### **3. Серумни липиди и липопротеини**

Значими дислипидемични промени се наблюдават дори и в хода на нормално протичаща бременност [166]. Въпреки физиологично настъпващите промени, нарушенията в липидната обмяна се свързват с повишен кардио-васкуларен риск по време на самата бременност и след нейното приключване. Нарушенията в липидната обмяна се обозначават, подобно на „гестационен диабет“, като гестационна

дислипидемия [166]. Стойностите на липидните показатели обикновено се нормализират около или скоро след раждането. Налице е връзка между ГЗД и гестационната дислипидемия, но не всички жени, които имат ГЗД имат дислипидемия и обратното [128]. Гестационната дислипидемия е дозакан рисков фактор за развитието на дислипидемия на по-късен етап от живота и по-ранното развитие на ССЗ [128]. Освен това, нивата на триглицеридите могат да достигнат стойности много по-високи от тези, наблюдавани често при пациенти със ЗД тип 2, което значимо покачва риска от развитие на панкреатит [128].

Холестеролът се усвоява от плацентарния трофобласт под формата на липопротеини чрез рецептор-медиран, както и рецептор-независим транспорт, като този път е зависим от концентрацията на холестерол от двете страни на плацентата. През първата половина на бременността, феталната плазмена холестеролова концентрация корелира с майчините нива, но тази асоциация намалява през последния триместър на бременността като феталните нива на холестерол се нормализират. Проучване сред 2500 бременности показва, че високите нива на липидните показатели (освен HDL-холестерола) са независим фактор за развитие на макрозомия [56].

#### **4. Високо специфичен С-реактивен протеин (hsCRP)**

С-реактивният протеин е острофазов белтък, който се приема за универсален и неспецифичен маркер за възпаление. Произвежда се главно от хепатоцитите под влияние на цитокини, от които основно значение има IL-6. Нискостепенният възпалителен процес може да бъде оценен посредством чувствителен анализ на CRP-hsCRP (hypersensitive CRP (<3mg/l) [186]. Данните от големи проспективни проучвания като Women's Health Study доказват предиктивната стойност на hsCRP за бъдещето развитие на ЗД. Резултатите от това проучване показват, че hsCRP се явява силен предиктор за бъдещето развитие на ЗД независимо от традиционните рискови фактори като LDL-холестерол [248]. Асоциира се и със състояния на метаболитни отклонения като ИР, предиабет и ЗД тип 2 [241]. Свързва се и с развитието на абдоминалното затлъстяване.

През първият триместър от бременността нивата на CRP са повишени и някои автори ги свързват с повишен риск от развитието на ГЗД [305]. Такава асоциация е установена и през по-късните етапи от бременността [305]. С-реактивният протеин се установява и в случаи на затлъстяване през бременността, в случаите на ИР и майчина дислипидемия [246].

Патофизиологичната роля на инфламаторните протеини изглежда, че е свързана с постепенно настъпващото нарушение в  $\beta$ -клетъната функция и нарастващата ИР, което води до неефективна регулация на плазмената глюкоза и последваща дисгликемия месеци и дори години след приключването на бременността. Има данни, че жените с анамнеза за ГЗД имат повишени нива на CRP, които манифестират хроничното субклинично възпаление [333]. Повишени нива на CRP са установени и при жени с метаболитен синдром, имащи анамнеза за ГЗД [333].

Постпарталният период при жени с ГЗД се характеризира с хронично субклинично възпаление. Някои автори установяват значимо по-високи нива на CRP при жени с ГЗД спрямо контроли 3 месеца след приключване на бременността [333]. Други автори установяват негативна корелация между нивата на адипонектин и CRP, като тази връзка изчезва след уеднаквяване на групите според процента на мастната тъкан. Тези резултати изследователи свързат с връзката на CRP с абдоминалното затлъстяване [95]. Резултатите от проучването NHANES III също показват, че след уеднаквяването на групите според коремната обиколка е намаляла значимостта между групите с анамнеза за ГЗД и контролната група [157].

В проучване сред 46 жени, с анамнеза за ГЗД, при 3 от жените след приключването на бременността, се установяват значимо по-високи нива на hsCRP спрямо контролна група жени [13]. Heitritter и колектив в своето проучване сред 25 жени, 4 години след приключването на бременност, протекла с ГЗД, също установяват такава значимост. Разликите са се запазили дори и след уеднаквяването на групите според ИТМ. С-реактивният протеин е бил право пропорционален на нивото на IL-6 и обратно пропорционален на нивото на адипонектин, като и тази връзка се е запазила след уеднаквяването според ИТМ [125]. Ferraz и колектив изследват 70 жени 6 години след

приключване на бременност, протекла с ГЗД спрямо контролна група и също установяват подобна значимост. Те установяват значимо по-високо ниво на висцерална мастна тъкан и данни за предиабет сред групата с ГЗД [95].

## **5. Гликиран хемоглобин (HbA1c)**

Гликираният хемоглобин се формира при неензимно свързване на глюкозата с N-терминалния валин на  $\beta$ -веригата на хемоглобина като по този начин става отражение на глюкозната концентрация за предходните 8-12 седмици [258]. Той е утвърден в клиничната практика показател, представляващ „златен стандарт“ за оценка на гликемичния контрол при лица със ЗД [117]. В последните няколко години се направи преоценка на ролята на HbA1c в клиничната практика и възможността за неговото използване за диагнозата на ЗД и до известна степен за идентифициране на лицата с повишен риск от развитие на заболяването. Според препоръките на WHO от 2006г HbA1c не следва да се използва за диагноза на ЗД, главно поради проблеми, свързани със стандартизирането на методиката в различните части на света, както и с относително високата цена на изследването и повлияването на показателя от някои заболявания като хемоглобинопатии и състояния, свързани с повишен turn-over на еритроцитите /напр. бременност/ [245]. През 2008г бе свикан международен експертен комитет, включващ представители на ADA, Международната диабетна федерация и EASD, които през 2009г излезат с препоръки относно ролята на HbA1c в диагнозата на ЗД. Съгласно препоръките на комитета, HbA1c  $\geq 6,5\%$  е диагностичен критерий за поставяне на диагноза ЗД. Изследването на HbA1c трябва да е проведено с лабораторен метод, който е сертифициран от Националната програма за стандартизиране на гликиран хемоглобин – NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program). Тестът трябва да бъде повторен с изключение на случаите, когато са налице симптоми на хипергликемия или случайна кръвна захар  $\geq 11,1$ ммол/л [108]. На базата на този доклад ADA в стардартите за медицински грижи при ЗД от 2010г въвежда HbA1c като диагностичен критерий за ЗД, като диагнозата се поставя при стойности на показателя  $\geq 6,5\%$  [285]. В началото на 2011г WHO публикува доклад, относно използването на HbA1c като диагностичен критерий за

ЗД, който представлява допълнение на препоръките от 2006г. Съгласно този доклад HbA1c се въвежда като средство за диагноза на ЗД при прагова стойност 6,5%, като се посочва, че под тази стойност не се изключва наличието на ЗД, диагностициран на базата на измерването на кръвната захар [229]. Нараства и неговото приложение при оценка на предиабетните състояния (HbA1c 5.7-6.4%)[218] като за българската популация Танкова и колектив определят стойност на HbA1c 5.5% (оптимална чувствително и специфичност), а за поставяне на диагноза на ЗД 6.1% [343]. До момента не е възприета стойност на HbA1c за поставяне на диагноза ГЗД.

По време на бременност, Peterson през 1977г за първи път описва гликиране на протеини, които са с по-кратък полуживот спрямо хемоглобина и които биха могли да бъдат маркер за гликемичен контрол [235]. Той установява, че албуминът е протеин, който претърпява в най-голяма степен гликиране, като под терминът фруктозамин се възприема гликоалбимуна и тоталния/ общ гликиран протеин.

Фруктозаминът и гликирания хемоглобин се използват за оценка на гликемичния контрол. Тъй като полуживотът на гликирания хемоглобин е 6-8 седмици, то той ще даде отражение на гликемичния контрол за по-дълъг период от време, спрямо фруктозамина, чийто полуживот е само 2-3 седмици. Заради краткия полуживот на фруктозамина, той ще бъде с по-голяма чувствителност по отношение на бързо настъпващите промени в хода на бременността. Въпреки високата му чувствителност, фруктозаминът не се налага като диагностичен показател за ГЗД. Agarwal и колектив, при изследване на 849 бременни жени, установяват висока чувствителност, но ниска специфичност, което налага провеждане на ОГТТ при всеки 4 от 5 жени, които са потенциални за развитие на ГЗД [9].

По време на бременност, HbA1c все още не е приет като показател за диагностициране на ГЗД. Знае се, че нивото му е намалено, което е резултат от фетоплацентарната глюкозна утилизация, скъсения полуживот на еритроцитите и при повечето бременности с диабет – подобрен гликемичен контрол [187, 209]. Въпреки това, някои проучвания сред бременни със и без ЗД установяват покачване в нивото на HbA1c от началото на втория и третия триместър [120, 187].

O'Shea и колектив определят триместър специфични нива на HbA1c на базата на изследване на 311 жени, от които 246 бременни без ЗД и 65 небременни контроли [220]. Те ги разделят на три групи, според гестационната възраст - I, II и III триместър. Те определят референтните стойности на HbA1c за здравите контроли 4,8-5,5%, I триместър 4,3-5,4%, II триместър 4,4-5,4% и III триместър 4,7-5,7%. Според тях нивата на HbA1c са били значимо по-ниски спрямо контролната група. Провеждайки ретроспективен анализ, те установяват, че при 46% от пациентите, които са диагностицирани с ГЗД според критериите на IADPSG (използвана кохорта от проучването HAPO), е било достатъчно изследването на HbA1c (DCCT  $\geq$  5.4%). Поради тази причина, авторите препоръчват рутинното въвеждане на изследване на HbA1c през II триместър от бременността като диагностичен маркер за ГЗД. С въвеждането му в клиничната практика ще намалее броя на провежданите ОГТТ [220].

Един от главните недостатъци на HbA1c е, че се наблюдават бифазни промени в нивото му по време на бременност, както и най-ниско ниво, установено през 24 гестационна седмица [239]. От друга страна, за разлика от албумина, нивото на HbA1c се покачва при наличието на желязо-дефицитна анемия, каквато често се наблюдава по време на бременност, независимо от нивото на кръвната захар [120].

При жените, които имат ГЗД и при тези, които имат повишен риск за развитието на такъв, HbA1c може да бъде показател за неблагоприятен изход от бременността и/или постпартално развитие на ЗД. Въпреки всички данни, няма до момента изградени препоръки за използването на HbA1c в диагностичния подход при ГЗД.

#### **IV. НЕТРАДИЦИОННИ МАРКЕРИ ПРИ ГЗД**

##### **1. Адипоцитокени**

Редица проучвания доказват ролята на мастната тъкан в патогенезата на ИР при бременни и небременни жени. В тази връзка, адипоцитокенините, които се секретират от мастната тъкан се проучват като участници в регулацията на майчиния метаболизъм и гестационната ИР. Поради тази причина, изследователи се насочват към търсене на

потенциални медиатори на ИР, включващи хормони, секретирани от мастната тъкан, наречени адипоцитокени [89, 251]. Механизмите на секреция на адипоцитокени при нормална и усложнена бременност не са напълно изяснени, а наличните такива са противоречиви. По време на бременност, някои от адипоцитокени (лептин, адипонектин, TNF- $\alpha$ , интерлевкин 6, както и някои новооткрити като резистин, висфатин и апелин) се секретират и от плацентата [52, 53, 58, 155, 190, 336]. Освен че адипоцитокени регулират майчиния енергиен метаболизъм и инсулиновата чувствителност при нормално протичаща бременност, те са замесени и в патогенезата на някои от нейните усложнения – ГЗД, прееклампсия и интраутеринна ретардация на плода [20, 122, 176].

В България до момента са провеждани изследвания относно нивото на адипонектина и неговото действие при жени с андроидно затлъстяване [2, 3]. Провеждано е и сравнително изследване между пациенти с първичен алдостеронизъм и пациенти с есенциална хипертония по отношение на адипонектина и допълнителни показатели за ИР, като авторите не установяват значими разлики между двете групи [1]. Липсват публикувани данни за изследването на адипоцитокени сред жени с ГЗД.

### 1.1. Адипонектин

Адипонектинът е адипозо-тъканно специфичен протеин, който се секретира във високи концентрации от мастната тъкан и плацентата и има противовъзпалително, антиатерогенно и инсулин очувствяващо действие [330]. За разлика от другите адипоцитокени, циркулиращите адипонектинови нива намаляват при състояние на ИР като ЗД тип 2, затлъстяване и коронарни заболявания [38]. Адипонектиновите рецептори се експресират в големи количества в плацентата, докато адипонектиновата експресия от плацентата подлежи на обсъждане [53]. Установена е корелация между адипонектиновата и лептиновата генна експресия, отразяваща се на действието на двата адипоцитокени в плацентарната тъкан [294].

При някои проучвания се установяват адипонектинови нива обратно пропорционални на ИТМ, докато други не успяват да докажат тази връзка. При

експериментални модели с хора и животни се намират намалени или непроменени нива при нормално протичаща бременност. Намалените адипонектинови нива могат да персistirат с намаляването на инсулиновата чувствителност при нормална бременност. Липсата на промени в нивото на адипонектина през цялата бременност може да има независима протективна роля срещу прогресивно нарастващата ИР.

Не са установени разлики в освобождаването на адипонектин от човешката плацента или майчината мастна тъкан при бременни жени с ГЗД или такива с нормално протичаща бременност. За разлика обаче, ниска адипонектинова генна експресия се наблюдава в плацентата на жени с ГЗД. Редица проучвания показват намалени нива на адипонектин при ГЗД, независимо от ИТМ или инсулиновата чувствителност. В допълнение, намалените майчини адипонектинови концентрации могат да увеличат риска от нарастване на плода при пациентки с ГЗД. На базата на тези данни, някои автори обсъждат физиологичното значение на съпътстващите високи концентрации на TNF- $\alpha$  и IL-6 при ГЗД, които биха могли да потискат продукцията на адипонектин. Според резултатите на Williams и сътрудници, нивото на адипонектина би могло да предсказва ГЗД няколко месеца преди неговата изява, независимо от ИТМ [331]. Убедителните данни, че ГЗД представлява състояние на „предиабет“ сочат, че хипоадипонектинемията е предиктивен маркер за прогресията на заболяването към ЗД тип 2 [247].

## 1.2. Лептин

Лептинът е протеин, продукт на *ob* гена, който се синтезира предимно от бялата мастна тъкан [324]. Той е важен метаболитен хормон, въздействащ върху инсулиновата секреция, глюкозната утилизация, гликогеновата синтеза и метаболизма на мастните киселини [324]. В резултат на неговото действие се намалява приема на храна и се увеличава енергийния разход [324]. Лептиновата експресия и действие се променят при метаболитни нарушения, свързани с ИР, каквито са затлъстяването и ЗД тип 2 [342].

При нормално протичаща бременност, концентрациите на лептин нарастват през трети триместър и се връщат до нивата преди бременността около момента на раждането [190, 263, 272]. Има данни, които показват че плацентата, в по-голяма степен от мастната

тъкан, допринася за нарастването на лептиновата концентрация. От една страна, нарастването на лептиновата концентрация предхожда физиологичното нарастване на ИТМ и от друга, лептиновите нива бързо намаляват след раждането [263]. Човешката плацента експресира високи нива на тРНК и протеин на фона на изобилие на лептинови рецептори в плацентата, а също така в хориона и амниона [127, 190]. Приблизително 95% от плацентарния лептин попада в циркулацията, където модулира енергийното изразходване и метаболизъм. Лептиновата иРНК допълнително се регулира и от TNF- $\alpha$  и IL-6 [184]. В допълнение, лептинът регулира плацентарното нарастване, трансфера на хранителни вещества, ангиогенезата и трофобластната инвазия [123, 219]. Едно от потенциалните действия на високите лептинови нива е увеличената мобилизация на майчините мастни запаси, увеличаване на трансплацентарния трансфер на липидни субстрати към фетуса [127, 272]. Високите нива на лептин са свързани и с ИР при здрави бременни жени [65].

Налице са противоречиви данни по отношение на лептиновите нива при бременни жени с ГЗД. Според някои автори те са завишени [20, 156], непроменени [279] или намалени [96, 198], сравнени с бременни жени с нормален глюкозен толеранс. Това противоречие може да бъде резултат от разликите във времето на вземане на кръвните проби (гестационната седмица) [20]. Въпреки това се смята, че ГЗД е свързан с повишена плацентарна лептинова експресия [180, 198]. При сравнение на бременни здрави жени и такива с ГЗД се установява завишена лептинова синтеза и висока продукция на инфламаторни цитокини (TNF- $\alpha$  и IL-6) при тези с ГЗД [198]. По този начин увеличената лептинова експресия при пациентки с ГЗД може да играе протективна роля чрез поддържане на баланса на инфламаторните цитокини [180].

Хетерогенността на патологичните състояния, свързани с промени на плацентарния лептин, определят и специфичността на регулаторните процеси [198]. Инсулинът е главен стимул на лептиновия ген [182]. Увеличените нива на лептиновата иРНК при ЗД тип 2 подсказват за ролята на инсулина като активатор на плацентарния ген [182].

### 1.3. Висфатин

Висфатинът е адипоцитокин също открит в последните години. Експресира се в големи количества в абдоминалната спрямо подкожната мастна тъкан. Смята се, че е отговорен в процеса на адипогенезата и упражнява инсулин-подпомагаща роля [104]. Налице са противоречия относно приноса на абдоминалната мастна тъкан за серумните нива на висфатин, като патофизиологичната му роля остава неизяснена [17]. Редица автори сочат, че нивото на висфатин нараства при затлъстяване и заболявания свързани с ИР като ЗД тип 2 и метаболитен синдром [104]. За разлика, други автори не установяват връзка между нивата на циркулиращия висфатин и инсулиновата чувствителност, ИТМ и висцералната мастна тъкан [31].

Някои автори твърдят, че висфатина би могъл да регулира трансфера на глюкоза от майката към плода [211]. От друга страна, при проучване сравняващо бременни жени в трети триместър и небременни индивиди, не се установяват разлики в серумните нива на висфатин, доказвайки, че плацентата може би не играе роля за нивата на циркулиращия висфатин или значимо нараства, за да компенсира нарастващата ИР [137]. Filippatos и колектив установяват 7-кратно увеличаване на генната експресията на висфатин и самия протеин в оменталната мастна тъкан на бременни жени спрямо контроли. Те установяват само леко увеличаване на серумните нива на висфатина, предполагайки че неговият механизъм на действие е паракринен или автокринен [97]. Така и колектив доказват, че висфатина се освобождава от ЗТЗ L1 адипоцитите по атипичен механизъм, който не изисква везикуларизация [250]. В допълнение, относителните нива на висфатинова иРНК в мастната тъкан нарастват значително в късния период на бременността по модел сходен на лептиновата иРНК. Налице са убедителни данни, според които висфатина и лептина пречат за развитието на ИР, което би могло да обясни тяхното прогресивно нарастване през бременността при жени с ГЗД [104]. Mastorakos и сътрудници, проследявайки 80 бременни жени без затлъстяване и ЗД преди бременността, установяват, че серумната концентрация на висфатин през първия триместър на бременността предсказва степента на инсулинова чувствителност през втория триместър. Тази асоциация изчезва с напредването на бременността, тъй като висфатиновата секреция се увеличава за сметка на плацентата, а не на мастната тъкан [189].

Някои автори установяват ниски нива на висфатин при жени с ГЗД [116], а други демонстрират нарастващи нива с настъпването на нарушение в глюкозния толеранс през третия триместър на бременността [104, 296]. Предполага се, че разликите идват от различния дизайн на проведените проучвания, като броят на участниците, гестационната възраст при включване в пручването, ИТМ, специфичността на използваните китове модифицират получените резултати. Тъй като ГЗД се възприема като временно състояние на ИР, то увеличените нива на висфатин биха могли да противодействат на високите нива на кръвна захар и инсулин [170]. Увеличените майчини нива на висфатин при пациентки с ГЗД по предполагаемия автокринен и паракринен механизъм на регулация могат до доведат до нарушение в механизма на неговото действие в прицелните тъкани, нарушение в собствената му биосинтеза и отговора към хипергликемия [170]. От друга страна, TNF- $\alpha$  води до увеличаване на експресията на висфатин в човешките плацентарни клетки [225]. Хроничното възпаление, асоциирано с увеличени концентрации на TNF- $\alpha$ , се установява при пациентки с ГЗД [332]. Предполага се, че плацентата е съответно източника на увеличени концентрации на висфатин. Въпреки това, не са установени разлики в експресията на иРНК между мастната тъкан и плацентата при жени с ГЗД и контролна група по време на раждане [303].

Висфатинът подобрява глюкозния толеранс чрез своите инсулин миметични ефекти, като увеличената му плазмена концентрация при усложнения на бременността, свързани с ИР, най-вероятно са в резултат на физиологичен компенсаторен механизъм, водещ до подобряване на инсулиновото предаване.

#### 1.4. Апелин

Апелинът е сравнително скоро открит пептид, който представлява ендогенен лиганд на G-протеин свързания рецептор APJ [300]. Той оказва своето действие в централната нервна система и други периферни тъкани, където участва в регулацията на имунния отговор, мозъчното предаване, хемодинамичната хомеостаза, вазодилатацията, ангиогенезата, глюкозния метаболизъм, свързаната с оксидативен стрес атеросклероза, физиологията на гастро-интестиналния тракт и водно-електролитната хомеостаза. В някои

случай би могъл да действа и като диуретичен пептид [121]. Апелинът и неговия рецептор са установени и в мастната тъкан, където се произвежда, за разлика от другите адипоцитокени, както в бялата, така и в кафявата мастна тъкан. Инсулинът и TNF- $\alpha$  осъществяват директен контрол върху апелиновата генна експресия в адипоцитокенините [69]. Следователно, секрецията му от адипоцитокенините зависи от хранителния режим, като неговата експресия е намалена в състояние на гладуване и се възстановява след прием на храна, контролирайки по този начин енергийната хомеостаза [98]. Затова и серумните апелинови нива са променени в случаите на затлъстяване и хиперинсулинемия. Апелинът има и отношение към процесите на ангиогенеза като се смята, че би могъл да стимулира и нарастването на кръвоносните съдове, водещи до нарастване на растежа на мастната тъкан [121]. Свръхпродукцията на апелин при затлъстяване се смята за адаптационен механизъм, който пречи на развитието на асоциираните със затлъстяване нарушения (умереното хронично възпаление, хипертонията и кардиоваскуларната дисфункция) [173]. Проучвания при мишки доказват, че апелинът би могъл да стимулира глюкозната утилизация [78]. Настоящият фокус на проучвания пада върху потенциалната връзка на апелина с наднорменото телесно тегло/затлъстяване и асоциираната ИР [169].

Проучвания върху ембриони установяват, че апелина е ангиогенен фактор, необходим за нормалното образуване на кръвоносните съдове и ендотелна клетъчна пролиферация [169]. Наличието му е установено също и в човешката плацентарна тъкан, доказващо неговата роля и по време на бременност [58]. Tanaka и колектив установяват увеличена апелинова иРНК експресия в мастната тъкан само в начална бременност и липсата на увеличение с напредване на бременността. Те заключават, че увеличената апелиновата експресия не е свързана с настъпващата хиперинсулинемия, макар хиперинсулинемията да е свързана с покачването на телесното тегло [152]. Причината за нарастването на инсулиновата експресия в мастната тъкан през ранната бременност не е установена, но може да се обсъжда акумулирането на повече мастна тъкан в ранните седмици от бременността [152].

Малко са проучванията до момента, чиято цел е уточняване на механизмите на действие на апелина по време на бременност. Както и повечето адипоцитокени, противоречиви са резултатите и за апелина. Някои автори установяват понижени нива [169], докато други установяват повишени [18].

#### 1.5. Резистин

Резистинът е скоро открит адипозо-специфичен секретиращ се хормон, който принадлежи към фамиията на богатите на цистеин, с-терминални протеини [161]. Експресира се в големи количества в моноцитите и макрофагите и в по-малки в адипоцитите [289]. Резистинът е мощен регулатор на глюкозната хомеостаза и се смята, че противодейства на инсулиновото действие в периферните тъкани [290]. Установени са повишени нива на резистин при хора със затлъстяване [290] и 3Д тип 2 [79], макар че има и проучвания, при които не се установява такава връзка [90]. По време на бременност, резистина се експресира и секретира от плацентата, като се смята, че нивата му нарастват през третия триместър от бременността [63]. Тези промени са паралелни на установената резистинова генна експресия в плацентата като се обсъжда потенциалната му роля в патогенезата на ИР през втората половина на бременността и развитието на ГЗД [337]. *In vitro* проучвания върху човешка плацента установяват бифазно действие на инсулина спрямо освобождаването на резистин [176]. При ниски концентрации, инсулинът значимо стимулира освобождаването на резистин, докато при високи се връща към базалните нива [176]. Това бифазно действие на инсулина може да обясни установените ниски нива на резистин при ГЗД от някои автори [176]. Въпреки това са противоречиви данните относно ролята на резистина по време на ГЗД.

Някои автори установяват по-ниски нива на резистин при жени с ГЗД спрямо контролна група бременни и допълнително намаляване на нивото след раждане [201], докато други установяват повишени нива при жени с ГЗД [51]. Нивото на резистин е било значимо по-високо 18 месеца след раждане при жени с нормален или нарушен глюкозен толеранс, които са имали ГЗД по време на бременността спрямо жени, които не са имали въглехидратни нарушения по време на бременността [55]. Тези резултати авторите също

обясняват с бифазния ефект на инсулина върху освобождаването на резистин, като ниските концентрации на инсулин водят до освобождаване на резистин, докато този процес е потиснат при високи инсулинови нива [176]. Авторите също установяват, че нивото на резистина корелират с ИТМ, количеството на мастната тъкан и плазмения инсулин. От друга страна, развитието на метаболитен синдром не е корелират с нивото на резистин в постпарталния период.

#### 1.6. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) и интерлевкин-6 (IL-6)

Tumor necrosis factor- $\alpha$  и интерлевкин-6 са инфламаторни медиатори, които се произвеждат не само от моноцитите и макрофагите в мастната тъкан, но също така и от Т-клетките, неутрофили, фибробласти. Тези цитокини са увеличени при затлъстяване и имат редица ефекти върху инсулиновата чувствителност в скелетните мускули, черния дроб и  $\beta$ -клетките на панкреаса, немуниемо водещи до ИР. При затлъстелите животни и хора се установява позитивна връзка между нивата на TNF- $\alpha$  и ИТМ и хиперинсулинемията [136]. Вкарването на TNF- $\alpha$  води до нарастване на ИР при мишки и клетъчни култури на човешки скелетни мускули [102]. Въпреки че концентрацията на TNF- $\alpha$  в плазмата на пациенти със затлъстяване е много по-ниска спрямо концентрацията, установена при пациенти с кахексия, данните сочат, че TNF- $\alpha$  действа по паракринен механизъм, за да доведе до ИР [224].

По време на бременност, в плацентата също се произвежда TNF- $\alpha$  и IL-6 като се смята, че хроничния възпалителен процес в мастната тъкан може да допринесе до индуцираната от бременността ИР [163]. Най-голяма продукция на TNF се установява през късните етапи на бременността и бързо намалява след раждането, подкрепяйки хипотезата за плацентарната продукция [52]. През ранната бременност TNF- $\alpha$  и РНК се установява предимно в синцитиотрофобластта. С напредването на бременността и по-специално около раждането, TNF- $\alpha$  и РНК се установява във вилоните стромални клетки, а TNF- $\alpha$  транскрипти са налице в майчините клетки на децидуата [163]. По-голямата част от плацентарния TNF- $\alpha$  отива в майчината циркулация, докато само една малка част отива към фетуса [163].

Смята се, че при бременност, протичаща с ГЗД, серумните нива на TNF- $\alpha$  и IL-6 рядко се увеличават [105]. Когато настъпи подобно увеличение, то най-вероятно е в резултат на оксидативен стрес или възпаление, свързано с хипергликемия [291]. Обратно, TNF- $\alpha$  вероятно потиска инсулиновата секреция и регулираното от инсулин глюкозно усвояване [198, 332].

Резултатите от ин витро проучване сочат, че плацентата на жени с ГЗД произвежда по-големи количества TNF- $\alpha$  в отговор на глюкозен стимул спрямо плацентата на жени с нормален глюкозен толеранс [64].

Нивата на IL-6 са значимо по-високи при жени с анамнеза за ГЗД една година след приключване на бременност спрямо контролна група [42]. Тези разлики стават незначими след уеднаквяване на групите според ИТМ. Интересното е обаче, че когато жени с анамнеза за ГЗД и нормално телесно тегло бъдат сравнени с жени с нормално телесно тегло и без анамнеза за ГЗД, разликите по отношение на IL-6 се запазват. В този случай, IL-6 позитивно е корелирал с CRP.

При жени с анамнеза за ГЗД, 3 месеца след приключването на бременността, нивото на TNF- $\alpha$  е било значимо по-високо спрямо нивото на TNF- $\alpha$  при жени с нормален въглехидратен толеранс по време на бременност [333]. За разлика от TNF- $\alpha$ , нивото на IL-6 е било значимо по-високо преди уеднаквяване според процента на мастната тъкан и изчезва след това. Haugel-de Mouzon и колектив установяват, че нивото на TNF- $\alpha$  се покачва значимо 6 седмици постпартум при жени с ГЗД и контролна група съпоставени с антепарталните нива [123]. Нарастването на TNF- $\alpha$  е било незначимо за двете групи след 6 месеца след раждането.

В друго проучване, 18 жени с анамнеза за ГЗД поне 12 месеца след раждането, са сравнени с нормални контроли и жени със СПКЯ. Авторите не се установили значимо разлики между жените с анамнеза за ГЗД и контролите, но била налице значима разлика между жените с анамнеза за ГЗД и жените със СПКЯ [305].

## 2. Pregnancy associated plasma protein (PAPP-A)

PAPP-A е един от двата биохимични показателя, използвани в скрининга за Даун между 11-13<sup>+6</sup> г.с. Липсата на експресия на PAPP-A от плацентата на пациентки със синдрома на Cornelia de Lange – състояние, характеризиращо се с интраутеринна ретардация, лицев дисморфизъм, аномалии на крайниците и забавено психическо развитие, става причина за изследването на ролята на PAPP-A в човешкото развитие [326]. Установено е, че ниските серумни нива на субстанцията се асоциират с повишен риск от анеуплоидии и нарушена трофобластна инвазия.

PAPP-A има структура, сходна с тази на човешкия плацентарен лактоген и човешкия хорионгонадотропин и е специфичен за бременността. Концентрацията му нараства с напредване на бременността и увеличаване на плацентарния обем. PAPP-A се произвежда от плацентарния синцитиотрофобласт и играе ролята на протеаза за свързващия протеин 4 на инсиноподобния растежен фактор (IGFBP-4) [40]. Вероятно нарушената трофобластна инвазия е причина за намалена синтеза на PAPP-A от плацентата. Поради това, ниските нива на PAPP-A се асоциират с по-високи нива на IGFBP-4 и по-ниски нива на IGF. Това предполага, че бременните с ниски нива на PAPP-A ще имат по-ниски нива на IGF, който от своя страна, играе ключова роля в регулирането на феталния растеж [40].

Ниските нива на PAPP-A през първия триместър при бременни без хромозомни аномалии се асоциират с неблагоприятен перинатален изход, включително ИУРП, спонтанни аборти, ниско тегло при раждане, предтерминно раждане и ПЕ [261]. PAPP-A изглежда че участва във въглехидратния метаболизъм по време на бременност, като данните от проучвания сочат, че ниските му нива през първия триместър на бременността се свързват с развитието на ГЗД и лоша прогноза за изхода на бременността (неонатална хипогликемия, ниско тегло на новороденото, по-тежка жълтеница и нисък Апгар score [185]. Механизмът на участие на PAPP-A в патогенезата на ГЗД не е напълно изяснен. Смята се, че PAPP-A действа индиректно като намаленото ниво на IGF води до развитието на хиперинсулинемия, нарушения във въглехидратната обмяна и е съответно обратна корелация със степента на инсулинова резистентност [185].

## V. ГЕНЕТИЧНИ МАРКЕРИ

Идентифицирането на причините за развитието на ГЗД ще ни помогне за разкриването на молекулните механизми на това заболяване. Данните от редица проучвания сочат, че в основата на ГЗД стои генетична предразположеност. Въпреки че не са провеждани проучвания върху наследствеността при ГЗД, са налице данни, сочещи по-висока честота на ГЗД сред пациентки с фамилна обремененост от ЗД тип 2 [218]. Генетични проучвания сред пациенти със ЗД тип 2 сочат, че това е едно мултигенетично заболяване, при което множество гени взаимодействат с факторите на околната среда и водят до развитието на заболяването [212]. Гестационният захарен диабет и ЗД тип 2 споделят сходни патофизиологични механизми, включващи  $\beta$ -клетъчна дисфункция и инсулинова резистентност [316]. Поради наличието на тази поразителната връзка се смята, че и в основата на ГЗД стои мултигенетично обусловено заболяване. Във фокуса на настоящите проучвания се поставя за цел установяването на ролята на гените и генните полиморфизми, които водят до развитието на ГЗД. Генетична предиспозиция за развитие на ГЗД до момента е установена за вариантите на гени, участващи в развитието на инсулиновата резистентност и инсулиновата секреция [275]. Въпреки тези данни, не всички изследователски групи установяват повторемост на резултатите. Това може да е във връзка с малката изследвана група или етническата хетерогенност.

Сред гените, които са предразполагащи и кандидат гени при ГЗД спадат KCNJ11, IRS-1, TCF7L2, PPAR $\gamma$ , CAPN10, INSR, IGF2, FTO и MBL2 [111]. По настоящен връзката между познатите варианти на генен полиморфизъм при тези кандидат гени са обект на задълбочени проучвания.

Друг тип пациентки, които развиват ГЗД са предимно жени с недиагностициран ЗД тип 1 [275]. Често тези жени страдат от лека форма на maturity onset diabetes of the young, който не е бил диагностициран по-рано (например пациентките с мутация в глюкокиназния ген [59]). Идентифицирани са 5 гена, нарушенията в които причиняват различните типове MODY. Освен MODY 2, всички останали форми се причиняват от дефект в транскрипционните фактори [86]. Тези гени са потенциални кандидати за развитието на

ГЗД, поради сходните характеристики между двете заболявания относно нарушението в  $\beta$ -клетъчната функция, показваща възможността за обща етиология.

Гените и генни полиморфизми, при които се установява връзка с ГЗД за следните:

#### 1. KCNJ11

KCNJ11 кодира представител на калий усвояващите АТФ-чувствителни канали, подфамилия J, член 11. Протеинът е част от комплекса, формиращ порите, които контролират инсулиновата секреция чрез свързване на глюкозния метаболизъм с мембранный потенциал на  $\beta$ -клетките. Има данни, които сочат че полиморфизъм в KCNJ11гена E23K ин витро води до умерено свръх активиране на протеина с последващо намаляване на чувствителността към АТФ. Това води до намаляване на инсулиновото освобождаване [188]. Ин виво този вариант се асоциира с намаляване на инсулиновата секреция в глюкозо-толерантни индивиди. В проучване на Shaat и колектив, включващо 588 жени с ГЗД и 1189 здрави бременни жени от Скандинавските държави се установява, че K алела има асоциация с развитието на ГЗД [275]. Тази асоциация е по-силна при жени с ГЗД, които имат позитивни GAD-65 и/или IA-2 антитела и/или относително по-ниска базална C-пептидна секреция.

#### 2. Transcriptional factor-like 2 (TCF7L2)

TCF7L2 кодира транскрипционен фактор, наречен T-клетъчен фактор 7 подобен 2. Механизмът на неговото действие не е напълно изяснен. Смята се, че участва в контрола на инсулиновата генна експресия и на инсулиновата секреция в панкреасната  $\beta$ -клетка, като междувременно регулира  $\beta$ -клетъчното оцеляване и функцията [188]. Генът се експресира в  $\beta$ -клетките и адипоцитите като играе роля в глюкозната хомеостаза [70]. TCF7L2 се установява и в интестиналните L-клетки и има отношение към глюкагоновия ген, регулирайки по този начин и синтезата на GLP-1 и инсулиновата секреция [70]. За доказателство, проучванията показват, че полиморфизъм в TCF7L2 гена е свързан с нарушения в GLP-1 индуцираната инсулинова секреция.[267] Полиморфизмът на TCF7L2, rs7903146 - C>T субституция в IVS3 се асоциира със ЗД тип 2 при жени от Дания, Исландия,

Полша и Америка. Saxena и колектив установяват, че хетерозиготите и хомозитите, носещи T алела имат 1,40 и съответно 1,86 относителен риск за развитието на ЗД спрямо тези, при които липсва T алел [265]. Проучване сред 649 жени с ГЗД и 1232 здрави контроли от Скандинавските държави установява, че наличието на T Алела при TCF7L2 rs7903146 полиморфизъм се асоциира с 1,49 относителен риск за развитие на ГЗД. Хетерозиготните и хомозиготните носителки на T алела имат 1,6 и 2,08 относителен риск за развитие на ГЗД спрямо здравите контроли с генотип CC [82]. Друго проучване, включващо 94 Мексикано-Амеикански жени с ГЗД и техните роднини, установява 2,49 релативен риск при полиморфизъм в TCF7L2 rs12255372 [323].

### 3. Insulin receptor substrate 1 (IRS-1)

Инсулиновия рецепторен субстрат-1 (IRS-1) е ключов участник в инсулиновата каскада. Той е доставящ протеин, който се фосфорилира от протеин-киназа 3 по време на свързването на инсулина с неговия рецептор и има важна роля в глюкозната хомеостаза. Полиморфизмът в IRS-1 се асоциира със ЗД тип 2 в няколко големи проучвания [275]. Един от тези варианти, G97R, е два пъти по-често срещан при пациенти с ИР и дислипидемия спрямо контролна група. Jellema и колектив установяват, че носителите на R алела имат 25% по-висок риск за развитие на ЗД тип 2 като при тези индивиди обикновено заболяването се развива в млада възраст и има по-тежко протичане. Ин витро експерименти показват, че при 972R варианта се наблюдава нарастване на глюкозната и сулфанилурейната инсулинова секреция, сравнени с див тип клетки [147]. Въпреки че този ефект не е напълно изяснен, се предполага, че той зависи от инхибицията на протеин-киназа 3, свързваща се с IRS-1, оказваща въздействие върху сигналната каскада. Няколко големи проучвания се фокусират върху ролята на G972R полиморфизма относно предразположеността за развитие на ГЗД. Ток и колектив генотипизират 62 жени с ГЗД и 1232 здрави контроли [306]. Shaat и колектив установяват, че въпреки статистически значимите разлики в честотата на R алела в двете групи, RR генотипа се среща значимо по-често при жени с ГЗД (0.7% спрямо 0%) [275].

#### 4. Mannose-binding lectin (MBL-2)

MBL-2 кодира свързващия лектин-2, остро фазов белтък, синтезиран главно в черния дроб, ключова молекула във вродения имунитет. Експресията на MBL е генетично обусловена и дефицита на този протеин води до по-голяма предразположеност към рекурентни инфекции и автоимунни заболявания. Няколко полиморфизма, включващи R52C и G54D в MBL2 гена се асоциират с намаляване на нивата на експресия на протеина. Полиморфизмът G54D, както и нивата на MBL са изследвани подробно сред испанска популация от жени с ГЗД. Полиморфизмът G54D се асоциира с двукратно нарастване риска за развитие на ГЗД. В допълнение, жени с ГЗД, носителки на G54D варианта, имат по-често високи гликемични нива, нуждаещи инсулиново лечение [200]. Механизмът, по който се развива ГЗД при тези носителки не е напълно изяснен. Въпреки това, ролята на MBL във възпалителния процес внася светлина относно механизма на хроничното възпаление като фактор за развитието на ГЗД.

