

**Paweł Jan Stanirowski**

**"Badanie korelacji pomiędzy łożyskową ekspresją transporterów glukozy GLUT-1, GLUT-4 i GLUT-9, a wybranymi parametrami matczyno-płodowymi w ciąży powikłanej cukrzyca"**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych w zakresie  
medycyny**

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Krzysztof Cendrowski

Katedra i Klinika Położnictwa, Chorób Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej, II Wydział Lekarski, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Kierownik Kliniki: Prof. dr hab. n. med. Włodzimierz Sawicki



Warszawa 2018

## STRESZCZENIE

### Wprowadzenie

Cukrzyca ciążowa (gestational diabetes mellitus, GDM) oraz cukrzyca występująca przed ciążą (pre-gestational diabetes mellitus, PGDM) stanowią jedne z najczęściej stwierdzanych zaburzeń metabolicznych w przebiegu ciąży i odpowiadają za wzrost chorobowości i umieralności okołoporodowej noworodków. Dane zgromadzone w piśmiennictwie sugerują, iż w patogenezie powikłań cukrzycy, takich jak makrosomia płodu, istotną rolę mogą odgrywać zmiany w ekspresji białek transportujących glukozę GLUT-1, GLUT-4 i GLUT-9 w łożysku.

Głównym celem projektu jest uzyskanie lepszego wglądu w proces przezłożyskowego transportu glukozy w ciążach z współistniejącą nietolerancją glukozy. W tym celu prezentowane badanie dotyczy oceny ekspresji białek transportujących glukozę GLUT-1, GLUT-4 i GLUT-9 w łożysku u kobiet z rozpoznanymi GDM oraz PGDM. Dodatkowe cele projektu obejmują analizę korelacji pomiędzy łożyskową ekspresją transporterów GLUT, a wybranymi parametrami matczyno-płodowymi, w szczególności masą urodzeniową płodu oraz typem cukrzycy i stosowanym leczeniem.

### Material i metody

Do udziału w badaniu zakwalifikowano 53 pacjentki, które w okresie od marca do października 2015r. odbyły poród w Katedrze i Klinice Położnictwa, Chorób Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej, II Wydziału Lekarskiego, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Projekt badania uzyskał pozytywną opinię Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (KB/150/2013), a każda z uczestniczek wyraziła świadomą i pisemną zgodę na udział w badaniu. Kryteria włączenia do badania stanowiły: wiek pacjentki >18 lat, ciąża pojedyncza oraz wiek ciąży >37 tygodni. Z badania wykluczono pacjentki ze zdiagnozowanymi wadami rozwojowymi płodu; wewnątrzmacicznym ograniczeniem wzrastania płodu; nadciśnieniem tętniczym indukowanym ciążą lub przewlekłym; przewlekłymi chorobami układu sercowo-naczyniowego, nerek lub wątroby; po zapłodnieniu metodą *in vitro*; z przedwczesnym pęknięciem błon płodowych i nikotynizmem.

Grupę badaną stanowiło 28 pacjentek z rozpoznaną cukrzycą, w tym 16 pacjentek z cukrzycą ciążową leczoną dietą (GDMG1, n=16), 6 pacjentek z cukrzycą ciążową leczoną dietą i insuliną (GDMG2, n=6) oraz 6 pacjentek z cukrzycą typu 1 występującą przed ciążą (PGDM, n=6). Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 25 pacjentek w ciąży fizjologicznej.

GDM diagnozowano w oparciu o wyniki przeprowadzonego pomiędzy 24 a 28 tygodniem ciąży testu doustnego obciążenia 75g glukozy (oral glucose tolerance test, OGTT) zgodnie z kryteriami Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome Study (HAPO). W początkowym etapie leczenia każda z pacjentek z GDM otrzymywała zalecenia dietetyczne i jedynie w przypadkach niedostatecznej kontroli glikemii zdecydowano o włączeniu terapii insuliną. Pacjentki z PGDM otrzymywały insulinę przez cały okres ciąży. W celu zagwarantowania jednolitego przebiegu procesu diagnostyczno-terapeutycznego wszystkie pacjentki z grupy badanej znajdowały się pod opieką przyklinicznej Poradni Diabetologicznej do 38 tygodnia ciąży.

