



UMF Craiova Facultatea de Medicină
Disciplina: Diabet Nutriție Boli Metabolice
Tel/Fax 0251 502 418 Email:
diabetes@umfcv.ro



Programul:	IDEI
Tipul proiectului:	Proiecte de cercetare exploratorie
Cod proiect:	ID_711

NR CONTRACT: 234/01.10.2007

Director grant: Prof. Univ. Dr. Mota Maria

Sinteza lucrării

„NOI PERSPECTIVE IN STUDIUL SISTEMULUI ENDOCANABINOID-POLIMORFISMELE GENEI CNR1 SI FENOTIPUL METABOLIC”

a) Stadiul atins în derularea grantului în raport cu obiectivele prevăzute inițial:

In faza finala a anului 2008 au fost atinse obiectivele propuse.

In cadrul proiectului, initial, s-a stabilit modul de derulare si planul de lucru.

S-au facut demersurile necesare in vederea pregatirii fazei de cercetare prin achizitionarea infrastructurii, a materialelor si obiectelor de inventar utile desfasurarii grantului.

S-a continuat includerea subiectilor in studiu pe baza criteriilor de includere (virsta>35 ani, subiecti caucazieni, neinruditi, consimtamant semnat de subiecti) si criteriilor de excludere (diagnostic de DZ tip 1, afectiuni sau medicamente care interfera cu insulinosecretia, IR si nivelul lipidelor, sarcina si lactatie).

Subiectii au semnat Consimtamantul informat anterior intrarii in studiu, in deplina cunostinta de cauza, dupa ce au fost informati asupra tuturor aspectelor relevante in luarea deciziei. Studiul este condus in concordanta cu principiile etice, care isi au originea in Declaratia de la

Helsinki, si sunt in concordanta cu GCP si reglementarile nationale si internationale in vigoare, respectandu-se dreptul la integritate, confidentialitate, optiunea retragerii oricand din studiu a subiectului. Desfasurarea tuturor activitatilor din proiectului de cercetare s-a realizat cu respectarea normelor legale prevazute în Legea 206/2004 privind buna conduita în cercetarea stiintifica, dezvoltarea tehnologica si inovare. Toate drepturile asupra documentelor, datelor obtinute precum si asupra rezultatelor si rapoartelor studiului sunt si ramin proprietatea colectivului care va proteja toate datele de orice utilizare, multiplicare, dezvaluire, pierdere sau deteriorare neautorizata pina la comunicarea si respectiv publicarea in reviste de specialitate a rezultatelor finale.

S-a completat fisa pacientilor studiati cu date personale: antecedente personale patologice (vechimea diabetului, prezenta/absenta complicatiilor cronice macrovasculare si microvasculare ale diabetului, greutatea maxima atinsa pana in prezent, prezenta dislipidemiei, analiza respectarii masurilor de optimizare a stilului de viata la persoanele diagnosticate cu diabet zaharat tip 2) si antecedente heredocolaterale (prezenta diabetului, obezitatii, dislipidemiei la rudele de gradul I ale subiectiilor inclusi in studiu).

Au fost inregistrati parametrii antropometrici: greutate, inaltime, circumferinta taliei si soldului. Pe baza acestor parametri s-au calculat: indicele talie / sold si indicele masei corpului (IMC).

In functie de indicii calculati si valoarea circumferintei abdominale subiectii au fost considerati: normoponderali ($IMC\ 18.5-24.9\ Kg/m^2$), supraponderali ($IMC\ 25-29.9\ Kg/m^2$), obezi ($IMC\ \geq\ 30\ Kg/m^2$) si subiecti cu obezitate abdominala (Circumferinta abdominala $\geq\ 80\ cm$ la femei si $\geq 94\ cm$ la barbati, Indicele abdomino-fesier >0.95 la barbati si >0.8 la femei).

La toti subiectii inclusi in studiu s-au prelevat probe de sange dupa un post alimentar de 12 ore, in vederea dozarii glicemiei bazale.

La subiectii fara diagnostic de diabet s-a efectuat test de toleranta orala la glucoza cu 75g glucoza pulvis. S-au prelevat probe de sange dupa un post alimentar de 12 ore in vederea determinarii glicemiei bazale. Ulterior s-au administrat 75g glucoza pulvis dizolvata in 200 ml apa. S-au prelevat probe de sange la 1 ora si la 2 ore dupa administrarea glucozei in vederea determinarii glicemiei la 1 ora si la 2 ore dupa ingestia glucozei.

Pe baza testului de toleranta orala la glucoza s-a urmarit excluderea tulburarilor metabolismului glucidic la subiectii nediagnosticati anterior cu diabet zaharat.