#### 5. Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ )

PPAR- $\gamma$  е транскрипционен фактор, който регулира адипоцитната диференциация, липидния и глюкозен метаболизъм и повишената чувствителност към инсулин. Мутации в PPAR- $\gamma$  гена са описани като свързани със затлъстяване и ЗД. Алела Ala на Pro12Ala полиморфизма се свързва с намален риск за развитие на ЗД тип 2.[30] При проучване върху полиморфизма Pro12Ala и C1431T на PPAR- $\gamma$  гена сред 1708 бременни жени, авторите установяват обратнопропорционална зависимост с риска за развитие на ГЗД. Жените, които имат носителство на Ala-C хаплотипа имат най-нисък риск за развитие на ГЗД, докато носителките на Pro-T имат най-висок риск [129].

#### 6. Генът за адипонектин (ADIPOQ)

Адипонектинът е важен фактор участващ във въглехидратната и липидната обмяна. Произвежда се и се секретира от мастната тъкан, има противовъзпалителен и антиатерогенен ефект, увеличава глюкозното усвояване в мускулните клетки и потиска глюкозната синтез в черния дроб [111]. Полиморфизмът в неговия ген (ADIPOQ) се смята,

че води до предиспозиция към развитието на метаболитен синдром и ЗД тип 2. По време на нормално протичаща бременност нивата на адипонектин прогресивно намаляват, като са значимо по-ниски при пациентки с ГЗД [135]. Това намаление може да бъде обяснено с намалената транскрипционна активност на ADIPOQ ген [44].

Няколко от полиморфизмите в ADIPOQ гена се асоциират със затлъстяване, метаболитен синдром и ЗД тип 2. Сред тях са rs266729 (-11377 C>G), която се намира в промоторния регион, rs2241766 в екзон 2 (+45 T>G; Gly15Gly) и rs1501299 в интрон 2(+276G>T). Тези 3 варианта се намират в 2 адипонектинови LD (linkage disequilibrium) блока [124].

#### 7. Генът за лептин

Лептинът е малък пептид, който се продуцира от адипоцитите и участва в ендокринната регулация, включително затлъстяването, апетита и фертилитета [207]. Установена е секреция на лептин от плацентата, което поставя под въпрос различния механизъм на регулация спрямо регулацията на мастната тъкан [190]. Описан е полиморфизъм в лептиновия ген, който се свързва с екстремно затлъстяване [144]. За разлика от другите установени полиморфизми, G-2548A полиморфизма в 5' региона на лептиновия ген е свързан не само със затлъстяването, но влияе и върху самата лептинова генна експресия в мастната тъкан [133]. Поради тази причина, предполагаме, че може би оказва влияние върху нивото на лептина и по време на бременността.

#### 8. Cyclin-dependent kinase 5 (CDKAL-1)

Генът за CDKAL-1 кодира 65kDa протеин-циклин зависима киназа 5, регулаторна субединица асоциирана с протеин 1. Полиморфизъм в интрон 5 на гена за CDKAL1 е асоцииран с развитието на ЗД тип 2 в изследваната европейска и азиатска популация. Тази асоциация е допълнително изследвана при фенотипи с даъни за -клетъчна дисфункция (нарушена глюкозна секреция, оценена чрез ОГТТ или ВГТТ или кламп методика. Резултатите сочат еднопосочно, че полиморфизмът е свързан с намалена първа фаза на инсулиновата секреция [226]. В допълнение, наличието на полиморфизъм се

свързва и с ниско тегло при раждането, което също е рисков фактор за развитието на ЗД тип 2, най-вече поради намалената инсулинова секреция или инсулинова чувствителност. Заедно тези данни показват ролята на CDKAL-1 в патогенезата на ЗД тип 2. Има данни, че наличието на полиморфизъм в CDKAL-1 води до развитието и на ГЗД [177].

#### 9. Fat mass and obesity associated gene (FTO)

Полиморфизъм във FTO гена се свързва с регулацията на мастната тъкан при човека. Експресира се в хипоталамуса, хипофизата и надбъбречните жлези като се обсъжда неговата потенциална роля в регулацията на телесното тегло. В популационни проучвания, хомозиготните носители на rs9939609 вариант са с повишено телесно тегло и мастна тъкан още преди настъпването на пубертета. Установена е асоциацията между наличието на FTO генен полиморфизъм и ЗД тип 2 [99]. Установена е и такава зависимост при пациентки с ГЗД [177].

Наличието на доказани за ЗД тип 2 алели се срещат по-често при пациентки с ГЗД. Жените, които са носителки на 15 или повече рискови алела за ЗД тип 2 са 3-пъти по рискови за развитието на ГЗД спрямо жените, носителки на по-малък брой алели.

#### 10. Maturity onset diabetes of the young (MODY)

Maturity onset diabetes of the young (MODY) е моногенна форма на ЗД тип 2, която се унаследява по автозомно-доминантен начин. Познати са 5 генетични дефекти, които водят до развитието на MODY – хепатоцитния нуклеарен фактор  $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ )(MODY 1), глюкокиназия (GCK)(MODY 2), хепатоцитния нуклеарен фактор  $\alpha$  (HNF-1 $\alpha$ )(MODY 3), инсулин промоторния фактор-1 (IPF-1)(MODY 4) и хепатоцитния нуклеарен фактор  $\beta$  (HNF-1 $\beta$ )(MODY 5).[134] При всички познати форми на MODY се наблюдава нарушение в  $\beta$ -клетъчната функция на панкреаса. Някои автори сочат, че 5-6% от случаите с ГЗД са в резултат на мутации в глюкокиназия ген (MODY 2) [39, 259, 292]. При проучване в Швеция сред жени с установен в ранна възраст диабет тип MODY 3, 11 от 29 (38%), са имали ГЗД [181]. Тези предишни открития ни насочиха да потърсим ролята на мутацията в гените MODY 1-4 и честотата на ГЗД.

## VI. ЛЕЧЕНИЕ НА GESTАЦИОННИЯ ЗАХАРЕН ДИАБЕТ

Правилният хранителен режим е основния и ключов момент в лечението на ГЗД. Той трябва да се базира на препоръките за хранене при бременни жени [107, 203]. Адекватната хранителна диета е тази, в която се съдържат всички есенциални нутриенти, необходими за феталното развитие и поддържането на майчиното здраве. От друга страна е важно да се доставят калориите, необходими за поддържане на подходящо телесно тегло, а междувременно да се избегне кетонурия.

Жените с ГЗД, които успяват да постигнат добър гликемичен контрол, имат същите шансове за раждане на здраво новородено, както общата популация. Смята се, че хранителният режим е достатъчен за достигането на добър гликемичен контрол при 75% от бременностите, засегнати от ГЗД [94].

Факторите, които допълнителни могат да доведат до покачване на кръвната захар са стресът (емоционален и физически), който действа чрез покачване на контраинсуларните хормони, включително и по време на бременност. Бременността води и до покачване на нормалния сутрешен глюкозен интолеранс поради завишените нива на кортизол, прогестерон и растежен хормон (хорион соматомаотропин). Поради тази причина, постпрандиалната стойност на кръвната захар след закуска се покачва при пациентки с ГЗД, освен ако не е ограничен приема на въглехидрати. Часът от денонощието засяга също кръвната захар заради ежедневната вариация на контраинсуларните хормони. Упражненията водят до намаляване на нивото на кръвната захар чрез нарастване на нейното усвояване в клетките без нуждата от допълнителен инсулин.

Ако е налице персистиране на хипергликемията при майката е наложително добавянето на инсулиново лечение с цел подобряване на изхода от бременността. Все повече се обсъжда в световен мащаб и приложението на метформин по време на бременност, тъй като той води до подобряване на инсулиновата чувствителност чрез активиране на АМФ киназата. В Австралия е проведеното проучването MiG (метформин при пациентки с ГЗД), чиято цел има да съпостави изхода от бременността при 334 жени

лекувани с метформин и 331, лекувани с инсулин [253]. Резултати еднопосочно сочат сходна честота на перинаталните усложнения, по-малък процент на жени, които достигат до приложение на инсулин и по-малко наддаване на телесно тегло. Проучването в годините преминава в MiG TOFU (проследяване на новороденото), което ще продължи 8 години [254]. Първичната хипотеза на проучването е, че новородените/ децата на жените, лекувани с метформин ще имат по-малко количество висцерална мастна тъкан и съответно липса на инсулинова резистентност. Резултатите от първите 2 години (обхванати са 577 деца на жени, лекувани с метформин и/или инсулин) след проведена антропометрия, биоимпеданс и DEXA, сочат сходни резултати и в двете групи. Въпреки убедителните ползи, Hellmuth E. И колектив при проучване сред 118 бременни жени, установяват увеличена честота на прееклампсия и висока перинатална заболяемост при жени, които са лекувани с метформин [126].

В България, при жени с ГЗД, след изчерпване на възможностите на хранителния режим, единствен медикамент на избор остава инсулина.

По време на бременност обичайно се използват бързодействащи и интермедиерни (NPH) инсулинови препарати. Разрешени за употреба са и някои аналогови инсулини [131, 191, 192]. Налице са убедителен брой проучвания, обхващащи голям брой бременни жени с различна етническа принадлежност, които показват по-добър гликемичен контрол, намалена честота на хипогликемии и съответно подобрен неблагоприятен изход от бременността при приложение на аналогови инсулини (бързодействащи и дългодействащи) спрямо човешки [131, 192]. Тези проучвания са довели до преквалифицирането на някои инсулинови аналози от U.S. Food and Drug Administration от клас С към клас В за приложение по време на бременност. При избора на подходящ инсулин по време на бременност трябва да се предвид, че той трябва максимално да наподобява физиологичната инсулинова секреция, да намалява риска от хипогликемии и да бъде възпроизводим и предвидим.

Множество проспективни проучвания установяват, че по време на бременност водеща е кръвната захар на гладно и постпрандиалната стойност на 1-ви час след нахранване. Оптимален гликемичен контрол, при който риска за плода се свежда до този

в общата популация е кръвна захар на гладно 3,3-5,5 ммол/л и 1-ви час след нахранване 5,5-7,5 ммол/л [175].

Стойността на кръвната захар след закуска често е най-високата постпрандиална стойност при бременни жени. Тъй като по време на бременност постпрандиалната стойност на първия час е тази, която се асоциира в най-голяма степен с неблагоприятен риск за плода, прилагането на бързодействащи инсулини с по-бързо начало на действие и достигане на по-бърз пик, са от по-голяма полза при бременните жени, имащи нужда от инсулиново лечение. Бързодействащите инсулинови аналози имат малък афинитет за свързване с рецептора на IGF-1 и са с нисък митогенен потенциал.

## **V. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

### **I. ЦЕЛ**

Целта на настоящата работа е да се определи честотата и да се оцени значението на клиничко – лабораторните показатели за диагнозата и еволюцията на гестационен захарен диабет сред рискова група от бременни жени.

### **II. ОСНОВНИ ЗАДАЧИ**

1. Да се определи честотата на ГЗД сред бременни жени в 24-28 гестационна седмица с повишен риск за развитие на състоянието в българска популация.
2. Да се определят критериите за ГЗД с най-голяма диагностична стойност за българска популация.
3. Да се определи ролята на кръвната захар на гладно в диагностичния алгоритъм на ГЗД и необходимостта от провеждането на масов скрининг за ГЗД сред бременни жени.
4. Да се определи праговата стойност на гликирания хемоглобин за поставяне на диагноза ГЗД.
5. Да се анализира значимостта на отделните рискови фактори за развитие на ГЗД.
6. Да се анализират класическите и нетрадиционни метаболитни показатели при жени с ГЗД и да се сравнят с тези при контролна група бременни жени.
7. Да се установи честотата на автоантителата към  $\beta$ -клетката на панкреаса при бременни жени.
8. Да се изследват гените и генните полиморфизми, определени като доказани и кандидат-гени за развитието на ГЗД.
9. Да се проследи изхода от бременността в изследваната популация по отношение на майката и на плода.
10. Да се оцени прогресията на ГЗД към нарушения в глюкозния толеранс след приключване на бременността.

## VI. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

### I. МАТЕРИАЛ

Проучването бе разделено на две части – /Срезово/ крос-секционно проучване и проспективно проучване.

#### 1. Крос – секционно проучване

В проучването са включени 1000 бременни жени в 24 – 28 гестационна седмици, на средна възраст  $31,1 \pm 4,7$  години (от 19 до 51 години), с повишен риск за развитие на ГЗД. В единични случаи изследването е проведено в по-ранна гестационна възраст при наличие на множество включващи критерии. Изследването бе проведено в Клиничен Център по Ендокринология, Медицински Университет София през периода юни 2009г. до януари 2012г. Участниците бяха насочвани от лекари акушер-гинеколози, от клиники по пренатална диагностика, клиники по акушерство и ендокринологи от гр. София и други градове от страната при наличие на повишен риск за ГЗД. Повишен риск за развитие на ГЗД приехме при наличие на поне един от следните рискови фактори:

- фамилна обремененост за ЗД, наднормено телесно тегло /затлъстяване преди началото на бременността, анамнеза за репродуктивни неудачи, ГЗД при предходна бременност, последвана от нормогликемия, СПКЯ, раждане на плод с тегло > 4000 гр., ехографски данни за макрозомия и хидрамнион на плода, многображдани жени, възраст >30 години;

Наличието на ЗД тип 1 или 2 преди настъпването на бременността бе единствения изключващ критерий.

Допълнително при 130 жени с ГЗД и 130 бременни контроли е извършен генетичен анализ.

#### 2. Проспективно проучване

В проспективното проучване бяха включени 100 жени от крос-секционното проучване с диагностициран ГЗД. Те бяха изследвани на 6 – 12 седмица след приключване на бременността.

Всички бременни жени, участвали в проучването, са получили подробни разяснения за целите, методите и рисковете на провежданото изследване, подписали са информирано съгласие. Проучването е одобрено от Етичната комисия на Медицински Университет София (КЕМИНУС).

## II. МЕТОДИ

### 1. Анкетен метод

Използван бе изготвен от нас стандартен въпросник, включващ основните рискови фактори за развитие на ГЗД.

### 2. Клинични методи

- Антропометрични методи - измерване на ръст, тегло, регистриране на теглото преди бременността, преизчисляване на индекса на телесна маса (ИТМ =  $\text{кг}/\text{м}^2$ );
- Артериалното налягане и средно артериално налягане (САН).

### 3. Функционални тестове

- Орален глюкозо толерантен тест (ОГТТ) – проведен е сред всички участници в проучването, при спазени стандартни условия на теста – сутрин на гладно след 10-12 часа нощно гладуване, със 75гр. глюкоза на прах, разтворена в 300мл. вода и изпита за 5 минути. Кръвни проби бяха вземани чрез венепункция на гладно, на 60 минута и 120 минута след изпиване на разтворената глюкоза. За периода от 2 часа, участниците са били в седнало положение, без извършване на движения. Три дни преди провеждането на изследването участниците не са били на рестриктивна диета.

### 4. Лабораторни методи

- кръвна захар трикратно в хода на ОГТТ – на гладно, на 60 и 120 минута (хексокиназен ензимен метод);
- серумен инсулин - имуно-радио-метричен метод (IRMA);
- $HOMA\ IR = \text{инсулин на гладно (mIU/l)} \times \text{плазмена глюкоза на гладно (mmol/l)} / 22.5$
- $HOMA\ \%B = \text{серумен инсулин на гладно (mIU/l)} / \text{плазмена глюкоза на гладно (mmol/l)} - 3,5$
- hsCRP (турбидиметричен метод);
- гликиран хемоглобин (HbA1c) – турбидиметричен метод;
- липиден профил, включващ общ холестерол, HDL-холестерол и триглицериди – ензимен колориметричен метод, формула на Friedwald за LDL-холестерол;
- адипонектин (BioVendor® kits), лептин (DRG Germany® kits), резистин (BioVendor® kits), ; TNF- $\alpha$  и IL-6 (ензимно свързан имуно – сорбентен метод);
- апелин, висфатин (Phoenix Pharmaceuticals Inc., USA) - радио – имунологичен метод;
- автоантитела към 65 kD изоформата на декарбоксилазата на глутаминовата киселина (GAD-65 антитела), инсулинови автоантитела (IAA) и тирозин-фосфатазни антитела (IA-2) - ензимно свързан имуно – сорбентен метод;

##### 5. Генетичен анализ

- ДНК бе изолирана от венозна кръв взета с помощта на Chemagic Magnetic Separation Module (ChemagenAG). SNP генотипизиране бе извършено с помощта на TaqMan проби и апарат 7500 HT Real Time PCR system (Applied Biosystems). Изследвани са GCKR, IRS-1, Adiponectin, PPARG, CDKAL1, GSK, LEP, MBL2, TCF7L2, INS, KCNJ11, STRA6, FTO и TCF2. Първичната обработка на данните от проведената полимеразна верижна реакция в реално време бе направена с програмния продукт на същата фирма SDSv2.2.2. За успешно проведени приехме анализите с амплификация на над 95% от пробите. Десет проби бяха генотипизирани два пъти, в два независими експеримента за възпроизводимост на метода. По този начин гарантирахме надеждност и повторяемост на резултатите.

**Таблица 2.** Кандидат гени и полиморфни варианти, включени в генетичните изследвания.

<b>ген</b>	<b>хромозома.</b>	<b>SNP</b>
<b>GCKR</b>	2	rs780094
<b>IRS1</b>	2	rs1801278
<b>ADIPONECTIN</b>	3	rs2241766
<b>ADIPONECTIN</b>	3	rs1501299
<b>ADIPONECTIN</b>	3	rs266729
<b>PPARG</b>	3	rs1801282
<b>CDKAL1</b>	6	rs7756992
<b>GCK</b>	7	rs1799884
<b>LEP</b>	7	rs7799039
<b>MBL2</b>	10	rs1800450
<b>TCF7L2</b>	10	rs7903146
<b>TCF7L2</b>	10	rs290481
<b>INS</b>	11	rs689
<b>KCNJ11</b>	11	rs5219
<b>STRA6</b>	15	rs736118
<b>FTO</b>	16	rs9939609
<b>TCF2</b>	17	rs7501939

## 6. Диагностични критерии

За поставяне на диагнозата ГЗД са използвани критериите на Международната Асоциация за изучаване на диабет и бременност. За сравняване на диагностичните подходи в различните държави са използвани критериите на Американската Диабетна Асоциация (ADA), Международната Асоциация по изучаване на диабет и бременност (IADPSG), Канадската Диабетна Асоциация (CDA), Европейската Асоциация за изучаване на диабет (EASD), Дружеството за изучаване на Диабет в Нова Зеландия (NZSSD), Дружеството за изучаване на диабет и бременност в Австралия (ADIPS) и Световната здравна организация (СЗО). В таблица 1 са представени отделните диагностични критерии и праговете стойности за поставяне на диагнозата ГЗД.

## 7. Изход от бременността

До месец юни 2012, данни за изхода от бременността имахме при 682 (68.2%) жени от общо 1000, участвали в проучването. За останалите участници липсват данни поради невъзможност за установяване на контакт. Анализирахме метод на родоразрешение (нормално раждане, цезарово сечение), ехографски отношението на обиколка на главата към обиколка на корема (HC/AC ratio), тегло на новороденото (макрозомия >4000гр.) и е изчислен пондерален индекс на новороденото. Пондерален индекс – теглото на новороденото (гр.) x 100/ дължината на новороденото (см.).

## 8. Статистически методи

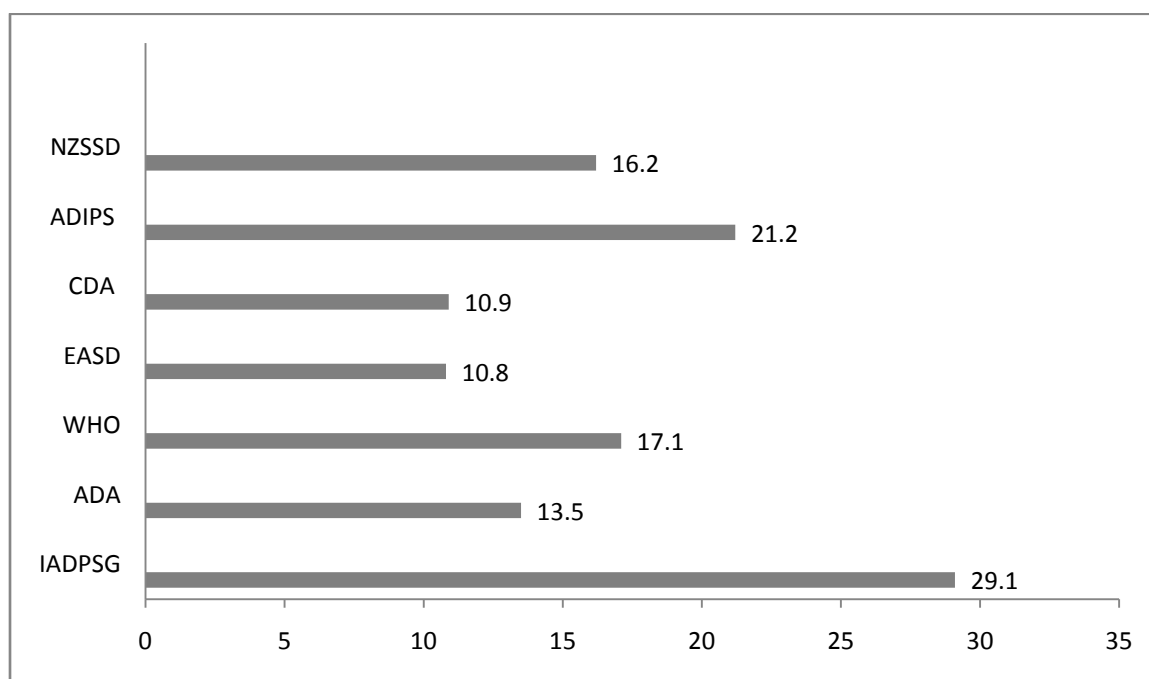
За обработка и анализ на данните от проучването използвахме статистически методи: дескриптивен, вариационен анализ, графични изображения, Т-тест за две независими извадки, Колмогоров – Смирнов, Shapiro-Wilk, Mann – Witney,  $\chi$ -квадрат и тест на Фишер, логистичен регресионен анализ, изчисляване на чувствителност и специфичност, ROC анализ, Капа ( $\kappa$  – kappa) – степен на съгласуваност между два показателя (SPSS v. 17.0). За ниво на значимост бе прието ниво на значимост  $p \leq 0,05$ .

Статистически анализ за наличие на отклонения от закона на Харди-Вайнбер и за асоциация между болестта и полиморфни варианти в кандидат гените бе направен с помощта на програмата PLINK (Purcell, S., Am J Hum Genet, 2007. 81(3): p. 559-75.)

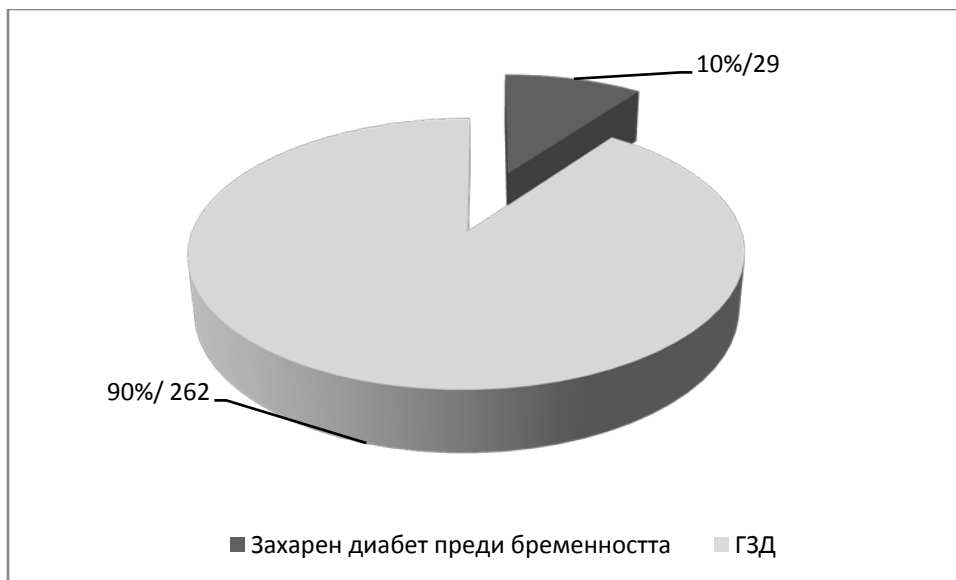
## VII. РЕЗУЛТАТИ

### I. ЧЕСТОТА НА ГЗД И ИЗБОР НА ДИАГНОСТИЧЕН ПОДХОД

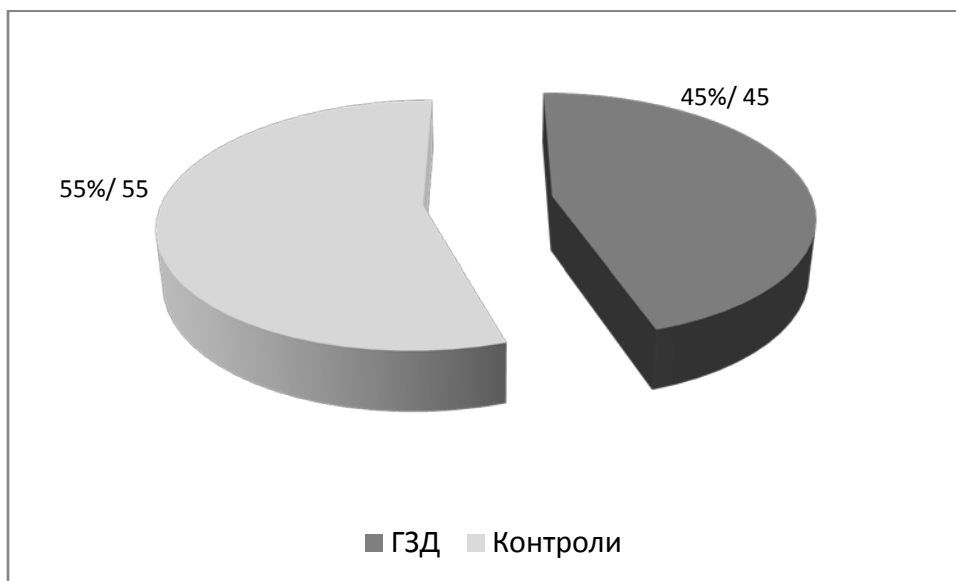
На фигура 3 е представена честотата на ГЗД според различни международни критерии. Най-висока честота на ГЗД получихме използвайки критериите на IADPSG – 29.1% (291 бременни жени), а най-ниски според критериите EASD – 10,8% (108) и CDA – 10,9% (109). От случаите с диагностициран ГЗД 29 от бременните (10%) отговаряха на критериите за ЗД преди бременността (фиг. 4). Честотата на ГЗД сред бременните жени след IVF/ICSI е по-висока – 45% в сравнение с 29,1% в общата популация (IADPSG) (фиг. 5).



Фигура 3. Честота (%) на ГЗД според различните диагностични критерии.



Фигура 4. Разпределение на бременните в групата с ГЗД според критериите за ЗД (%/n)



Фигура 5. Честота (%/n) на ГЗД сред бременни жени след IVF/ ICSI

С цел определяне на периода, в който се установява най-голям процент на бременни жени с ГЗД се направи разпределение на бременните според гестационната възраст, в която беше диагностицирано състоянието (фиг. 6). При 63,6% от всички

бременни жени, участвали в проучването, ГЗД се установява между 24 – 28 г.с. Най-висок е процентът в 28 г.с. (19,1%), следван от тези в 24 г.с. (18,4%).



Фигура 6. Разпределение на бременните жени според гестационната възраст на установяване на ГЗД

## II. ДИАГНОСТИЧНИ КРИТЕРИИ

Сравнихме различните използвани до момента критерии по двойки и степен на съгласуваност - капа. Използваният к-капа определя степента на съгласуваност между два показателя. Представя се със стойности между 1 и 0 като колкото по-близо е до 1, толкова по-добра е степента на съгласуваност. Съответно степента е слаба ( $\kappa = 0-0.19$ ), лека ( $\kappa = 0.2-0.39$ ), средна ( $\kappa = 0.4-0.59$ ), добра ( $\kappa = 0.6-0.79$ ) и много добра ( $\kappa = 0.8-1.0$ ). Не установихме слаба и лека степен на съгласуваност. Много добра асоциация наблюдавахме при два от критериите (CDA/ ADA и ADIPS/ NZSSD). Добра степен на съгласуваност установихме при 9 от двойките критерии, а средна степен на съгласуваност също при 9 от двойките критерии (табл.3).

От седемте вида критерии бяха възможни 21 комбинации по двойки, като между всяка една от двойките се установи значима разлика ( $p < 0,0001$ ). Установи се значима

разлика в честотата на ГЗД дори и при най-добрата степен на съгласуваност ( $\kappa = 0,88$ ) при двете най географско близко разположени държави (CDA/ ADA).

Таблица 3. Сравняване на различните критерии по двойки и степен на съгласуваност / - карра/ между всяка една от двойките.

К-капа	IADPSG	ADA	WHO	EASD	CDA	ADIPS	NZSSD
IADPSG		0.5	0.49	0.41	0.42	0.67	0.59
ADA	145 (18.4)		0.58	0.69	0.88	0.65	0.73
WHO	116 (14.8)	29 (3.6)		0.59	0.5	0.77	0.56
EASD	167 (21.1)	22 (2.7)	51 (6.3)		0.74	0.62	0.77
CDA	166 (21)	21 (2.6)	50 (6.2)	1 (0.1)		0.56	0.69
ADIPS	83 (10.7)	62 (7.7)	33 (4.1)	84 (10.4)	83 (10.3)		0.84
NZSSD	123 (15.7)	22 (2.7)	7 (0.9)	44 (5.4)	43 (5.3)	40 (5)	

### III. РОЛЯ НА КРЪВНАТА ЗАХАР НА ГЛАДНО В ДИАГНОСТИЧНИЯ АЛГОЛИТЪМ НА ГЗД

На таблица 4 са представени тестове за чувствителност и специфичност. Само при 4,8% (9/1000) сред жените със стойност на КЗГ  $\leq 4.4$  ммол/л диагнозата ГЗД ще бъде пропусната. Чувствителността на теста е 95.6%. Всички жени с КЗГ  $\geq 5.1$  ммол/л попадат в групата на ГЗД като специфичността достига до 100%.

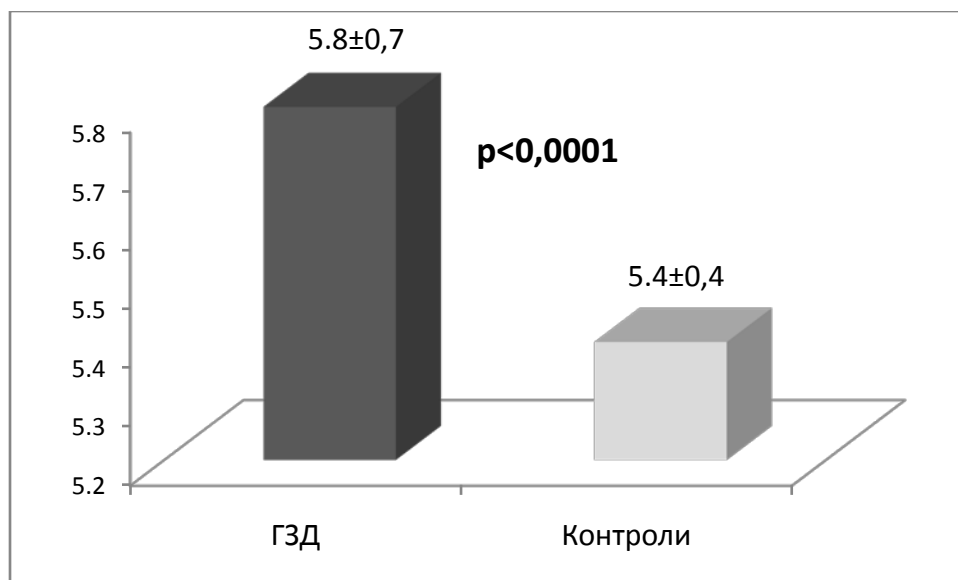
Таблица 4. Разпределение на бременните жени според нивото на КЗГ.

КЗГ на или над прага	4.2 mmol/l	4.4 mmol/l	4.6 mmol/l	4.8 mmol/l	5.1 mmol/l	5.3 mmol/l
Брой на жените на или над прага (%)	836 (83.6)	720 (72.0)	570 (57.0)	384 (38.4)	233 (23.3)	169 (16.9)
Положителна предиктивна стойност (%)	2.2	4.4	8.3	19.3	27.1	47
Чувствителност (%)	97.8	95.6	91.7	80.7	72.9	53.1
PPV (%)	37.3	42.4	51.4	67	100	100
LR +	-4.4	-2.5	-1.6	-1.0	-0.7	-0.5
Брой на жените под нивото на прага (%)	164 (16.4)	280 (28.0)	430 (43.0)	616 (61.6)	767 (76.7)	831 (83.1)
Фалшиви позитивен резултат (%)	0.8	0.6	0.4	0.2	0	0
Специфичност (%)	23.1	39.1	59.3	81.3	100	100
Отрицателна предиктивна стойност (%)	95.7	95	93.9	90	88.7	82
LR-	-4.2	-2.4	-1.5	-1.0	-0.7	-0.5

Избрани стойности на КЗГ и съответните тестове за чувствителност, специфичност, положителна и отрицателна предиктивна стойност, likelihood ratios of positive (LR+) и negative (LR-); Фалшиво позитивен резултат (1 – специфичността) и Фалшиво отрицателен резултат (1 – чувствителността).

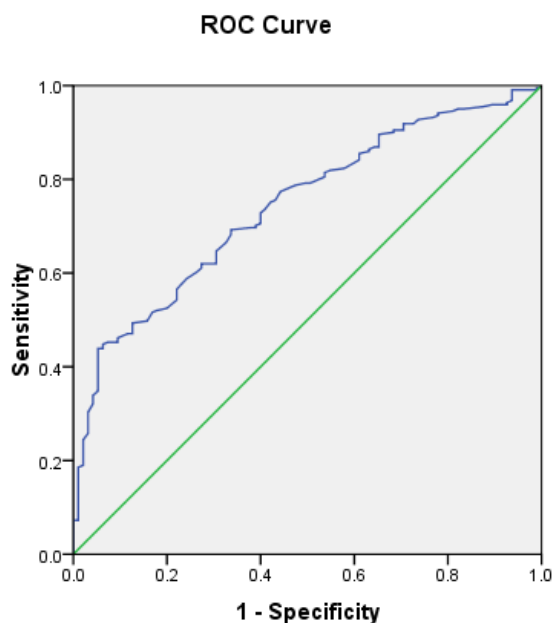
#### IV. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ПРАГОВА СТОЙНОСТ НА HbA1C

Средната стойност на HbA1c е с значимо по-висока в групата с ГЗД ( $5.8 \pm 0.7$ ) спрямо тази на контролната група ( $5.4 \pm 0.4$ ,  $p < 0.0001$ ) (фиг. 7). Стойността на HbA1c сред бременните жени с ГЗД варираше между 4,5 и 7.7%.



Фигура 7. Средни стойности на HbA1c в групата с ГЗД и контролната група бременни жени

Използвахме ROC анализ, даващ нива на чувствителност и специфичност, за да оценим показателя HbA1c като диагностичен метод. Площта под ROC кривата за определяне на диагнозата ГЗД е 0,742 (area under the curve = 0.742, SE =0.04, 95%CI 0.687 – 0.798,  $p < 0.0001$ ), (фиг.8). При прагова стойност  $\geq 6,0\%$  чувствителността е 36,36%, а специфичността 93,27%. Оптимална чувствителност и специфичност се установява при прагова стойност 5.6%, като по този начин HbA1c може да изключи ГЗД с чувствителност 64.71% и специфичност 62.02% (табл. 5). Фалшиво отрицателен резултат бе установен при 35,3% от жените, а фалшиво положителен при 38%.



Diagonal segments are produced by ties.

Фигура 8. ROC крива демонстрираща специфичност и чувствителност на HbA1c

Таблица 5. Разпределение на бременните жени според различните стойности на HbA1c.

<b>HbA1c на или над прага (%)</b>	<b>4.6%</b>	<b>5%</b>	<b>5.3%</b>	<b>5.6%</b>	<b>6%</b>	<b>6.5%</b>
<b>Брой на жените на или над прага (%)</b>	291 (100%)	278(95.7)	249(85.6)	188(64.7)	106(36.4)	33(11.2)
<b>Фалшиво отрицателен резултат (%)</b>	0	4.3	14.4	35.3	63.6	88.8
<b>Чувствителност (%)</b>	100	95.72	85.56	64.71	36.36	11.23
<b>Положителна предиктивна стойност (%)</b>	47.46	48.25	53.16	60.5	82.93	91.3
<b>Брой на жените под нивото на прага (%)</b>	0 (0%)	8	27	66	119	166
<b>Фалшиви позитивен резултат (%)</b>	100	92.3	67.8	38.0	6.7	1
<b>Специфичност (%)</b>	0.48%	7.69%	32.21	62.02	93.27	99.04
<b>Отрицателна предиктивна стойност (%)</b>	100	66.67	71.28	66.15	61.98	55.38

Избрани стойности на HbA1c и съответните тестове за чувствителност, специфичност, положителна и отрицателна предиктивна стойност, Фалшиви позитивен резултат (1 – специфичността) и Фалшиво отрицателен резултат (1 – чувствителността).

#### **V. РИСКОВИ ФАКТОРИ ЗА РАЗВИТИЕ НА ГЗД**

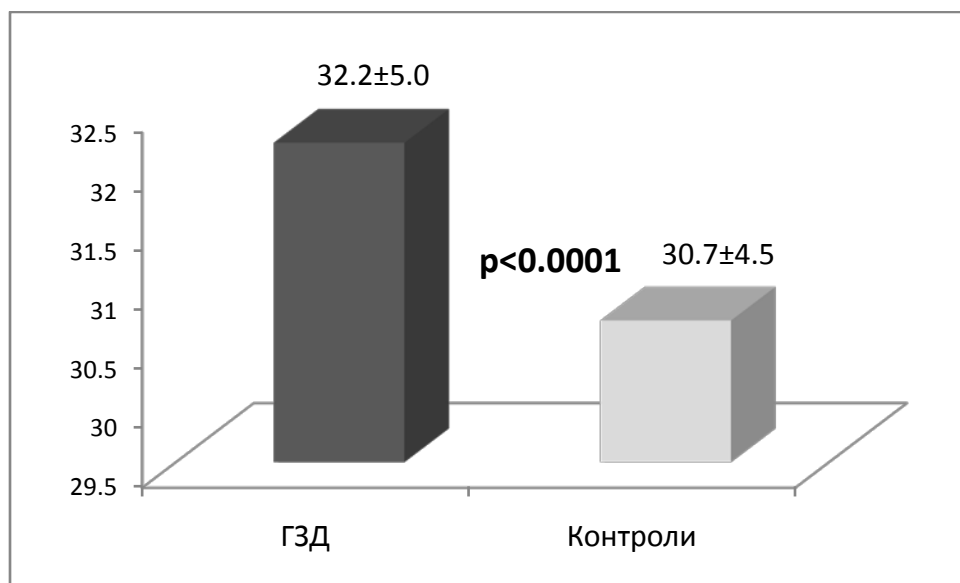
Анализирахме връзката между отделните рискови фактори за развитието на ГЗД, използвайки логистичен регресионен анализ. Най-голямо стойност като рисков фактор за ГЗД имат възрастта >30 години; установена случайно завишена стойност на кръвната захар; анамнеза за репродуктивни неудачи; наднормено телесно тегло и в по-голяма степен затлъстяване преди настъпване на бременността (табл. 6). Установихме значимо влияние на наличието на първостепенни и второстепенни родственици със ЗД тип 2 спрямо отделното им влияние /само първостепенни или второстепенни родственици/. Жените, чиято бременност е настъпила чрез IVF/ICSI, също имат значимо по-голям риск за развитието на ГЗД. Факторите възраст под 29 години, многораждали жени, раждане на плод с тегло > 4000гр., собствено тегло при раждането > 4000гр., двуплодна бременност, анамнеза за СПКЯ не достигнаха статистическа значимост.