Biorąc pod uwagę sugerowany związek pomiędzy zmianami w łożyskowej ekspresji glukoporterów, a zaburzeniami wzrastania płodu w ciążach powikłanych cukrzycą u każdej z uczestniczek w okresie 48 godzin poprzedzających poród wykonano badanie ultrasonograficzne płodu. Ocenie poddano niestandardowe parametry biometryczne, takie jak grubość tkanki tłuszczowej przedniej ściany brzucha (abdominal fat mass, AFM), grubość tkanki tłuszczowej okolicy podłopatkowej (subscapular fat mass, SSFM) oraz grubość tkanki tłuszczowej i tkanek miękkich uda płodu (mid-thigh fat mass, MTFM; mid-thigh lean mass, MTLM). Pomiaru zasadniczego parametru biometrycznego płodu, jakim jest masa urodzeniowa (fetal birth-weight, FBW) dokonywano bezpośrednio po porodzie z wykorzystaniem wagi elektronicznej.

W celu oceny łożyskowej ekspresji transporterów glukozy GLUT-1, GLUT-4 i GLUT-9 od każdej z uczestniczek badania bezpośrednio po porodzie pobrano próbki z centralnego i brzeżnego obszaru łożyska. Analiza ekspresji transporterów glukozy w utrwalonych skrawkach łożyska została przeprowadzona w ramach standardowego barwienia immunohistochemicznego z następczą komputerową morfometrią ilościową.

Wyniki przeprowadzonych analiz statystycznych przedstawiono jako mediany i rozstępy międzykwartyłowe (interquartile range, IQR). Zależności pomiędzy ekspresją glukoporterów, a parametrami matczyno-płodowymi obejmującymi typ i stosowane leczenie cukrzycy, wiek ciąży, przedciążowy wskaźnik masy ciała (body mass index, BMI), przyrost masy ciała w ciąży, stężenie hemoglobiny glikowanej (glycated hemoglobin, HbA1c), masę łożyska oraz pomiary FBW, AFM, SSFM, MTFM i MTLM przedstawiono jako współczynniki korelacji Pearsona (r). Wartość  $p < 0.05$  uznano za istotną statystycznie.

## Wyniki

Analiza porównawcza pomiędzy grupami pacjentek z GDMG1 (n=16), GDMG2 (n=6), PGDM (n=6) oraz w ciąży fizjologicznej (n=25) nie wykazała istotnych statystycznie różnic w odniesieniu do podstawowych danych demograficznych i klinicznych, takich jak wiek, rodność, BMI przed ciążą, przyrost masy ciała w ciąży, wiek ciąży, sposób odbycia porodu, płeć płodu oraz stan ogólny noworodka w 10 minucie po porodzie oceniany według skali Apgar. Zarówno FBW, jak i masa łożyska były istotnie wyższe w grupach pacjentek z GDMG2, PGDM oraz w ciąży fizjologicznej w porównaniu z pacjentkami z GDMG1 (FBW: GDMG2 3550g [2980-4410g]; PGDM 4010g [3790-4080g]; kontrola 3470g [3240-3810g] vs. GDMG1 3270g [3180-3430g],  $p < 0.05$ ; masa łożyska: GDMG2 634g [472-683g]; PGDM 733g [700-796g]; kontrola 597g [498-664g] vs. GDMG1 523g [457-677g],  $p < 0.05$ ). Makrosomia płodu  $> 4000g$  okazała się dodatkowym czynnikiem różnicującym podgrupy z istotnie częstszym występowaniem wśród pacjentek z PGDM w porównaniu z pacjentkami z GDMG1 (50% vs. 0%,  $p < 0.05$ ). W odniesieniu do parametrów biometrycznych płodu ocenianych w badaniu ultrasonograficznym wykazano, iż pomiary SSFM, AFM oraz stosunek MTFM/MTLM były istotnie wyższe wśród pacjentek z GDM i PGDM w porównaniu z grupą kontrolną (SSFM: GDMG1 5.41mm [4.71-5.65mm]; GDMG2 6.1mm [5.62-6.70mm]; PGDM 7.3mm [5.60-7.36mm] vs. kontrola 5.21mm [4.80-5.85mm],  $p < 0.05$ ; AFM: GDMG1 6.0mm [5.8-6.4mm]; GDMG2 7.22mm [7.15-7.68mm]; PGDM 8.3mm [6.5-8.5mm] vs. kontrola 5.85mm [5.61-6.53mm],  $p < 0.05$ ; MTFM/MTLM: GDMG1 0.36 [0.31-0.39]; GDMG2 0.37 [0.36-0.40]; PGDM 0.38 [0.36-0.44] vs. kontrola 0.33 [0.30-0.36],  $p < 0.05$ ). Mediana stężeń HbA1c w trzecim tryestrze ciąży w grupach pacjentek z GDMG1, GDMG2 oraz PGDM wyniosła odpowiednio 5.15% [5.00-5.40%], 5.90% [5.50-6.10%] i 5.85% [5.20-6.10%] wskazując na optymalną kontrolę glikemii u większości uczestniczek badania (zakres normy:  $\leq 6\%$ ).