In vederea desfasurarii fazelor urmatoare ale proiectului o parte din probele de sange prelevate au fost stocate in vederea determinarii

nivelurilor plasmatice ale: colesterolului total, trigliceridelor, HDL colesterol, adiponectinei, leptinei.

S-au dozat insulina a jeun prin metoda ELISA cu anticorpi monoclonali. Pe baza valorilor ale glicemiei si insulinemiei, s-a calculat indicele de insulinoresistenta: HOMA-IR (homeostasis model assessment for insulin resistance), $[\text{Insulinemie a jeun } (\mu\text{U/ml}) \times \text{Glicemie a jeun (mmol/l)}] / 22,5$ si s-a estimat insulinosecretia cu ajutorul indicelui HOMA%B $[\text{Insulinemie a jeun } (\mu\text{U/ml}) \times 20] / [\text{Glicemie a jeun (mmol/l)} - 3,5]$.

S-a initiat izolarea și purificarea ADN-ului genomic. Probele de sange recoltate pe EDTA au fost supuse metodelor de extracție ADN folosind DNA Purification Kit. Protocolul este destinat izolării ADN din leucocite, cantitatea obținută fiind de aproximativ 5-15μg. Purificarea ADN are loc în patru etape: (1) liză celulară și nucleară - această etapă implică inițial liza eritrocitelor în *soluția de liză celulară* urmată de liza leucocitelor și a nucleilor acestora în *soluția de liză nucleară*; digestia opțională a ARN-ului total cu ajutorul RN-azelor; (2) înlăturarea proteinelor după o prealabilă precipitare a acestora în soluție salină ce lasă în soluție ADN-ul cu masă moleculară mare (*soluție de precipitare a proteinelor*); (3) concentrarea ADN-ului și eliminarea sărurilor din soluție prin precipitare în *izopropanol*; (4) spălarea cu etanol, deshidratarea și rehidratarea ADN-ului.

Evaluarea concentrației și purității ADN s-a realizat folosind spectrofotometrul Eppendorf Biophotometer cuplat cu unitatea optică Hellma TrayCell fiind astfel posibilă măsurarea în volume de 0,7 - 5 μl.

S-a initiat genotiparea a cinci SNP-uri ale genei CNR1 (rs1049353 (1359 G>A), rs806381 (10908 A>G), rs12720071 (3813 A>G), rs754387 (23866A>C), rs806368 (4894 C>T).

În vederea identificării SNP-urilor (single nucleotide polymorphism) genei CNR1 ce codifica receptorul endocannabinoid CB1, s-a utilizat International HapMap Project. Cu același program s-a stabilit patternul pentru linkage disequilibrium caracteristic populației studiate.

Nu s-au înregistrat accidente și incidente pe parcursul desfășurării studiului iar probele au fost prelevate, transportate și stocate în concordanță cu prevederile protocoalelor tehnice specifice fiecărei determinări.