Таблица 6. Връзка на различните рискови фактори с развитието на ГЗД (логистичен регресионен анализ)

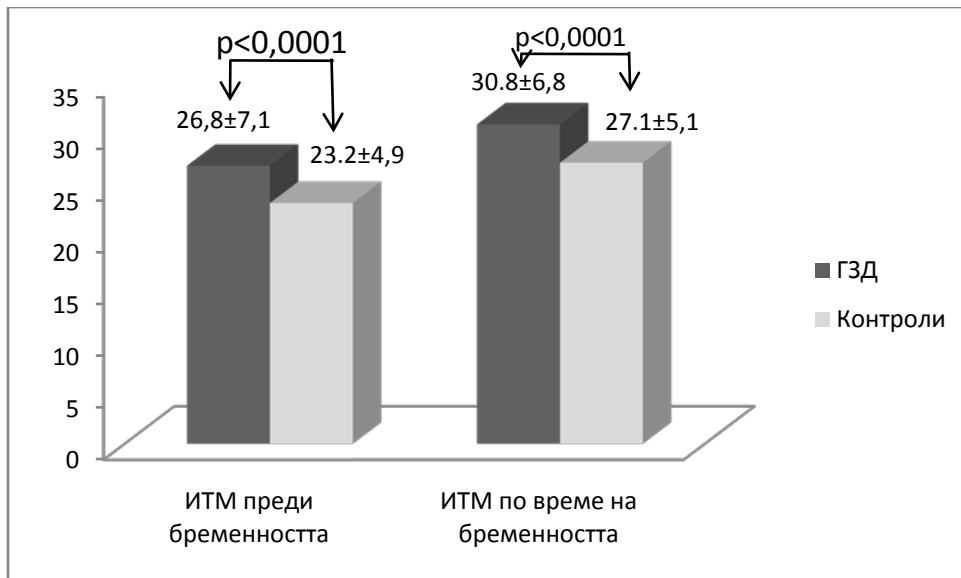
Показател	OR	95% CI	P
Възраст			
<29г.	1,175	0,825 – 1,673	0,371
30-34г.	<b>2,245</b>	1,503 – 3,353	<b>0,0001</b>
>35г.	<b>2,235</b>	1,113 – 4,856	<b>0,025</b>
Родственик със ЗД:			
Първостепенен родственик	1,469	0,959 – 2,251	0,077
Първостепенен и второстепенен родственик	<b>2,523</b>	1,491 – 4,267	<b>0,001</b>
Второстепенен родственик	1,103	0,750 – 1,620	0,619
Родственик със ЗД	<b>1,394</b>	1,026 – 1,894	<b>0,034</b>
Раждане на плод с тегло >4000гр.	2,074	0,891 – 4,826	0,09
Собствено тегло при раждане >4000гр.	0,506	0,284 – 1,102	0,93
Забременяване чрез асистирана репродукция	<b>2,123</b>	1,340 – 3,363	<b>0,001</b>
Двуплодна бременност	1,293	0,593 – 2,921	0,518
Репродуктивни неудачи	<b>1,448</b>	1,043 – 2,012	<b>0,027</b>
Многораждали жени	0,848	0,610 – 1,181	0,330
Анамнеза за СПКЯ	1,202	0,845 – 1,710	0,307
Установена случайно завишена кръвна захар	<b>3,883</b>	2,786 – 5,412	<b>0,0001</b>
ИТМ /кг/м <sup>2</sup> / преди бременността			
>25 и <29,9	<b>1,629</b>	1,082 – 2,453	<b>0,019</b>
>30	<b>4,162</b>	2,812 – 6,160	<b>0,0001</b>

## VI. МЕТАБОЛИТНИ ПОКАЗАТЕЛИ

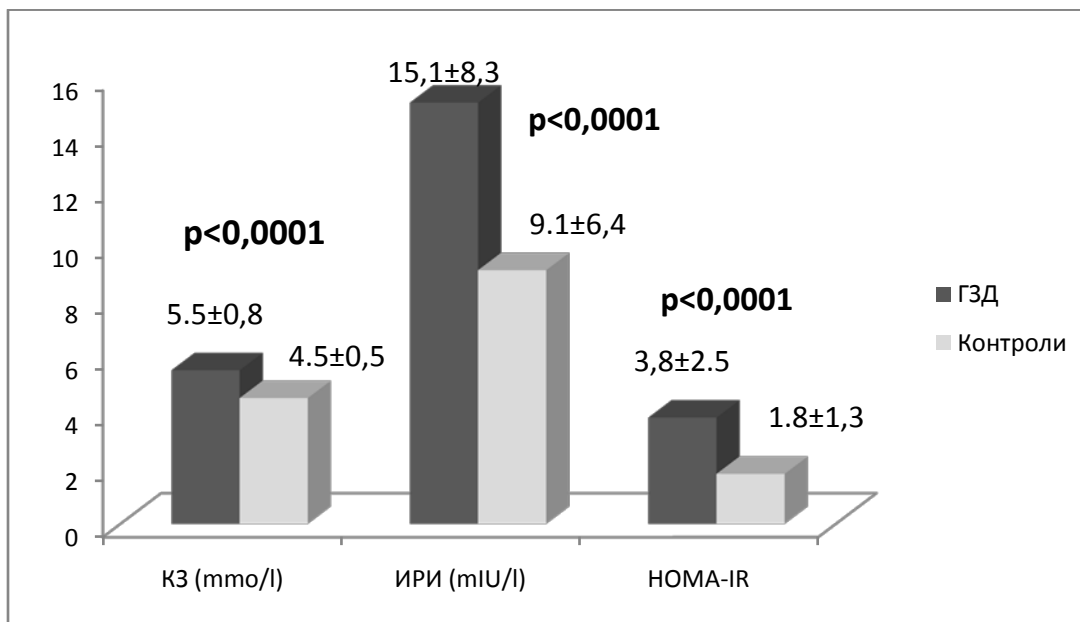
Анализът на данните от сравнението на изследваните групи с ГЗД и контролната група бременни показва, че жените с ГЗД са по-възрастни ( $p < 0,0001$ ), (фиг. 9); имат значимо по-голям ИТМ, както преди бременността, така и по време на самата бременност, сравнен съответно по гестационната седмица ( $p < 0,0001$ ), (фиг. 10); по-високи нива на кръвната захар на гладно ( $p < 0,0001$ ), (фиг.11), базалния серумен инсулин ( $p < 0,0001$ ), (фиг.11) и НОМА IR ( $p < 0,0001$ ), (фиг.11) и по-ниски на НОМА-%В ( $p < 0,044$ ), (фиг. 12), както и на серумните липиди – HDL холестерол ( $p < 0,0001$ ). Значимо по-високи бяха и нивата на триглицеридите ( $p < 0,0001$ ), (фиг. 12), hsCRP ( $p < 0,001$ ), (фиг. 14) и САН ( $p < 0,0001$ ), (фиг. 15).



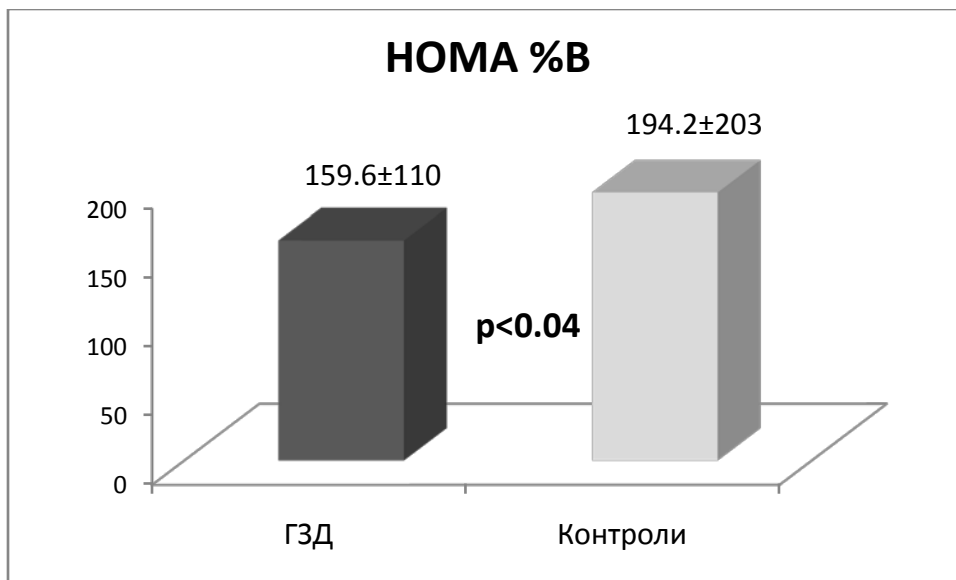
Фигура 9. Средна възраст на жените с ГЗД и контролната група бременни жени.



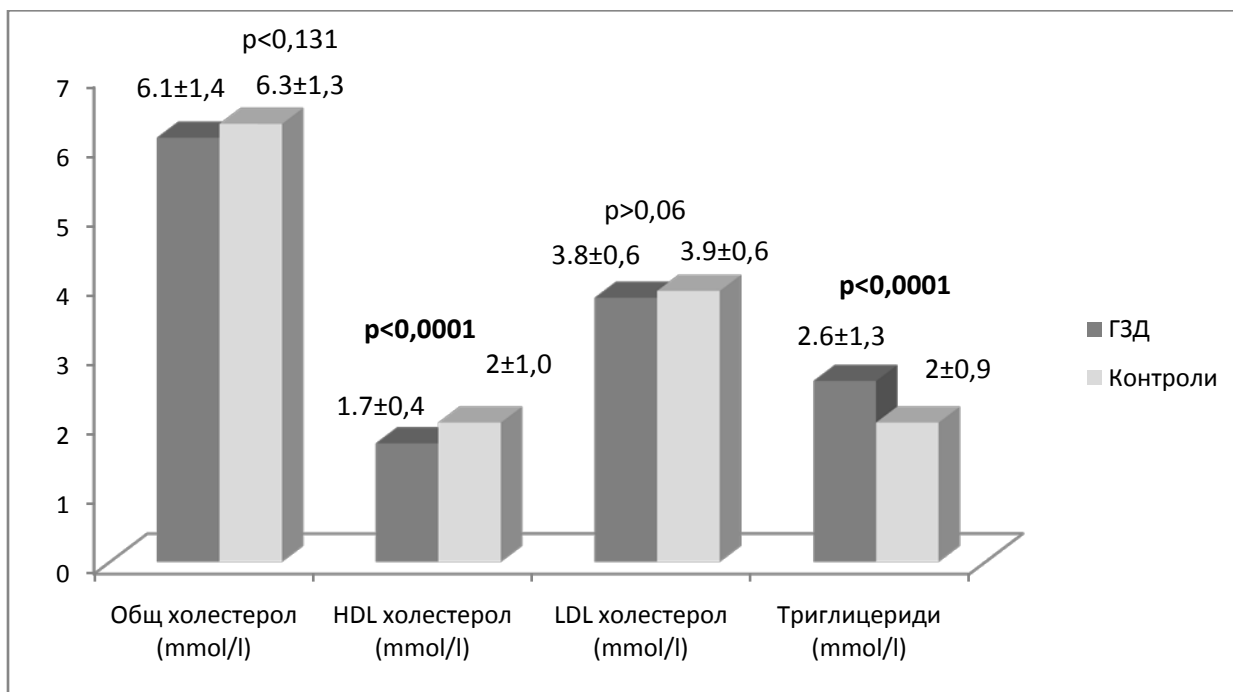
Фигура 10. Индекс на телесна маса ( $\text{kg/m}^2$ ) при жените с ГЗД и контролната група преди и по време на бременността



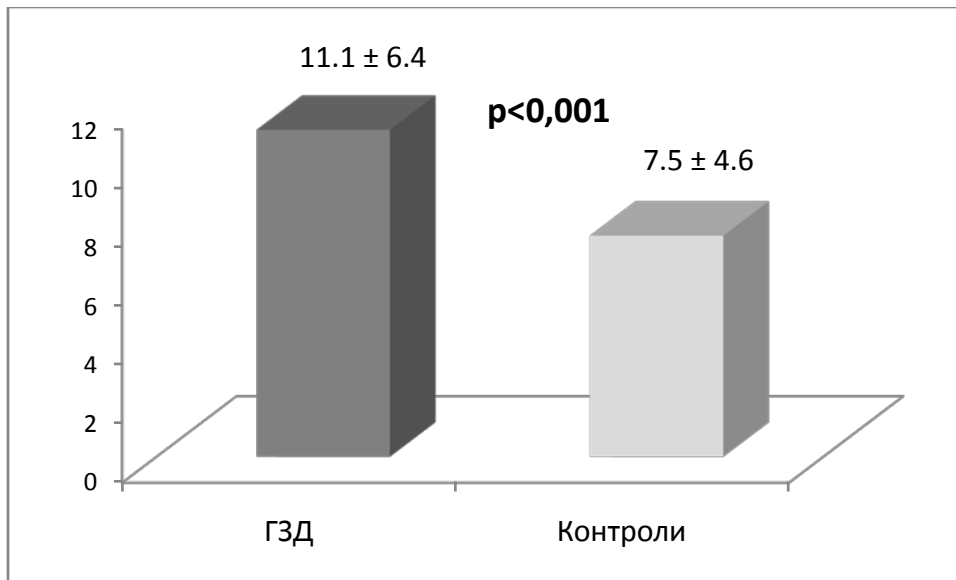
Фигура 11. Средни стойности на кръвната захар на гладно (mmol/l), базалния имунореактивен инсулин (mIU/l) и НОМА IR индекс при жените с ГЗД и контролна група бременни жени.



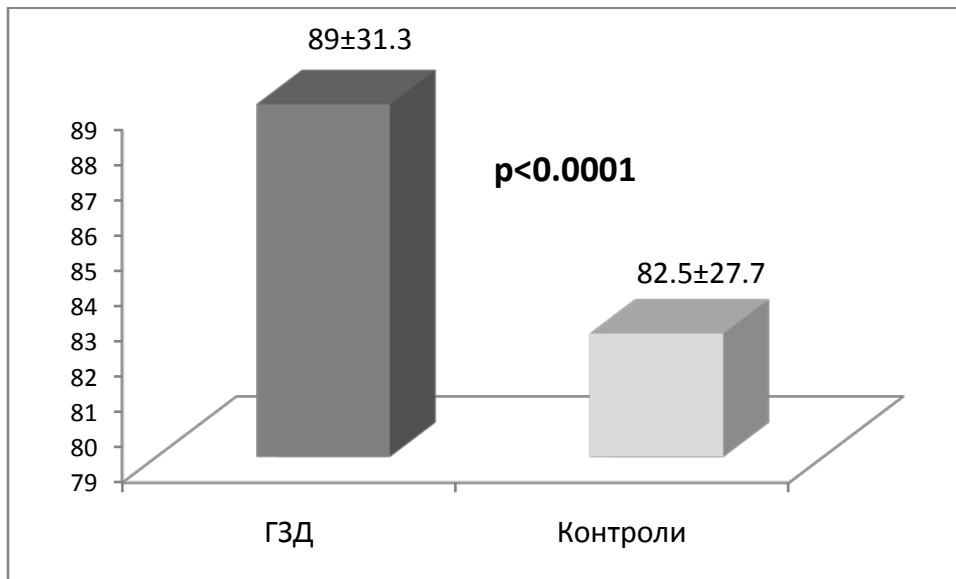
Фигура 12. Средна стойност на НОМА %В при жените с ГЗД и контролна група бременни жени



Фигура 13. Средни стойности на серумните липиди (Общ холестерол, HDL-холестерол, LDL-холестерол и триглицериди при жените с ГЗД и контролната група бременни жени



Фигура 14. Средни стойност на hsCRP (umol/l) при жените с ГЗД и контролната група бременни жени.

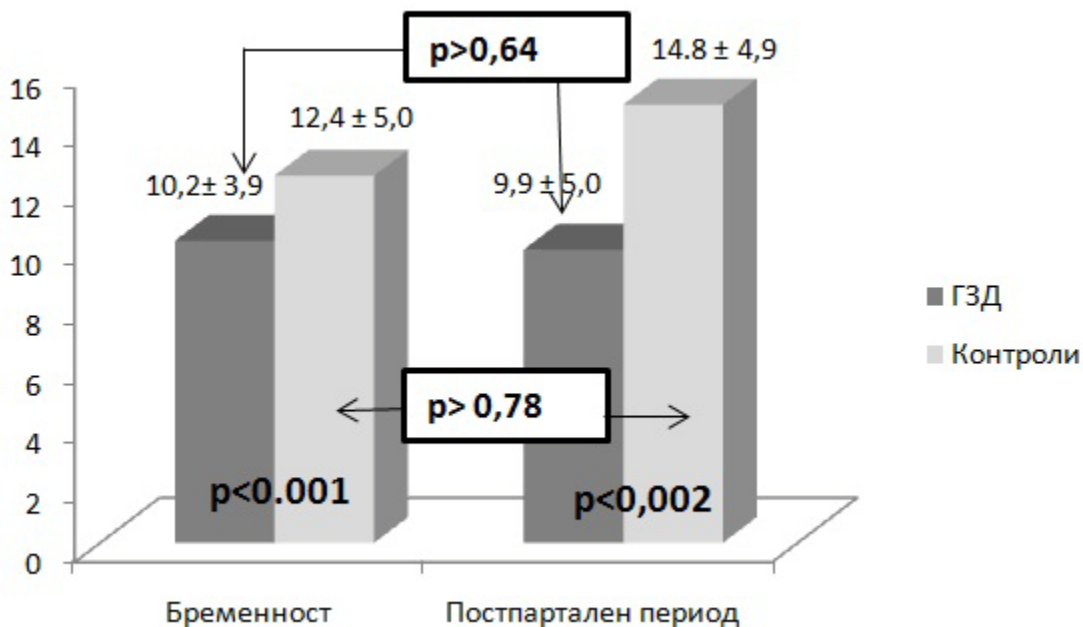


Фигура 15. Средни стойности на САН (mmHg) при жените с ГЗД и контролна група бременни жени

## VII. АДИПОЦИТОКИНИ

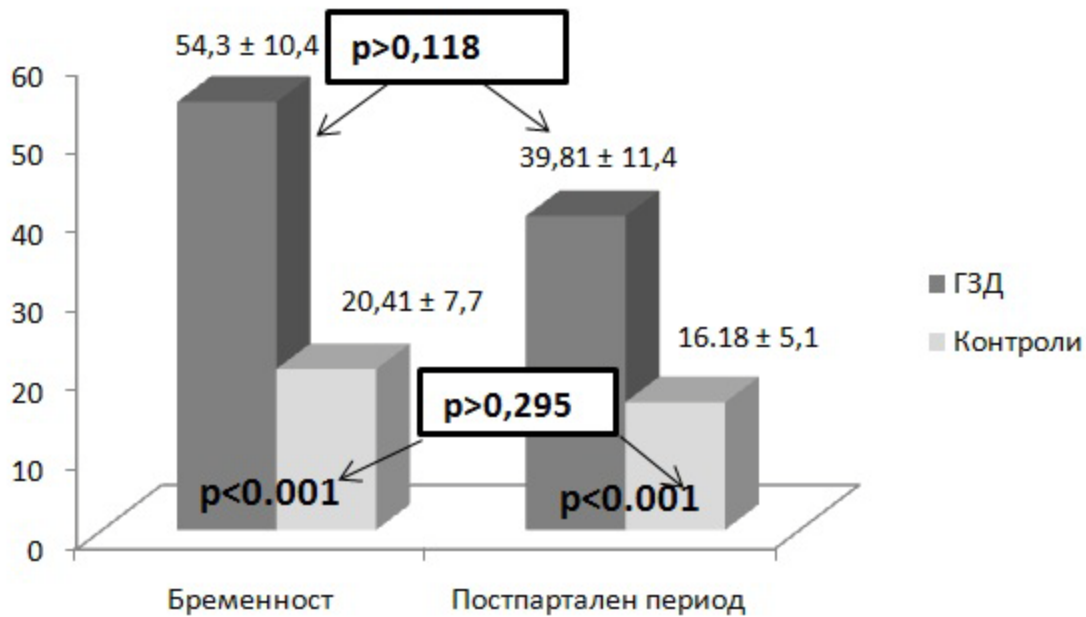
Установихме значимо по-ниски нива на адипонектин в групата с ГЗД спрямо контролната група бременни ( $p < 0,001$ ), (фиг. 16). Това ниво на значимост се запази и след приключване на бременността ( $p < 0,002$ ). Въпреки тенденцията за покачване нивото на

адипонектин след приключване на бременността, не се установяват значими разлика нито в групата с ГЗД ( $p>0,64$ ), нито в контролната група ( $p>0,78$ ).



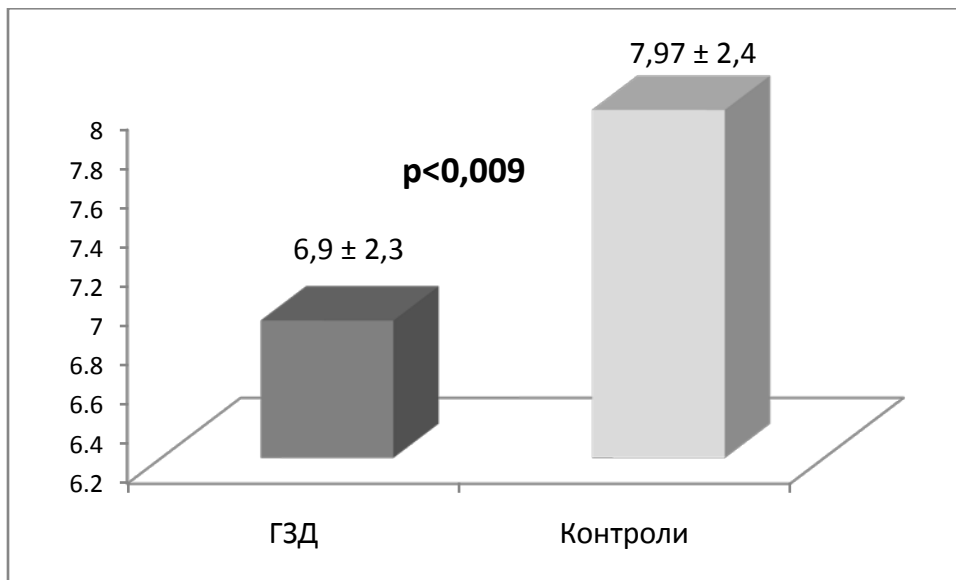
Фигура 16. Нива на адипонектин ( $\mu\text{g/ml}$ ) по време и след приключване на бременността при жени с ГЗД и контролна група

Серумните нива на лептина бяха значимо по-високи в групата с ГЗД спрямо контролната група ( $p<0,001$ ), (фиг. 17). Тази разлика се запази и след приключване на бременността ( $p<0,001$ ), но подобно на адипонектина, се установи единствено тенденция към нормализиране (намаляване) на нивото в групата с ГЗД и контролната група.



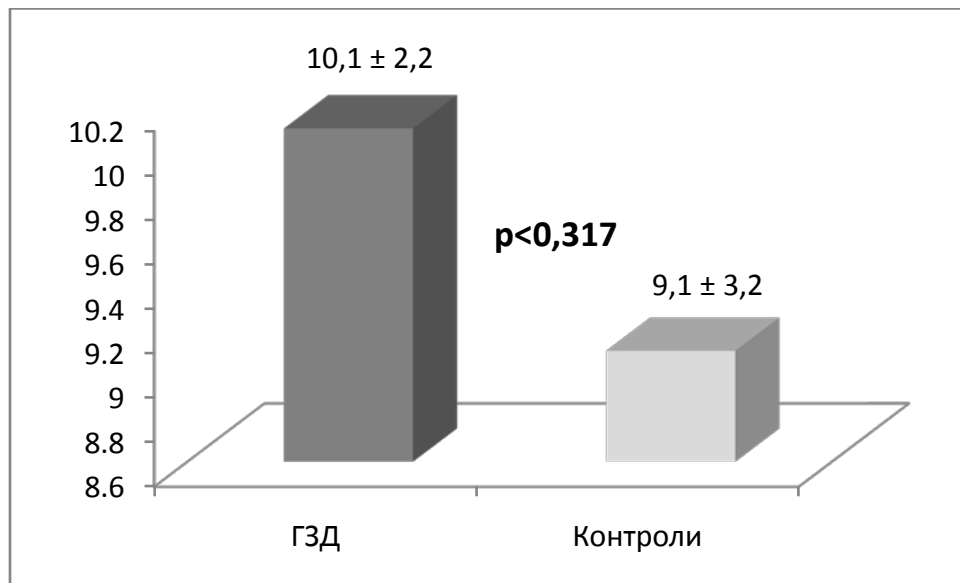
Фигура 17. Серумни нива на лептин (ng/ml) по време и след приключване на бременността при жени с ГЗД и контролна група

Серумните нива на апелина бяха значимо по ниски при жените с ГЗД в сравнение с контролната група (p=0,009), (фиг. 18).

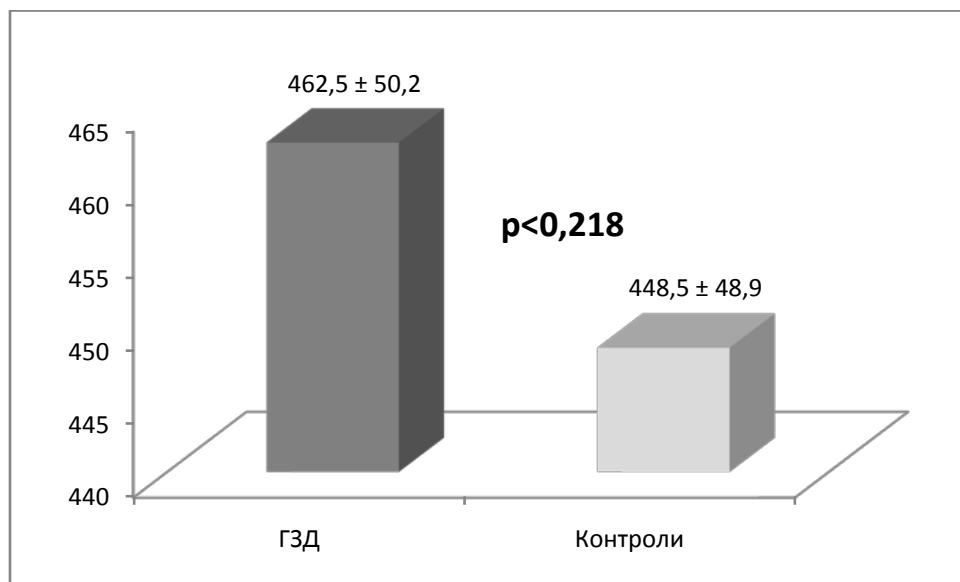


Фигура 18. Серумни нива на апелин (ng/ml) при жени с ГЗД и контролна група бременни жени

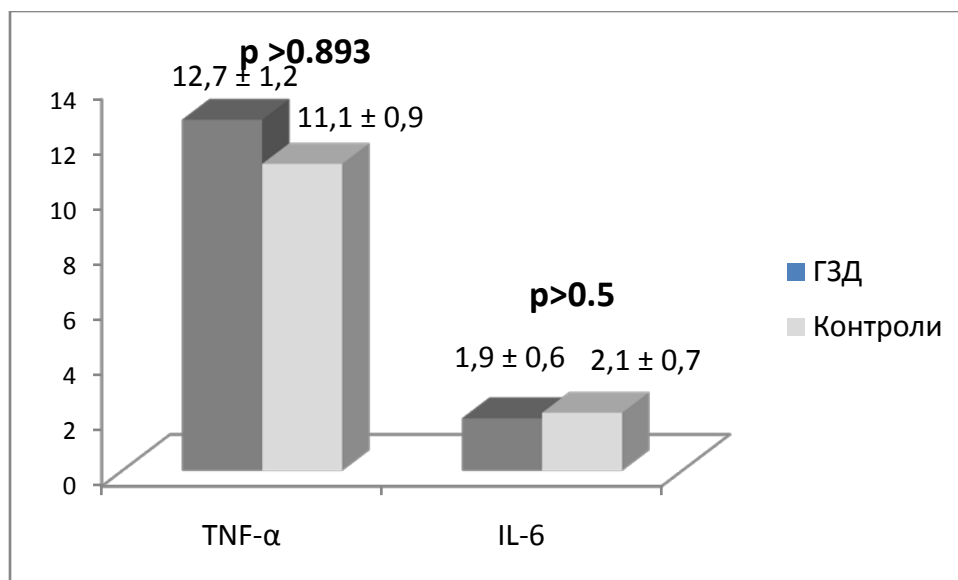
Не установихме статистически значима разлика между двете групи по отношение на серумните нива на резистина ( $p=0,317$ ), (фиг. 19), висфатина ( $p=0,218$ ), (фиг. 20), TNF- $\alpha$  ( $p=0,893$ ) и IL-6 ( $p=0,500$ ), (фиг. 21).



Фигура 19. Серумни нива на резистин (ng/ml) при жени с ГЗД и контролна група бременни жени



Фигура 20. Серумни нива на висфатин (ng/ml) при жени с ГЗД и контролна група бременни жени



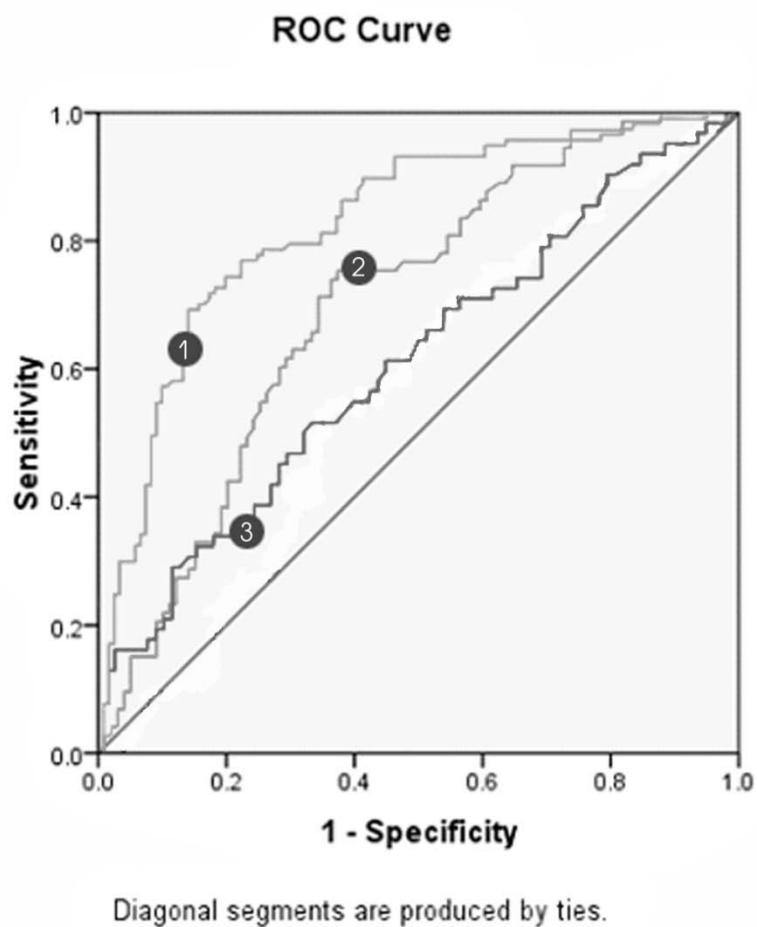
Фигура 21. Серумни нива на TNF-α и IL-6 в групата с ГЗД и контролна група бременни жени

Потърсихме връзка между адипоцитокините и някои демографските показатели. Установихме негативна връзка между нивото на адипонектин и НОМА IR, ИТМ, HbA1c и hsCRP, (табл. 7). Не установихме връзка между адипонектина и останалите адипоцитокини с изключение на лептина. Нивото на лептина корелира с нивото на резистина, НОМА IR, ИТМ, HbA1c и hsCRP. Резистинът корелираше с НОМА IR. Не установихме други значими взаимовръзки.

Таблица 7. Ниво на значимост между адипоцитокините и някои метаболитни параметри.

		Лептин	Резистин	Апелин	Висфатин	НОМА IR	ИТМ преди бременността	ИТМ по време на бременността	HbA1c	hsCRP
Адипонектин	r	-.324	-.163	.138	.093	-.344	-.364	-.399	-.169	-.032
	p	.0001*	.033*	.229	.467	.0001*	.0001*	.0001*	.027*	.676
Лептин	r		0.241	.083	.078	.558	.634	.691	.167	.02
	p		.001*	.333	.301	.0001*	.0001*	.0001*	.01*	.757
Резистин	r			-.182	.044	.226	.104	.138	.105	.000
	p			.108	.532	.003*	.193	.082	.172	.992
Апелин	r				.131	-.005	.038	.022	-.004	-.035
	p				.243	.95	.66	.799	.963	.688
Висфатин	r					.042	.08	.069	.097	.099
	p					.564	.309	.387	.453	.48

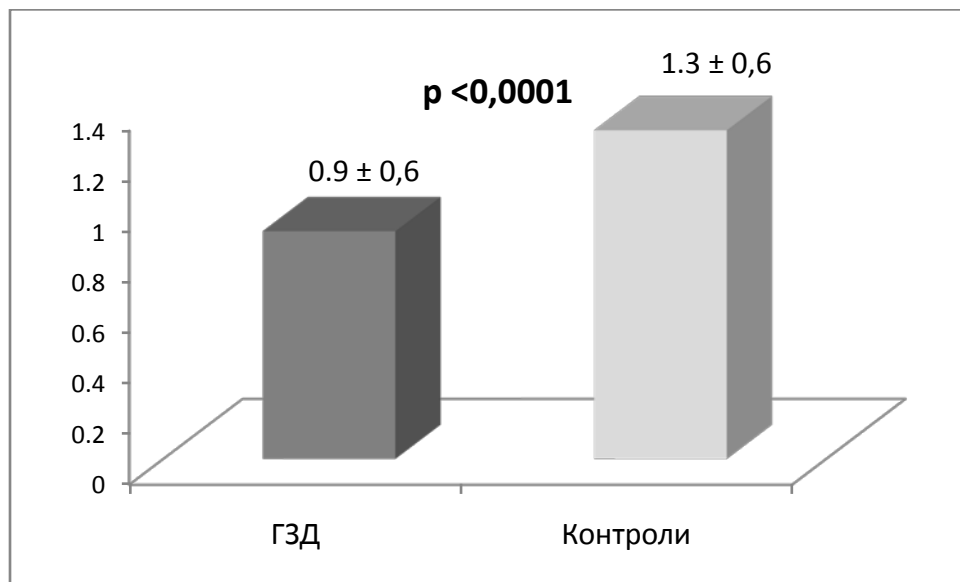
Чрез ROC анализа получихме значима разлика само за стойностите на адипонектина (area under the curve = 0.702, SE =0.04, 95 % CI 0.625 – 0.780,  $p < 0.0001$ ), лептина (area under the curve = 0.827, SE =0.027, 95 % CI 0.774 – 0.880,  $p < 0.0001$ ) и апелина (area under the curve = 0.608, SE =0.048, 95 % CI 0.514 – 0.703,  $p < 0.028$ ), (фиг. 22). Използвайки стойност на адипонектина под 8.2  $\mu\text{g/ml}$ , ГЗД може да бъде отхвърлен със чувствителност 83.6 % и специфичност 56.6 %, а нива на лептина над 28.7  $\text{ng/ml}$  - с чувствителност 81.2 % и специфичност 64.2%.



Фигура 22. ROC крива на 1) лептин; 2) адипонектин и 3) апелин по време на бременност като предиктор за развитието на ГЗД

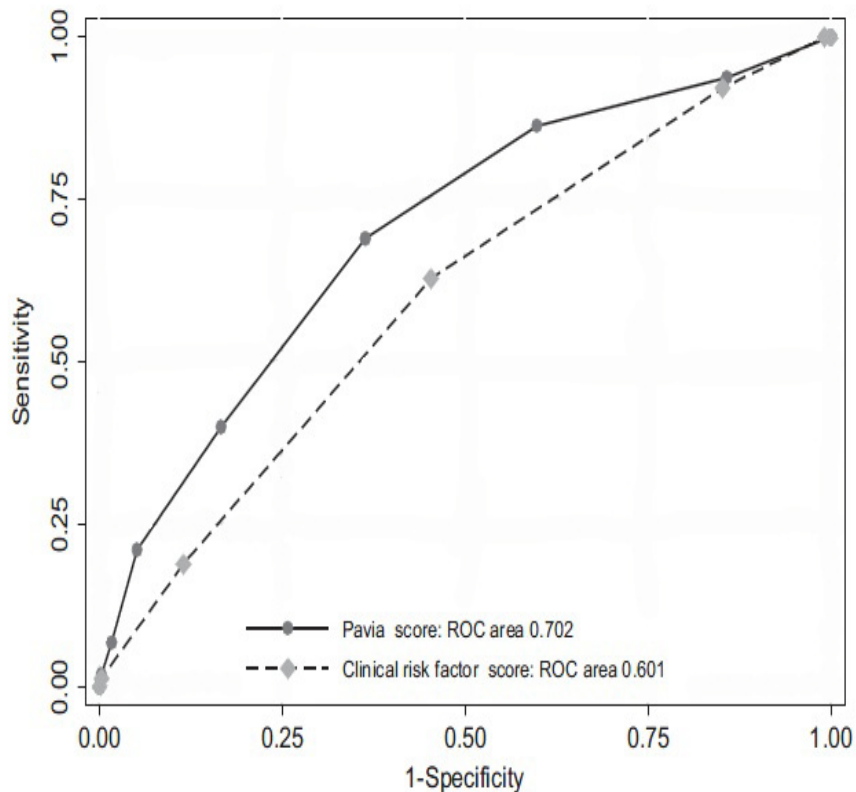
### VIII. РОЛЯ НА PAPP-A

Установихме значимо по-ниски стойности в нивото на коригирания PAPP-A в групата с ГЗД спрямо контролна група бременни жени ( $p < 0,0001$ ), (фиг. 23).



Фигура 23. Средни стойности на коригирания МоМ PAPP-A в групата с ГЗД и контролната група

Използвахме ROC анализа, даващ ниво на чувствителност и специфичност, за да оценим показателя PAPP-A като диагностичен метод. Площта под ROC кривата за определяне на диагнозата ГЗД е 0,702 (area under the curve=0.702, 95%CI 0.66 – 0.74,  $p < 0.0001$ ), (фиг. 24). Праговата стойност 0,7 МоМ PAPP-A може да изключи ГЗД с ниво на чувствителност 62,9% и специфичност 54,6%.



Фигура 24. ROC крива демонстрираща специфичност и чувствителност на PAPP-A

#### IX. АВТОАНТИТЕЛА, ОПРЕДЕЛЯЩИ ТИПА НА ЗАХАРНИЯ ДИАБЕТ

В групата на бременните жени с установен ГЗД бе проведено изследване на автоантителата, насочени към  $\beta$ -клетките на панкреаса, които са утвърдени маркери за автоимунен захарен диабет тип 1. На таблица 8 са представени демографската характеристика на изследваната група (n=130). Жените с ГЗД се различават от контролната група единствено по ИТМ ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ).