Wyniki przeprowadzonej morfometrii ilościowej wykazały znamienne wzrost ekspresji transporterów glukozy GLUT-4 i GLUT-9 w łożyskach pacjentek z GDMG2 i PGDM w porównaniu z grupą kontrolną (GLUT-4: GDMG2 0.052 [0.038-0.064]; PGDM 0.055 [0.044-0.064] vs. kontrola 0.024 [0.021-0.027],  $p < 0.05$ ; GLUT-9: GDMG2 0.062 [0.055-0.066]; PGDM 0.058 [0.048-0.061] vs. kontrola 0.027 [0.02-0.032],  $p < 0.05$ ). W odróżnieniu od wyżej wymienionych izoform GLUT, istotne zwiększenie ekspresji transportera GLUT-1 zaobserwowano jedynie w próbkach łożysk pochodzących od pacjentek z PGDM (GLUT-1: PGDM 0.048 [0.044-0.061] vs. kontrola 0.031 [0.027-0.035],  $p < 0.05$ ). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji transporterów GLUT-1, GLUT-4 i GLUT-9

między pacjentkami z GDMG1, a grupą kobiet w ciąży fizjologicznej (GLUT-1: GDMG1 0.029 [0.024-0.038] vs. kontrola 0.031 [0.027-0.035], NS; GLUT-4: GDMG1 0.024 [0.018-0.032] vs. kontrola 0.024 [0.021-0.027], NS; GLUT-9: GDMG1 0.026 [0.024-0.030] vs. kontrola 0.027 [0.020-0.032], NS).

W grupie kobiet z PGDM przeprowadzona analiza korelacji wykazała istnienie silnych, dodatnich zależności pomiędzy ekspresją transporterów glukozy GLUT-1, GLUT-4 i GLUT-9, a FBW (odpowiednio  $r=0.82$ ,  $p<0.05$ ;  $r=0.91$ ,  $p=0.01$ ;  $r=0.82$ ,  $p<0.05$ ) oraz pomiarami AFM (odpowiednio  $r=0.85$ ,  $p<0.05$ ;  $r=0.92$ ,  $p=0.01$ ;  $r=0.90$ ,  $p=0.01$ ). Dodatkowo, w tej samej grupie pacjentek ekspresja transportera GLUT-4 wykazywała pozytywną korelację z pomiarami SSFM ( $r=0.81$ ,  $p<0.05$ ) oraz stosunkiem MTFM/MTLM ( $r=0.84$ ,  $p<0.05$ ), podczas gdy GLUT-9 z SSFM ( $r=0.84$ ,  $p<0.05$ ). Podobne zależności w odniesieniu do ekspresji transportera GLUT-4 oraz pomiarów FBW i SSFM zaobserwowano wśród pacjentek z GDMG2 (odpowiednio  $r=0.87$ ,  $p<0.05$ ;  $r=0.86$ ,  $p<0.05$ ). Jediną istotną statystycznie korelacją odnotowaną w grupach pacjentek z GDMG1 i kontrolnej była umiarkowana zależność pomiędzy ekspresją transportera GLUT-1, a przedciążowym BMI u kobiet w ciąży fizjologicznej ( $r=0.61$ ,  $p<0.01$ ).