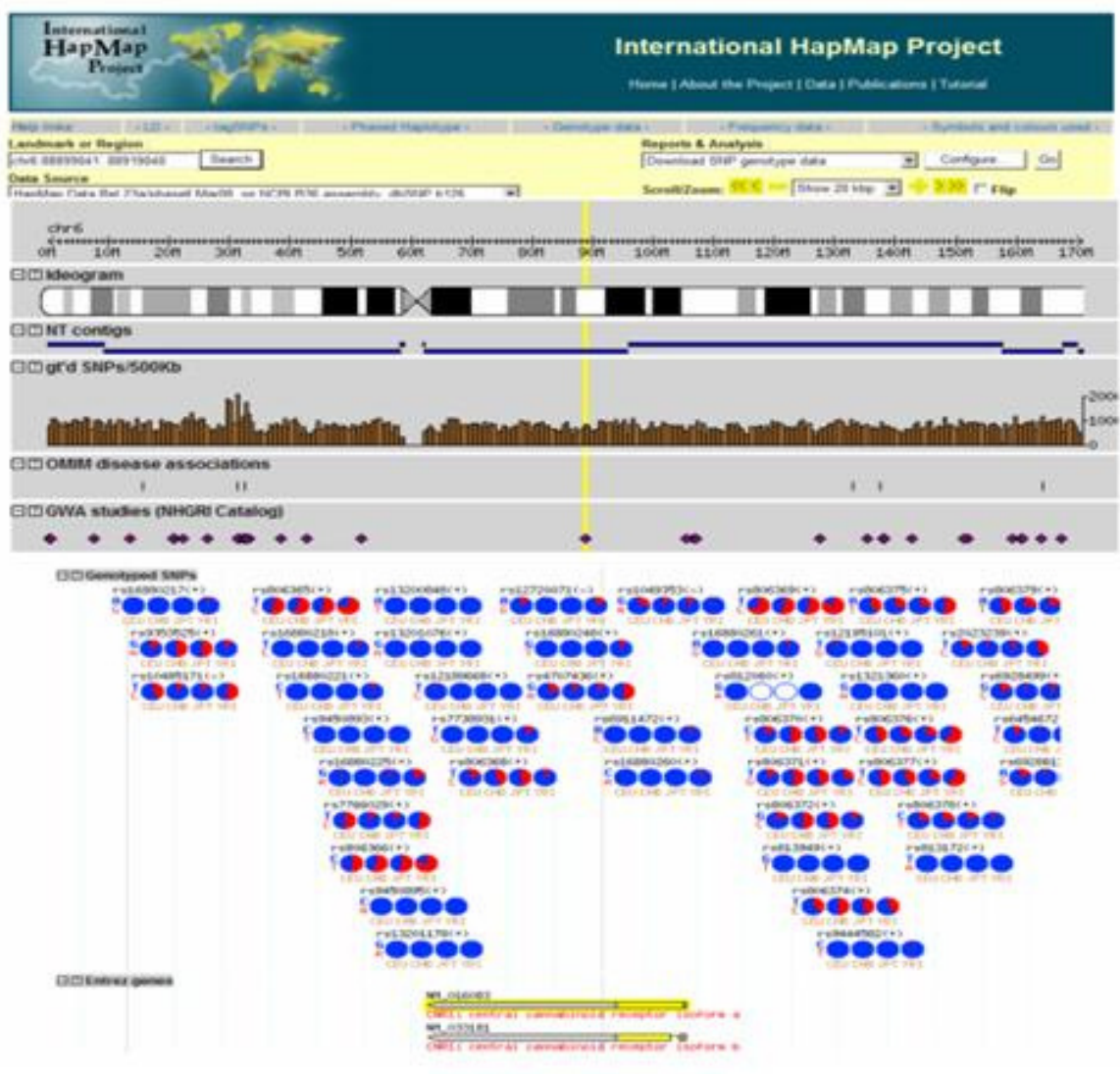
b) Valoarea și nivelul științific al rezultatelor obținute până în stadiul respectiv:

Au fost inclusi in studiu 556 subiecti. In functie de paramentrii antropometrice si de rezultatul testului de toleranta orala la glucoza s-au structurat loturile de studiu lot 1: subiecti diagnosticati cu DZ tip 2, normoponderali ($IMC < 25 \text{ Kg/m}^2$), fara tratament antidiabetic, echilibrati numai prin masuri de optimizare a stilului de viata. Lot 2: pacienti diagnosticati cu DZ tip 2, obezi ($IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$), fara tratament antidiabetic, echilibrati numai prin masuri de optimizare a stilului de viata. Lot 3: subiecti fara tulburari ale metabolismului glucidic, obezi ($IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$). Lot 4: Lotul control constituit din subiecti fara tulburari ale metabolismului glucidic, normoponderali ($IMC 18.5-24.9 \text{ Kg/m}^2$).

Datele obtinute in aceasta faza a grantului sugereaza existenta predominant a obezitatii (evaluate cu ajutorul parametrilor antropometrici) la pacientii diagnosticati cu diabet zaharat tip 2, fara tratament antidiabetic, echilibrati numai prin masuri de optimizare a stilului de viata si a normoponderii la subiectii nediagnosticati cu diabet. Polimorfismele studiate ale genei CNR1, gena ce codifica receptorii endocanabinoizi CB1, se asociaza cu componentele fenotipului metabolic (obezitate, insulinoresistenta si modificarea insulinosecretiei pancreatice).

Evidentierea corelatiei polimorfismelor CNR1 cu fenotipul metabolic (evaluat prin parametrii antropometrici si biologici) are o importanta deosebita deoarece polimorfismele CNR1 pot constitui noi markeri ai fenotipului metabolic, putand fi astfel utilizati in screening-ul persoanelor cu risc crescut. Se va putea, astfel, preveni aparitia obezitatii, IR, DLP, DZ tip 2 si a complicatiilor acestuia scazind astfel considerabil costurile.

Cu ajutorul programului HapMap, s-a scanat o regiune de 20kbp a genei CNR1. S-au selectat SNP-urile aflate in linkage disequilibrium si s-au identificat haplotipurile, frecventa alelelor. Exista, astfel, posibilitatea genotiparii unui numar mai mic de SNP, fara a pierde nicio informatie datorita identificarii SNP-urilor aflate in linkage disequilibrium.