Таблица 8. Характеристика на бременните с ГЗД и контролната група бременни

	<b>ГЗД</b>	<b>Контроли</b>	<b>P</b>
Брой	90	40	
Възраст	29,6 ± 1,8	30,1 ± 1,2	-
Гестационна седмица	26,5 ± 4,8	26,1 ± 4,5	-
ИТМ (кг/м <sup>2</sup> )	27,2 ± 1,9	22,5 ± 1,3	0,001

Честотата на автоантителата към структури на  $\beta$ -клетката на панкреаса са представени в таблица 9. В 10% установихме наличие на едно или повече автоантитела. В контраст, в контролната група бременни жени не намерихме положителни автоантитела. При 9 от изследваните жени с ГЗД (10%) установихме наличие на едно положително автоантитяло. Честота на антителата е както следва - 4,4% имат анти-GAD-65, 4.4% имат анти-IA-2 и 3,3% имат IAA. Две от жените с ГЗД бяха позитивни за две автоантитела (GAD-65 + IA-2 и IA-2 + IAт). Други две жени с ГЗД, които по време на бременността имаха негативни автоантитела, развиха ЗД тип 1 след бременността.

Таблица 9. Честота на автоантителата в групата с ГЗД и контролната група.

<b>Автоантитела/ Проучвани лица</b>	<b>ГЗД N (%)</b>	<b>Контроли N (%)</b>	<b>P</b>
Анти-GAD-65	4 (4,4)	0 (0)	<0,001
Анти-IA-2	4 (4,4)	0 (0)	<0,001
IAA	3 (3,3)	0 (0)	<0,001
Общо	9 (10)	0 (0)	<0,001
С 2 Антитела	2 (2,2)	0 (0)	<0,001

На таблица 10 е представена характеристика на жените с ГЗД, разделени според наличието или отсъствието на антитела. Установихме значима разлика по отношение на теглото ( $p < 0,003$ ) и ИТМ ( $p < 0,004$ ) преди бременността, и възрастта ( $p < 0,0001$ ). Не

установихме значими разлики по отношение на необходимостта от инсулиново лечение за овладяване на хипергликемията и телесното тегло на новороденото.

Таблица 10. Характеристика на групата с ГЗД според антияло (+) или антияло (-).

	<b>ГЗД ААг (+)</b> <b>(n=9)</b>	<b>ГЗД ААг (-)</b> <b>(n=81)</b>	<b>P</b>
Възраст (г)	27,7 ± 1,7	31,5 ± 1,9	<0,0001
ИТМ преди бременността (кг/м <sup>2</sup> )	26,2 ± 2	28,2 ± 1,7	<0,004
Тегло преди бременността (кг)	74,8 ± 6,5	81,2 ± 5,8	<0,003
Инсулинова терапия	3 (33,3%)	12 (14.8%)	0,3
Тегло на плода (кг)	3,4 ± 0,3	3,6 ± 0,3	0,06

#### **Х. ГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ ЗА ОТКРИВАНЕ НА АСОЦИАЦИЯ МЕЖДУ ГЕСТАЦИОННИЯ ДИАБЕТ И ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ В КАНДИДАТ ГЕНИ**

Изследвахме асоциацията между ГЗД и едно-нуклеотидни полиморфизми в кандидат гени.

Данните от асоциативния анализ на всички 17 еднонуклеотидни полиморфизма в кандидат гените са представени на таблица 11. Статистически значима асоциация се наблюдава единствено за варианта rs266729 в адипонектиновия ген AdipoQ (p=0,0274). Редкият алел G, се среща по-често при здрави хора и очевидно има защитен ефект като намалява риска от появата на ГЗД (OR=0,64).

Таблица 11. Резултат от асоциативния анализ за всички включени в изследването SNP полиморфизми.

SNP	Рядък алел	Честота при болни	Честота при здрави	P	OR
rs780094	T	0,4577	0,5385	0,0655	0,7234
rs1801278	T	0,0625	0,05469	0,7067	1,152
rs1801282	G	0,15	0,1038	0,1139	1,523
rs266729	<b>G</b>	<b>0,2154</b>	<b>0,3</b>	<b>0,02739</b>	<b>0,6405</b>
rs2241766	G	0,1308	0,1	0,2722	1,354
rs1501299	T	0,3538	0,2846	0,09041	1,376
rs7756992	G	0,3411	0,2692	0,07574	1,405
rs1799884	T	0,2154	0,1962	0,5876	1,125
rs7799039	A	0,4419	0,4153	0,5465	1,114
rs1800450	T	0,1977	0,1385	0,07146	1,533
rs7903146	T	0,35	0,3654	0,7144	0,9352
rs290481	T	0,2385	0,1846	0,1328	1,383
rs689	A	0,2615	0,2326	0,4445	1,169
rs5219	T	0,3538	0,2962	0,1602	1,301
rs736118	T	0,05769	0,09231	0,134	0,602
rs9939609	A	0,4923	0,4385	0,2184	1,242
rs7501939	T	0,4385	0,4102	0,5154	1,123

Отклонение от закона на Харди-Вайнберг бе отчетено само за полиморфния вариант rs2241766, за който не се наблюдава статистически значима асоциация с болестта.

Наличието на статистически значима асоциация между G алела на rs266729 и ГЗД ни даде основание да анализираме от една страна генотипния ефект (генотипна асоциация) и от друга взаимодействието между този генетичен вариант и другите два полиморфизма в същия ген (хаплотипен анализ).

Таблица 12. Генотипен анализ за варианта rs266729 на гена AdipoQ.

SNP	Рядък алел	Чест алел	Модел	Ген. съотн. - болни	Ген. съотн. - контроли	Степен на свобода	P
rs266729	G	C	генотипен	6/44/80	14/50/66	2	0,0852
rs266729	G	C	доминантен	50/80	64/66	1	0,08015
rs266729	G	C	рецесивен	6/124	14/116	1	0,06262

Както може да се види от резултатите в таблица 12, анализът за асоциация показва, че няма статистически значима връзка между ГЗД и който и да е от трите генотипа (G/G, G/C и C/C). Това важи както за доминантния, така и за при рецесивен тип на унаследяване.

Въпреки, че анализа на данните от генотипирането за едно-нуклеотидните варианти rs2241766 и rs1501299 не показва наличие на значима асоциация на отделните алели и генотипи с ГЗД, хаплотипният анализ ни позволи да идентифицираме една комбинация от алели, която се среща по-често при здрави жени (табл. 13). Това бе хаплотипа GTG, който включва редкия алел на rs266729 и честите алели на rs2241766 и rs1501299 ( $p=0,0216$ ).

Таблица 13. Хаплотипен анализ за полиморфизмите rs266729, rs2241766 и rs1501299 в AdipoQ.

хаплотип	Честота при болни	Честота при здрави	P
GTT	0,01495	0,01973	0,6765
CTT	0,3389	0,2649	0,06605
GGG	0,01882	0,01471	0,7154
CGG	0,112	0,08529	0,3079
<b>GTG</b>	<b>0,1816</b>	<b>0,2656</b>	<b>0,02161</b>
CTG	0,3338	0,3498	0,6995

Проверихме и асоциациите на основни метаболитни характеристики и полиморфни варианти в кандидат гени.

Анализирахме асоциацията на едно-нуклеотидните полиморфизми в 7<sup>-те</sup> кандидат гена с количествените показатели ИТМ, ниво на глюкоза в кръв на гладно, серумен инсулин, адипонектин и лептин, както и НОМА IR (табл. 14). Установихме следните статистически значима асоциации: концентрация на глюкоза в кръвта на гладно с rs1800450 в MBL2 ( $p=0,00697$ ) и rs290481 в TCF7L2 ( $p=0.0258$ ); серумен инсулин с rs780094 в GSKR ( $p=0.00777$ ) и rs7903146 в TCF7L2 ( $p=0,009868$ ); серумен лептин с rs689 в INS ( $p=0,00577$ ) и rs9939609 в FTO ( $p=0.017$ ) и НОМА IR и rs780094 в GSKR ( $p=0,00629$ ).

В Таблица 16 са представени стойностите за отделните количествени показатели при трите генотипа за всеки от полиморфните варианти.

Таблица 14. Генотипен асоциативен анализ за количествени показатели

SNP	Биохимичен показател			
	Кръвна захар			
rs1800450	генотип	Т/Т	Т/С	С/С
	брой хора	11	61	170
	генотипна честота	0,04545	0,2521	0,7025
	средни нива в серум	5,488	5,278	4,989
	С.О.	1,111	1,019	0,7945
rs290481	генотип	Т/Т	Т/С	С/С
	брой хора	11	82	150
	генотипна честота	0,04527	0,3374	0,6173
	средни нива в серум	5,293	5,245	4,983
	С.О.	0,8896	0,9664	0,8164
	серумен инсулин			

<b>rs780094</b>	<b>генотип</b>	<b>T/T</b>	<b>T/C</b>	<b>C/C</b>
	<b>брой хора</b>	63	116	63
	<b>генотипна честота</b>	0,2603	0,4793	0,2603
	<b>средни нива в серум</b>	12,51	11,94	17,13
	<b>С.О.</b>	7,633	7,82	13,45
<b>rs7903146</b>	<b>генотип</b>	<b>T/T</b>	<b>T/C</b>	<b>C/C</b>
	<b>брой хора</b>	35	104	103
	<b>генотипна честота</b>	0,1446	0,4298	0,4256
	<b>средни нива в серум</b>	16,2	14,21	11,72
	<b>С.О.</b>	14,9	9,474	7,418
<b>Серумен лептин</b>				
<b>rs689</b>	<b>генотип</b>	<b>A/A</b>	<b>A/T</b>	<b>T/T</b>
	<b>брой хора</b>	8	53	92
	<b>генотипна честота</b>	0,05229	0,3464	0,6013
	<b>средни нива в серум</b>	42,43	34,66	25,2
	<b>С.О.</b>	32,72	26,56	21,29
<b>rs9939609</b>	<b>генотип</b>	<b>A/A</b>	<b>A/T</b>	<b>T/T</b>
	<b>брой хора</b>	36	70	47
	<b>генотипна честота</b>	0,2353	0,4575	0,3072
	<b>средни нива в серум</b>	39,85	26,09	26,25
	<b>С.О.</b>	26,23	22,02	24,31
<b>НОМА IR</b>				
<b>rs780094</b>	<b>генотип</b>	<b>T/T</b>	<b>T/C</b>	<b>C/C</b>

	<b>брой хора</b>	63	116	63
	<b>генотипна честота</b>	0,2603	0,4793	0,2603
	<b>средни стойности на индекса</b>	2,895	2,832	4,13
	<b>С.О.</b>	1,911	2,294	3,258

**Легенда за таблиците:** SNP – еднонуклеотиден полиморфизъм; честота при болни/здрави – честота на редък алел/хаплотип при болни/здрави; ген. съотн. – съотношения в генотипите, съответно редък/редък, редък/чест и чест/чест алел; С.О. – стандартно отклонение.

#### **XI. ПРОСЛЕДЯВАНЕ НА ПЛОДА – ЕХОГРАФСКИ ПОКАЗАТЕЛИ, МЕТОД НА РОДОРАЗРЕШЕНИЕ И ТЕГЛО НА НОВОРОДЕНОТО**

На таблица 15 са представени средните стойности на теглото на новороденото, ехографското съотношение на обиколка на главата на плода спрямо обиколката на корема (НС/АС) и пондералния индекс при жените с ГЗД и контролната група според различните критерии. Статистически значими разлики установихме в теглото на новороденото само, когато са използвани критериите на IADPSG ( $p < 0,036$ ), (фиг. 25), ADA ( $p < 0,04$ ) и CDA ( $p < 0,03$ ). Не установихме статистически значими разлики по отношение на НС/АС, независимо кои от диагностичните критерии са използвани. Значими по-ниски бяха стойностите на пондералния индекс само при използване на критериите на ADA ( $p < 0,04$ ) и CDA ( $p < 0,02$ ).

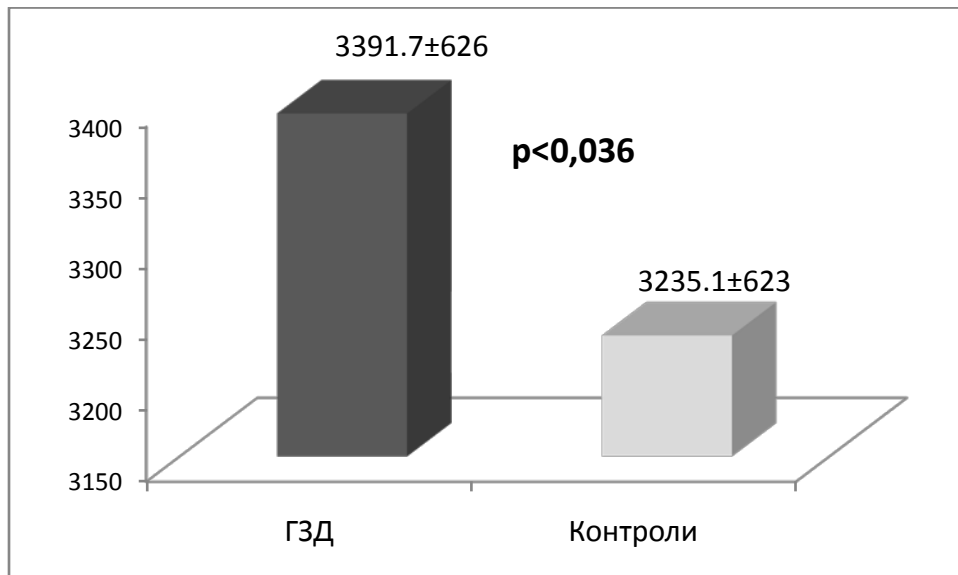
Таблица 15. Средни стойности на теглото на новороденото, НС/АС съотношението и пондералния индекс при жени с ГЗД и контролна група бременни според използваните критерии.

Критерии	Тип	Тегло на новороденото	ρ	НС/ АС	ρ	Пондерален индекс	ρ
<b>IADPSG</b>	ГЗД	3391,7±626.2	<b>0.036</b>	1.08±0.25	0.08	2.61±0.31	0.17
	Контроли	3235.1±623.2		1.13±0.37		2.57±0.27	
<b>ADA</b>	ГЗД	3351.1±849.1	<b>0.04</b>	1.01±0.34	0.55	2.65±0.33	<b>0.04</b>
	Контроли	3244.0±617.1		1.13±0.33		2.57±0.27	
<b>WHO</b>	ГЗД	3280.2±811.4	0.27	1.07±0.28	0.4	2.59±0.33	0.247
	Контроли	3251.6±618.6		1.12±0.35		2.58±0.27	
<b>CDA</b>	ГЗД	3407.6±798.5	<b>0.03</b>	1.00±0.33	0.052	2.67±0.34	<b>0.02</b>
	Контроли	3237.9±630.8		1.13±0.33		2.57±0.27	
<b>EASD</b>	ГЗД	3353.9±835.3	0.1	1.07±0.24	0.53	2.63±0.24	0.24
	Контроли	3243.3±627.9		1.12±0.34		2.58±0.27	
<b>ADIPS</b>	ГЗД	3320.3±762.9	0.25	1.08±0.24	0.4	2.61±0.31	0.25
	Контроли	3239.5±624.4		1.12±0.35		2.57±0.27	
<b>NZSSD</b>	ГЗД	3341.4±782.0	0.08	1.09±0.23	0.29	2.62±0.32	0.29
	Контроли	3238.6±625.9		1.12±0.35		2.58±0.27	

Честотата на макрозомия се повишава значимо само при използването на IADPSG критериите ( $p < 0,02$ ) и ADA ( $p < 0,01$ ), (табл. 16). Всеки един от критериите предсказва значимо по-висока честота на проведено Цезарово сечение като метод на родоразрешение.

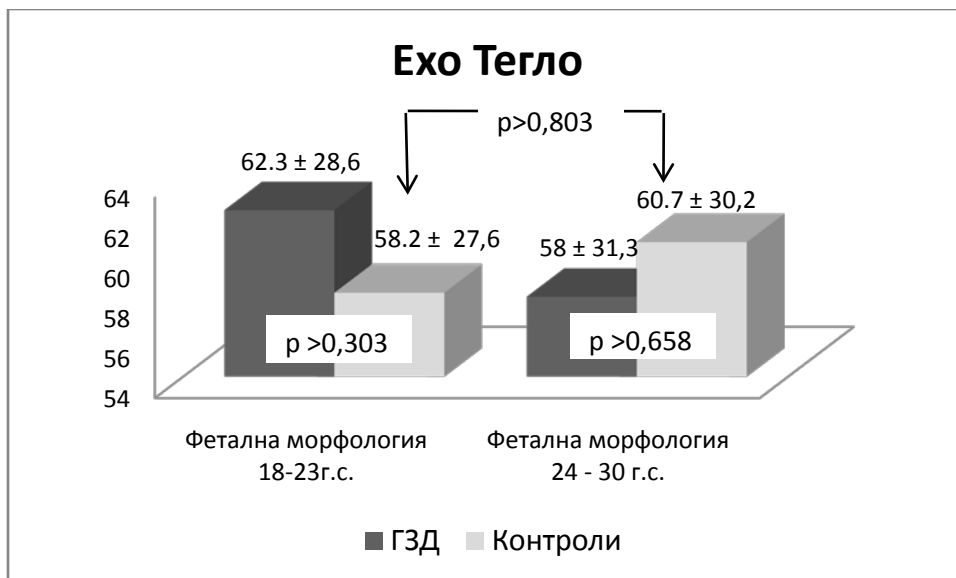
Таблица 16. OR за макрозомия и проведено Цезарово сечение като метод на родоразрешение според различните критерии.

	Макрозомия			Честота на проведено Цезарово сечение		
	Odds ratio	95% CI	P	Odds ratio	95% CI	P
IADPSG	2.289	0.734 - 6.255	<b>0.02</b>	1.808	1.149 - 2.844	<b>0.01</b>
ADA	2.357	0.766 - 7.255	<b>0.01</b>	3.487	1.741 - 6.981	<b>0.000</b>
WHO	1.575	0.531 - 4.673	0.374	2.127	1.197 - 3.778	<b>0.01</b>
CDA	1.674	0.432 - 6.480	0.434	3.236	1.563 - 6.697	<b>0.001</b>
EASD	0.82	0.175 - 3.849	1	2.254	1.128 - 4.507	<b>0.025</b>
ADIPS	1.392	0.508 - 3.815	0.583	2.133	1.250 - 3.637	<b>0.005</b>
NZSSD	1.575	0.531 - 4.673	0.374	2.261	1.260 - 4.055	<b>0.006</b>

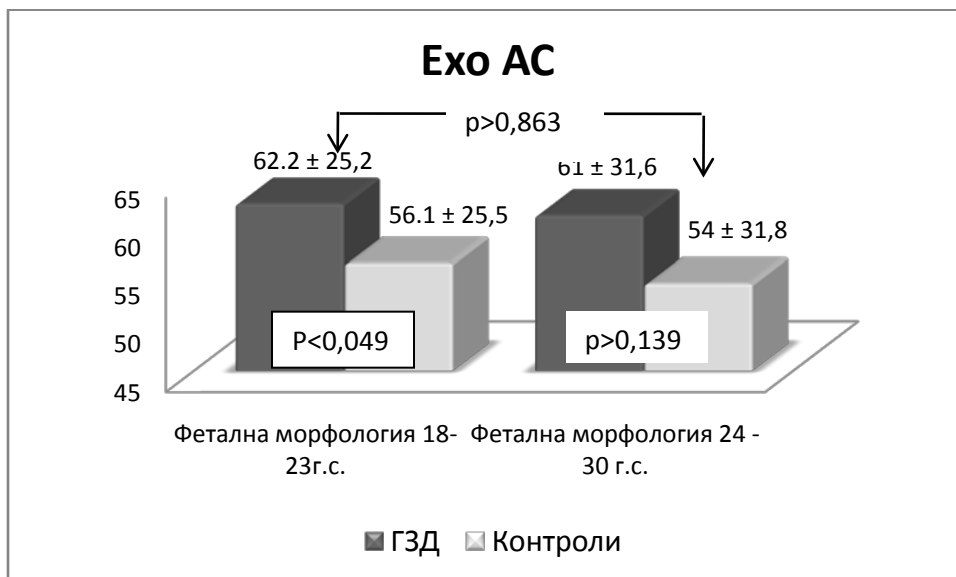


Фигура 25. Средни стойности на теглото на новороденото (грам) в групата с ГЗД и контролна група бременни жени

На фигура 26 е представено ехографското тегло на плода в персентили, измерено в 18-23г.с. и 24-30г.с. Не установихме статистически значими разлики между групата с ГЗД и контролната група. Не установихме значимост и по отношение на ехографския показател за измерване на коремна обиколка при жените с ГЗД и контролната група (фиг. 27).



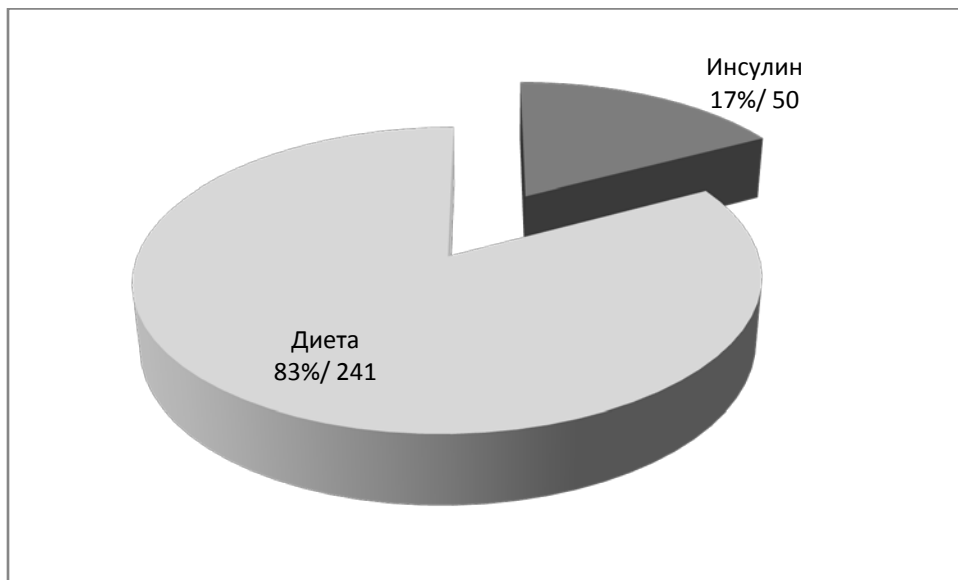
Фигура 26. Тегло на плода, представено в персентили според гестационната възраст при жени с ГЗД и контролна група бременни жени



Фигура 27. Коремна обиколка на плода, представено в персентили според гестационната възраст при жени с ГЗД и контролната група бременни жени

## ХІІ. ЛЕЧЕНИЕ НА ГЗД

Лечението на ГЗД включваше основно диета – 83% от случаите (Фиг. 28).



Фигура 28. Процентно разпределение на вида използван инсулин за лечение на ГЗД.

В останалите случаи бе проведено инсулиново лечение, като процентното използване на инсулин бе следното: NPH инсулина 82% (n=41), актрапид 61% (n=34), новорапид 33% (n=17) и хумалог 2% (n=4). NPH инсулин бе използван самостоятелно или в комбинация с останалите бързодействащи инсулини.

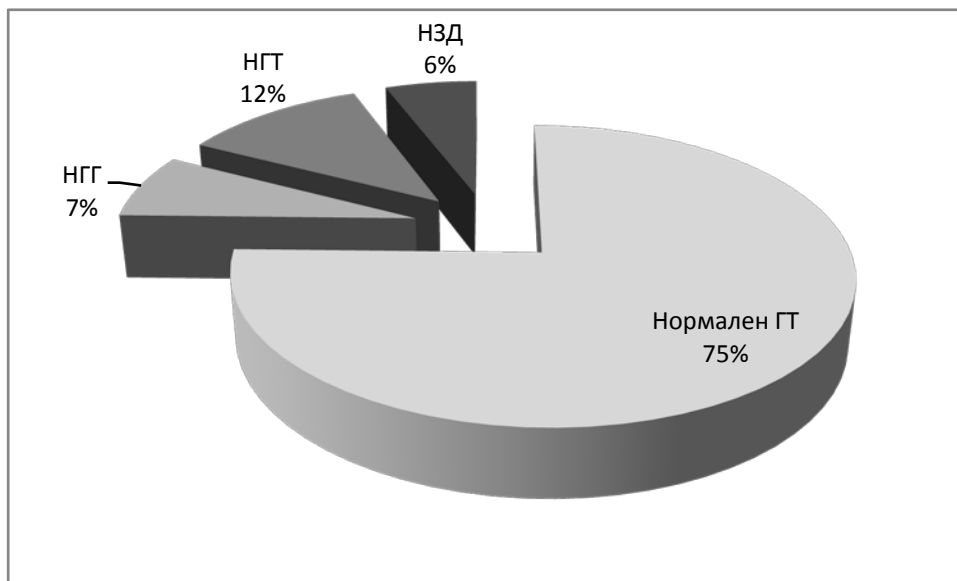
За нуждата от приложение на инсулин в случаите с ГЗД са възрастта, особено над 35 години, родственик със ЗД, поставяне на диагноза ГЗД преди 10 и между 10-20г.с., както и наличието на наднормено телесно тегло и затлъстяване преди бременността (табл. 17).

Таблица 17. Предиктивни фактори за необходимост от приложението на инсулин при пациентки с ГЗД (логистичен регресионен анализ)

Показател	OR	95% CI	P
Възраст			
30-35г.	<b>1,033</b>	<b>1,001 – 1,059</b>	<b>0,045</b>
>35г.	<b>2,65</b>	<b>2,035 – 3,445</b>	<b>0,0001</b>
Родственик със захарен диабет	<b>1,568</b>	<b>1,062 – 1,986</b>	<b>0,036</b>
Диагностициране на ГЗД			
<10г.с.	<b>3,493</b>	<b>1,963 – 5,896</b>	<b>0,0001</b>
10-20г.с.	<b>2,933</b>	<b>2,311 – 4,307</b>	<b>0,0001</b>
21-28г.с.	1,152	0,915 – 1,549	0,089
>28г.с.	0,895	0,678 – 1,045	0,253
ИТМ преди бременността			
<25кг/м <sup>2</sup>	0,949	0,756 – 1,354	0,967
25-30 кг/м <sup>2</sup>	<b>1,45</b>	<b>1,008 – 2,156</b>	<b>0,048</b>
>30кг/м <sup>2</sup>	<b>2,412</b>	<b>1,319 – 4,986</b>	<b>0,001</b>

### XIII. ПРОСПЕКТИВНО ПРОУЧВАНЕ

Проучването бе проведено 6 до 12 седмици след приключване на бременността при 100 жени с бременност, протекла с ГЗД. За оценка на глюкозния толеранс използвахме провеждането на повторно ОГТТ. При 6 (6%) от жените с ГЗД се установиха данни за новоизявен ЗД, 7 жени (7%) - НГГ, 12 (12%) - НГТ и при 4 (5%) - комбиниран НГГ и НГГ ), (фиг. 29).



Фигура 29. Разпределение на жените провели ОГТТ 6-12 седмици след приключване на бременността според въглехидратната обмяна

## VIII. ОБСЪЖДАНЕ

### I. ЧЕСТОТА, ИЗБОР НА ДИАГНОСТИЧНИ КРИТЕРИИ, РОЛЯТА НА КРЪВНАТА ЗАХАР НА ГЛАДНО И НЬА1с

#### 1. Честота на ГЗД

Застаряващото население, урбанизацията, намалената физическа активност, наднорменото телесно тегло, затлъстяването и стресовия начин на живот са рискови фактори, които водят до епидемия от предиабет и ЗД. Честотата на ГЗД прогресивно нараства в световен мащаб [92] паралелно с нарастване на честотата на затлъстяването и ЗД тип 2 [49]. Нарастващото значение на ГЗД се определя и от влиянието на майчината хипергликемия върху перинаталната болестност и смъртност.

Честотата на ГЗД сред неселектирана група бременни варира от 1.4% до 17% в световен мащаб и зависи от изследваната етническа популация [268, 321]. Резултатите от проучването НАРО показват 17,8% честота на ГЗД [205]. Индийската популация има 11 пъти по-висок риск от развитие на ГЗД спрямо европейската раса [274]. Резултатите от нашето проучване сред рискова група бременни показаха най-висока честота на ГЗД – 29,1%, използвайки критериите на IADPSG, а най-ниска – 10,8% и 10.9% според критериите на EASD и CDA (фиг. 3). Подобно на нашето проучване върху рискова група бременни жени е проведено само едно проучване в Холандия [16]. Използвайки критериите на WHO, получената от тях честота на ГЗД от 24,2% е малко по-висока от нашата – 17.1%. Това показва, че ако бъдат приложени критериите на IADPSG преизчислената честота ще бъде дори по-висока от установената в нашата селектирана популация. Липсата на повече данни относно честотата сред рискова група бременни се дължи най-вероятно на факта, че повечето развити държави имат изградена здравна политика за провеждане на масов скрининг за ГЗД.

Установихме честота на ГЗД 45% (45) сред бременни жени, при които бременността е настъпила чрез IVF или ICSI (фиг. 5). В тази група са отстранени бременните, при които

процедурата е била необходима поради наличието на мъжки стерилитет. Сходни резултати се потвърждават и в световната литература [271]. В контраст, при проучване с над хиляда бременни, Farhi и колектив не установяват по-висок процент на жените с ГЗД след IVF/ICSI [88]. Установеният от нас висок процент най-вероятно се дължи на наличието на повече рискови фактори за развитие на ГЗД, но най-вероятно и в резултат на проведената хормонална стимулация.

Разпределението на жените с ГЗД е представено на фигура 6. Основният процент от бременни са изследвани в периода 24-28 гестационна седмици и по-малък процент в по-ранна или съответно по-късна седмица. Обяснението за проведеня по-ранен скрининг е поради наличието на повече от 3 рискови фактори при съответната бременна жена. Когато са налице рискови фактори, повечето международни препоръки съветват провеждането на скрининг за ГЗД още при установяването на бременността [73, 205].

Макар в определението за ГЗД да се включва всяко нарушение във въглехидратната обмяна, според препоръките на IADPSG, бременните, чиито стойности на кръвната захар на гладно и в хода на проведения ОГТТ отговарят на критериите за поставяне на диагноза ЗД трябва да бъдат смятани не като ГЗД, а като неразпознат ЗД преди бременността [205]. Нашите резултати сочат, че 10% (29) от жените с ГЗД би трябвало да бъдат пречислени към жените със ЗД преди бременността (фиг. 4). Сходни са и резултатите от проучването НАРО [205].

Използвайки международните критерии установихме, че 75% от изследваната популация жени с ГЗД биха били диагностицирани само по кръвната захар на гладно. Стойността на кръвната захар на 1-ви час в хода на ОГТТ ще диагностицира допълнително още 18.2% от бременните жени към тази категория, а добавянето на стойността от 3-ти час още 6,4%. Петдесет процента (50%) от жените с ГЗД са имали само една завишена стойност (КЗГ, на 1-ви или 2-ри час в хода на ОГТТ), 27.5% са имали две завишени стойности и 22.5% - три. Въпреки големият процент на случаи с диагностициран ГЗД само по кръвната захар на гладно, НАРО проучването доказва, че идентифицирането на всеки един допълнителен случай с ГЗД ще намали риска от майчини и фетални усложнения [205].

## 2. Избор на диагностични критерии

Както по света, така и в България липсват единни критерии за диагноза на ГЗД. Преди да бъдат публикувани резултатите от HAPO проучването и представени IADPSG критериите, някои центрове в България използваха критериите на ADA, други критериите на WHO. Неуспорим е факта, че след публикуването на резултатите, голям брой държави в момента адаптират новите критерии на IADPSG за поставяне на диагноза ГЗД [205]. Съответно, при прилагането на тези критерии спрямо които и да е други за диагноза, честотата на ГЗД нараства значимо. Нашите резултати сочат, че честотата на ГЗД варира от 10.8 до 29.1% според различните диагностични критерии (фиг. 3). Въпреки, че проучването е проведено сред рискова група бременни тази честота остава висока. Прилагането на критериите на IADPSG доведе до най-висока честота на ГЗД – 29.1%. Тя е 1,5 до 2,2 пъти по-голяма спрямо честотата, установена чрез критериите на другите асоциации, установяващи висока такава - тези на ADIPS и ADA. Нашите резултати също така показват, че прилагането на IADPSG критериите води до диагностициране на всички случаи с ГЗД, които биха били определени като такива според останалите критерии (табл. 3). Ще бъдат пропуснати само 13 случая (7,3%), диагностицирани като ГЗД според критериите на WHO, което се дължи на факта, че тези критерии поставят диагноза ГЗД при стойност на кръвната захар на 120 минута в хода на ОГТТ  $\geq 7,8$  ммол/л, докато IADPSG  $\geq 8,5$  ммол/л.

При сравнителния анализ на останалите двойки критерии, дялът на недиагностицираните случаи достига до 18.4%. (табл. 4). Сходно проучване е проведено от Agarwal и колектив преди въвеждането на IADPSG критериите, като резултатите са сходни на установените от нас (2005г) [12]. Повечето проучвания сравняват 2 вида критерия за поставяне на диагноза, а включването на повече видове критерии увеличава вариабилитета и честотата на ГЗД. От друга страна сравняване на повече критерии би било трудно, защото има разлики и в използвания диагностичен метод (50, 75 или 100 грама глюкоза за ОГТТ). Адаптирането на IADPSG критериите от повечето държави ще доведе до заличаване на разликите по отношение на диагнозата. През януари 2011г в

своите годишни препоръки за ЗД ADA адаптира IADPSG критериите, докато WHO все още ги обсъжда.

Налице са някои големи разлики в стойностите на кръвната захар, необходими за диагноза между отделните критерии. До момента, WHO използва същите стойности на кръвната захар за диагноза на ГЗД, каквито са и за пациенти със нарушения в глюкозния толеранс. Добре е известно от редица проучвания, че референтните стойности на кръвната захар извън бременността не могат да се прилагат по време на бременност [14]. Критериите на NZSSD са по-рестриктивни спрямо тези на ADIPS, защото ще установят по-малък процент на жени с ГЗД, но пък спестяват повече финансови ресурси [60]. Макар критериите на CDA да са съвсем сходни на тези на ADA, те също идентифицират по-малък брой случаи с ГЗД. Праговите стойности на кръвната захар за поставяне на диагноза ГЗД според критериите на ADA са приложими, както при ОГТТ със 75, така и със 100 грама глюкоза. Изследването може да бъде проведено до 120 или 180 минута, но липсата на комплайенс от страна на бременните довежда до провеждането на ОГТТ само до 120 минута [73].

В основата на проучването НАРО стои нуждата от уточняване на риска от неблагоприятен изход от бременността в резултат на майчината хипергликемия по-ниска от тази, наблюдавана при жени със ЗД преди бременността [205]. По-ниските стойности на кръвната захар за поставяне на диагноза ГЗД според IADPSG критериите са предложени на базата на доказана линейна зависимост между нея и увеличаване на теглото на новородено >90 персентил, С-пептида от пъпна връв и мастната тъкан. При използването на ADA критериите, преди въвеждането на IADPSG критериите, сме пропуснали 125 случая на ГЗД, при които установихме 14% честота на макрозомия. Въпреки това, както чрез ADA така и чрез IADPSG доказахме по-висока честота на макрозомия и нужда от приложение на Цезарово сечение като метод на родоразрешение при жените с ГЗД (табл. 16).

При избора на диагностичен критерии, оценихме и ехографските показатели обиколка на главата/ корема, теглото на новороденото, пондералния индекс и метода на родоразрешение (табл. 15-16). Пондералният индекс е често използван индекс за оценка на степента на обезитет при плода [46]. Подобно на ИТМ, той отговаря само за малка част

(15%) от вариантите за натрупване на мастна тъкан при новороденото. Ние установихме значими разлики по отношение на теглото на новородените между двете групи бременни, когато са използвани критериите на IADPSG, ADA и CDA (табл. 15). Ехографията на плода също е основен метод за определяне на отклоненията от нормата при бременните жени. Използва се във всеки един от отделните триместри и предлага безценна информация относно развитието на плода – гестационна възраст, анатомичните структури и др. При анализа на съотношението HC/AC, което е често намалено при пациентки с ГЗД и ЗД, също не установихме значими разлики (табл. 15, фиг. 26-27). Може би по-задълбочен анализ е необходим за оценка на ехографските показатели при ГЗД. Само използвайки критериите на ADA и IADPSG установиха увеличена честота на макрозомия и честота на прилаганото Цезарово сечение като метод на родоразрешение макар всички жени с ГЗД да са преминали през обучение относно своето състояние.

Удвояването на честотата на ГЗД при използването на IADPSG критериите поставя въпроса за свръхдиагностиката и свързаните с това допълнителни прегледи и изследвания. Има някои положителни и отрицателни страни на тези критерии. Високият процент на случаи може да доведе до множество антенатални прегледи с нужда от повече лабораторни изследвания, но от друга страна е полезен с оглед дълготрайната прогноза за намаляване на честотата на ЗД на по-късен етап от живота. Според прогнозите на Zimmer и Alberty (2001г), честотата на ЗД тип 2 ще достигне до 365 милиона души през 2030г.

Препоръките за ГЗД имат множество недостатъци - те често са разработени от недостатъчно голям брой данни, често са резултат от експертно мнение, понякога продиктувани от икономически цели, а понякога и ориентирани към удобството [158]. На базата на нашите резултати, ние доказахме, че IADPSG имат най-добра диагностична стойност, обхващайки най-голям брой пациентки и пропускащи да диагностицират ГЗД само в единични случаи. Те установяват най-голям процент на макрозомия на плода и необходимостта на Цезарово сечение.

### 3. Място на кръвната захар на гладно

Масовият скрининг за ГЗД ще идентифицира по-голям брой жени спрямо скрининга само сред рисковата група бременни [252]. Въпреки това, според Jensen и колектив, провеждането на скрининг за ГЗД само сред рисковата група бременни е също толкова ефективен, колкото и универсалния. Тези му изводи се базират на факта, че нарушенията в глюкозния толеранс, които са пропуснати поради липса на рискови фактори за развитие на състоянието, не са били толкова чести спрямо тези, установени при жени с наличие на такива [150]. В тази връзка, резултати от скоро проведено проучване, оценяващо влиянието на критериите на WHO и IADPSG, показва, че масовия скрининг, последван от специфично лечение, има само минимално въздействие върху изхода от бременността [87]. Тези данни еднопосочно показват, че при липса на здравно финансиране е необходимо да се търсят евтини и достъпни методи за диагностициране на ГЗД. Макар според критериите на IADPSG [205] да се препоръчва масов скрининг, провеждането на ОГТТ при всички бременни ще натовари значимо здравната система и лабораториите.

Стойността на еднократното измерената кръвна захар на гладно може да насочи към нуждата от провеждане на ОГТТ [10]. Ние доказахме, че жените със стойности на КЗГ  $\geq 5.1$  ммол/л могат да бъдат определени като ГЗД, поради високата специфичност 100% на IADPSG критериите (табл. 4). При тях теоретично не е необходимо да се проведе ОГТТ. Въпреки това, ОГТТ има смисъл за пълно и по-точно потвърждаване на диагнозата. Доказахме още висока чувствителност на тези критерии за изключване на ГЗД при стойности на КЗГ  $\leq 4.4$  ммол/л. Само 4,8% от бременните жени при тези стойности остават погрешно определени като здрави, при липса на проведено ОГТТ. Според НАРО проучването, рискът от усложнения за фетуса и новороденото е много нисък, когато КЗГ е под 4.4 ммол/л [205]. На базата на получените от нас резултати можем да кажем, че въвеждането на тези критерии в клиничната практика ще намали нуждата от провеждането на ОГТТ при 51.3% от всички бременни жени или поне при 28% (КЗГ  $< 4.4$  ммол/л). Това би имало голямо икономическо значение и ще намали разходите по

скрининг за ГЗД. Въз основа на посочените резултати предлагаме определяне на КЗГ като първа стъпка и ориентир за провеждането на ОГТТ.