Ostatecznie, przeprowadzona analiza metodą regresji wieloczynnikowej wykazała, iż jedynie typ i stosowane leczenie cukrzycy oraz FBW pozostają w dodatniej zależności z ekspresją transporterów GLUT w łożysku ( $p<0.001$ ). Dodatkowo, ekspresja transportera GLUT-1 pozostaje w dodatniej zależności z matczynym BMI przed ciążą ( $p<0.001$ ).

## **Wnioski**

Prezentowane badanie wykazało, że ekspresja transporterów glukozy GLUT-1, GLUT-4 i GLUT-9 ulega zwiększeniu w łożysku u kobiet z cukrzycą ciążową leczoną dietą i insuliną oraz cukrzycą typu 1 występującą przed ciążą. Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją glukoporterów, a masą urodzeniową noworodka wskazuje, iż zmiany w łożyskowej ekspresji GLUT mogą odpowiadać za intensyfikację wzrostu płodu w ciążach z współistniejącą nietolerancją glukozy. Ponadto, stosowane leczenie cukrzycy, w szczególności włączenie terapii insuliną, może prowadzić do zwiększonej ekspresji glukoporterów w trofoblaście łożyska.

## **SUMMARY**

### **Introduction**

In the course of pregnancy gestational diabetes mellitus (GDM) and pre-gestational diabetes mellitus (PGDM) constitute some of the most frequently diagnosed metabolic disorders, and are responsible for the increase in the perinatal morbidity and mortality rates among neonates. Literature data suggest that in the pathogenesis of diabetes-related complications, such as fetal macrosomia, important role may be played by the alterations in the expression of glucose-transporting proteins GLUT-1, GLUT-4 and GLUT-9 in the placenta.

The main objective of the study was to gain better insight into the process of transplacental glucose transfer in pregnancies with concomitant glucose intolerance. For this purpose, the present project aims to investigate the expression of glucose transporters GLUT-1, GLUT-4 and GLUT-9 in the placenta of women diagnosed with GDM and PGDM. Additional objectives of the study include the analysis of correlations between the placental expression of GLUT proteins and selected maternal and fetal parameters, in particular birth-weight of the fetus, type of diabetes and applied treatment.

### **Material and methods**

Fifty-three patients who, in the period between March and October 2015, delivered in the Chair and Department of Obstetrics, Gynecology and Oncology, II Faculty of Medicine at the Medical University of Warsaw, were qualified for the study. The research project was approved by the Bioethics Committee at the Medical University of Warsaw (KB/150/2013), and each of the participants signed their written informed consent. The inclusion criteria were as follows: patient's age >18 years, singleton pregnancy and gestational age >37 weeks. Fetal malformations, intrauterine fetal growth restriction, maternal chronic or pregnancy-induced hypertension, chronic cardiovascular, renal or hepatic diseases, *in vitro* fertilization, premature rupture of membranes and smoking constituted the exclusion criteria.

The study group comprised 28 patients with diagnosed diabetes, including 16 patients with gestational diabetes mellitus treated with a diet (GDMG1, n=16), 6 patients with gestational diabetes mellitus treated with diet and insulin (GDMG2, n=6) and 6 patients with type 1 pre-gestational diabetes mellitus (PGDM, n=6). A total of 25 patients in uncomplicated pregnancies were assigned to the control group. GDM was diagnosed based on the 75g oral glucose tolerance test (OGTT) performed between 24 and 28 gestational weeks, in accordance

with the criteria defined by the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome study (HAPO). Each GDM patient received dietary advice at the initial stage of treatment and insulin therapy was introduced only in case of repeatedly inadequate glycemic control. Patients with PGDM received insulin throughout the entire gestational period. In order to ensure uniform course of the diagnostic and therapeutic process, all patients in the study group remained under the care of the Diabetes Outpatient Clinic until 38 weeks of gestation.