Tinerii cercetatori din echipa de cercetare au participat la selectarea pacienților, la culegerea datelor anamnestice, la măsurarea și înregistrarea parametrilor antropometrici, la evaluarea și monitorizarea clinică, la efectuarea curentă a testelor genetice. Au participat activ la colectarea și stocarea computerizată a parametrilor clinici și paraclinici în bazele de date.

c) Măsura în care rezultatele au fost difuzate (articole, cărți, comunicări) alte constatări:

Au fost publicate și susținute lucrări la manifestări științifice de profil ce au abordat teme din cadrul grantului:

1. Robert Dinu, Simona Popa, Mihaela Bîcu, Maria Moța. **The implication of CNR1 gene's polymorphisms in the modulation of endocannabinoid system effects.** Romanian Journal of Internal Medicine. Vol 46/No. 3/ 2008, *in press*. ISSN 1220-4749 [PubMed-MEDLINE]
2. **Premiul III la sesiunea poster.** Simona Popa, Mihaela Bîcu, Robert Dinu, M. Ioana, Camelia Pănuș, Maria Moța. **Endocannabinoid system and metabolic phenotype.** Annual Congress of the Romanian Medical Association, Bucharest, 2008
3. Mihaela L. Bicu, Simona G. Popa, R.I. Dinu, Camelia Panus, Maria Mota. **The correlation between waist circumference and TG/HDL>3 ratio as insulinresistance markers with the disturbances of glycemic metabolism.** Al 7-lea Congres al Federatiei Romane de Diabet, Nutritie, Boli Metabolice, Sibiu 2008.
4. Robert Dinu, M. Ioana, Simona Popa, Maria Moța, M. Cruce. **Biomarkers of obesity evaluating the risk for complications.** Annual Congress of the Romanian Medical Association, Bucharest, 2008.
5. Nicoleta Mitroi, Maria Moța. **Nutrigenomics/Nutrigenetics.** Roumanian Journal of Internal Medicine – in Press, Medline
6. Glavce C., Mota Maria, Popa I., Petrescu M., Stan C., Popa S. **Evolution of overweight problems in adolescents (11-18 years) and modulating factors.** Revista de Igiena si Sanatate Publica, Vol 58, Nr 2/2008. Jur Oficial al Societ de Igiena si Sanat Publica, Romania. CNCSIS – D; ISSN 1221-2520
7. Dinu IR, Ioana M, Popa Simona, Moța Maria. **Diagnosticul și prognosticul complicațiilor obezității.** Zilele UMF din Craiova, Ediția a XXXVIII-a, iunie 2008. ISSN:1843-2441. Prezentare orală
8. **Maria Mota - Premiu de excelență al Societății de Nutriție din România, pentru contribuții importante la dezvoltarea specialității-** aprilie 2008, Iași
9. Mota Maria. Curs național cu tema **Alimentatia omului sanatos si bolnav** organizat de Societatea Romana de Diabet. Timisoara, octombrie 2008
10. Mota Maria. Curs EASD cu tema **Riscul cardiovascular case report** Sibiu 2008
11. Maria Mota. **Factori ce influenteaza progresia diabetului.** Diabetes Care (ed in limba romana) Vol 1 Nr 3/2008: 237-240. ISSN 1844-2439.
12. Maria Mota - **Organizarea de manifestari stiintifice in concordanta cu tematica grantului:**
 - *Simpozion național: Etiopatogenia obezității* –EQI, febr. 2008
 - *Simpozion interjudețean: Tratamentul DZ tip 2* – Craiova, mai 2008
 - *Simpozion interjudețean: Obezitatea* – Craiova, mai 2008

- *Simpozion interjudețean: Prevenție în diabet* –organizator Medic.ro, Rm Vîlcea, mar. 2008
- *Simpozion interjudețean: Cardiodiabet*, Craiova – febr. 2008
- *Simpozion interjudețean: Prevenție în diabet* – organizator Medic.ro, Craiova, febr. 2008

In cadrul acestei faze a grantului toți membri echipei, în mod special **tinerii cercetatori au fost angrenați permanent in activitatea de documentare** in concordanta cu tematica grantului, in elaborarea rapoartelor de etapa si a lucrarilor stiintifice.

In iulie 2008 s-a aprobat de catre Comisia de Stiinte Medicale din cadrul CNCSIS cererea de modificare a echipei de cercetare in sensul inlocuirii Dr. Dragos Alexandru cu Dr. Ilie-Robert Dinu.

d) Modul de utilizare a fondurilor până în stadiul respectiv:

Fondurile alocate pe anul 2008 pentru cercetare in cadrul acestui grant, au fost utilizate pentru achizitionarea de materiale consumabile, reactivi, echipamente de infrastructura si pentru salarizarea membrilor echipei de cercetare implicati in aceasta etapa a grantului. S-au efectuat stagii de documentare-cercetare.