## **1. Показатели за гликемичен контрол – HbA1c**

За разлика от ЗД, където HbA1c се използва като рутинен диагностичен показател, то при ГЗД неговата роля не е доказана. Стойностите на HbA1c по време на бременността е засегната от скъсения полуживот на еритроцитите и релативната анемия в резултат на хемодилуцията [231].

Данните от редица проучвания и метаанализи показват наличието на значима и независима връзка между нивата на HbA1c и честотата на ГЗД, която се простира и в диапазона от стойности на показателя под характерните за захарния диабет [11, 213]. В настоящето проучване установихме значимо по-високи нива на HbA1c в групата с ГЗД спрямо контролната група ( фиг. 7). Тези стойности са значимо по-ниски спрямо описаните в литературата данни при пациенти с новодиагностициран ЗД. Поради тази причина е необходимо определянето на отделна прагова стойност на HbA1c за диагностициране на ГЗД и използването ѝ като средство за скрининг при нарушенията в глюкозния толеранс по време на бременност. Чрез построяването на ROC крива, даващата нивото на специфичност и чувствителност се определя способността на даден показател да бъде използван като диагностичен маркер. Площта под ROC кривата за определяне на диагнозата ГЗД е 0,802 и при прагова стойност  $\geq 6,0\%$  чувствителността е 36,36%, а специфичността 93,27% (фиг. 8). Съчетание на оптимална чувствителност (64,7%) и специфичност (62%) доказахме при прагова стойност на HbA1c  $\geq 5.6\%$ . При тази стойност, обаче в около 1/3 от случаите получихме фалшиво негативни, а в друга 1/3 фалшиво позитивни резултати. При стойност на HbA1c  $\geq 5.0\%$  само 8 жени (2,7%), които имат ГЗД, няма да бъдат диагностицирани. Чувствителността на теста е 95.7%. Литературните данни сочат, че при тези жени, които ще останат недиагностицирани, рискът за развитие на неблагоприятен изход от бременността е минимален [15]. Следователно, жените, които попадат в интервала 5-6% за HbA1c трябва да проведат ОГТТ. Mathiesen и колектив

установяват прагова стойност на HbA1c 5.6%, като според тях над тези стойности се наблюдава 3-кратно увеличен риск от макрозомия на плода и 6-кратно по-висок риск от неонатална хипогликемия [208]. Подобно на посочените резултати, Rajput и колектив установяват сходни стойности на HbA1c (5,95%) за поставяне на диагноза ГЗД и съчетание на оптимална чувствителност и специфичност при HbA1c 5,45% [244]. От друга страна, установихме значима положителна връзка между HbA1c и плазмената кръвна захар на гладно, както и на 120 минута в хода на ОГТТ. Тези данни сочат, че двата метода се допълват. Подобни резултати се установяват и при голям брой проучвания, чиято основна цел е определянето на праговата стойност на HbA1c при предиабетните състояния (нарушена гликемия на гладно и/или нарушен глюкозен толеранс) [262]. За българската популация Танкова и колектив установяват съчетание на оптимална чувствителност и специфичност при прагова стойност за предиабетните състояния 5.5%, а за поставяне на диагноза ЗД 6.1% [298]. Тези данни ни дават основание да предполагаваме, че ГЗД с право би могъл да се разглежда като едно предиабетно състояние, подобно на НГГ и НГТ.

Считаме, че самостоятелното използване на HbA1c не може да бъде препоръчан за поставяне на диагнозата ГЗД. При стойности на HbA1c между 5-6% трябва да се проведе ОГТТ. Налице са редица фактори, които правят HbA1c неблагоприятен маркер за скрининг за ГЗД, част от които са: скъсения полуживот на еритроцитите, релативната анемия в резултат на хемодилуцията, гестационната седмица, в която се изследва, наличието на често срещана желязо-дефицитна анемия. Въпреки това, резултатите подкрепят становището, че измерването на HbA1c има място в цялостната оценка на ГЗД и индикира наличието на повишен риск от бъдещо развитие на ЗД [73].

## **II. АНАЛИЗ НА РИСКОВИТЕ ФАКТОРИ ЗА РАЗВИТИЕ НА ГЗД**

Настоящите препоръки на IADPSG, базирани на HAPO проучването доказваха връзката между нивата на майчината хипергликемия и риска за майчино-фетални усложнения.[205] Редица страни в Европа и света коментират нуждата от провеждането на масов скрининг за ГЗД сред бременните жени. Повечето държави в Европа

препоръчват измерването на кръвната захар на гладно още при диагностицирането на бременността с идентифицирането на жените с диабет преди бременността [314]. Ако няма данни за хипергликемия в ранните срокове на бременността се препоръчва провеждането на скрининг в 24 – 28 гестационни седмици при жените с рискови фактори за развитието на това състояние. В нашето проучване оценихме значението на основните рискови фактори за ГЗД сред българките. В таблица 6 е представен проведения логистичен регресионен анализ и отношението на шансовете според различните рискови фактори.

## **1. Демографски рискови фактори**

### *Възраст*

Бременните жени бяха разделени в няколко възрастови групи (<29, 30-34 и >35 годишна възраст) като анализирахме риска за развитие на ГЗД (табл. 6). Доказахме, че бременните жени на възраст между 30-34 имат 2,245 пъти по-висок риск за развитие на ГЗД спрямо възраст <29 години. Този риск се запазва и при възраст >35 години. Подобни резултати са установени и от други колективи [281]. Една от вероятните причини е влошаването на инсулиновата секреция и намаляване на инсулиновата чувствителност с възрастта [22]. Трябва да се подчертае, че изследвания контингент бременни имат рискови фактори за развитие на ГЗД. Повечето от тях имат висок ИТМ преди бременността, което предполага голям процент на висцерална мастна тъкан. Въпреки тези данни за значимо по-висок риск за развитие на ГЗД над 30 годишна възраст, не трябва да бъдат пренебрегвани и жените под тази възраст, тъй като голям процент от тях имат и други рискови фактори. При отсъствие обаче на други рискови фактори, възрастта трябва да бъде ориентир за целенасочено търсене на ГЗД. Резултатите ни показват също, че възрастта е рисков фактор и нуждата от инсулиново лечение при пациентките с ГЗД (табл. 17).

## **2. Анамнестични рискови фактори**

### *Фамилна обремененост от захарен диабет*

Фамилната обремененост от захарен диабет е един от най-добре проучените рискови фактори за развитие на ЗД 2 в потомството [73]. Нашите резултати показват 1,394 пъти по-висок риск за развитие на ГЗД при наличие на родственик със ЗД тип 2. Разгледани поотделно - 1.5 пъти е по-висок риск при бременни с първостепенен родственик със ЗД тип 2 и 1,1 пъти по-висок риск при второстепенен родственик (табл. 6). Рискът се увеличава с 2,253 пъти при жените с първостепенен и второстепенен родственик със ЗД тип 2. Танкова и колектив също установяват значимо повишение на риска за развитие на предиабет и ЗД тип 2 при пациентите с фамилна обремененост [299]. Това отговаря на резултатите при бременните жени. При анамнеза за родственик със ЗД е необходимо провеждане на ОГТТ. Големи проучвания са установили, че риска за развитие на ЗД тип 2 е петкратно по-висок при лица, които имат първостепенен родственик със заболяването [73]. Наличието на родственик със ЗД определя задължително нуждата от провеждане на ОГТТ.

### *Предшестващи отклонения във въглехидратната обмяна*

Жените, които са имали данни за отклонения в нивото на кръвната захар и/ или инсулинова резистентност са по-склонни и сами търсещи провеждането на ОГТТ по време на бременност. Често лицата, при които се установява предиабет или ЗД имат в миналото регистрирано отклонение във въглехидратната обмяна [82]. Случайно установена по-висока стойност на кръвната захар на гладно увеличава риска за ГЗД с до 3,883 пъти (табл. 6). Това също съпада с резултатите на Танкова и колектив за по-висок риск за развитие на предиабет и ЗД сред рисков контингент [298]. Ние препоръчваме, независимо на каква възраст е установено отклонението в нивото на кръвната захар, то изисква периодично проследяване, тъй като създава риск и за бъдещи въглехидратни нарушения по време и след бременността.

### *Синдром на поликистозните яйчници*

Синдрома на поликистозните яйчници е едно от най-честите ендокринни заболявания при жените в репродуктивна възраст. Литературни данни показват, че СПКЯ води до стерилитет, а при бременните жени с такава анамнеза е по-висока честотата на спонтанни аборти, ГЗД, гестационна хипертония и прееклампсия [35]. Рискът за развитие на ГЗД при тези пациентки се свързва най-често с ИР, която стои в патогенезата на СПКЯ. Ние установихме 1,202 пъти по-висок риск за развитие на ГЗД, но не доказахме статистическа значимост (табл. 6). Данните в литературата са противоречиви, като повечето автори установяват значимост по отношение на СПКЯ [35]. Други автори, не установяват връзка между анамнезата за СПКЯ и развитието на ГЗД [271]. От друга страна, процентът на жените с анамнеза, които имат нужда от асистирана репродукция непрекъснато нараства, а жените след IVF/ICSI имат 2,123 пъти по-голям риск за развитие на ГЗД. Сходни резултати публикуват и Sebastiani и колектив [271].

#### *Репродуктивен неудач*

Друг водещ рисков фактор за развитието на ГЗД представлява анамнезата за репродуктивни неудачи. Според нашите резултати, това покачва риска с до 1.448 пъти (табл. 6). Някои проучвания сочат, че 59,6% от жените с ГЗД имат подобна анамнеза [228]. Най-вероятно не репродуктивните неудачи водят до въглехидратните нарушения, а самата хипергликемия е тази, която води до тях. Това показва, че излишъка на кръвна захар е отговорна за голям процент от перинаталната и неонаталната заболяемост и болестност.

### **3. Антропометрични показатели**

#### *Индекс на телесна маса*

Нашите резултати потвърждават голямото значение на наднорменото телесно тегло и затлъстяването преди бременността за развитие на ГЗД. В групата с ГЗД се установи значимо по-висок ИТМ преди бременността спрямо контролната група. Тази разлика се запазва и в хода на бременността между двете групи. Необходимо е да се

уточни, че ИТМ по време на бременността и е съпоставян съответно по гестационна седмица, а не по лунарен месец или триместър (фиг. 10). Редица други изследвания също са установили линейна зависимост между ИТМ и въглехидратния толеранс [56].

Процентите на лицата с наднормено телесно тегло преди бременността са съответно 37,7% в контролната група спрямо 30,6% спрямо групата с ГЗД. За разлика от наднорменото телесно тегло в групата с ГЗД преобладава процента на различна степен на затлъстяване 51,2% (27,4; 15,1 и 8,7%) спрямо контролната група бременни жени - 24,8% (17,0; 5,4 и 2,4%). Този висок процент в групата с ГЗД се обуславя от предварителната селекция на участниците, тъй като според дизайна на изследването в него са включени жени с повишен риск за развитие на ГЗД, а един от основните и най-лесно установими от практическа гледна точка рискови фактори са именно наднорменото телесно тегло и затлъстяването. Прави впечатление и високата честота на наднормено телесно тегло и затлъстяване и в контролната група, но отново трябва да се уточни, че се касае за рискова популация бременни жени.

При ИТМ 25-29,9кг/м<sup>2</sup> рискът нараства с 1,629 пъти, а при ИТМ >30кг/м<sup>2</sup> се увеличава 4,162 пъти (табл. 6). Тези резултати са в подкрепа на тезата, че наднорменото телесно тегло и затлъстяването са мощни рискови фактори за изява на ГЗД. Подобни резултати се установяват и в проведените изследвания относно риска за развитие на ЗД [299]. Танкова и колектив установяват, че наднорменото телесно тегло е по-важен рисков фактор за изява на предиабет и ЗД, отколкото затлъстяването [299]. Въз основа на нашите данни, ние препоръчваме провеждането на скрининг за ГЗД не само при затлъстяване, но и при наличие на наднормено телесно тегло преди бременността. Ако бъдат изследвани само жените със затлъстяване се увеличава риска да бъдат пропуснати голям процент на бременни, които ще развият ГЗД.

### **III. КЛАСИЧЕСКИ МАРКЕРИ**

#### **1. Имунореактивен инсулин (ИРИ), НОМА индекс**

В началните етапи на бременността, кръвната захар на гладно е относително ниска и инсулиновата чувствителност започва постепенно да намалява. Това се последва от прогресивно нарастване на инсулиновата резистентност през втория и третия триместър на бременността с относително слабо покачване на инсулиновата продукция и хиперинсулинемия. Инсулиновата резистентност най-често възниква като резултат от действието на плацентарните хормони, които антагонизират действието на инсулина – естроген, прогестерон, човешки плацентарен лактоген, човешки плацентарен растежен хормон, кортизол, пролактин. Тези метаболитни промени водят до развитието на ГЗД в случаите, при които нарастналата инсулинова секреция не може да компенсира свързаната с бременността инсулинова резистентност [22].

Установихме по-високи нива на кръвната захар на гладно, базалния серумен инсулин, HOMA IR и по-ниски на HOMA-%B в групата с ГЗД (фиг. 11-12). Такива данни се установяват и в редица други проучвания и допълнително доказват тезата за основните патогенетични механизми на ГЗД – наличие на  $\beta$ -клетъчна дисфункция и инсулинова резистентност [22]. Тези разлики се наблюдават и са характерни за пациенти със ЗД тип 2.

## **2. Серумни липиди**

Гестационната дислипидемия се среща при голяма част от бременните жени. От 12г.с. фосфолипидите, холестерола (общ, HDL, LDL) и триглицеридите нарастват в отговор на естрогеновата стимулация и инсулиновата резистентност. Липидите като катаболни продукти на мастната тъкан служат като енергиен източник, подsigурявайки глюкоза и аминокиселини за плода. Те са необходими и на плода за изграждане на клетъчните мембрани, като са и прекурсор на жлъчни киселини и стероидни хормони. Също така е необходимо за клетъчна пролиферация и развитие на плода [128].

Установихме наличие на гестационна дислипидемия при 48% от всички бременни. За разлика от дислипидемията при пациенти с предиабет и захарен диабет тип 2, гестационната дислипидемия се характеризира с по-високи нива на HDL. Макар нивото на общия холестерол да е по-ниско в групата с ГЗД, значима разлика не се установи между двете групи ( фиг. 13). Най-вероятно тенденцията към по-високи нива на общ холестерол в

контролната група се дължи на значимо по-високите нива на HDL. Не се установиха разлики и по отношение на преизчисления по формулата на Friedwald LDL-холестерол. Добре известно е, че нивото на HDL-холестерола е в обратна корелация с нарушенията в глюкозния толеранс [84]. Едно предполагаемо обяснение е, че ГЗД се развива най-често в края на втори и началото на трети триместър, когато нивата на HDL-холестерола започват да спадат. Установихме значимо по-високи серумни нива на триглицеридите при жените с ГЗД, което е в съответствие с резултатите, които се установяват при пациенти с подобни нарушения. Въпреки това, бихме могли да приемем, че липидните отклонения в хода на бременността най-вероятно имат алиментарен произход и нямат отношение към ГЗД. Публикувани са редица данни за по-висока честота на гестационна хипертония, прееклампсия, предтерминно раждане, които са в пряка връзка с нивата на серумните липиди, но редица проучвания, сходно на нашите резултати, не установяват връзка между гестационната дислипидемия и ГЗД [84].

### **3. Високочувствителен С-реактивен протеин (hsCRP)**

В настоящето изследване в комплексната оценка на риска от развитието на ГЗД е изследван hsCRP. Установихме значима разлика по отношение на hsCRP между групата с ГЗД и контролната група (фиг. 14). Тъй като ГЗД се възприема като състояние на ИП, а ИП от своя страна се асоциира с нискостепенно възпаление, то нашите резултати следват световните тенденции [241, 305]. Thomann и колектив, изследвайки бременни жени с ГЗД и контролна група, не установяват значимост по отношение на CRP през втория триместър от бременността. Те установяват значимост през третия триместър, като този резултат, според тях, е свързан с нивото на натрупване на мастна тъкан [305]. Чакърова и колектив, която изследва българска популация с наличие на рисков фактор за развитие на ЗД, установява значими разлики в нивото на hsCRP между предиабетните групи и групата с нормален глюкозен толеранс. Не се установява значима разлика в изследвания маркер при сравнение на отделните групи с предиабетни състояния помежду си. Въпреки нарастването на hsCRP не намираме за обосновано рутинното изследване на hsCRP в клиничната практика.

#### **4. Артериално налягане**

Средното артериално налягане по време на бременността се смята за по-добър показател в сравнение със систолното и диастолното артериално налягане поотделно [57]. Поради това в изследваната от нас популация сме изчислили САН, като установихме значимо по-високи стойности на САН в групата с ГЗД спрямо контролната група (фиг. 15). Тези резултати са сходни на резултати, публикувани от други автори [91]. Паралелно с по-високите стойности на САН установихме и по-висока честота на гестационна хипертония. Гестационна хипертония бе установена при 20% от жените с ГЗД спрямо 4.2% при контролите. Прееклампсия беше регистрирана при 7% от пациентките с ГЗД спрямо 2,6% в контролната група. Често жените с данни за гестационна хипертония са в по-напреднала възраст, имат признаци на инсулинова резистентност и метаболитен синдром. Те са с повишен риск за развитие на сърдечно-съдови заболявания след приключване на бременността [278].

#### **IV. НЕТРАДИЦИОННИ МАРКЕРИ**

##### **1. Адипоцитокени**

Категорични данни сочат, че адипоцитокени са свързани с ИР, която е ключов механизъм в патогенезата на ГЗД [313]. По време на бременност, нивото на майчиното затлъстяване е свързано с повишен риск от майчини и фетални усложнения [266]. Въпреки, че майчините мастни депа нарастват през бременността, голяма част от нарастването на ИТМ се дължи на фетуса, плацентата, амниотичната течност и др, които могат да доведат до нарушения в адипоцитокени и други параметри. В литературата съществуват противоречиви данни по отношение на серумните/ плазмени нива на адипоцитокени по време на бременност. Те най-често се дължат на разлики в методиката на тяхното изработване, разлики в гестационната седмица, в която са вземани кръвните проби, размера на изследваната кохорта и етническата група, която е изследвана.

За разлика от повечето адипоцитокени, нивото на адипонектина е намалено при състояния на ИР, каквито са затлъстяването и ЗД тип 2 [269, 327]. В изследваната от нас популация, установихме значимо по-ниски адипонектинови нива в групата с ГЗД, спрямо контролната група (фиг. 16). Установените от нас данни следват повечето от данните в световната литература [135, 319, 334]. Въпреки това има проучвания, които установяват непроменени адипонектинови концентрации при изследване на серум от бременни с ГЗД, което е най-вероятно във връзка с малката изследвана група и различните гестационни седмици, в които е провеждано изследването [63, 264]. При проследяване на нивото на адипонектина 6 до 12 седмици след приключване на бременността, установихме задържаща се значима разлика между жените, които са имали ГЗД и контролната група (фиг. 16). Установихме тенденция към покачване в нивото на адипонектина, но то не достигна степен на значимост нито в групата с ГЗД, нито в контролната група (фиг. 16). Независимо от значимите разлики между двете групи, установихме че, нивото на адипонектина е допълнително намалено в групата с ГЗД, което би могло да бъде обяснено с липсващата плацента, която е секретирала допълнително адипонектин в хода на бременността.

Налице са противоречия и по отношение на лептиновата концентрация при бременни жени с ГЗД. Някои автори сочат, че нивата на лептина са повишени [105], непроменени [135, 264] или дори намалени [198]. Подобно на повечето резултати от литературата [105], лептиновите нива в нашето проучване бяха по-високи в групата с ГЗД (фиг. 17). Тези данни потвърждават също, че високите нива на лептин са свързани с ИР. Литературните данни сочат, че лептина възпрепятства развитието на ИР, което би могло да обясни неговото прогресивно нарастване през бременността при жени с ГЗД [104]. Значима разлика се установява и в постпарталния период в групата с ГЗД и контролната група бременни жени (фиг. 17). Roca-Rodriguez и колектив също установяват подобни разлики, изследвайки жени с анамнеза за ГЗД и контролна група жени [249]. Едно от потенциално възможните обяснения за задържащата се значима разлика в групата с ГЗД и контролната група по време на бременността и в постпарталния период е, наличието на разлика в ИТМ. Horosz и сътрудници установяват, че лептиновата и адипонектиновата

концентрация остава значима при жени с ИТМ < 25кг/м<sup>2</sup> и изчезва при жени с наднормено телесно тегло/ затлъстяване [135]. Ние установихме единствено тенденция за понижаване на нивото на лептина след раждане, което не достигна ниво на значимост в групата с ГЗД, нито в контролната група (фиг. 14). Според някои автори, лептина достига пик на своята концентрация през третия триместър и достига нива сходни на тези преди бременността около дните на раждане [42, 263].

През последните години апелинът е причислен към групата на адипоцитокините, като преди това е бил познат единствено като лиганд на човешкия APJ рецептор [36, 300]. Експресира се в бялата и кафявата мастна тъкан, за разлика от повечето адипоцитокини [152], които се експресират различно в двата типа мастна тъкан. Въпреки, че са налице достоверни данни за ролята на адипоцитокините, основно адипонектин и лептин, в енергийната хомеостаза по време на бременността и лактацията, малко се знае за действието на апелина. Нивото на апелин е повишено при затлъстяване и състояния, свързани с ИР, докато повишена експресия на иРНК е установена при мишки само през ранните етапи на бременността. Не е била установена закономерност с нивото на хиперинсулинемията, а само с натрупването на мастна тъкан [36]. Telejko и колектив установяват, че експресията на иРНК на апелин е 10 пъти по-висока в плацентата спрямо мастната тъкан при сравнително проучване между 101 жени и ГЗД и 101 контролна група бременни между 24 и 32 гестационни седмици [302]. В същото проучване авторите не установяват разлика в серумното ниво на апелин. Нашите резултатите сочат, че серумното ниво на апелин е значимо по-ниско при жените с ГЗД спрямо контролната група (фиг. 18). Подобни резултати установяват и Kourtis и сътрудници [169], но има и литературни данни, сочеще непроменени нива [302]. Boucher и колектив, които са наблюдавали високи нива на апелин само в началото на бременността, стигат до извода, че апелина може би няма връзка с хиперинсулинемията и затлъстяването [36]. В противоречие на посочените данни, високи нива на апелин са установени при пациенти със ЗД тип 2 [43]. От друга страна, инсулинът и TNF- $\alpha$  осъществяват директен контрол върху апелиновата генна експресия в адипоцитокините [69]. В тази връзка, липсата на статистически

значими разлики по отношение на апелина в изследваната от нас група може да е в резултат на липса на значимост и по отношение и на нивата на TNF- $\alpha$ .

Не установихме значими разлики по отношение на резистин (фиг. 19) и висфатин (фиг. 20) между изследваните от нас групи. Някои изследователи са публикували данни за повишени концентрации на резистин по време на бременност, подкрепяйки хипотезата за ролята на инсулиновата резистентност в патогенезата на ГЗД [318]. Други автори установяват понижени нива [201]. Разностранни резултати са установени и по отношение на нивото на висфатин като са установени, както ниски [116], така и високи нива [296]. Налице са убедителни данни, според които висфатина, подобно на лептина пречи за развитието на ИР, което би могло да обясни тяхното прогресивно нарастване през бременността при жени с ГЗД [104]. В нашето проучване не успяхме да потвърдим тази хипотеза.

Макар да са налице убедителни литературни данни за участието на TNF и IL-6 в патогенезата на ГЗД, резултатите при пациентки с ГЗД са противоречиви [38]. Ние не установихме значими разлики по тези показатели в изследваната група (фиг. 21). Най-голяма продукция на TNF се установява през късните етапи на бременността и бързо намалява след раждането, подкрепяйки хипотезата за плацентарната продукция [52]. Липсата на статистически значими разлики могат да бъдат обяснени с факта, че изследването на TNF- $\alpha$  сред нашата популация е било през втората половина на бременността, когато секрецията на TNF- $\alpha$  не е била максимална.

Установихме негативна корелация между адипонектина и НОМА индекса за ИР, ИТМ, HbA1c и hsCRP (табл. 7). Не установихме връзка между адипонектина и останалите адипоцитокени, освен по отношение на лептина. Лептинът корелира позитивно с резистин, НОМА-ИР индекса, HbA1c и hsCRP. Освен, че резистинът корелира с НОМА-ИР индекса, не установихме взаимосвързаност между показателите за въглехидратната обмяна и апелин и висфатин.

Статистически доказаните разлики в нивата на адипоцитокени между групата с ГЗД и контролната група бременни изискват допълнителна проверка за значимост. Чрез построяването на ROC крива, даващата нивото на специфичност и чувствителност се

определя способността на даден показател да бъде използван като диагностичен маркер. Доказахме, че праговата стойност на адипонектина  $8,2\mu\text{g/ml}$  може да изключи ГЗД с чувствителност 83,6% и специфичност 56,6% (фиг. 22). Подобно на посочените резултати, Vitoratos и колектив, както и Tsai и колектив установяват сходни резултати [309, 319]. Прагова стойност на лептина  $28,7\text{ng/ml}$  също може да изключи ГЗД с ниво на чувствителност 81,2% и специфичност 64,2% (фиг. 22). Нашите данни сочат, че адипонектина и лептина биха били полезни за диагнозата ГЗД, но имат само допълнително значение за диагнозата ГЗД. Определянето на апелина няма диагностична стойност.

Някои от недостатъците на изследването по отношение на адипоцитокините е, че нямахме възможност да проследим всичките адипоцитокини по време на бременността и в постпарталния период, което би могло да спомогне за разбиране на патофизиологичните механизми при ГЗД. Биха могли да бъдат изследвани нивата на адипоцитокините през различните гестационни седмици, а също така и повлияването им в резултат на спазване на диета или проведено инсулиново лечение. И не на последно място, изследване на адипоцитокините от пъпна връв и плацента също ще бъде полезно.

## **2. Pregnancy associated plasma protein-A (PAPP-A)**

Биологичната роля на PAPP-A при нормално протичаща бременност не е напълно ясна. Има данни, че PAPP-A е протеаза на свързващия протеин 4 на IGF (IGFBP-4) [326]. Продукцията на PAPP-A от трофобласта подsigурява плацентарния трофизъм чрез освобождаването на IGF-2. Поради това, намаленото ниво на PAPP-A през първия триместър на бременността може да стои в основата за развитие на неблагоприятен изход от бременността.

В проведеното от нас проучване установихме значимо по-ниски серумни нива на PAPP-A при жените с ГЗД спрямо контролната група бременни (фиг. 23). Нашите резултати потвърждават резултатите на други изследователски колективи [29, 185, 261]. Ниски нива на PAPP-A са установени и при 15% от всички бременни жени със ЗД тип 1, както и при ЗД

тип 2. Неуспорима е връзката между нивото на PAPP-A и въглехидратната обмяна, макар че нито едно от проведените проучванията не може да обоснове дали въглехидратните нарушения водят до ниски нива на PAPP-A или ниските нива на PAPP-A водят до въглехидратни нарушения.

В световен мащаб се дискутира необходимостта, ползите и разходите от провеждането на масов скрининг за ГЗД. В тази посока нивото на PAPP-A като наличен резултат при 80% от всички бременни жени би могъл да се използва като ранен маркер за диагноза или поне насочване към изследване за ГЗД. Ние дозахме по-ниски серумни нива на PAPP-A при жените с ГЗД подоно на други изследователски колективи. Прагова стойност на коригирания PAPP-A 0,7 МоМ може да изключи ГЗД с ниво на чувствителност 62,9% и специфичност 54,6% (фиг. 24). Сходни резултати се установяват и от Lovati и колектив [185]. Световните дружества по Акушерство и Гинекология също използват сходни референтни стойности за оценка на риска от развитие на ПЕ (0,844 МоМ), 0,813 МоМ за ИУРП, а PAPP-A под 0,5 МоМ се свързва със значително по висока честота на интраутеринна смърт на плода и тегло на новороденото под 10ия перцентил [261]. Препоръчваме оценката му само като допълнителен маркер за диагнозата ГЗД.

## **V. АВТОАНТИТЕЛА**

Хетерогенността на ГЗД налага типизиране на бременните чрез изследване антителата, насочени срещу  $\beta$ -клетките на панкреаса. Автоантителата (ААт) срещу панкреасната  $\beta$ -клетка предхождат клиничната изява на ЗД тип 1. По тази причина те се използват освен за диагностика на типа ЗД, но и като маркери за риск от изява на автоимунен ЗД тип 1. Възрастта модифицира риска за развитие на ЗД тип 1, наличието или отсъствието на ААт, прогресията към по-лабилно протичане на ЗД и инсулиновата секреция. Приема се, че рискът от изява на ЗД тип 1 се увеличава пропорционално на броя автоантитела. При 10% от бременните с ГЗД установихме поне едно позитивно антитяло, при 2,2% - две антитела и при нито една - три антитела (табл. 9). Сходни резултати за позитивни на поне едно антитяло при пациентки с ГЗД (16.7% и 18.1%) се

представят и от други изследователи [103, 146]. Висока честота, 38,8%, на поне едно завишено антитяло установяват при проучване в Сардиния, което авторите обясняват с високата честота на аутоимунните заболявания като цяло на острова [214]. При 4,4% от бременните с ГЗД установихме GAD-65 аутоантитела, което съответства на резултатите от проучвания в други Европейски страни (табл. 9). Проучване в Швеция установява 3% честота на GAD-65 позитивни жени с ГЗД [325], а в Дания 2,2% [234]. При 4,4% бяха позитивни IA-2 антителата и при 3,3% IAA антитела. Подобно в Дания установяват честота от 2,9% положителни IAA при жени с ГЗД [67]. Тирозин фосфатазни антитела се установяват най-често при индивиди с новопоявил се ЗД тип 1, и установяването им в предиабетна фаза корелира с бързата прогресия към ЗД тип 1 [196, 215]. Въпреки това, самостоятелното наличие на анти-IA-2 трябва да бъде уточнено, тъй като две проучвания сочат, че IA-2 антителата не са представлявали независим риск за развитие на ЗД тип 1 в постпарталния период, докато анти-GAD-65 са били негативни. [103, 146]. Когато се установят позитивни GAD-65 и IA-2 антитела чувствителността на теста се показва от 63% на 75% [103]. Установяването на инсулинови антитела също трябва да се обсъжда, тъй като при проучване във Финландия, където честотата на ЗД тип 1 е висока, не е установено нито една жена с ГЗД с позитивни антитела [103]. Прилагането на по-специфични и чувствителни китове се намалява на процента на пациентите с позитивни антитела [171].

Индексът на телесна маса сред жените с ГЗД е значимо по-висок спрямо контролната група бременни (табл. 8). Наднорменото телесно тегло и затлъстяването са добре известни водещи рискови фактори за развитието на ГЗД [205]. Въпреки това, сред групата с ГЗД, жените с положителни антитела бяха със значимо по-ниско тегло, спрямо тези с негативни (табл. 10). Установяването на подобна значимост насочва по-скоро към диагнозата ЗД тип 1, а не към тип 2, за който е по-характерно затлъстяването. Подобни резултати се установяват и от други автори [193]. Жените с позитивни антитела бяха на значимо по-ниска възраст спрямо тези с негативни антитела, подобно на жените, които развиват ЗД тип 1 след бременност [146].

Две (2,2%) от жените с ГЗД, при които не установихме позитивни автоантитела по време на бременността развиха ЗД тип 1 на 6 и 12 месец след приключването на бременността. Това най-вероятно се дължи на така наречения „имунологичен парадокс“ на бременността, при който има супресия на клетъчно-медиирания имунитет с цел имплантация и инвазия на трофобластта [315]. Възможно обяснение за негативните антитела в хода на бременността при двете жени е и във връзка и с използваните ELISA китове, макар те да имат описана висока специфичност (90-98%) и чувствителност (90-96%). Разширяване на панела автоантитела (напр. с цинк транспортер 8) би могло допълнително да допринесе за ранната диагноза на заболяването.

Ранната диагноза на ЗД тип 1 е доказано, че води до съхраняване на част от ендогенната инсулинова секреция и води до намаляване на честотата на микроваскуларните усложнения [288]. На базата на нашите резултати и поради наличието на имунологичен парадокс по време на бременността препоръчваме изследване на ААт да се провежда само при съмнение за ЗД тип 1 след приключване на бременността – установяване на въглехудратни нарушения, нисък ИТМ посочва , нужда от инсулиново лечение по време на бременността.

## **VI. ГЕНЕТИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ**

### **1. Алелна и хаплотипна асоциация**

Генетичния анализ, включен в настоящето проучване, обхваща 17 полиморфизма в 14 гена, за които съществуват литературни данни, че увеличават риска от поява на ГЗД и ЗД 2 (табл. 1) [243]. Сравнението на алелните честоти за всеки от едно-нуклеотидните варианти при 130 бременни с ГЗД и 130 здрави бременни, показва наличие на статистически значима асоциация между ГЗД и честият алел (С) на rs266729 ( $p=0,0274$ ). Този полиморфизъм се намира в промоторния участък на AdipoQ, в позиция -11377 и представлява замяна на базата С с G (табл. 11).

AdipoQ кодира белтъка адипонектин, който се произвежда преимуществено от мастната тъкан и има антиатерогенен, противовъзпалителен и хипогликемичен ефект.

Нивата на адипонектина в кръвта са обратно пропорционални на концентрацията на триглицериди и правопрпорционални на концентрацията на липопротеини с висока плътност (HDL холестерол). Ниските серумни концентрации на адипонектин са свързани с повишен риск от високо кръвно налягане, левокамерна хипертрофия, затлъстяване, инсулинова резистентност и ЗД тип 2.

Установено е, че в хода на бременността концентрацията на адипонектина в кръвта намалява, което е резултат от понижена експресия на AdipoQ като това намаление е по-значително при жени с ГЗД. В подкрепа на това твърдение, нивата на серумния адипонектин се запазват ниски след раждането, както при майката с ГЗД, така и при новороденото [207]. Тези резултати бяха потвърдени и в хода на проведеното проучване върху нивата на серумния адипонектин (фиг. 16).

Макар асоциацията на полиморфния вариант rs266729 със ЗД тип 2 да е обект на усилен проучвания, данните за ефекта му върху риска от появата на това заболяване не са еднозначни. Според някои автори носителите на редкия алел (G) са предразположени към развитието на затлъстяване, метаболитен синдром и ЗД тип 2, а според други- такъв ефект се наблюдава за честия алел [85]. Съществуват публикации, които докладват липса на асоциация между rs266729 и тези заболявания. Единственото публикувано до този момент, проучване за асоциация на този вариант с ГЗД, не установява статистически значими разлики между болни и здрави контроли [111]. Подобни противоречиви резултати съществуват и за другите два изследвани варианта на AdipoQ, rs2241766 и rs1501299, макар че повечето автори се обединяват около тезата, че алелът G на rs2241766 е свързан с хипергликемия, намалена концентрация на адипонектин в кръвта и висок риск от метаболитен синдром и ЗД тип 2.

Нашите резултати подкрепят тезата, че присъствието на честият алел на полиморфния вариант rs266729 води до повишен риск от появата на ГЗД, докато редкият алел, G, има протективен ефект (OR=0,64). В изследваната извадка не установихме статистически значима асоциация на ГЗД с останалите два варианта в адипонектиновия ген. В същото време, изчисленията показват, че при здравите жени по-често срещан е

хаплотипът GTG, съставен от редкия алел на промоторния вариант rs266729 и честите алели на промоторния rs2241766, и интронния rs1501299 (табл. 12).

Един от изследователските колективи, които доказват, че редкият алел на rs266729 е свързан с усложнения при ЗД тип 2, изказва хипотезата, че той води до промяна в секвенцията разпознавана от транскрипционния фактор Sp1. По този начин се затруднява свързването му с промотора и съответно води до намалени експресия на гена за адипонектин [338]. Типът на въздействие на Sp1 върху промоторните региони, стимулиране или потискане на активността им, зависи силно от наличието на допълнителни кофактори (тъканно специфични или елементи на полимеразния комплекс), степента на фосфорилирането му и др. Известно е например, че Sp1 се конкурира за свързване с определени промоторни секвенции с един друг транскрипционен фактор, Sp3, който има по-скоро инхибиращо действие върху полимеразния комплекс. Значението на Sp1 и Sp3 за регулацията на активността на AdipoQ е доказана, макар че обект на анализ в цитираното изследване е друг участък от промотора на този ген [24]. В този смисъл, възможно е и друго обяснение на получените от нас резултати. Ако приемем, че присъствието на алела G наистина води до промяна на секвенцията разпознавана от Sp1, който стимулира експресията на гена, то тази промяна би се отразила на свързването и на конкурентния фактор с инхибиращо действие, Sp3. Така при бременни жени, при които има физиологично обусловено снижаване на активността на гена, може би резултат от свързване на Sp3, това понижение на нивата на синтез на адипонектинова иРНК би било по-малко.

По отношение на KCNJ11 гена, въпреки литературните данни за асоциация на E23K варианта и ЗД тип 2, само едно проучване установява силна връзка на този полиморфизъм с развитието на ГЗД [275]. В нашето проучване, не установихме данни за връзка с развитието на ГЗД или другите метаболитни показатели. Подобно на нашите данни, Cho и колектив също не установяват значима връзка между наличието на този полиморфизъм с ГЗД в genome-wide association study (GWAS) сред корейска популация с ГЗД [54].

С изключение на вариантът rs266729 в адипонектиновия ген, нито един от останалите едно-нуклеотидни полиморфизми, включени в изследването не показва асоциация с ГЗД в нашата извадка, въпреки че редица проучвания намират връзка между присъствието им и появата на метаболитен синдром и/или ЗД тип 2. Това вероятно се дължи или на малкия ни за генетичен анализ брой изследвани индивиди или на факта, че отделните изследователски колективи се фокусират върху различни аспекти от клиничната картина на тези заболявания – ИТМ, ИР, определени биохимични показатели, наличие на усложнения и др. Вероятно роля за това разминаване в резултатите играят и особености на проучваните популации.

## **2. Количествена асоциация**

Подробният анализ за наличие на асоциация между генните полиморфизми и някои основни биохимични показатели, свързани със ЗД, показва статистически значими резултати с нивото на кръвната захар и серумния инсулин, концентрациите на лептин, както и HOMA IR индекса (табл. 14).

### **Нива на имунореактивен инсулин и HOMA IR**

Два едно-нуклеотидни полиморфизма се оказаха асоциирани с промяна в нивата на имунореактивния инсулин - rs780094 в гена GCKR и rs7903146 в TCF7L2.

Генът GCKR кодира глюकोкиназния регулаторен белтък (GKRP), който участва в регулацията на първия ензим от гликолизата, глюकोкиназа. Ефектът на GKRP е най-изявен в клетките на черния дроб и в по-малка степен в  $\beta$ - клетките на панкреаса. Вариантът rs780094 е разположен в интрон и е относително чест - според НарМар честотата на редкия алел е приблизително 40%.

Нашите резултати за асоциация на този полиморфизъм, с нивата на инсулин в кръвта, са в съответствие с данните от други изследвания. Настоящото проучване установи, че алелът T е значително по-често срещан при жени с по-ниски нива на инсулин (средно 12,51 mIU/l) и с по-нисък HOMA индекс (средно 2,895). Аналогичен е резултатът от

проучването Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC), което обхваща над 10 000 индивида от европейската раса [32].