Considering the suggested relationship between alterations in the placental expression of glucose transporters and disturbances of the fetal growth in pregnancies complicated by diabetes mellitus, an ultrasound examination was performed in all study participants within the 48 hour period prior to the delivery. During each examination non-standard biometric parameters of the fetus were assessed, including thickness of the abdominal fat mass (AFM), subscapular fat mass (SSFm), mid-thigh fat mass (MTFM) and mid-thigh lean mass (MTLM). The measurement of the basic biometric parameter of the fetus, the fetal birth-weight (FBW), was performed directly after the delivery with the use of an electronic scales.

In order to evaluate the placental expression of glucose transporters GLUT-1, GLUT-4 and GLUT-9, specimens from the central and peripheral region of the placenta were collected immediately upon delivery from each study participant. Computer-assisted quantitative morphometry of placental sections stained in the standard immunohistochemical procedure was performed to determine the expression of selected glucose transporter proteins.

The results of the statistical analyses were expressed as medians and interquartile ranges (IQR). Correlations between the expression of glucose transporters and maternal-fetal parameters including type of diabetes, mode of treatment, gestational age, pre-gestational body mass index (BMI), gestational weight gain, glycated hemoglobin concentration (HbA1c), placental weight and the measurements of FBW, AFM, SSFM, MTFM and MTLM were presented as Pearson's correlation coefficients ( $r$ ). A  $p$  value of  $<0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

The comparative analysis between the groups of patients with GDMG1 ( $n=16$ ), GDMG2 ( $n=6$ ), PGDM ( $n=6$ ) and with an uncomplicated pregnancy ( $n=25$ ) did not reveal statistically significant differences in relation to basic demographic and clinical data, such as age, parity, pre-pregnancy BMI, gestational weight gain, gestational age, mode of delivery, fetal sex and neonate's Apgar score at 10 minutes after birth. Both FBW and placental weight were significantly higher in the groups of patients with GDMG2, PGDM and with an

uncomplicated pregnancy compared to those with GDMG1 (FBW: GDMG2 3550g [2980-4410g]; PGDM 4010g [3790-4080g]; control 3470g [3240-3810g] vs. GDMG1 3270g [3180-3430g],  $p<0.05$ ; placental weight: GDMG2 634g [472-683g]; PGDM 733g [700-796g]; control 597g [498-664g] vs. GDMG1 523g [457-677g],  $p<0.05$ ). Fetal macrosomia  $>4000$ g proved to be an additional differentiating factor between the subgroups, with significantly more frequent incidence among patients with PGDM, compared to patients with GDMG1 (50% vs. 0%,  $p<0.05$ ). With regard to the biometric parameters of the fetus evaluated using ultrasound, it was found that the SSFM and AFM measurements and the MTFM/MTLM ratio were significantly higher among GDM and PGDM patients, compared to the control group (SSFM: GDMG1 5.41mm [4.71-5.65mm]; GDMG2 6.1mm [5.62-6.7mm]; PGDM 7.3mm [5.60-7.36mm] vs. control 5.21mm [4.80-5.85mm],  $p<0.05$ ; AFM: GDMG1 6.0mm [5.8-6.4mm]; GDMG2 7.22mm [7.15-7.68mm]; PGDM 8.3mm [6.5-8.5mm] vs. control 5.85 mm [5.61-6.53mm],  $p<0.05$ ; MTFM/MTLM: GDMG1 0.36 [0.31-0.39]; GDMG2 0.37 [0.36-0.40]; PGDM 0.38 [0.36-0.44] vs. control 0.33 [0.30-0.36],  $p<0.05$ ). The median HbA1c concentration in the third trimester of pregnancy among patients with GDMG1, GDMG2 and PGDM was 5.15% [5.00-5.40%], 5.90% [5.50-6.10%] and 5.85% [5.20-6.10%], respectively, indicating optimal glycemetic control in the majority of study participants (normal range:  $\leq 6\%$ ).