Множество проучвания доказват защитният ефект на алелът T на rs780094 по отношение на риска от появата на ЗД тип 2. Вариантът се свързва с понижени нива на глюкоза и инсулин, повишени нива на триглицериди и намалена ИР [80, 283, 297]. Нашето изследване ни дава основание да подозираме, че редкият алел на този полиморфизъм в гена за глюкокиназияния регулатор, вероятно осигурява защита и срещу ГЗД.

Полиморфният вариант rs7903146 е разположен в интрон 4 на гена TCF7L2 и се намира в неравновесна връзка с микросателитен повтор в същия интрон. Генът кодира транскрипционен фактор, член на сигналния път Wnt, който има важна роля в процесите на клетъчно делене и диференциация. Множество асоциативни проучвания показват, че този вариант (или скаченият с него микросателит) е свързан с предразположение към ЗД тип 2 и ГЗД [100, 232, 307]. Това засили изследователския интерес към функцията на TCF7L2 в панкреаса. Така бе установено, че транскрипционният фактор има отношение към диференциацията на този орган, защитата на  $\beta$ -клетките и поддържането на тяхната функция. Въпреки, че все още се знае съвсем малко за това, кои гени в  $\beta$ -клетките на панкреаса са обект на регулация на TCF7L2, има данни, че транскрипционният фактор влияе върху експресията на GLP-1, онкогените c-myc, c-jun и циклин D [70].

Ролята на полиморфния вариант rs780094 за патогенезата на ЗД все още не е изяснена, но съществуват данни, че редкият алел T е асоцииран с намалено превръщане на проинсулина в инсулин [109, 119, 162, 293].

Резултатите от нашите изследвания показват, че макар полиморфизмът в интрон 4 на TCF7L2 гена да не е свързан с повишен риск от появата на ГЗД, съществува връзка между него и нивата на имунореактивен инсулин в кръвта на бременни жени. Съгласно данните от настоящето проучване, алелът T на rs780094 е асоцииран със статистически значимо повишение на нивата на инсулин на гладно.

Серумна концентрация на лептин

Серумната концентрация на лептина се влияе от някои от изследваните от нас генетични варианти. Ефект върху него оказват два полиморфизма, rs689 в инсулиновия ген (INS) и rs9939609 в FTO.

В настоящото изследване включихме генотипизиране за едно-нуклеотидния полиморфизъм rs689, поради факта, че той се намира в почти пълна неравновесна скаченост с микросателитен повтор в промоторния участък на гена, за който се знае, че оказва влияние върху нивата му на експресия. Установено е, че алелът А на rs689 отговаря на клас I VNTR (къси фрагменти), а Т на клас III (дълги фрагменти). Средният тип фрагменти, клас II VNTR, не са характерни за индивиди от европеидната раса и поради това не са обект на научен интерес. Наличието на неравновесна връзка между двата полиморфизма ни позволи да използваме rs689, чието генотипизиране е значително по-бързо и евтино, като маркер за алелите на повтора.

Съществуват данни, че дългите алели на микросателита (представени от алел Т на rs689) в промоторния регион на гена INS са свързани с по-ниски нива на инсулин. Предполага се, че това се дължи на потискане на активността на транскрипцията. Според някои изследователи, в регулаторния участък на лептиновия ген при хора и мишки присъстват IRE (insulin response element), което предполага, че инсулина има пряка роля в регулацията на неговата експресия [195, 322]. Според други, инсулинът влияе върху активността на гена индиректно [210].

Резултатите от нашето генетично проучване показват, че полиморфния вариант в инсулиновия промотор, за който се знае, че води до потискане на инсулиновия синтез, е свързан с намаление на концентрациите на лептин. В този смисъл, нашите данни потвърждават изследванията на други колективи за ролята на инсулина в регулацията на лептиновия синтез.

Въпреки, че не откриваме статистически значима асоциация между rs689 и нивата на инсулин, ние не можем да изключим наличието на малки разлики в концентрацията му при носителите на рисковия алел. Ефектът на една такава минимална промяна в нивата на инсулина би могъл да се амплифицира при преноса на сигнала към регулаторните

елементи в промотора на гените, чиято експресия се повлиява от него. Това би могло да обясни по-ниските концентрации на лептин, които се наблюдават при пациенти хомозиготни по алела T и съответно клас III VNTR, при отсъствие на снижени нива на инсулин при същите индивиди [195].

Генът FTO кодира белтъчен продукт със същото име (FTO произлиза от fat mass and obesity associated), който функционира като деметилаза с голям афинитет към едноверижни ДНК и РНК молекули. Установено е, че генът се експресира повсеместно, но белтъчният продукт изпълнява важна роля главно в клетки на мастната тъкан, нервната и сърдечно-съдовата системи. Той е обект на голям брой изследвания заради асоциацията му със социално значими заболявания като атеросклероза, метаболитен синдром и ЗД. Резултатите от проведените в рамките на настоящия проект изследвания показват, че полиморфизмът rs9939609, разположен в интронна секвенция на FTO, е свързан с промяна в плазмените нива на лептин. Носителството на алела A е свързано с по-високи концентрации на лептин в кръвта (39,85 ng/ml за индивиди с генотип AA срещу 26,25 ng/ml за жените с TT). Тези резултати са в съответствие с данните на други изследователски колективи [172, 255, 341].

### **3. Нива на глюкоза в кръвта**

Резултатите от настоящето проучване показаха, че съществува зависимост между нивата на глюкоза в кръвта на гладно и два генни варианта, rs1800450 в MBL2 и rs290481 в TCF7L2.

Генът MBL2 кодира маноза свързващ лектин, който се произвежда в черния дроб и играе важна роля за правилното функциониране на вродената имунна система. Вариантът rs1800450 е функционален – води до аминокиселинна замяна Gly54Asp, която потиска активиране на системата на комплемента [295]. Множество проучвания показват наличие на асоциация между този полиморфизъм и риска от ЗД тип 1. Съществуват данни и за връзка между редкия алел и ГЗД - авторите на това проучване са установили, че присъствието на редкия алел, в хомо- или хетерозиготно състояние, е свързан с повишени

нива на глюкоза в кръвта и по-голям риск от раждане на по-едро новородено [200]. Асоциацията на rs1800450 с нивата на кръвната захар се потвърждава и от резултатите, които получихме при българските бременни жени в настоящето проучване.

За полиморфният вариант rs290481 в 3' края на TCF7L2 е установено наличие на асоциация с между честия алел (С) и повишените нива на глюкоза [50]. В изследваната от нас група бременни жени, редкият алел Т е свързан със значително повишение на нивата на глюкоза на гладно. Разликата между нашето проучване и това на Chang и съавтори, вероятно се дължи на популационни причини. Друго възможно обяснение е фактът, че в китайското проучване пациенти са подбрани по критерий присъствие или отсъствие на високо кръвно налягане и едва след това са били подложени на скрининг за ГЗД, което прави сравнението на двете групи пациенти невъзможно.

## **VII. ИЗХОД ОТ БРЕМЕННОСТТА**

За оценка на изхода от бременността са взети под внимание ехографските показатели по време на бременността (съотношението HC/ AC - обиколка на главата/ корема, само абдоминалната обиколка и теглото на плода в персентили), метода на родоразрешение (нормално или Церарово сечение), теглото на новороденото, макрозомията и пондералния индекс. Тези данни са бяха достъпни при 682 бременни жени (68,2%) от провешите изследването на базата на многократни телефонни обаждания. В литературата повечето автори сочат 100% установен изход от бременността поради наличието на достъпни електорни досиета на родилките. В таблици 15 и 16 са представени изброените показатели според различните критерии. Те са обсъдени отчасти в глава I „Честота и избор на диагностични критерии“.

Не установихме и разлики по отношение на ехографски измереното тегло на плода в персентили (фиг. 26). Макар коремната обиколка на плода да е един от най-честите показатели, отразяващ хипергликемията, не установихме значими разлики в двете групи (фиг. 27). Наблюдава се значима разлика в теглото на новороденото в групата с ГЗД спрямо контролната група (фиг. 25). Тези разлики по отношение на ехографските

показатели и теглото на новороденото най-вероятно се дължат на факта, че ехографията на плода е провеждана в 18-21г.с., а майчината хипергликемия се отразява върху темпа на растеж най-често в по-напреднала възраст. В литературата са налице също подобни резултати [199].

Макрозомия (тегло на новороденото >4000гр) бе регистрирана при 76 (9.5%) от новородените. Макрозомията на плода е нежелан изход от бременността, тъй като води до увеличен риск от травма по време на раждането, затлъстяване и ЗД на по-късен етап от живота [132]. Редица автори свързват наличието на макрозомия с нивото на гликемичен контрол на майката [112, 216]. Постигането на добър гликемичен контрол намалява честотата на макрозомията [62].

Процентът на проведено Цезарово сечение е висок - 57,9%, най-вероятно във връзка с акушерските показания за провеждането, но и във връзка с нарастващия процент на жените, желаещи посочения метод за родоразрешение. Въпреки това честотата на проведеното Цезарово сечение следва световните тенденции [199]. При 7 (1.3%) се наблюдава мъртво раждане. Отношението на шансовете (OR) за макрозомия и Цезарово сечение може да бъде разгледано в Таблица 16. Четиринадесет процента (14% (20) от жените, родили макрозомичен плод и имали ГЗД според критериите на IADPSG, са били пропуснати от критериите на ADA.

## **VIII. ЛЕЧЕНИЕ**

Необходимостта от провеждането на скрининг за ГЗД се определя на базата на индиректни методи за оценка на ролята на майчината хипергликемия върху изхода от бременността и ефективността на проведения скрининг за намаляване на неблагоприятния изход. Два системни анализа на литературата до момента са известни относно ползата от лечението на ГЗД [87]. Те еднопосочно показват намаляване на процента на макрозомия, големи за гестационната си възраст новородени, по-малък процент на прееклампсия при провеждане на лечение на ГЗД. Резултатите също сочат, че няма данни за преждевременно раждане или малки за гестационната си възраст

новородените в резултат на лечението. Независимо дали се касае за диабет, предхождащ бременността, или ГЗД, хипергликемията се асоциира с повишен риск от усложнения, както за майката, така и за плода/ новороденото. Промяната в нивото на кръвната захар само с 0.4 ммол/л се свързва с повишен риск за настъпване на майчини и фетални усложнения.

Обучението относно начина на живот и хранителния режим са водещи фактори за поддържането на добър гликемичен контрол при жените с ГЗД. Те са и първа стъпка в препоръките за лечение на предиабета и ЗД. Нашите резултати показват, че при 83% от всички жени с ГЗД бе достатъчно провеждането само на диета. Приложение на инсулиново лечение бе необходимо при 17% жените с ГЗД (фиг. 28). Тези резултати са сходни на данните в литература. Резултатите от проучването ACHOIS показват, че при 20% от жените е било необходимо инсулиново лечение, а Gamet и колектив установяват 24% [253]. Трябва да се има предвид, че не бяха намерени литературни данни за процента на инсулиново лечение в Европейските държави. Данните от проведените проучвания са от Северна Америка и Австралия. Другото, което трябва да се вземе под внимание е, че процентът на инсулиново лечение при пациентките с ГЗД все повече намалява, поради използването на метформин и СУП. Landon и колектив (2009г) при проучване, обхванало приблизително 1000 жени с ГЗД установява 7,6% на инсулиново приложение.[174] За разлика от Landon, в миналото O'Sullivan и колектив прилагат при 100% от пациентките инсулин [223]. Друг важен фактор относно процента на инсулиновото лечение е и вида на използваните критерии. Когато O'Sullivan и колектив въвеждат за първи път критериите се базират изцяло на риска за развитие на ЗД в бъдеще, докато настоящите критерии на IADPSG са изградени с цел намаляване неблагоприятния фетален изход [205].

В групата с ГЗД влизат и жените, които за били със ЗД тип 1 и са продължили своето инсулиново лечение след приключване на бременността. Голяма част от жените в патологично отношение са подобно на пациентите със ЗД тип 2 и метаболитен синдром, за които промяна в начина на живот е бил в полза по отношение, както на лечение, така и на дълготрайна превенция.

Поради липсата на оплаквания при пациентките с ГЗД е трудно да се постигне консенсус по отношение на необходимостта от приложението на инсулин. Използваните инсулини са Актрапид, Новорапид, Хумалог и NPH инсулин. Данните от литературата сочат, че те разрешени за приложение по време на бременност за овладяване на хипергликемия. Дългодействащи инсулинови аналози не са използвани за лечение, тъй като към момента на анализиране на резултатите инсулин детемир бе категория С за употреба при бременност. Инсулин гларжин все още остава категория С. В редица държави за лечението на ГЗД се използват и инсулинови смеси.

Ние доказахме, че нуждата от инсулиново лечение нараства при 3,493 пъти при появата му в ранна гестационна възраст, 2,421 – при затлъстяване преди бременността и 2,65 пъти при възраст на майката над 35 години (табл. 17). Тези резултатите се потвърждават и в проучването НАРО, където са обхванати над 25 000 бременни [205].

Въпреки, че скоро проведен системен анализ на литературата показва, че провеждането на лечение при пациентки с ГЗД води до подобряване на майчините и фетални усложнения [87], проблемът със скрининга и установяването на ГЗД остава отворен поради все още обсъжданата тема за провеждане на масов скрининг или само след селектирана група бременни.

## **IX. ПРОСЛЕДЯВАНЕ**

Възприемайки изцяло концепцията на проучването НАРО, според която по време на бременността, диагностицирането и лечението на ГЗД е свързано с цел намаляване рисковете от усложнения на плода и новороденото [68, 205], то след приключване й вниманието ни е насочено към проследяване на жената и превенцията на развитието на ЗД [160, 203, 222]. Проследяването на жените с ГЗД в постпарталния период позволява да бъдат идентифицирани високо-рисковите групи за развитие на ЗД в бъдеще. Редица проучвания сочат, че промяната в начина на живот би могла да доведе до профилактика на заболяването – да не се развие в бъдеще или съответно да се появи на по-късен етап от живота [310]. Лечението само с ниско въглехидратна диета води до намаляване на ИР,

повишаване на инсулиновата чувствителност (основен патофизиологичен механизъм при развитие на ГЗД), като процента се увеличава с времето [233].

Според препоръките на IADPSG за поведение при жени с ГЗД е необходимо провеждането на стандартен 75 грама глюкоза, 2 часов ОГТТ на 6 – 12 седмица след приключване на бременността. При данни за нормален глюкозен толеранс следва изследването да бъде повторено 1 година след проведеното постпартално ОГТТ, а след това - на поне всеки 3 години [203]. Поредица от проучвания са доказали, че измерването само на кръвната захар на гладно, не е с достатъчна чувствителност, за да потвърди или отхвърли НГТ или ЗД. Само 34% от жените с НГТ или ЗД тип 2 имат НГГ, докато 44% от тези със ЗД тип 2 имат кръвна захар на гладно <5,5ммол/л.

Проследяване на жените с анамнеза за ГЗД е трудно, т.к. по-голямата част от тях не се явяват за повторно изследване. Макар да са проведени телефонни обаждания и е осъществен контакт с над 80% от всички бременни жени, участвали в проучването, едва 34,5% от жените с ГЗД са се явили за контролна визита. Други държави също демонстрират сходен процент /33.7%/ на жените, провели повторно ОГТТ [287]. Процентът варира от 14 до 60% според типа на медицинските грижи и типа на проведеното проучване, като многобройните телефонни обаждания и напомняне чрез електронна поща го увеличават [168, 277].

При 25% от жените с ГЗД в изследваната кохорта установихме данни за нарушение в глюкозния толеранс (7% с НГГ, 12% НГТ, 5% НГГ+НГТ и 6% с новооткрит ЗД) още в ранния постпартален период (6-8 седмица), (фиг. 29). Catalano и сътрудници, в сходно проучване сред 103 жени с ГЗД изследвани също в ранния постпартален период, установяват 22% честота на въглехидратните нарушения [48, 165]. Kjos и сътрудници установяват сходна честота (19%) сред 246 жени [165]. Установихме, че най-важен предиктор за развитието на въглехидратни нарушения е стойност на кръвната захар по време на скрининга >5.8ммол/л (OR 3,8). Друг важен предиктор е установяването на ГЗД преди 24 г.с. (OR 2,9). Аналогични резултати са представени и в други проучвания, като в частност, майчиното затлъстяване, завишените нива на кръвната захар на гладно и ранното откриване на ГЗД преди 24г.с. са най-значимите предиктивни фактори за НГГ, НГТ, НГГ+НГТ или НЗД след

бременността [48, 76, 164, 165]. От друга страна, предиабетните състояния (НГГ, НГТ и комбинацията им) се приемат също за етап от еволюцията на нормалната глюкозна хомеостаза в ЗД тип 2 [312].

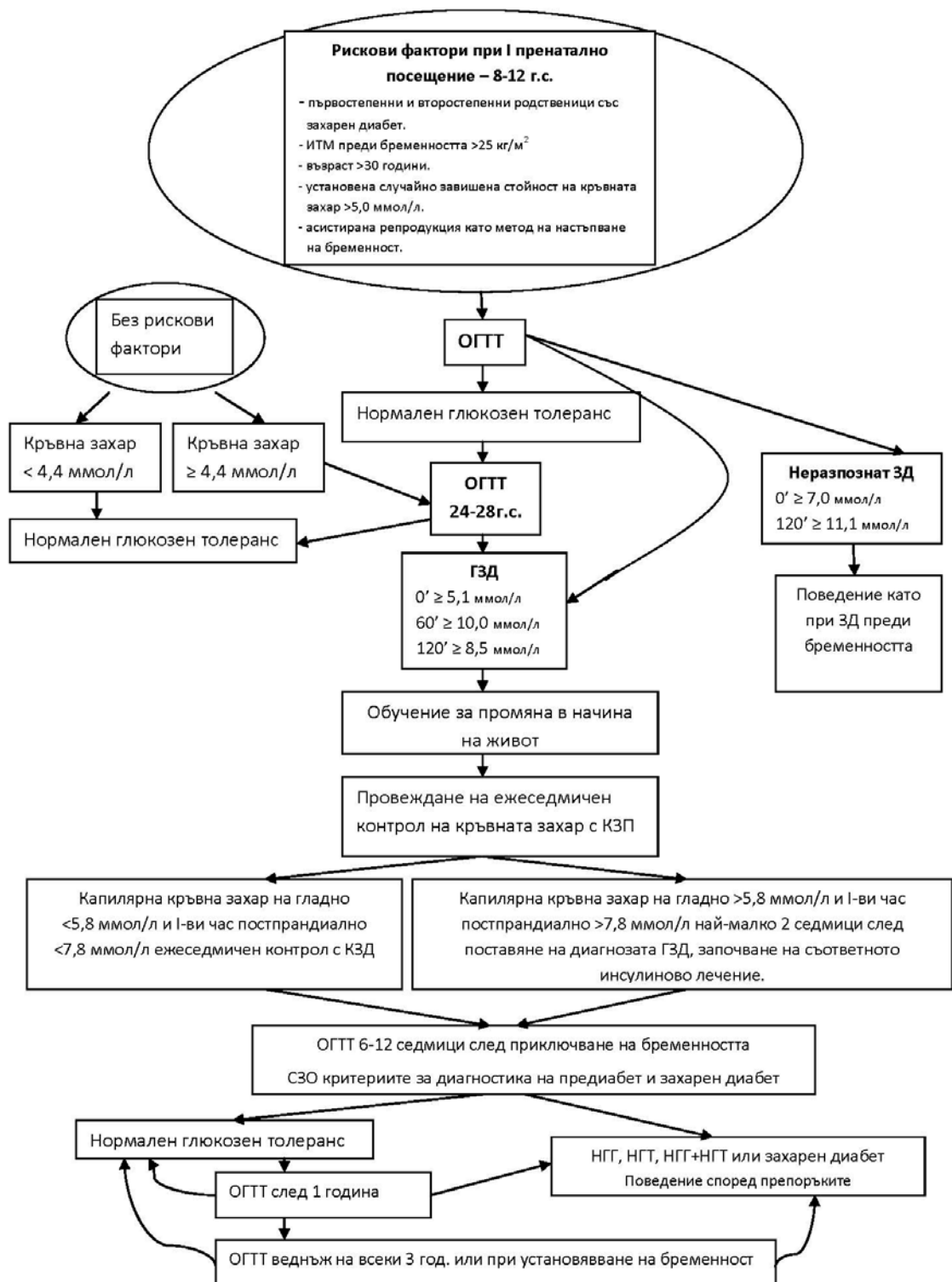
Гестационният захарен диабет е несъмнено рисков фактор за развитието на ЗД. При провеждането на мета-анализ сред 675,455 жени, от които 10 859 случая със ЗД тип 2, Bellamy и колектив установяват, че жените с анамнеза за ГЗД имат 7 пъти по-висок риск за развитие на ЗД тип 2 в бъдеще спрямо тези с нормален ГТ по време на бременност [28]. Танкова в своя дисертационен труд установява връзка между ГЗД и развитието на ЗД (OR 1.054), която не достига ниво на значимост, най-вероятно в резултат на проследената малка кохорта (213) жени [343].

Други проучвания сочат, че 35-60% от жените с анамнеза за ГЗД, ще развият ЗД до 10 години [73]. Поради тази причина, групата от жените с ГЗД, представлява цел в първичната профилактиката на ЗД. Хетерогенността на ГЗД налага и определяне на типа на ЗД. Някои популации имат различно разпределение, като например 10% от жените с ГЗД във Финландия ще развият ЗД до 6 години от приключване на бременността. Приблизително половината от тях ще развият ЗД тип 1, а другата половина ЗД тип 2 [146]. В тази посока, международната група по ГЗД препоръчва, изследване на анти-GAD-65 и анти-IA2 да бъдат изследвани по време на бременността [203]. От жените с ГЗД, при които е проведено повторно ОГТТ с данни за ЗД, при 2 (2%) се установиха позитивни антитела, което ги категоризира към ЗД тип 1. В случай че бъдат идентифицирани жени, които са позитивни на някои от посочените антитела, то те следва да бъдат проследени.

## **IX. СТРАТЕГИЯ ЗА СКРИНИНГ И ПОДХОД ПРИ ГЕСТАЦИОНЕН ЗАХАРЕН ДИАБЕТ**

Смисълът на понятието скрининг се влага в изследване на група хора и търсене на специфично заболяване посредством тестове, изследвания или други процедури, които ще отграничат индивидите, които имат заболяването, от тези, които най-вероятно нямат. Скринингът за гестационен захарен диабет отговаря на посочените критерии. Нарастващият в световен мащаб процент на ГЗД, паралелно с нарастването на процента на захарния диабет (разпознат и неразпознат) налага целенасоченото търсене и провеждане на изследване сред бременните жени. Данните от изследваната високо-рисквата популация убедително сочат, че процентът на жените с ГЗД е висок (29.1%). Това налага изработването на единна стратегия за скрининг още с настъпването на бременността.

На базата на проведеното крос-секционно и проспективно проучване предлагаме следната стратегия за скрининг за ГДЗ:



## Х. ОСНОВНИ ИЗВОДИ

1. Наличието на поне един рисков фактор при бременни жени е свързан с висока честота на ГЗД (29%). Критериите на IADPSG са с най-добра диагностична стойност. Кръвната захар на гладно няма самостоятелно значение за поставяне на диагноза ГЗД, но е насочващ фактор за необходимостта от провеждане на ОГТТ.
2. Прагова стойност на HbA1c над 5.6% съчетава оптимална чувствителност и специфичност за диагностициране на ГЗД.
3. Рискът за развитие на ГЗД нараства с възрастта - 2,2 пъти над 30 години, с телесното тегло преди бременността - 1,6 пъти при наднормено и 4,2 при затлъстяване, както и с установяването на случайно завишена стойност на кръвна захар – 3,9 пъти.
4. При жени с ГЗД се наблюдават промени в базалната инсулинова секреция и индиректните показатели за оценка на инсулинова резистентност и  $\beta$ -клетъчна функция (НОМА индекс), характерни за захарен диабет тип 2.
5. При жени с ГЗД нивото на адипонектин е по-ниско спрямо контролна група бременни жени, а това на лептин по-високо. Тази тенденция се запазва и след приключване на бременността.
6. Нивото на PAPP-A е по-ниско при жени с ГЗД. Прагова стойност на PAPP-A 0.7 е също ранен маркер за ГЗД.
7. При 10% от жените с ГЗД се установяват автоантитела към  $\beta$ -клетката на панкреаса, което е в подкрепа на диагнозата захарен диабет тип 1 при тях.
8. Полиморфизмът rs266729 в гена за адипонектин и честият алел С е свързан с изява на ГЗД, докато минорният G алел има протективна роля за развитието на състоянието.
9. При жени с ГЗД нараства процента на Цезарово сечение като метод за родоразрешение. При тях се наблюдава по-голямо тегло на новороденото и по-висока честота на макрозомията.

10. Нарушения в глюкозния толеранс след приключване на бременността остават при 25% от случаите с ГЗД (НГГ – 7%, НГТ – 12%, НГГ+НГТ – 5% и захарен диабет – 6%). Най-важните предсказващи рискови фактори са стойност на кръвната захар на гладно по време на скрининга  $>5.8$ ммол/л и установяването на ГЗД преди 24 г.с.

## **XI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

### **I. ПРИНОСИ С НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕН ХАРАКТЕР**

1. Настоящото проучване установява високата честота на ГЗД за българската популация – 29%.
2. Извършена е комплексна оценка на ГЗД включваща широк набор от фактори и маркери за оценка на въглехидратната обмяна.
3. Анализирани са различни рискови фактори за изява и протичане на ГЗД сред рисковата група бременни жени и са определени тези с най-висок риск.
4. Извършена е комплексна оценка на адипоцитокени при жени с ГЗД по време на бременността и след нейното приключване, които са сравнително слабо проучени досега.
5. Анализирани са комплекс от антителата насочени срещу  $\beta$ -клетките на панкреаса при бременни жени с ГЗД.
6. Направена е оценка на генетични показатели при жени с ГЗД и контролна група бременни, които са слабо проучени.
7. Анализирани са връзката между ГЗД и изхода от бременността.
8. Проведено е проспективно проследяване на нарушенията в глюкозния толеранс 6-12 седмици след приключване на бременността.

### **II. ПРИНОСИ С ПОТВЪРДИТЕЛЕН ХАРАКТЕР**

1. Настоящото изследване потвърждава необходимостта от провеждане на скрининг за ГЗД. При ограничени ресурси за масов скрининг препоръчваме да се насочи към бременни жени с повишен риск за развитие на състоянието.

### **III. ПРИНОСИ С НАУЧНО-ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР**

1. Разработена е цялостна стратегия за скрининг и поведение при жени с ГЗД в българска популация.
2. Установени са ролята, тежестта и значението на голям набор от маркери и рискови фактори.
3. Не се налага рутинно генетично изследване при пациентки с ГЗД.
4. Изработен е диагностичен алгоритъм за ГЗД при бременни жени. На базата на получените резултати са дадени препоръки за лечение при жени с ГЗД.

## ХИ. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Матрозова Й., Захаријева С., Еленкова Ат, Кирилов Г., Адипонектин и показатели за инсулинова резистентност при първичен алдостеронизъм. *Ендокринология*, 2010. 15(2).
2. Орбецова М., Атанасова И., Милчева Б., Шигарминова Р., Асланова Н., Захаријева С. Хормони на мастната тъкама при жени с различни морфологични типове на затлъстяване. *Ендокринология*, 2004. 9(4): п. 214-223.
3. Орбецова М., Захаријева С., Атанасова И., Милчева Б., Шигарминова Р., Асланова Н., Адипонектин и неговите взаимодействия с определени клинични, хормонални и метаболитни характеристики при жени с андройдно затлъстяване. *Ендокринология*, 2007. 12(1): п. 4-17.
4. Танкова Ц., Оценка на общ и индивидуален риск за захарен диабет. Дисертационен труд за присъжданер на научна степен "Доктор на медицинските науки". 2012.
5. Христов В., Първична превенция на захарен диабет тип 2. *Медицинска мисъл*, 2004(1): п. 94-100.
6. Чакърова Н., Предиабет и сърдечно-съдов риск. *Наука и Ендокринология. Наука и Ендокринология*, 2010(1): п. 4-8.
7. ACOG practice bulletin. No. 73: Use of hormonal contraception in women with coexisting medical conditions. *Obstet Gynecol*, 2006. 107(6): п. 1453-72.
8. ACOG technical bulletin. Diabetes and pregnancy. Number 200--December 1994 (replaces No. 92, May 1986). Committee on Technical Bulletins of the American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet*, 1995. 48(3): п. 331-9.
9. Agarwal, M.M., G.S. Dhath, Y. Othman, and M.R. Ljubisavljevic, Gestational diabetes: an evaluation of serum fructosamine as a screening test in a high-risk population. *Gynecol Obstet Invest*, 2011. 71(3): п. 207-12.
10. Agarwal, M.M., G.S. Dhath, and J. Punnose, Gestational diabetes: utility of fasting plasma glucose as a screening test depends on the diagnostic criteria. *Diabet Med*, 2006. 23(12): п. 1319-26.
11. Agarwal, M.M., G.S. Dhath, J. Punnose, and G. Koster, Gestational diabetes: a reappraisal of HBA1c as a screening test. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2005. 84(12): п. 1159-63.
12. Agarwal, M.M., G.S. Dhath, J. Punnose, and G. Koster, Gestational diabetes: dilemma caused by multiple international diagnostic criteria. *Diabet Med*, 2005. 22(12): п. 1731-6.
13. Akinci, B., T. Demir, A. Celtik, M. Baris, S. Yener, M.A. Ozcan, F. Yuksel, M. Secil, and S. Yesil, Serum osteoprotegerin is associated with carotid intima media thickness in

- women with previous gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008. 82(2): p. 172-8.
14. Alberti, K.G. and P.Z. Zimmet, Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*, 1998. 15(7): p. 539-53.
  15. Aldasouqi, S.A., D.J. Solomon, S.A. Bokhari, P.M. Khan, S. Muneera, and V.V. Gossain, Glycohemoglobin A1c: A promising screening tool in gestational diabetes mellitus. *Int J Diabetes Dev Ctries*, 2008. 28(4): p. 121-4.
  16. Arendz, I.J., P.H. Oomen, A. Wolthuis, N.M. van der Velde, J.A. Kroese, I. van der Veen, N.J. Veeger, and T. Spinder, [Prevalence of gestational diabetes in high-risk pregnancies: screened using an oral glucose tolerance test]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 2013. 157(18).
  17. Arner, P., Visfatin--a true or false trail to type 2 diabetes mellitus: *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Jan;91(1):28-30.
  18. Aslan, M., O. Celik, N. Celik, I. Turkcuoglu, E. Yilmaz, A. Karaer, Y. Simsek, E. Celik, and S. Aydin, Cord blood nesfatin-1 and apelin-36 levels in gestational diabetes mellitus. *Endocrine*, 2012. 41(3): p. 424-9.
  19. Asselin, B.L. and R.A. Lawrence, Maternal disease as a consideration in lactation management. *Clin Perinatol*, 1987. 14(1): p. 71-87.
  20. Ategbro, J.M., O. Grissa, A. Yessoufou, A. Hichami, K.L. Dramane, K. Moutairou, A. Miled, A. Grissa, M. Jerbi, Z. Tabka, et al., Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. 91(10): p. 4137-43.
  21. Balsells, M., R. Corcoy, D. Mauricio, J. Morales, A. Garcia-Patterson, G. Carreras, M. Puig-Domingo, and A. de Leiva, Insulin antibody response to a short course of human insulin therapy in women with gestational diabetes. *Diabetes Care*, 1997. 20(7): p. 1172-5.
  22. Barbour, L.A., C.E. McCurdy, T.L. Hernandez, J.P. Kirwan, P.M. Catalano, and J.E. Friedman, Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care*, 2007. 30 Suppl 2: p. S112-9.
  23. Barbour, L.A., J. Shao, L. Qiao, L.K. Pulawa, D.R. Jensen, A. Bartke, M. Garrity, B. Draznin, and J.E. Friedman, Human placental growth hormone causes severe insulin resistance in transgenic mice. *Am J Obstet Gynecol*, 2002. 186(3): p. 512-7.
  24. Barth, N., T. Langmann, J. Scholmerich, G. Schmitz, and A. Schaffler, Identification of regulatory elements in the human adipose most abundant gene transcript-1 ( apM-1) promoter: role of SP1/SP3 and TNF-alpha as regulatory pathways. *Diabetologia*, 2002. 45(10): p. 1425-33.
  25. Beck-Nielsen, H., O. Pedersen, and N.S. Sorensen, Effects of dietary changes on cellular insulin binding and in vivo insulin sensitivity. *Metabolism*, 1980. 29(5): p. 482-7.
  26. Beck, P. and W.H. Daughaday, Human placental lactogen: studies of its acute metabolic effects and disposition in normal man. *J Clin Invest*, 1967. 46(1): p. 103-10.

27. Beischer, N.A., J.N. Oats, O.A. Henry, M.T. Sheedy, and J.E. Walstab, Incidence and severity of gestational diabetes mellitus according to country of birth in women living in Australia. *Diabetes*, 1991. 40 Suppl 2: p. 35-8.
28. Bellamy, L., J.P. Casas, A.D. Hingorani, and D. Williams, Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 2009. 373(9677): p. 1773-9.
29. Beneventi, F., M. Simonetta, E. Lovati, G. Albonico, C. Tinelli, E. Locatelli, and A. Spinillo, First trimester pregnancy-associated plasma protein-A in pregnancies complicated by subsequent gestational diabetes. *Prenat Diagn*, 2011. 31(6): p. 523-8.
30. Berger, J. and D.E. Moller, The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*, 2002. 53: p. 409-35.
31. Berndt, J., N. Kloting, S. Kralisch, P. Kovacs, M. Fasshauer, M.R. Schon, M. Stumvoll, and M. Bluher, Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes*, 2005. 54(10): p. 2911-6.
32. Bi, M., W.H. Kao, E. Boerwinkle, R.C. Hoogeveen, L.J. Rasmussen-Torvik, B.C. Astor, K.E. North, J. Coresh, and A. Kottgen, Association of rs780094 in GCKR with metabolic traits and incident diabetes and cardiovascular disease: the ARIC Study. *PLoS One*, 2010. 5(7): p. e11690.
33. Bingley, P.J., Clinical applications of diabetes antibody testing. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. 95(1): p. 25-33.
34. Boney, C.M., A. Verma, R. Tucker, and B.R. Vohr, Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics*, 2005. 115(3): p. e290-6.
35. Boomsma, C.M., B.C. Fauser, and N.S. Macklon, Pregnancy complications in women with polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med*, 2008. 26(1): p. 72-84.
36. Boucher, J., B. Masri, D. Daviaud, S. Gesta, C. Guigne, A. Mazzucotelli, I. Castan-Laurell, I. Tack, B. Knibiehler, C. Carpenne, et al., Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*, 2005. 146(4): p. 1764-71.
37. Brelje, T.C., D.W. Scharp, P.E. Lacy, L. Ogren, F. Talamantes, M. Robertson, H.G. Friesen, and R.L. Sorenson, Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology*, 1993. 132(2): p. 879-87.
38. Briana, D.D. and A. Malamitsi-Puchner, Reviews: adipocytokines in normal and complicated pregnancies. *Reprod Sci*, 2009. 16(10): p. 921-37.
39. Brown, C.J., A. Dawson, R. Dodds, H. Gamsu, M. Gillmer, M. Hall, B. Hounsome, A. Knopfler, J. Ostler, I. Peacock, et al., Report of the Pregnancy and Neonatal Care Group. *Diabet Med*, 1996. 13(9 Suppl 4): p. S43-53.

40. Bunn, R.C. and J.L. Fowlkes, Insulin-like growth factor binding protein proteolysis. *Trends Endocrinol Metab*, 2003. 14(4): p. 176-81.
41. Buschur, E. and C. Kim, Guidelines and interventions for obesity during pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet*, 2012.
42. Butte, N.F., J.M. Hopkinson, and M.A. Nicolson, Leptin in human reproduction: serum leptin levels in pregnant and lactating women. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. 82(2): p. 585-9.
43. Castan-Laurell, I., C. Dray, C. Attane, T. Duparc, C. Knauf, and P. Valet, Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine*, 2011. 40(1): p. 1-9.
44. Catalano, P.M., M. Hoegh, J. Minium, L. Huston-Presley, S. Bernard, S. Kalhan, and S. Hauguel-De Mouzon, Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetologia*, 2006. 49(7): p. 1677-85.
45. Catalano, P.M., L. Huston, S.B. Amini, and S.C. Kalhan, Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol*, 1999. 180(4): p. 903-16.
46. Catalano, P.M., E.D. Tyzbir, S.R. Allen, J.H. McBean, and T.L. McAuliffe, Evaluation of fetal growth by estimation of neonatal body composition. *Obstet Gynecol*, 1992. 79(1): p. 46-50.
47. Catalano, P.M., E.D. Tyzbir, and E.A. Sims, Incidence and significance of islet cell antibodies in women with previous gestational diabetes. *Diabetes Care*, 1990. 13(5): p. 478-82.
48. Catalano, P.M., K.M. Vargo, I.M. Bernstein, and S.B. Amini, Incidence and risk factors associated with abnormal postpartum glucose tolerance in women with gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol*, 1991. 165(4 Pt 1): p. 914-9.
49. Centers for Disease Control and Prevention. National Diabetes Fact Sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States,. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2011.
50. Chang, Y.C., Y.F. Chiu, L.L. Ho, C.T. Ting, K.C. Shih, J.D. Curb, Y.D. Chen, H.Y. Li, and L.M. Chuang, TCF7L2 genetic variants and progression to diabetes in the Chinese population: pleiotropic effects on insulin secretion and insulin resistance. *J Mol Med (Berl)*, 2010. 88(2): p. 183-92.
51. Chen, D., Q. Fang, Y. Chai, H. Wang, H. Huang, and M. Dong, Serum resistin in gestational diabetes mellitus and early postpartum. *Clin Endocrinol*, 2007. 67(2): p. 208-11.
52. Chen, H.L., Y.P. Yang, X.L. Hu, K.K. Yelavarthi, J.L. Fishback, and J.S. Hunt, Tumor necrosis factor alpha mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at early and late stages of gestation. *Am J Pathol*, 1991. 139(2): p. 327-35.