The results of the quantitative morphometry demonstrated a significant increase in the expression of glucose transporters GLUT-4 and GLUT-9 in the placentas of patients with GDMG2 and PGDM in comparison with control group (GLUT-4: GDMG2 0.052 [0.038-0.064]; PGDM 0.055 [0.044-0.064] vs. control 0.024 [0.021-0.027],  $p<0.05$ ; GLUT-9: GDMG2 0.062 [0.055-0.066]; PGDM 0.058 [0.048-0.061] vs. control 0.027 [0.020-0.032],  $p<0.05$ ). Contrary to the two above-mentioned isoforms, significant increase in the expression of GLUT-1 transporter was observed only in placental specimens obtained from patients with PGDM (GLUT-1: PGDM 0.048 [0.044-0.061] vs. control 0.031 [0.027-0.035],  $p<0.05$ ). No statistically significant differences in the expression of GLUT-1, GLUT-4 and GLUT-9 transporters were found between GDMG1 patients and healthy controls (GLUT-1: GDMG1 0.029 [0.024-0.038] vs. control 0.031 [0.027-0.035], NS; GLUT-4: GDMG1 0.024 [0.018-0.032] vs. control 0.024 [0.021-0.027], NS; GLUT-9: GDMG1 0.026 [0.024-0.030] vs. control 0.027 [0.020-0.032], NS).

The correlation analysis in the group of PGDM patients revealed the presence of strong, positive correlations between the expression of glucose transporters GLUT-1, GLUT-4 and GLUT-9 and FBW ( $r=0.82$ ,  $p<0.05$ ;  $r=0.91$ ,  $p=0.01$ ;  $r=0.82$ ,  $p<0.05$ , respectively), as well as AFM measurement ( $r=0.85$ ,  $p<0.05$ ;  $r=0.92$ ,  $p=0.01$ ;  $r=0.90$ ,  $p<0.01$ , respectively).



Additionally, in the same group of patients, GLUT-4 expression demonstrated a positive correlation with fetal SSFM ( $r=0.81$ ,  $p<0.05$ ) and MTFM/MTLM ratio ( $r=0.84$ ,  $p<0.05$ ), whereas GLUT-9 positively correlated with fetal SSFM ( $r=0.84$ ,  $p<0.05$ ). Similar correlations regarding GLUT-4 expression, FBW and fetal SSFM measurements were observed in patients with GDMG2 ( $r=0.87$ ,  $p<0.05$ ;  $r=0.86$ ,  $p<0.05$ , respectively). The only statistically significant correlation observed in patients with GDMG1 as well as those from the control group was a moderate relationship between GLUT-1 expression and maternal pre-pregnancy BMI in patients with uncomplicated pregnancies ( $r=0.61$ ,  $p<0.01$ ).

Eventually, an analysis performed using the multivariate regression method demonstrated that only the type of diabetes, mode of treatment and FBW were significantly associated with GLUT expression ( $p<0.001$ ). Additionally, maternal pre-pregnancy BMI significantly contributed to GLUT-1 expression ( $p<0.001$ ).

### **Conclusions**

The present study demonstrated that the expression of glucose transporters GLUT-1, GLUT-4 and GLUT-9 is increased in the placenta of women with gestational diabetes mellitus treated with diet and insulin and type 1 pre-gestational diabetes mellitus. The positive correlation between the expression of glucose transporters and the fetal birth-weight indicates that the alterations in placental GLUT expression may be responsible for the intensification of fetal growth in pregnancies with concomitant glucose intolerance. Moreover, the mode of diabetes treatment, in particular the introduction of insulin therapy, may contribute to the increased expression of glucose transporters in the placental trophoblast.