53. Chen, J., B. Tan, E. Karteris, S. Zervou, J. Digby, E.W. Hillhouse, M. Vatish, and H.S. Randeve, Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. *Diabetologia*, 2006. 49(6): p. 1292-302.
54. Cho, Y.M., T.H. Kim, S. Lim, S.H. Choi, H.D. Shin, H.K. Lee, K.S. Park, and H.C. Jang, Type 2 diabetes-associated genetic variants discovered in the recent genome-wide association studies are related to gestational diabetes mellitus in the Korean population. *Diabetologia*, 2009. 52(2): p. 253-61.
55. Choi, S.H., S.H. Kwak, B.S. Youn, S. Lim, Y.J. Park, H. Lee, N. Lee, Y.M. Cho, H.K. Lee, Y.B. Kim, et al., High plasma retinol binding protein-4 and low plasma adiponectin concentrations are associated with severity of glucose intolerance in women with previous gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008. 93(8): p. 3142-8.
56. Clausen, T., T.K. Burski, N. Oyen, K. Godang, J. Bollerslev, and T. Henriksen, Maternal anthropometric and metabolic factors in the first half of pregnancy and risk of neonatal macrosomia in term pregnancies. A prospective study. *Eur J Endocrinol*, 2005. 153(6): p. 887-94.
57. Cnossen, J.S., K.C. Vollebregt, N. de Vrieze, G. ter Riet, B.W. Mol, A. Franx, K.S. Khan, and J.A. van der Post, Accuracy of mean arterial pressure and blood pressure measurements in predicting pre-eclampsia: systematic review and meta-analysis. *Bmj*, 2008. 336(7653): p. 1117-20.
58. Cobellis, L., M. De Falco, A. Mastrogiacomo, D. Giraldi, D. Dattilo, C. Scaffa, N. Colacurci, and A. De Luca, Modulation of apelin and APJ receptor in normal and preeclampsia-complicated placentas. *Histol Histopathol*, 2007. 22(1): p. 1-8.
59. Collares, C.V., A.F. Evangelista, D.J. Xavier, P. Takahashi, R. Almeida, C. Macedo, F. Manoel-Caetano, M.C. Foss, M.C. Foss-Freitas, D.M. Rassi, et al., Transcriptome meta-analysis of peripheral lymphomononuclear cells indicates that gestational diabetes is closer to type 1 diabetes than to type 2 diabetes mellitus. *Mol Biol Rep*, 2013. 9: p. 9.
60. Colman, P.G., D.W. Thomas, P.Z. Zimmet, T.A. Welborn, P. Garcia-Webb, and M.P. Moore, New classification and criteria for diagnosis of diabetes mellitus. Position Statement from the Australian Diabetes Society, New Zealand Society for the Study of Diabetes, Royal College of Pathologists of Australasia and Australasian Association of Clinical Biochemists. *Med J Aust*, 1999. 170(8): p. 375-8.
61. Cordero, L. and M.B. Landon, Infant of the diabetic mother. *Clin Perinatol*, 1993. 20(3): p. 635-48.
62. Cordero, L., S.H. Treuer, M.B. Landon, and S.G. Gabbe, Management of infants of diabetic mothers. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 1998. 152(3): p. 249-54.
63. Cortelazzi, D., S. Corbetta, S. Ronzoni, F. Pelle, A. Marconi, V. Cozzi, I. Cetin, R. Cortelazzi, P. Beck-Peccoz, and A. Spada, Maternal and foetal resistin and adiponectin

- concentrations in normal and complicated pregnancies. *Clin Endocrinol*, 2007. 66(3): p. 447-53.
64. Coughlan, M.T., K. Oliva, H.M. Georgiou, J.M. Permezel, and G.E. Rice, Glucose-induced release of tumour necrosis factor-alpha from human placental and adipose tissues in gestational diabetes mellitus. *Diabet Med*, 2001. 18(11): p. 921-7.
  65. Cseh, K., E. Baranyi, Z. Melczer, G.M. Csakany, G. Speer, M. Kovacs, G. Gero, I. Karadi, and G. Winkler, The pathophysiological influence of leptin and the tumor necrosis factor system on maternal insulin resistance: negative correlation with anthropometric parameters of neonates in gestational diabetes. *Gynecol Endocrinol*, 2002. 16(6): p. 453-60.
  66. Cutchie, W.A., N.W. Cheung, and D. Simmons, Comparison of international and New Zealand guidelines for the care of pregnant women with diabetes. *Diabet Med*, 2006. 23(5): p. 460-8.
  67. Damm, P., C. Kuhl, K. Buschard, B.K. Jakobsen, A. Svejgaard, F. Sodayez-Goffaux, M. Shattock, G.F. Bottazzo, and L. Molsted-Pedersen, Prevalence and predictive value of islet cell antibodies and insulin autoantibodies in women with gestational diabetes. *Diabet Med*, 1994. 11(6): p. 558-63.
  68. Davey, R.X. and P.S. Hamblin, Selective versus universal screening for gestational diabetes mellitus: an evaluation of predictive risk factors. *Med J Aust*, 2001. 174(3): p. 118-21.
  69. Daviaud, D., J. Boucher, S. Gesta, C. Dray, C. Guigne, D. Quilliot, A. Ayav, O. Ziegler, C. Carpenne, J.S. Saulnier-Blache, et al., TNFalpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *Faseb J*, 2006. 20(9): p. 1528-30.
  70. Delgado-Lista, J., P. Perez-Martinez, A. Garcia-Rios, C.M. Phillips, C.M. Williams, H.L. Gulseth, O. Helal, E.E. Blaak, B. Kiec-Wilk, S. Basu, et al., Pleiotropic effects of TCF7L2 gene variants and its modulation in the metabolic syndrome: from the LIPGENE study. *Atherosclerosis*, 2011. 214(1): p. 110-6.
  71. Dello Russo, M., W. Ahrens, T. De Vriendt, S. Marild, D. Molnar, L.A. Moreno, A. Reeske, T. Veidebaum, Y.A. Kourides, G. Barba, et al., Gestational weight gain and adiposity, fat distribution, metabolic profile, and blood pressure in offspring: the IDEFICS project. *Int J Obes*, 2013. 9(10): p. 35.
  72. Diabetes and impaired glucose tolerance in women aged 20-39 years. World Health Organization Ad Hoc Diabetes Reporting Group. *World Health Stat Q*, 1992. 45(4): p. 321-7.
  73. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2012. 35 Suppl 1: p. S64-71.
  74. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2009. 32 Suppl 1: p. S62-7.

75. Dooley, S.L., B.E. Metzger, and N.H. Cho, Gestational diabetes mellitus. Influence of race on disease prevalence and perinatal outcome in a U.S. population. *Diabetes*, 1991. 40 Suppl 2: p. 25-9.
76. Dornhorst, A., P.C. Bailey, V. Anyaoku, R.S. Elkeles, D.G. Johnston, and R.W. Beard, Abnormalities of glucose tolerance following gestational diabetes. *Q J Med*, 1990. 77(284): p. 1219-28.
77. Dozio, N., A. Beretta, C. Belloni, M. Castiglioni, S. Rosa, E. Bosi, and E. Bonifacio, Low prevalence of islet autoantibodies in patients with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 1997. 20(1): p. 81-3.
78. Dray, C., C. Knauf, D. Daviaud, A. Waget, J. Boucher, M. Buleon, P.D. Cani, C. Attane, C. Guigne, C. Carpenne, et al., Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab*, 2008. 8(5): p. 437-45.
79. Dunmore, S.J. and J.E. Brown, The Role of Adipokines in Beta-Cell Failure of Type 2 Diabetes. *J Endocrinol*, 2012. 18: p. 18.
80. Dupuis, J., C. Langenberg, I. Prokopenko, R. Saxena, N. Soranzo, A.U. Jackson, E. Wheeler, N.L. Glazer, N. Bouatia-Naji, A.L. Gloyn, et al., New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet*, 2010. 42(2): p. 105-16.
81. Ehrlich, S.F., L.G. Rosas, A. Ferrara, J.C. King, B. Abrams, K.G. Harley, M.M. Hedderson, and B. Eskenazi, Pregnancy Glucose Levels in Women without Diabetes or Gestational Diabetes and Childhood Cardiometabolic Risk at 7 Years of Age. *J Pediatr*, 2012.
82. Ekelund, M., N. Shaat, P. Almgren, E. Anderberg, M. Landin-Olsson, V. Lyssenko, L. Groop, and K. Berntorp, Genetic prediction of postpartum diabetes in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 2012. 97(3): p. 394-8.
83. El-Chaar, D., S.A. Finkelstein, X. Tu, D.B. Fell, L. Gaudet, J. Sylvain, G. Tawagi, S.W. Wen, and M. Walker, The impact of increasing obesity class on obstetrical outcomes. *J Obstet Gynaecol Can*, 2013. 35(3): p. 224-33.
84. Emet, T., I. Ustuner, S.G. Guven, G. Balik, U.M. Ural, Y.B. Tekin, S. Senturk, F.K. Sahin, and A.F. Avsar, Plasma lipids and lipoproteins during pregnancy and related pregnancy outcomes. *Arch Gynecol Obstet*, 2013. 12: p. 12.
85. Enns, J.E., C.G. Taylor, and P. Zahradka, Variations in Adipokine Genes AdipoQ, Lep, and LepR are Associated with Risk for Obesity-Related Metabolic Disease: The Modulatory Role of Gene-Nutrient Interactions. *J Obes*, 2011. 2011: p. 168659.
86. Fajans, S.S., G.I. Bell, and K.S. Polonsky, Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. *N Engl J Med*, 2001. 345(13): p. 971-80.
87. Falavigna, M., M.I. Schmidt, J. Trujillo, L.F. Alves, E.R. Wendland, M.R. Torloni, S. Colagiuri, and B.B. Duncan, Effectiveness of gestational diabetes treatment: a systematic

- review with quality of evidence assessment. *Diabetes Res Clin Pract*, 2012. 98(3): p. 396-405.
88. Farhi, A., B. Reichman, V. Boyko, A. Hourvitz, R. Ron-El, and L. Lerner-Geva, Maternal and neonatal health outcomes following assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*, 2013. 26(5): p. 454-61.
  89. Fasshauer, M. and R. Paschke, Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia*, 2003. 46(12): p. 1594-603.
  90. Fehmman, H.C. and J. Heyn, Plasma resistin levels in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus and in healthy controls. *Horm Metab Res*, 2002. 34(11-12): p. 671-3.
  91. Feig, D.S., B.R. Shah, L.L. Lipscombe, C.F. Wu, J.G. Ray, J. Lowe, J. Hwee, and G.L. Booth, Preeclampsia as a risk factor for diabetes: a population-based cohort study. *PLoS Med*, 2013. 10(4): p. 16.
  92. Ferrara, A., Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus: a public health perspective. *Diabetes Care*, 2007. 30 Suppl 2: p. S141-6.
  93. Ferrara, A., M.M. Hedderson, C.P. Quesenberry, and J.V. Selby, Prevalence of gestational diabetes mellitus detected by the national diabetes data group or the carpenter and coustan plasma glucose thresholds. *Diabetes Care*, 2002. 25(9): p. 1625-30.
  94. Ferrara, A., N.S. Weiss, M.M. Hedderson, C.P. Quesenberry, Jr., J.V. Selby, I.J. Ergas, T. Peng, G.J. Escobar, D.J. Pettitt, and D.A. Sacks, Pregnancy plasma glucose levels exceeding the American Diabetes Association thresholds, but below the National Diabetes Data Group thresholds for gestational diabetes mellitus, are related to the risk of neonatal macrosomia, hypoglycaemia and hyperbilirubinaemia. *Diabetologia*, 2007. 50(2): p. 298-306.
  95. Ferraz, T.B., R.S. Motta, C.L. Ferraz, D.M. Capibaribe, A.C. Forti, and A.R. Chacra, C-reactive protein and features of metabolic syndrome in Brazilian women with previous gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 2007. 78(1): p. 23-9.
  96. Festa, A., N. Shnawa, W. Krugluger, P. Hopmeier, G. Schernthaner, and S.M. Haffner, Relative hypoleptinaemia in women with mild gestational diabetes mellitus. *Diabet Med*, 1999. 16(8): p. 656-62.
  97. Filippatos, T.D., H.S. Randeve, C.S. Derdemezis, M.S. Elisaf, and D.P. Mikhailidis, Visfatin/PBEF and atherosclerosis-related diseases. *Curr Vasc Pharmacol*, 2010. 8(1): p. 12-28.
  98. Foldes, G., F. Horkay, I. Szokodi, O. Vuolteenaho, M. Ilves, K.A. Lindstedt, M. Mayranpaa, B. Sarman, L. Seres, R. Skoumal, et al., Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. 308(3): p. 480-5.
  99. Frayling, T.M., N.J. Timpson, M.N. Weedon, E. Zeggini, R.M. Freathy, C.M. Lindgren, J.R. Perry, K.S. Elliott, H. Lango, N.W. Rayner, et al., A common variant in the FTO gene is

- associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, 2007. 316(5826): p. 889-94.
100. Freathy, R.M., M.G. Hayes, M. Urbanek, L.P. Lowe, H. Lee, C. Ackerman, T.M. Frayling, N.J. Cox, D.B. Dunger, A.R. Dyer, et al., 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*, 2010. 59(10): p. 2682-9.
  101. Friedman, J.E., T. Ishizuka, J. Shao, L. Huston, T. Highman, and P. Catalano, Impaired glucose transport and insulin receptor tyrosine phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes. *Diabetes*, 1999. 48(9): p. 1807-14.
  102. Frost, R.A. and C.H. Lang, Skeletal muscle cytokines: regulation by pathogen-associated molecules and catabolic hormones. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2005. 8(3): p. 255-63.
  103. Fuchtenbusch, M., K. Ferber, E. Standl, and A.G. Ziegler, Prediction of type 1 diabetes postpartum in patients with gestational diabetes mellitus by combined islet cell autoantibody screening: a prospective multicenter study. *Diabetes*, 1997. 46(9): p. 1459-67.
  104. Fukuhara, A., M. Matsuda, M. Nishizawa, K. Segawa, M. Tanaka, K. Kishimoto, Y. Matsuki, M. Murakami, T. Ichisaka, H. Murakami, et al., Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*, 2005. 307(5708): p. 426-30.
  105. Gao, X.L., H.X. Yang, and Y. Zhao, Variations of tumor necrosis factor-alpha, leptin and adiponectin in mid-trimester of gestational diabetes mellitus. *Chin Med J*, 2008. 121(8): p. 701-5.
  106. Garvey, W.T., L. Maianu, J.A. Hancock, A.M. Golichowski, and A. Baron, Gene expression of GLUT4 in skeletal muscle from insulin-resistant patients with obesity, IGT, GDM, and NIDDM. *Diabetes*, 1992. 41(4): p. 465-75.
  107. Gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2004. 27 Suppl 1: p. S88-90.
  108. Gillett, M.J., International Expert Committee report on the role of the A1c assay in the diagnosis of diabetes: *Diabetes Care* 2009; 32(7): 1327-1334. *Clin Biochem Rev*, 2009. 30(4): p. 197-200.
  109. Gonzalez-Sanchez, J.L., M.T. Martinez-Larrad, C. Zabena, M. Perez-Barba, and M. Serrano-Rios, Association of variants of the TCF7L2 gene with increases in the risk of type 2 diabetes and the proinsulin:insulin ratio in the Spanish population. *Diabetologia*, 2008. 51(11): p. 1993-7.
  110. Grundy, S.M., R. Pasternak, P. Greenland, S. Smith, Jr., and V. Fuster, AHA/ACC scientific statement: Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart

- Association and the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol*, 1999. 34(4): p. 1348-59.
111. Gueuvoghlian-Silva, B.Y., M.R. Torloni, R. Mattar, L.S. de Oliveira, F.B. Scomarini, M.U. Nakamura, and S. Daher, Profile of inflammatory mediators in gestational diabetes mellitus: phenotype and genotype. *Am J Reprod Immunol*, 2012. 67(3): p. 241-50.
  112. Gyves, M.T., H.M. Rodman, A.B. Little, A.A. Fanaroff, and I.R. Merkatz, A modern approach to management of pregnant diabetics: a two-year analysis of perinatal outcomes. *Am J Obstet Gynecol*, 1977. 128(6): p. 606-16.
  113. Hadden, D.R., Diabetes in pregnancy 1985. *Diabetologia*, 1986. 29(1): p. 1-9.
  114. Hadden, D.R., A Historical Perspective on Gestational Diabetes. From the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 1998. 21(Supplement 2).
  115. Haffner, S.M., E. Kennedy, C. Gonzalez, M.P. Stern, and H. Miettinen, A prospective analysis of the HOMA model. The Mexico City Diabetes Study. *Diabetes Care*, 1996. 19(10): p. 1138-41.
  116. Haider, D.G., A. Handisurya, A. Storka, E. Vojtassakova, A. Luger, G. Pacini, A. Tura, M. Wolzt, and A. Kautzky-Willer, Visfatin response to glucose is reduced in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2007. 30(7): p. 1889-91.
  117. Hanas, R. and G. John, 2010 consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1C measurement. *Diabetes Care*, 2010. 33(8): p. 1903-4.
  118. Handwerger, S. and M. Freemark, The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2000. 13(4): p. 343-56.
  119. Hansson, O., Y. Zhou, E. Renstrom, and P. Osmark, Molecular function of TCF7L2: Consequences of TCF7L2 splicing for molecular function and risk for type 2 diabetes. *Curr Diab Rep*, 2010. 10(6): p. 444-51.
  120. Hashimoto, K., S. Noguchi, Y. Morimoto, S. Hamada, K. Wasada, S. Imai, Y. Murata, S. Kasayama, and M. Koga, A1C but not serum glycated albumin is elevated in late pregnancy owing to iron deficiency. *Diabetes Care*, 2008. 31(10): p. 1945-8.
  121. Hashimoto, T., M. Kihara, N. Imai, S. Yoshida, H. Shimoyamada, H. Yasuzaki, J. Ishida, Y. Toya, Y. Kiuchi, N. Hirawa, et al., Requirement of apelin-apelin receptor system for oxidative stress-linked atherosclerosis. *Am J Pathol*, 2007. 171(5): p. 1705-12.
  122. Haugen, F., T. Ranheim, N.K. Harsem, E. Lips, A.C. Staff, and C.A. Drevon, Increased plasma levels of adipokines in preeclampsia: relationship to placenta and adipose tissue gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006. 290(2): p. E326-33.
  123. Hauguel-de Mouzon, S., J. Lepercq, and P. Catalano, The known and unknown of leptin in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 2006. 194(6): p. 1537-45.

124. Heid, I.M., S.A. Wagner, H. Gohlke, B. Iglseder, J.C. Mueller, P. Cip, G. Ladurner, R. Reiter, A. Stadlmayr, V. Mackevics, et al., Genetic architecture of the APM1 gene and its influence on adiponectin plasma levels and parameters of the metabolic syndrome in 1,727 healthy Caucasians. *Diabetes*, 2006. 55(2): p. 375-84.
125. Heitritter, S.M., C.G. Solomon, G.F. Mitchell, N. Skali-Ounis, and E.W. Seely, Subclinical inflammation and vascular dysfunction in women with previous gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(7): p. 3983-8.
126. Hellmuth, E., P. Damm, and L. Molsted-Pedersen, Oral hypoglycaemic agents in 118 diabetic pregnancies. *Diabet Med*, 2000. 17(7): p. 507-11.
127. Henson, M.C., K.F. Swan, and J.S. O'Neil, Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet Gynecol*, 1998. 92(6): p. 1020-8.
128. Herrera, E., H. Ortega, G. Alvino, N. Giovannini, E. Amusquivar, and I. Cetin, Relationship between plasma fatty acid profile and antioxidant vitamins during normal pregnancy. *Eur J Clin Nutr*, 2004. 58(9): p. 1231-8.
129. Heude, B., V. Pelloux, A. Forhan, J.F. Bedel, J.M. Lacorte, K. Clement, and M.A. Charles, Association of the Pro12Ala and C1431T variants of PPARgamma and their haplotypes with susceptibility to gestational diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. 96(10): p. 2011-0381.
130. Hillier, T.A., K.L. Pedula, M.M. Schmidt, J.A. Mullen, M.A. Charles, and D.J. Pettitt, Childhood obesity and metabolic imprinting: the ongoing effects of maternal hyperglycemia. *Diabetes Care*, 2007. 30(9): p. 2287-92.
131. Hod, M., E.R. Mathiesen, L. Jovanovic, D.R. McCance, M. Ivanisevic, S. Duran-Garcia, L. Brondsted, A. Nazeri, and P. Damm, A randomized trial comparing perinatal outcomes using insulin detemir or neutral protamine Hagedorn in type 1 diabetes. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2013. 12: p. 12.
132. Hod, M., P. Merlob, S. Friedman, A. Schoenfeld, and J. Ovadia, Gestational diabetes mellitus. A survey of perinatal complications in the 1980s. *Diabetes*, 1991. 2: p. 74-8.
133. Hoffstedt, J., P. Eriksson, S. Mottagui-Tabar, and P. Arner, A polymorphism in the leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of leptin. *Horm Metab Res*, 2002. 34(7): p. 355-9.
134. Horikawa, Y., N. Iwasaki, M. Hara, H. Furuta, Y. Hinokio, B.N. Cockburn, T. Lindner, K. Yamagata, M. Ogata, O. Tomonaga, et al., Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY: *Nat Genet*. 1997 Dec;17(4):384-5.
135. Horosz, E., D.A. Bomba-Opon, M. Szymanska, and M. Wielgos, Third trimester plasma adiponectin and leptin in gestational diabetes and normal pregnancies. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011. 93(3): p. 350-6.

136. Hotamisligil, G.S. and B.M. Spiegelman, Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*, 1994. 43(11): p. 1271-8.
137. Hu, W., Z. Wang, H. Wang, H. Huang, and M. Dong, Serum visfatin levels in late pregnancy and pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2008. 87(4): p. 413-8.
138. Hunter, D.J., Screening for gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol*, 1989. 161(5): p. 1423-4.
139. The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *Int J Gynaecol Obstet*, 2002. 78(1): p. 69-77.
140. Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study: associations with neonatal anthropometrics. *Diabetes*, 2009. 58(2): p. 453-9.
141. Ibrahim, M.M., Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev*, 2010. 11(1): p. 11-8.
142. Inoue, T., Y. Kido, S. Asahara, T. Matsuda, Y. Shibutani, M. Koyanagi, and M. Kasuga, Effect of intrauterine undernutrition during late gestation on pancreatic beta cell mass. *Biomed Res*, 2009. 30(6): p. 325-30.
143. Jang, H.C., N.H. Cho, Y.K. Min, I.K. Han, K.B. Jung, and B.E. Metzger, Increased macrosomia and perinatal morbidity independent of maternal obesity and advanced age in Korean women with GDM. *Diabetes Care*, 1997. 20(10): p. 1582-8.
144. Jaquet, D., J. Leger, C. Levy-Marchal, J.F. Oury, and P. Czernichow, Ontogeny of leptin in human fetuses and newborns: effect of intrauterine growth retardation on serum leptin concentrations. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. 83(4): p. 1243-6.
145. Jarrett, R.J., Reflections on gestational diabetes mellitus. *Lancet*, 1981. 2(8257): p. 1220-1.
146. Jarvela, I.Y., J. Juutinen, P. Koskela, A.L. Hartikainen, P. Kulmala, M. Knip, and J.S. Tapanainen, Gestational diabetes identifies women at risk for permanent type 1 and type 2 diabetes in fertile age: predictive role of autoantibodies. *Diabetes Care*, 2006. 29(3): p. 607-12.
147. Jellema, A., M.P. Zeegers, E.J. Feskens, P.C. Dagnelie, and R.P. Mensink, Gly972Arg variant in the insulin receptor substrate-1 gene and association with Type 2 diabetes: a meta-analysis of 27 studies. *Diabetologia*, 2003. 46(7): p. 990-5.
148. Jensen, D.M., P. Damm, B. Sorensen, L. Molsted-Pedersen, J.G. Westergaard, J. Klebe, and H. Beck-Nielsen, Clinical impact of mild carbohydrate intolerance in pregnancy: a study of 2904 nondiabetic Danish women with risk factors for gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol*, 2001. 185(2): p. 413-9.
149. Jensen, D.M., L. Korsholm, P. Ovesen, H. Beck-Nielsen, L. Molsted-Pedersen, and P. Damm, Adverse pregnancy outcome in women with mild glucose intolerance: is there a clinically meaningful threshold value for glucose? *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2008. 87(1): p. 59-62.

150. Jensen, D.M., L. Molsted-Pedersen, H. Beck-Nielsen, J.G. Westergaard, P. Ovesen, and P. Damm, Screening for gestational diabetes mellitus by a model based on risk indicators: a prospective study. *Am J Obstet Gynecol*, 2003. 189(5): p. 1383-8.
151. Jimenez-Moleon, J.J., A. Bueno-Cavanillas, J.D. Luna-Del-Castillo, M. Garcia-Martin, P. Lardelli-Claret, and R. Galvez-Vargas, Prevalence of gestational diabetes mellitus: variations related to screening strategy used. *Eur J Endocrinol*, 2002. 146(6): p. 831-7.
152. Josephs, T., H. Waugh, I. Kokay, D. Grattan, and M. Thompson, Fasting-induced adipose factor identified as a key adipokine that is up-regulated in white adipose tissue during pregnancy and lactation in the rat. *J Endocrinol*, 2007. 194(2): p. 305-12.
153. Jovanovic, L. and D.J. Pettitt, Gestational diabetes mellitus. *JAMA*, 2001. 286(20): p. 2516-8.
154. Kalter-Leibovici, O., L.S. Freedman, L. Olmer, N. Liebermann, A. Heymann, O. Tal, L. Lerner-Geva, N. Melamed, and M. Hod, Screening and Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus: Critical appraisal of the new International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group recommendations on a national level. *Diabetes Care*, 2012.
155. Kameda, T., N. Matsuzaki, K. Sawai, T. Okada, F. Saji, T. Matsuda, T. Hirano, T. Kishimoto, and O. Tanizawa, Production of interleukin-6 by normal human trophoblast. *Placenta*, 1990. 11(3): p. 205-13.
156. Kautzky-Willer, A., G. Pacini, A. Tura, C. Bieglmayer, B. Schneider, B. Ludvik, R. Prager, and W. Waldhausl, Increased plasma leptin in gestational diabetes. *Diabetologia*, 2001. 44(2): p. 164-72.
157. Kim, C., Y.J. Cheng, and G.L. Beckles, Inflammation among women with a history of gestational diabetes mellitus and diagnosed diabetes in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care*, 2008. 31(7): p. 1386-8.
158. Kim C, F.A., Agarwal MM, Evolution of screening and diagnostic criteria for GDM worldwide. In *Gestational Diabetes During and After Pregnancy*, Springer, 2010: p. 33–47.
159. Kim, C., W.H. Herman, and S. Vijan, Efficacy and cost of postpartum screening strategies for diabetes among women with histories of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2007. 30(5): p. 1102-6.
160. Kim, C., K.M. Newton, and R.H. Knopp, Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care*, 2002. 25(10): p. 1862-8.
161. Kim, K.H., K. Lee, Y.S. Moon, and H.S. Sul, A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem*, 2001. 276(14): p. 11252-6.
162. Kirchhoff, K., F. Machicao, A. Haupt, S.A. Schafer, O. Tschritter, H. Staiger, N. Stefan, H.U. Haring, and A. Fritsche, Polymorphisms in the TCF7L2, CDKAL1 and SLC30A8 genes are associated with impaired proinsulin conversion. *Diabetologia*, 2008. 51(4): p. 597-601.

163. Kirwan, J.P., S. Hauguel-De Mouzon, J. Lepercq, J.C. Challier, L. Huston-Presley, J.E. Friedman, S.C. Kalhan, and P.M. Catalano, TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes*, 2002. 51(7): p. 2207-13.
164. Kjos, S.L., After pregnancy complicated by diabetes: postpartum care and education. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2007. 34(2): p. 335-49, x.
165. Kjos, S.L., T.A. Buchanan, J.S. Greenspoon, M. Montoro, G.S. Bernstein, and J.H. Mestman, Gestational diabetes mellitus: the prevalence of glucose intolerance and diabetes mellitus in the first two months post partum. *Am J Obstet Gynecol*, 1990. 163(1 Pt 1): p. 93-8.
166. Knopp, R.H., J.C. LaRosa, and R.T. Burkman, Jr., Contraception and dyslipidemia. *Am J Obstet Gynecol*, 1993. 168(6 Pt 2): p. 1994-2005.
167. Knowler, W.C., E. Barrett-Connor, S.E. Fowler, R.F. Hamman, J.M. Lachin, E.A. Walker, and D.M. Nathan, Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*, 2002. 346(6): p. 393-403.
168. Korpi-Hyovalti, E., D.E. Laaksonen, U. Schwab, S. Heinonen, and L. Niskanen, How can we increase postpartum glucose screening in women at high risk for gestational diabetes mellitus? *Int J Endocrinol*, 2012. 519267: p. 25.
169. Kourtis, A., A. Gkiomisi, M. Mouzaki, K. Makedou, A.D. Anastasilakis, K.A. Toulis, S. Gerou, E. Gavana, and T. Agorastos, Apelin levels in normal pregnancy. *Clin Endocrinol*, 2011. 75(3): p. 367-71.
170. Krzyzanowska, K., W. Krugluger, F. Mittermayer, R. Rahman, D. Haider, N. Shnawa, and G. Scherthaner, Increased visfatin concentrations in women with gestational diabetes mellitus. *Clin Sci*, 2006. 110(5): p. 605-9.
171. Kuhl, C., Etiology and pathogenesis of gestational diabetes. *Diabetes Care*, 1998. 21 Suppl 2: p. B19-26.
172. Labayen, I., J.R. Ruiz, F.B. Ortega, J. Dallongeville, D. Jimenez-Pavon, M.J. Castillo, S. De Henauw, M. Gonzalez-Gross, G. Bueno, D. Molnar, et al., Association between the FTO rs9939609 polymorphism and leptin in European adolescents: a possible link with energy balance control. The HELENA study. *Int J Obes (Lond)*, 2011. 35(1): p. 66-71.
173. Lago, F., C. Dieguez, J. Gomez-Reino, and O. Gualillo, Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2007. 3(12): p. 716-24.
174. Landon, M.B., C.Y. Spong, E. Thom, M.W. Carpenter, S.M. Ramin, B. Casey, R.J. Wapner, M.W. Varner, D.J. Rouse, J.M. Thorp, Jr., et al., A multicenter, randomized trial of treatment for mild gestational diabetes. *N Engl J Med*, 2009. 361(14): p. 1339-48.
175. Langer, O., Y. Yogeve, O. Most, and E.M. Xenakis, Gestational diabetes: the consequences of not treating. *Am J Obstet Gynecol*, 2005. 192(4): p. 989-97.

176. Lappas, M., K. Yee, M. Permezel, and G.E. Rice, Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. *J Endocrinol*, 2005. 186(3): p. 457-65.
177. Lauenborg, J., N. Grarup, P. Damm, K. Borch-Johnsen, T. Jorgensen, O. Pedersen, and T. Hansen, Common type 2 diabetes risk gene variants associate with gestational diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009. 94(1): p. 145-50.
178. Lawrence RA, L.R., *Breastfeeding: A Guide for a Medical Profession*. Elsevier Mosby, 2005. 6th Ed.(Philadelphia).
179. Lawton, C., Highlights of the 2003 Clinical Practice Guidelines for the prevention and management of diabetes in Canada. *CANNT J*, 2004. 14(1): p. 40-3.
180. Lea, R.G., D. Howe, L.T. Hannah, O. Bonneau, L. Hunter, and N. Hoggard, Placental leptin in normal, diabetic and fetal growth-retarded pregnancies. *Mol Hum Reprod*, 2000. 6(8): p. 763-9.
181. Lehto, M., T. Tuomi, M.M. Mahtani, E. Widen, C. Forsblom, L. Sarelin, M. Gullstrom, B. Isomaa, M. Lehtovirta, A. Hyrkko, et al., Characterization of the MODY3 phenotype. Early-onset diabetes caused by an insulin secretion defect. *J Clin Invest*, 1997. 99(4): p. 582-91.
182. Leroy, P., S. Dessolin, P. Villageois, B.C. Moon, J.M. Friedman, G. Ailhaud, and C. Dani, Expression of ob gene in adipose cells. Regulation by insulin. *J Biol Chem*, 1996. 271(5): p. 2365-8.
183. Leung, M., D. Kwan, and M.F. Evans, Lifestyle intervention or treatment with metformin. Which delays onset of type 2 diabetes? *Can Fam Physician*, 2004. 50: p. 369-71.
184. Linnemann, K., A. Malek, R. Sager, W.F. Blum, H. Schneider, and C. Fusch, Leptin production and release in the dually in vitro perfused human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000. 85(11): p. 4298-301.
185. Lovati, E., F. Beneventi, M. Simonetta, M. Laneri, L. Quarleri, L. Scudeller, G. Albonico, E. Locatelli, C. Cavagnoli, C. Tinelli, et al., Gestational diabetes mellitus: Including serum pregnancy-associated plasma protein-A testing in the clinical management of primiparous women? A case-control study. *Diabetes Res Clin Pract*, 2013. 1(13): p. 00157-5.
186. Lu, Q., N. Tong, Y. Liu, N. Li, X. Tang, J. Zhao, H. Cao, D. Li, L. Gou, Y. Zhang, et al., Community-based population data indicates the significant alterations of insulin resistance, chronic inflammation and urine ACR in IFG combined IGT group among prediabetic population. *Diabetes Res Clin Pract*, 2009. 84(3): p. 319-24.
187. Lurie, S. and Y. Mamet, Red blood cell survival and kinetics during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2000. 93(2): p. 185-92.

188. Mao, H., Q. Li, and S. Gao, Meta-analysis of the relationship between common type 2 diabetes risk gene variants with gestational diabetes mellitus. *PLoS One*, 2012. 7(9): p. 24.
189. Mastorakos, G., G. Valsamakis, D.C. Papatheodorou, I. Barlas, A. Margeli, A. Boutsiadis, E. Kouskouni, N. Vitoratos, A. Papadimitriou, I. Papassotiriou, et al., The role of adipocytokines in insulin resistance in normal pregnancy: visfatin concentrations in early pregnancy predict insulin sensitivity. *Clin Chem*, 2007. 53(8): p. 1477-83.
190. Masuzaki, H., Y. Ogawa, N. Sagawa, K. Hosoda, T. Matsumoto, H. Mise, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, I. Tanaka, T. Mori, et al., Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med*, 1997. 3(9): p. 1029-33.
191. Mathiesen, E.R., M. Hod, M. Ivanisevic, S. Duran Garcia, L. Brondsted, L. Jovanovic, P. Damm, and D.R. McCance, Maternal efficacy and safety outcomes in a randomized, controlled trial comparing insulin detemir with NPH insulin in 310 pregnant women with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 2012. 35(10): p. 2012-7.
192. Mathiesen, E.R., B. Kinsley, S.A. Amiel, S. Heller, D. McCance, S. Duran, S. Bellaire, and A. Raben, Maternal glycemic control and hypoglycemia in type 1 diabetic pregnancy: a randomized trial of insulin aspart versus human insulin in 322 pregnant women. *Diabetes Care*, 2007. 30(4): p. 771-6.
193. Mauricio, D., M. Balsells, J. Morales, R. Corcoy, M. Puig-Domingo, and A. de Leiva, Islet cell autoimmunity in women with gestational diabetes and risk of progression to insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*, 1996. 12(4): p. 275-85.
194. Mauricio, D., R. Corcoy, M. Codina, J. Morales, M. Balsells, and A. de Leiva, Islet cell antibodies and beta-cell function in gestational diabetic women: comparison to first-degree relatives of type 1 (insulin-dependent) diabetic subjects. *Diabet Med*, 1995. 12(11): p. 1009-14.
195. Maymo, J.L., A.P. Perez, Y. Gambino, J.C. Calvo, V. Sanchez-Margalet, and C.L. Varone, Review: Leptin gene expression in the placenta--regulation of a key hormone in trophoblast proliferation and survival. *Placenta*, 2011. 32 Suppl 2: p. S146-53.
196. Mayrhofer, M., D.U. Rabin, L. Messenger, E. Standl, and A.G. Ziegler, Value of ICA512 antibodies for prediction and diagnosis of type 1 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1996. 104(3): p. 228-34.
197. McEvoy, R.C., B. Franklin, and F. Ginsberg-Fellner, Gestational diabetes mellitus: evidence for autoimmunity against the pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 1991. 34(7): p. 507-10.
198. McLachlan, K.A., D. O'Neal, A. Jenkins, and F.P. Alford, Do adiponectin, TNFalpha, leptin and CRP relate to insulin resistance in pregnancy? Studies in women with and without gestational diabetes, during and after pregnancy. *Diabetes Metab Res Rev*, 2006. 22(2): p. 131-8.

199. McNamara, J.M. and A.O. Odibo, Sonographic evaluation and the pregnancy complicated by diabetes. *Curr Diab Rep*, 2011. 11(1): p. 13-9.
200. Megia, A., L. Gallart, J.M. Fernandez-Real, J. Vendrell, I. Simon, C. Gutierrez, and C. Richart, Mannose-binding lectin gene polymorphisms are associated with gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(10): p. 5081-7.
201. Megia, A., J. Vendrell, C. Gutierrez, M. Sabate, M. Broch, J.M. Fernandez-Real, and I. Simon, Insulin sensitivity and resistin levels in gestational diabetes mellitus and after parturition. *Eur J Endocrinol*, 2008. 158(2): p. 173-8.
202. Mestman, J.H., Outcome of diabetes screening in pregnancy and perinatal morbidity in infants of mothers with mild impairment in glucose tolerance. *Diabetes Care*, 1980. 3(3): p. 447-52.
203. Metzger, B.E., T.A. Buchanan, D.R. Coustan, A. de Leiva, D.B. Dunger, D.R. Hadden, M. Hod, J.L. Kitzmiller, S.L. Kjos, J.N. Oats, et al., Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 2007. 30 Suppl 2: p. S251-60.
204. Metzger, B.E. and D.R. Coustan, Summary and recommendations of the Fourth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. The Organizing Committee. *Diabetes Care*, 1998. 21 Suppl 2: p. B161-7.
205. Metzger, B.E., S.G. Gabbe, B. Persson, T.A. Buchanan, P.A. Catalano, P. Damm, A.R. Dyer, A. Leiva, M. Hod, J.L. Kitzmiller, et al., International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care*, 2010. 33(3): p. 676-82.
206. Metzger, B.E., L.P. Lowe, A.R. Dyer, E.R. Trimble, U. Chaovarindr, D.R. Coustan, D.R. Hadden, D.R. McCance, M. Hod, H.D. McIntyre, et al., Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med*, 2008. 358(19): p. 1991-2002.
207. Miehle, K., H. Stepan, and M. Fasshauer, Leptin, adiponectin and other adipokines in gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2012. 76(1): p. 2-11.
208. Mikkelsen, M.R., S.B. Nielsen, E. Stage, E.R. Mathiesen, and P. Damm, High maternal HbA1c is associated with overweight in neonates. *Dan Med Bull*, 2011. 58(9).
209. Mills, J.L., L. Jovanovic, R. Knopp, J. Aarons, M. Conley, E. Park, Y.J. Lee, L. Holmes, J.L. Simpson, and B. Metzger, Physiological reduction in fasting plasma glucose concentration in the first trimester of normal pregnancy: the diabetes in early pregnancy study. *Metabolism*, 1998. 47(9): p. 1140-4.
210. Moreno-Aliaga, M.J., M.M. Swarbrick, S. Lorente-Cebrian, K.L. Stanhope, P.J. Havel, and J.A. Martinez, Sp1-mediated transcription is involved in the induction of leptin by insulin-stimulated glucose metabolism. *J Mol Endocrinol*, 2007. 38(5): p. 537-46.

211. Morgan, S.A., J.B. Bringolf, and E.R. Seidel, Visfatin expression is elevated in normal human pregnancy. *Peptides*, 2008. 29(8): p. 1382-9.
212. Morris, A.P., B.F. Voight, T.M. Teslovich, T. Ferreira, A.V. Segre, V. Steinthorsdottir, R.J. Strawbridge, H. Khan, H. Grallert, A. Mahajan, et al., Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat Genet*, 2012. 44(9): p. 981-90.
213. Moses, R.G., HbA1c and the diagnosis of gestational diabetes mellitus--a test whose time has not yet come. *Diabetes Res Clin Pract*, 2012. 98(1): p. 3-4.
214. Murgia, C., M. Orru, E. Portoghese, N. Garau, P. Zedda, R. Berria, C. Motzo, S. Sulis, M. Murenu, A.M. Paoletti, et al., Autoimmunity in gestational diabetes mellitus in Sardinia: a preliminary case-control report. *Reprod Biol Endocrinol*, 2008. 6: p. 24.
215. Naserke, H.E., A.G. Ziegler, V. Lampasona, and E. Bonifacio, Early development and spreading of autoantibodies to epitopes of IA-2 and their association with progression to type 1 diabetes. *J Immunol*, 1998. 161(12): p. 6963-9.
216. Neiger, R., Fetal macrosomia in the diabetic patient. *Clin Obstet Gynecol*, 1992. 35(1): p. 138-50.
217. Niu, J.M., Q. Lei, L.J. Lu, J.Y. Wen, X.H. Lin, D.M. Duan, X. Chen, Y.H. Zhou, C.Y. Mai, G.C. Liu, et al., [Evaluation of the diagnostic criteria of gestational metabolic syndrome and analysis of the risk factors]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2013. 48(2): p. 92-7.
218. Nolan, C.J., P. Damm, and M. Prentki, Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*, 2011. 378(9786): p. 169-81.
219. Nuamah, M.A., S. Yura, N. Sagawa, H. Itoh, H. Mise, D. Korita, K. Kakui, M. Takemura, Y. Ogawa, K. Nakao, et al., Significant increase in maternal plasma leptin concentration in induced delivery: a possible contribution of pro-inflammatory cytokines to placental leptin secretion. *Endocr J*, 2004. 51(2): p. 177-87.
220. O'Shea, P., C. O'Connor, L. Owens, L. Carmody, G. Avalos, L. Nestor, K. Lydon, and F.P. Dunne, Trimester-specific reference intervals for IFCC standardised haemoglobin A(1c): new criterion to diagnose gestational diabetes mellitus (GDM)? *Ir Med J*, 2012. 105(5 Suppl): p. 29-31.
221. O'Sullivan, J.B., Body weight and subsequent diabetes mellitus. *JAMA*, 1982. 248(8): p. 949-52.
222. O'Sullivan, J.B., Diabetes mellitus after GDM. *Diabetes*, 1991. 40 Suppl 2: p. 131-5.
223. O'Sullivan, J.B. and C.M. Mahan, Criteria for the Oral Glucose Tolerance Test in Pregnancy. *Diabetes*, 1964. 13: p. 278-85.
224. Ofei, F., S. Hurel, J. Newkirk, M. Sopwith, and R. Taylor, Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes*, 1996. 45(7): p. 881-5.

225. Ognjanovic, S., S. Bao, S.Y. Yamamoto, J. Garibay-Tupas, B. Samal, and G.D. Bryant-Greenwood, Genomic organization of the gene coding for human pre-B-cell colony enhancing factor and expression in human fetal membranes. *J Mol Endocrinol*, 2001. 26(2): p. 107-17.
226. Okamura, T., R. Yanobu-Takanashi, F. Takeuchi, M. Isono, K. Akiyama, Y. Shimizu, M. Goto, Y.Q. Liang, K. Yamamoto, T. Katsuya, et al., Deletion of CDKAL1 affects high-fat diet-induced fat accumulation and glucose-stimulated insulin secretion in mice, indicating relevance to diabetes. *PLoS One*, 2012. 7(11): p. 16.
227. Omori, Y. and L. Jovanovic, Proposal for the reconsideration of the definition of gestational diabetes. *Diabetes Care*, 2005. 28(10): p. 2592-3.
228. Opara, P.I., T. Jaja, and U.C. Onubogu, Morbidity and mortality amongst infants of diabetic mothers admitted into a special care baby unit in Port Harcourt, Nigeria. *Ital J Pediatr*, 2010. 36(1): p. 77.
229. Organosation, W.H., Use of Glycated hemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. 2011.
230. Palmer, J.P., What is the best way to predict IDDM? *Lancet*, 1994. 343(8910): p. 1377-8.
231. Panzer, S., G. Kronik, K. Lechner, P. Bettelheim, E. Neumann, and R. Dudczak, Glycosylated hemoglobins (GHb): an index of red cell survival. *Blood*, 1982. 59(6): p. 1348-50.
232. Papadopoulou, A., K.F. Lynch, N. Shaat, R. Hakansson, S.A. Ivarsson, K. Berntorp, C.D. Agardh, and A. Lernmark, Gestational diabetes mellitus is associated with TCF7L2 gene polymorphisms independent of HLA-DQB1\*0602 genotypes and islet cell autoantibodies. *Diabet Med*, 2011. 28(9): p. 1018-27.
233. Pedersen, O., H. Beck-Nielsen, and L. Hedning, Increased insulin receptors after exercise in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1980. 302(16): p. 886-92.
234. Petersen, J.S., T. Dyrberg, P. Damm, C. Kuhl, L. Molsted-Pedersen, and K. Buschard, GAD65 autoantibodies in women with gestational or insulin dependent diabetes mellitus diagnosed during pregnancy. *Diabetologia*, 1996. 39(11): p. 1329-33.
235. Peterson, C.M. and R.L. Jones, Minor hemoglobins, diabetic "control", and diseases of postsynthetic protein modification: *Ann Intern Med*. 1977 Oct;87(4):489-91.
236. Pettitt, D.J. and L. Jovanovic, Do we know how to find gestational diabetes mellitus? *Clin Chem*, 2006. 52(9): p. 1633-4.
237. Pettitt, D.J. and W.C. Knowler, Long-term effects of the intrauterine environment, birth weight, and breast-feeding in Pima Indians. *Diabetes Care*, 1998. 21 Suppl 2: p. B138-41.
238. Pettitt, D.J., W.C. Knowler, H.R. Baird, and P.H. Bennett, Gestational diabetes: infant and maternal complications of pregnancy in relation to third-trimester glucose tolerance in the Pima Indians. *Diabetes Care*, 1980. 3(3): p. 458-64.

239. Phelps, R.L., G.R. Honig, D. Green, B.E. Metzger, M.C. Frederiksen, and N. Freinkel, Biphasic changes in hemoglobin A1c concentrations during normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 1983. 147(6): p. 651-3.
240. Philipson, E.H. and D.M. Super, Gestational diabetes mellitus: does it recur in subsequent pregnancy? *Am J Obstet Gynecol*, 1989. 160(6): p. 1324-9; discussion 1329-31.
241. Pickup, J.C. and M.A. Crook, Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia*, 1998. 41(10): p. 1241-8.
242. Pihoker, C., L.K. Gilliam, C.S. Hampe, and A. Lernmark, Autoantibodies in diabetes. *Diabetes*, 2005. 54(2): p. S52-61.
243. Purcell, S., B. Neale, K. Todd-Brown, L. Thomas, M.A. Ferreira, D. Bender, J. Maller, P. Sklar, P.I. de Bakker, M.J. Daly, et al., PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*, 2007. 81(3): p. 559-75.
244. Rajput, R., Y. Yogesh, M. Rajput, and S. Nanda, Utility of HbA1c for diagnosis of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 2012. 98(1): p. 104-7.
245. Report of WHO/ IDF consultation. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia., 2006.
246. Retnakaran, R., A.J. Hanley, N. Raif, P.W. Connelly, M. Sermer, and B. Zinman, C-reactive protein and gestational diabetes: the central role of maternal obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. 88(8): p. 3507-12.
247. Retnakaran, R., A.J. Hanley, N. Raif, P.W. Connelly, M. Sermer, and B. Zinman, Reduced adiponectin concentration in women with gestational diabetes: a potential factor in progression to type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2004. 27(3): p. 799-800.
248. Ridker, P.M., N. Rifai, L. Rose, J.E. Buring, and N.R. Cook, Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med*, 2002. 347(20): p. 1557-65.
249. Roca-Rodriguez, M.M., C. Lopez-Tinoco, A. Fernandez-Deudero, M. Murri, M.V. Garcia-Palacios, M.A. Garcia-Valero, F.J. Tinahones-Madueno, and M. Aguilar-Diosdado, Adipokines and metabolic syndrome risk factors in women with previous gestational diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*, 2012. 28(6): p. 542-8.
250. Rongvaux, A., R.J. Shea, M.H. Mulks, D. Gigot, J. Urbain, O. Leo, and F. Andris, Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *Eur J Immunol*, 2002. 32(11): p. 3225-34.
251. Ronti, T., G. Lupattelli, and E. Mannarino, The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol*, 2006. 64(4): p. 355-65.

252. Round, J.A., P. Jacklin, R.B. Fraser, R.G. Hughes, M.A. Mugglestone, and R.I. Holt, Screening for gestational diabetes mellitus: cost-utility of different screening strategies based on a woman's individual risk of disease. *Diabetologia*, 2011. 54(2): p. 256-63.
253. Rowan, J.A., W.M. Hague, W. Gao, M.R. Battin, and M.P. Moore, Metformin versus insulin for the treatment of gestational diabetes. *N Engl J Med*, 2008. 358(19): p. 2003-15.
254. Rowan, J.A., E.C. Rush, V. Obolonkin, M. Battin, T. Wouldes, and W.M. Hague, Metformin in gestational diabetes: the offspring follow-up (MiG TOFU): body composition at 2 years of age. *Diabetes Care*, 2011. 34(10): p. 2279-84.
255. Rutters, F., A.G. Nieuwenhuizen, F. Bouwman, E. Mariman, and M.S. Westerterp-Plantenga, Associations between a single nucleotide polymorphism of the FTO Gene (rs9939609) and obesity-related characteristics over time during puberty in a Dutch children cohort. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. 96(6): p. E939-42.
256. Ryan, E.A., S. Imes, D. Liu, R. McManus, D.T. Finegood, K.S. Polonsky, and J. Sturis, Defects in insulin secretion and action in women with a history of gestational diabetes. *Diabetes*, 1995. 44(5): p. 506-12.
257. Sacks, D.A., J.S. Greenspoon, S. Abu-Fadil, H.M. Henry, G. Wolde-Tsadik, and J.F. Yao, Toward universal criteria for gestational diabetes: the 75-gram glucose tolerance test in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*, 1995. 172(2 Pt 1): p. 607-14.
258. Sacks, D.B., A1C versus glucose testing: a comparison. *Diabetes Care*, 2011. 34(2): p. 518-23.
259. Saker, P.J., A.T. Hattersley, B. Barrow, M.S. Hammersley, J.A. McLellan, Y.M. Lo, R.J. Olds, M.D. Gillmer, R.R. Holman, and R.C. Turner, High prevalence of a missense mutation of the glucokinase gene in gestational diabetic patients due to a founder-effect in a local population. *Diabetologia*, 1996. 39(11): p. 1325-8.
260. Sanada, H., H. Yokokawa, M. Yoneda, J. Yatabe, M. Sasaki Yatabe, M.W. S, A.F. R, and A.J. P, High Body Mass Index is an Important Risk Factor for the Development of Type 2 Diabetes. *Intern Med*, 2012. 51(14): p. 1821-6.
261. Saruhan, Z., M. Ozekinci, M. Simsek, and I. Mendilcioglu, Association of first trimester low PAPP-A levels with adverse pregnancy outcomes. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 2012. 39(2): p. 225-8.
262. Sarwar, N., T. Aspelund, G. Eiriksdottir, R. Gobin, S.R. Seshasai, N.G. Forouhi, G. Sigurdsson, J. Danesh, and V. Gudnason, Markers of dysglycaemia and risk of coronary heart disease in people without diabetes: Reykjavik prospective study and systematic review. *PLoS Med*, 2010. 7(5): p. 1000278.
263. Sattar, N., I.A. Greer, I. Pirwani, J. Gibson, and A.M. Wallace, Leptin levels in pregnancy: marker for fat accumulation and mobilization? *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1998. 77(3): p. 278-83.

264. Saucedo, R., A. Zarate, L. Basurto, M. Hernandez, E. Puello, R. Galvan, and S. Campos, Relationship between circulating adipokines and insulin resistance during pregnancy and postpartum in women with gestational diabetes. *Arch Med Res*, 2011. 42(4): p. 318-23.
265. Saxena, R., L. Gianniny, N.P. Burt, V. Lyssenko, C. Giuducci, M. Sjogren, J.C. Florez, P. Almgren, B. Isomaa, M. Orho-Melander, et al., Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. *Diabetes*, 2006. 55(10): p. 2890-5.
266. Schaefer-Graf, U.M., J. Pawliczak, D. Passow, R. Hartmann, R. Rossi, C. Buhner, T. Harder, A. Plagemann, K. Vetter, and O. Kordonouri, Birth weight and parental BMI predict overweight in children from mothers with gestational diabetes. *Diabetes Care*, 2005. 28(7): p. 1745-50.
267. Schafer, S.A., O. Tschritter, F. Machicao, C. Thamer, N. Stefan, B. Gallwitz, J.J. Holst, J.M. Dekker, L.M. t Hart, G. Nijpels, et al., Impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms. *Diabetologia*, 2007. 50(12): p. 2443-50.
268. Schneider, S., C. Bock, M. Wetzel, H. Maul, and A. Loerbroks, The prevalence of gestational diabetes in advanced economies. *J Perinat Med*, 2012. 0(0): p. 1-10.
269. Schondorf, T., A. Maiworm, N. Emmison, T. Forst, and A. Pflutzner, Biological background and role of adiponectin as marker for insulin resistance and cardiovascular risk. *Clin Lab*, 2005. 51(9-10): p. 489-94.
270. Schwarz, E.B., J. Maselli, and R. Gonzales, Contraceptive counseling of diabetic women of reproductive age. *Obstet Gynecol*, 2006. 107(5): p. 1070-4.
271. Sebastiani, G., A. Pertierra Cortada, E. Vidal Sorde, J. Figueras Aloy, and J. Balasch Cortina, [Factors associated with assisted reproduction technologies and neonatal outcomes]. *An Pediatr*, 2009. 70(4): p. 323-32.
272. Sennello, J.A., R. Fayad, A.M. Morris, R.H. Eckel, E. Asilmaz, J. Montez, J.M. Friedman, C.A. Dinarello, and G. Fantuzzi, Regulation of T cell-mediated hepatic inflammation by adiponectin and leptin. *Endocrinology*, 2005. 146(5): p. 2157-64.
273. Sermer, M., C.D. Naylor, D.J. Gare, A.B. Kenshole, J.W. Ritchie, D. Farine, H.R. Cohen, K. McArthur, S. Holzapfel, A. Biringer, et al., Impact of increasing carbohydrate intolerance on maternal-fetal outcomes in 3637 women without gestational diabetes. The Toronto Tri-Hospital Gestational Diabetes Project. *Am J Obstet Gynecol*, 1995. 173(1): p. 146-56.
274. Seshiah, V., A.K. Das, V. Balaji, S.R. Joshi, M.N. Parikh, and S. Gupta, Gestational diabetes mellitus--guidelines. *J Assoc Physicians India*, 2006. 54: p. 622-8.
275. Shaat, N. and L. Groop, Genetics of gestational diabetes mellitus. *Curr Med Chem*, 2007. 14(5): p. 569-83.

276. Shao, J., P.M. Catalano, H. Yamashita, T. Ishizuka, and J.E. Friedman, Vanadate enhances but does not normalize glucose transport and insulin receptor phosphorylation in skeletal muscle from obese women with gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol*, 2000. 183(5): p. 1263-70.
277. Shea, A.K., B.R. Shah, H.D. Clark, J. Malcolm, M. Walker, A. Karovitch, and E.J. Keely, The effectiveness of implementing a reminder system into routine clinical practice: does it increase postpartum screening in women with gestational diabetes? *Chronic Dis Can*, 2011. 31(2): p. 58-64.
278. Sibai, B.M., Etiology and management of postpartum hypertension-preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 2012. 206(6): p. 470-5.
279. Simmons, D. and B.H. Breier, Fetal overnutrition in polynesian pregnancies and in gestational diabetes may lead to dysregulation of the adipoinular axis in offspring. *Diabetes Care*, 2002. 25(9): p. 1539-44.
280. Simmons, D.S., B.N. Walters, P. Wein, and N.W. Cheung, Guidelines for the management of gestational diabetes mellitus revisited. *Med J Aust*, 2002. 176(7): p. 352.
281. Sivaraman, S.C., S. Vinnamala, and D. Jenkins, Gestational diabetes and future risk of diabetes. *J Clin Med Res*, 2013. 5(2): p. 92-6.
282. Sommerfeld, M.R., G. Muller, G. Tschank, G. Seipke, P. Habermann, R. Kurrle, and N. Tennagels, In vitro metabolic and mitogenic signaling of insulin glargine and its metabolites. *PLoS One*, 2010. 5(3): p. 0009540.
283. Sparso, T., G. Andersen, T. Nielsen, K.S. Burgdorf, A.P. Gjesing, A.L. Nielsen, A. Albrechtsen, S.S. Rasmussen, T. Jorgensen, K. Borch-Johnsen, et al., The GCKR rs780094 polymorphism is associated with elevated fasting serum triacylglycerol, reduced fasting and OGTT-related insulinaemia, and reduced risk of type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2008. 51(1): p. 70-5.
284. Spellacy, W.N., S. Miller, A. Winegar, and P.Q. Peterson, Macrosomia--maternal characteristics and infant complications. *Obstet Gynecol*, 1985. 66(2): p. 158-61.
285. Standards of medical care in diabetes--2010. *Diabetes Care*, 2010. 33 Suppl 1: p. S11-61.
286. Standards of medical care in diabetes--2011. *Diabetes Care*, 2011. 34 Suppl 1: p. S11-61.
287. Stasenko, M., Y.W. Cheng, T. McLean, A.C. Jelin, L. Rand, and A.B. Caughey, Postpartum follow-up for women with gestational diabetes mellitus. *Am J Perinatol*, 2010. 27(9): p. 737-42.
288. Steffes, M.W., S. Sibley, M. Jackson, and W. Thomas, Beta-cell function and the development of diabetes-related complications in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care*, 2003. 26(3): p. 832-6.
289. Stepan, C.M. and M.A. Lazar, The current biology of resistin. *J Intern Med*, 2004. 255(4): p. 439-47.

290. Stepan, C.M. and M.A. Lazar, Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*, 2002. 13(1): p. 18-23.
291. Sternberg, E.M., G.P. Chrousos, R.L. Wilder, and P.W. Gold, The stress response and the regulation of inflammatory disease. *Ann Intern Med*, 1992. 117(10): p. 854-66.
292. Stoffel, M., K.L. Bell, C.L. Blackburn, K.L. Powell, T.S. Seo, J. Takeda, N. Vionnet, K.S. Xiang, M. Gidh-Jain, S.J. Pilakis, et al., Identification of glucokinase mutations in subjects with gestational diabetes mellitus. *Diabetes*, 1993. 42(6): p. 937-40.
293. Stolerman, E.S., A.K. Manning, J.B. McAteer, C.S. Fox, J. Dupuis, J.B. Meigs, and J.C. Florez, TCF7L2 variants are associated with increased proinsulin/insulin ratios but not obesity traits in the Framingham Heart Study. *Diabetologia*, 2009. 52(4): p. 614-20.
294. Struwe, E., G.M. Berzl, R.L. Schild, and J. Dotsch, Gene expression of placental hormones regulating energy balance in small for gestational age neonates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2009. 142(1): p. 38-42.
295. Super, M., S.D. Gillies, S. Foley, K. Sastry, J.E. Schweinle, V.J. Silverman, and R.A. Ezekowitz, Distinct and overlapping functions of allelic forms of human mannose binding protein. *Nat Genet*, 1992. 2(1): p. 50-5.
296. Szamatowicz, J., M. Kuzmicki, B. Telejko, A. Zonenberg, A. Nikolajuk, A. Kretowski, and M. Gorska, Serum visfatin concentration is elevated in pregnant women irrespectively of the presence of gestational diabetes. *Ginekol Pol*, 2009. 80(1): p. 14-8.
297. Takeuchi, F., T. Katsuya, S. Chakrewarthy, K. Yamamoto, A. Fujioka, M. Serizawa, T. Fujisawa, E. Nakashima, K. Ohnaka, H. Ikegami, et al., Common variants at the GCK, GCKR, G6PC2-ABCB11 and MTNR1B loci are associated with fasting glucose in two Asian populations. *Diabetologia*, 2010. 53(2): p. 299-308.
298. Tankova, T., N. Chakarova, L. Dakovska, and I. Atanassova, Assessment of HbA1c as a diagnostic tool in diabetes and prediabetes. *Acta Diabetol*, 2012. 49(5): p. 371-8.
299. Tankova T, C.N., Dakovska L, Kalinov K, Atanassova I, Assessment of the risk for metabolic syndrome in prediabetes and newly-diagnosed type 2 diabetes. *Journal of Diabetology*, 2010. 2(5): p. 1-8.
300. Tatemoto, K., M. Hosoya, Y. Habata, R. Fujii, T. Kakegawa, M.X. Zou, Y. Kawamata, S. Fukusumi, S. Hinuma, C. Kitada, et al., Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 251(2): p. 471-6.
301. Taylor, J.S., J.E. Kacmar, M. Nothnagle, and R.A. Lawrence, A systematic review of the literature associating breastfeeding with type 2 diabetes and gestational diabetes. *J Am Coll Nutr*, 2005. 24(5): p. 320-6.
302. Telejko, B., M. Kuzmicki, N. Wawrusiewicz-Kurylonek, J. Szamatowicz, A. Nikolajuk, A. Zonenberg, D. Zwierz-Gugala, W. Jelski, P. Laudanski, J. Wilczynski, et al., Plasma apelin

- levels and apelin/APJ mRNA expression in patients with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010. 87(2): p. 176-83.
303. Telejko, B., M. Kuzmicki, A. Zonenberg, J. Szamatowicz, N. Wawrusiewicz-Kurylonek, A. Nikolajuk, A. Kretowski, and M. Gorska, Visfatin in gestational diabetes: serum level and mRNA expression in fat and placental tissue. *Diabetes Res Clin Pract*, 2009. 84(1): p. 68-75.
304. Thangaratinam, S., E. Rogozinska, K. Jolly, S. Glinkowski, W. Duda, E. Borowiack, T. Roseboom, J. Tomlinson, J. Walczak, R. Kunz, et al., Interventions to reduce or prevent obesity in pregnant women: a systematic review. *Health Technol Assess*, 2012. 16(31): p. 1-192.
305. Thomann, R., N. Rossinelli, U. Keller, B.F. Tirri, C. De Geyter, J. Ruiz, M. Kranzlin, and J.J. Puder, Differences in low-grade chronic inflammation and insulin resistance in women with previous gestational diabetes mellitus and women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*, 2008. 24(4): p. 199-206.
306. Tok, E.C., D. Ertunc, O. Bilgin, E.M. Erdal, M. Kaplanoglu, and S. Dilek, Association of insulin receptor substrate-1 G972R variant with baseline characteristics of the patients with gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol*, 2006. 194(3): p. 868-72.
307. Tong, Y., Y. Lin, Y. Zhang, J. Yang, H. Liu, and B. Zhang, Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BMC Med Genet*, 2009. 10: p. 15.
308. Tran, T., Is it time to screen women with history of hypertensive pregnancy disorders for diabetes? *PLoS Med*, 2013. 10(4): p. 16.
309. Tsai, P.J., C.H. Yu, S.P. Hsu, Y.H. Lee, I.T. Huang, S.C. Ho, and C.H. Chu, Maternal plasma adiponectin concentrations at 24 to 31 weeks of gestation: negative association with gestational diabetes mellitus. *Nutrition*, 2005. 21(11-12): p. 1095-9.
310. Tuomilehto, J., J. Lindstrom, J.G. Eriksson, T.T. Valle, H. Hamalainen, P. Ilanne-Parikka, S. Keinanen-Kiukaanniemi, M. Laakso, A. Louheranta, M. Rastas, et al., Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*, 2001. 344(18): p. 1343-50.
311. Tuomilehto, J., P. Zimmet, I.R. Mackay, P. Koskela, G. Vidgren, L. Toivanen, E. Tuomilehto-Wolf, K. Kohtamaki, J. Stengard, and M.J. Rowley, Antibodies to glutamic acid decarboxylase as predictors of insulin-dependent diabetes mellitus before clinical onset of disease. *Lancet*, 1994. 343(8910): p. 1383-5.
312. Unwin, N., J. Shaw, P. Zimmet, and K.G. Alberti, Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention. *Diabet Med*, 2002. 19(9): p. 708-23.
313. Valsamakis, G., S. Kumar, G. Creatsas, and G. Mastorakos, The effects of adipose tissue and adipocytokines in human pregnancy. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. 1205: p. 76-81.

314. Vambergue, A., [Gestational diabetes: Diagnosis, short and long term management.]. Presse Med, 2013. 12(13): p. 00481-8.
315. Veenstra van Nieuwenhoven, A.L., M.J. Heineman, and M.M. Faas, The immunology of successful pregnancy. Hum Reprod Update, 2003. 9(4): p. 347-57.
316. Veeraswamy, S., B. Vijayam, V.K. Gupta, and A. Kapur, Gestational diabetes: the public health relevance and approach. Diabetes Res Clin Pract, 2012. 97(3): p. 350-8.
317. Veeraswamy, S., B. Vijayam, V.K. Gupta, and A. Kapur, Gestational diabetes: The public health relevance and approach. Diabetes Res Clin Pract, 2012.
318. Vitoratos, N., A. Deliveliotou, A. Dimitrakaki, D. Hassiakos, C. Panoulis, E. Deligeoroglou, and G.K. Creatsas, Maternal serum resistin concentrations in gestational diabetes mellitus and normal pregnancies. J Obstet Gynaecol Res, 2011. 37(2): p. 112-8.
319. Vitoratos, N., A. Deliveliotou, N.F. Vlahos, G. Mastorakos, K. Papadias, D. Botsis, and G.K. Creatsas, Serum adiponectin during pregnancy and postpartum in women with gestational diabetes and normal controls. Gynecol Endocrinol, 2008. 24(11): p. 614-9.
320. Vohr, B.R., S.T. McGarvey, and R. Tucker, Effects of maternal gestational diabetes on offspring adiposity at 4-7 years of age. Diabetes Care, 1999. 22(8): p. 1284-91.
321. Wahi, P., V. Dogra, K. Jandial, R. Bhagat, R. Gupta, S. Gupta, A. Wakhloo, and J. Singh, Prevalence of gestational diabetes mellitus (GDM) and its outcomes in Jammu region. J Assoc Physicians India, 2011. 59: p. 227-30.
322. Wang, F.N., C.G. Ma, Y.L. Zhang, N.X. Zhang, Y.M. Chen, Q.Q. Tang, and H.Y. Song, Identification of Glucose-responsive and Insulin-responsive Elements in Promoter of Mouse ob Gene. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai), 2000. 32(5): p. 541-544.
323. Watanabe, R.M., H. Allayee, A.H. Xiang, E. Trigo, J. Hartiala, J.M. Lawrence, and T.A. Buchanan, Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) is associated with gestational diabetes mellitus and interacts with adiposity to alter insulin secretion in Mexican Americans. Diabetes, 2007. 56(5): p. 1481-5.
324. Wauters, M., R.V. Considine, and L.F. Van Gaal, Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. Eur J Endocrinol, 2000. 143(3): p. 293-311.
325. Weng, J., M. Ekelund, M. Lehto, H. Li, G. Ekberg, A. Frid, A. Aberg, L.C. Groop, and K. Berntorp, Screening for MODY mutations, GAD antibodies, and type 1 diabetes--associated HLA genotypes in women with gestational diabetes mellitus. Diabetes Care, 2002. 25(1): p. 68-71.
326. Westergaard, J.G., J. Chemnitz, B. Teisner, H.K. Poulsen, L. Ipsen, B. Beck, and J.G. Grudzinkas, Pregnancy-associated plasma protein A: a possible marker in the classification and prenatal diagnosis of Cornelia de Lange syndrome. Prenat Diagn, 1983. 3(3): p. 225-32.

327. Weyer, C., T. Funahashi, S. Tanaka, K. Hotta, Y. Matsuzawa, R.E. Pratley, and P.A. Tataranni, Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(5): p. 1930-5.
328. White, M.F., S.E. Shoelson, H. Keutmann, and C.R. Kahn, A cascade of tyrosine autophosphorylation in the beta-subunit activates the phosphotransferase of the insulin receptor. *J Biol Chem*, 1988. 263(6): p. 2969-80.
329. WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus: second report. World Health Organ Tech Rep Ser, 1980. 646: p. 1-80.
330. Wiecek, A., M. Adamczak, and J. Chudek, Adiponectin--an adipokine with unique metabolic properties: *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Apr;22(4):981-8. Epub 2007 Jan 18.
331. Williams, M.A., C. Qiu, M. Muiy-Rivera, S. Vadachkoria, T. Song, and D.A. Luthy, Plasma adiponectin concentrations in early pregnancy and subsequent risk of gestational diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(5): p. 2306-11.
332. Winkler, G., K. Cseh, E. Baranyi, Z. Melczer, G. Speer, P. Hajos, F. Salamon, Z. Turi, M. Kovacs, P. Vargha, et al., Tumor necrosis factor system in insulin resistance in gestational diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 2002. 56(2): p. 93-9.
333. Winzer, C., O. Wagner, A. Festa, B. Schneider, M. Roden, D. Bancher-Todesca, G. Pacini, T. Funahashi, and A. Kautzky-Willer, Plasma adiponectin, insulin sensitivity, and subclinical inflammation in women with prior gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 2004. 27(7): p. 1721-7.
334. Worda, C., H. Leipold, C. Gruber, A. Kautzky-Willer, M. Knofler, and D. Bancher-Todesca, Decreased plasma adiponectin concentrations in women with gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol*, 2004. 191(6): p. 2120-4.
335. Yang, X., B. Hsu-Hage, H. Zhang, C. Zhang, and Y. Zhang, Women with impaired glucose tolerance during pregnancy have significantly poor pregnancy outcomes. *Diabetes Care*, 2002. 25(9): p. 1619-24.
336. Yura, S., N. Sagawa, H. Itoh, K. Kakui, M.A. Nuamah, D. Korita, M. Takemura, and S. Fujii, Resistin is expressed in the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. 88(3): p. 1394-7.
337. Zavalza-Gomez, A.B., R. Anaya-Prado, A.R. Rincon-Sanchez, and J.M. Mora-Martinez, Adipokines and insulin resistance during pregnancy. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008. 80(1): p. 8-15.
338. Zhang, D., J. Ma, K. Brismar, S. Efendic, and H.F. Gu, A single nucleotide polymorphism alters the sequence of SP1 binding site in the adiponectin promoter region and is associated with diabetic nephropathy among type 1 diabetic patients in the Genetics of Kidneys in Diabetes Study. *J Diabetes Complications*, 2009. 23(4): p. 265-72.

339. Zhao, J. and H.A. Weiler, Long-term effects of gestational diabetes on offspring health are more pronounced in skeletal growth than body composition and glucose tolerance. *Br J Nutr*, 2010. 104(11): p. 1641-9.
340. Ziegler, A.G., B. Hillebrand, W. Rabl, M. Mayrhofer, M. Hummel, U. Mollenhauer, J. Vordemann, A. Lenz, and E. Standl, On the appearance of islet associated autoimmunity in offspring of diabetic mothers: a prospective study from birth. *Diabetologia*, 1993. 36(5): p. 402-8.
341. Zimmermann, E., K. Skogstrand, D.M. Hougaard, A. Astrup, T. Hansen, O. Pedersen, T.I. Sorensen, and T. Jess, Influences of the common FTO rs9939609 variant on inflammatory markers throughout a broad range of body mass index. *PLoS One*, 2011. 6(1): p. e15958.
342. Zimmet, P., E.J. Boyko, G.R. Collier, and M. de Courten, Etiology of the metabolic syndrome: potential role of insulin resistance, leptin resistance, and other players. *Ann N Y Acad Sci*, 1999. 892: p. 25-44.

### **XIII. НАУЧНИ ИЗЯВИ**

#### **I. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА:**

##### **Публикации в български списания:**

1. **Бояджиева М.**, Танкова Ц.. *Диабет и бременност, сп. Наука Ендокринология, бр.4 2008*
2. **Бояджиева М.**, И. Атанасова, Ц. Танкова, К. Тодорова, В. Димитрова, С. Захаријева. *Адипоцитокени при нормална и усложнена с гестационен захарен диабет бременност. сп. Ендокринология, бр. 1 2010, стр. 30-40*
3. **Бояджиева М.**, Атанасова И., Димитрова В., Захаријева С., Танкова Ц., Грозева Г., Тодорова К., Стойкова В., Кедикова С. *Скрининг за гестационен захарен диабет в България-предварителни резултати, сп. Акушерство и Гинекология, бр.3 2010, стр.3-9;*
4. **Бояджиева М.**, И. Атанасова, С. Захаријева, Ц. Танкова, Д. Марков, В. Димитрова, В. Стойкова, С. Кедикова, Е. Павлова, С. Иванов. *Роля на плазмената кръвна захар на гладно в диагностичния алгоритъм на Гестационния захарен диабет, сп. Акушерство и Гинекология, бр. 3 2011, стр. 3 – 8;*
5. **Бояджиева М.** И. Атанасова, С. Захаријева. *Честота на аутоимунния гестационен захарен диабет, сп. Ендокринология, бр. 4 2012, стр. 212-218*
6. **Бояджиева М.** *Краткосрочни и дългосрочни рискове при деца, родени от жени с анамнеза за гестационен захарен диабет, сп. Акушерство и Гинекология, бр. 7 2012, стр. 4-8*
7. **Бояджиева М.** *Лечение с инсулинови аналози по време на бременност, сп. Наука Ендокринология, бр. 2 2013*

##### **Публикации в международни списания:**

1. **Boyadzhieva M.**, Atanasova I., Zacharieva S., Tankova T., Dimitrova V.. Comparative analysis of current diagnostic criteria for gestational diabetes mellitus *Obstet Med* June 2012 5:71—77; published ahead of print 5 April 2012,doi:10.1258/om.2011.110073
2. Beltcheva O., **Boyadzhieva M.**, Atanasova I., Angelova O., Kaneva R., Mitev V.. Single nucleotide polymorphisms in the AdipoQ gene are associated with an increased risk of gestational diabetes. *Archives of Gynecology and Obstetrics*-in press.
3. **Boyadzhieva M.**, Atanasova I., Zacharieva S., Kedikova S.. Adipocytokines in normal and complicated with gestational diabetes mellitus pregnancy. *Journal of Endocrinological Investigation*-in press.

## II. **Участия в конгреси и научни конференции във връзка с дисертацията**

### **Национални конгреси и симпозиуми:**

1. **Бояджиева М.**, И. Атанасова, Г. Грозева, В. Димитрова, Д., Марков, В. Стойкова, С. Кедикова, Ц. Танкова. Оценка на някои метаболитни параметри при бременни жени с повишен риск за развитие на гестационен захарен диабет, XXIX Национална Акушерска Конференция, 24-26.06.2010, Поморие.
2. **Бояджиева М.**, И. Атанасова, В. Стойкова, Д. Марков, В.Димитрова, К.Тодорова, Ц. Танкова. С. Захариева., Кедикова С. Скрининг за гестационен захарен диабет в България – предварителни резултати. IX<sup>ти</sup> Национален конгрес по Ендокринология, 15-17.04.2010, Пловдив
3. Стойкова В., Д. Марков, Ж. Карагйозова, **М. Бояджиева**, С. Иванов, В. Дяволов. Телесно тегло и риск от развитие на прееклампсия, XII Национален конгрес по Акушерство и Гинекология, 07 – 10.10.2010, Пловдив
4. **Бояджиева М.**, И. Атанасова, Д. Марков, В. Димитрова, С. Захариева, К. Тодорова, С. Кедикова, В. Стойкова, Ц. Танкова, Г. Грозева. Влияние на индекса на телесна маса

- преди бременността върху развитието на гестационен захарен диабет. XII Национален конгрес по Акушерство и Гинекология, 07 – 10.10.2010, Пловдив
5. **Бояджиева М.**, И. Атанасова, С. Захаријева, Ц. Танкова, Д. Марков, В. Димитрова, К.Тодорова, С. Кедикова, В. Стойкова. Необходимо ли е провеждане на орален глюкозо – толерантен тест на всички бременни жени? XIV Национален симпозиум по Ендокринология, 9 – 11.06.2011, Пловдив
  6. **Бояджиева М.**, И. Атанасова, С. Захаријева, Ц. Танкова, Д. Марков, В. Димитрова, К.Тодорова, С. Кедикова, В. Стойкова. Влияние на новите диагностични критерии върху честотата на гестационния диабет в България, XIV Национален симпозиум по Ендокринология, 9 – 11.06.2011, Пловдив
  7. **Бояджиева М.**, И. Атанасова, Цв. Танкова, С. Захаријева, В. Стойкова. Рискови фактори за развитие на гестационен захарен диабет. X Национален конгрес по Ендокринология, 11 – 14.04.2013, Пловдив

#### **Международни участия в конгреси:**

1. **Boyadzhieva M.**, I. Atanasova, T. Tankova. Comparison of two diagnostic models for assessment of gestational diabetes mellitus. 14<sup>th</sup> World Congress of Gynecological Endocrinology, 4-7.03.2010, Florence, Italy
2. **Boyadzhieva M.**, I. Atanasova, T. Tankova, V. Dimitrova, D. Markov, V. Stoykova, K. Todorova, S. Kedikova. Screening for gestational diabetes mellitus in Bulgaria-preliminary results. 14<sup>th</sup> World Congress of Gynecological Endocrinology, 4-7.03.2010, Florence, Italy
3. **Boyadzhieva M.**, I. Atanasova, T. Tankova, S. Zacharieva, D. Markov, V. Dimitrova, V. Stoykova, S. Kedikova, K. Todorova, G. Grozeva, N. Chakarova. Assessment of metabolic parameters among pregnant women with high risk for gestational diabetes. The 6<sup>th</sup> International symposium on Diabetes and Pregnancy, 23 – 26.03.2011, Salzburg, Austria
4. **Boyadzhieva M.**, I. Atanasova, S. Zacharieva, T. Tankova, D. Markov, V. Dimitrova, V. Stoykova, S. Kedikova, K. Todorova, G. Grozeva, N. Chakarova. Adipocytokines in normal

- and complicated by gestational diabetes mellitus pregnancy. The <sup>6th</sup> International symposium on Diabetes and Pregnancy, 23 – 26.03.2011, Salzburg, Austria
5. **Boyadzhieva M.**, I. Atanasova, S. Zacharieva, T. Tankova, D. Markov, V. Dimitrova, K. Todorova, G. Grozeva, N. Chakarova. Adipocytokines visfatin and apelin in normal and complicated with gestational diabetes pregnancy. Prediabetes and metabolic syndrome, 6 – 9.04.2011, Madrid, Spain
  6. **Boyadzhieva M.**, I. Atanasova, T. Tankova, S. Zacharieva, V. Dimitrova, D. Markov, V. Stoykova, K. Todorova, S. Kedikova. Comparative analysis of current guidelines for evaluation of gestational diabetes mellitus, International diabetes federation meeting, 04-08.12.2011, Dubai, United Arab Emirates
  7. Beltcheva O., **M. Boyadzhieva**, I. Atanasova, O. Angelova, R. Kaneva, V. Mitev. Association of a single nucleotide polymorphism in the adiponectin gene (ADIPOQ) with gestational diabetes mellitus in Bulgarian population. European Society of Human Genetics Conference, 23-26.06.2012, Nuremberg, Germany
  8. **Boyadzhieva M.**, I. Atanasova, E. Natchev, I. Sigridov, M. Mihova, S. Zacharieva, T. Tankova Prevalence of Gestational Diabetes in IVF and spontaneous pregnancies. The <sup>7th</sup> International symposium on Diabetes and Pregnancy, 14 – 16.03.2013, Florence, Italy
  9. **Boyadzhieva M.**, I. Atanasova, S. Zacharieva, S. Kedikova. Myo-inositol supplementation is beneficial in gestational diabetes treatment. The <sup>7th</sup> International symposium on Diabetes and Pregnancy, 14 – 16.03.2013, Florence, Italy

#### **XIV. НАУЧНИ ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИЯТА**

- 1.** “Съвременен подход за диагностика и определяне честотата на генотипно-фенотипни корелации при пациенти с гестационен захарен диабет в България”  
Проект с договор № ДО 02-7/ 2009г към МОН, Фонд Научни изследвания, участник в научния колектив.
  
- 2.** “Съвременен подход за диагностика и определяне честотата на генотипно-фенотипни корелации при пациенти с гестационен захарен диабет в България”  
Проект с договор № 11-Д/2009г МУ-София, Съвет по медицинска наука, водещ изследовател на проекта
  
- 3.** “Адипоцитокени при нормална и усложнена с гестационен захарен диабет бременност” Проект с договор № 7-Д/2010г МУ-София, Съвет по медицинска наука, водещ изследовател на проекта