



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 proiectelor în raport cu obiectivele prevăzute inițial;

În faza finală a anului 2009 au fost atinse obiectivele propuse.

În cadrul proiectului, inițial, s-a stabilit modul de derulare și planul de lucru.

S-a finalizat includerea subiecților în studiu pe baza criteriilor de includere (varsta > 35 ani, subiecți caucazieni, neînruțiți, consimțământ semnat de subiecți) și criteriilor de excludere (diagnostic de DZ tip 1, sarcină și lactație, afecțiuni sau medicamente care interferează cu insulinosecreția, insulinorezistență, nivelul lipidelor).

Subiecții au semnat Consimțământul informat anterior intrării în studiu, în deplină cunoștință de cauză, după ce au fost informați asupra tuturor aspectelor relevante în luarea deciziei. Studiul este condus în concordanță cu principiile etice, care își au originea în Declarația de la Helsinki, și sunt în concordanță cu GCP și reglementările naționale și

internationale în vigoare, respectându-se dreptul la integritate, confidențialitate, opțiunea retragerii oricând din studiu a subiectului. Desfasurarea tuturor activitatilor din proiectului de cercetare s-a realizat cu respectarea normelor legale prevăzute în Legea 206/2004 privind buna conduită în cercetarea științifică, dezvoltarea tehnologică și inovare. Toate drepturile asupra documentelor, datelor obținute precum și asupra rezultatelor și rapoartelor studiului sunt și rămân proprietatea colectivului care va proteja toate datele de orice utilizare, multiplicare, dezvaluire, pierdere sau deteriorare neautorizată până la comunicarea și respectiv publicarea în reviste de specialitate a rezultatelor finale.

Au fost înregistrați parametrii antropometrici: greutate, înălțime, circumferința taliei și soldului. Pe baza acestor parametri s-au calculat: indicii talie / sold și indicii masei corpului (IMC).

În funcție de indicii calculați și valoarea circumferinței abdominale subiecții au fost considerați: normoponderali (IMC 18.5-24.9 Kg/m²), supraponderali (IMC 25-29.9 Kg/m²), obezi (IMC ≥ 30 Kg/m²) și subiecți cu obezitate abdominală (Circumferința abdominală ≥ 80 cm la femei și ≥94 cm la bărbați, Indicele abdomino-fesier >0.95 la bărbați și >0.8 la femei).

La toți subiecții incluși în studiu s-au prelevat probe de sânge după un post alimentar de 12 ore, în vederea dozării glicemiei bazale, colesterolului total, trigliceridelor, HDL colesterolului folosind sistemul de dozare Reflotron.

La subiecții fără diagnostic de diabet s-a efectuat test de toleranță orală la glucoză cu 75g glucoză pulvis. S-au prelevat probe de sânge după un post alimentar de 12 ore în vederea determinării glicemiei bazale. Ulterior s-au administrat 75g glucoză pulvis dizolvată în 200 ml apă. S-au prelevat probe de sânge la 1 oră și la 2 ore după administrarea glucozei în vederea determinării glicemiei la 1 oră și la 2 ore după ingestia glucozei.

Pe baza testului de toleranță orală la glucoză s-a urmărit excluderea tulburărilor metabolismului glucidic la subiecții nediagnosticați anterior cu diabet zaharat.

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

S-a continuat izolarea și purificarea ADN-ului genomic. Probele de sange recoltate pe EDTA au fost supuse metodelor de extracție ADN folosind DNA Purification Kit. S-a continuat genotiparea a cinci SNP-uri (single nucleotide polymorphism) ale genei CNR1 (rs1049353 (1359 G>A), rs806381 (10908 A>G), rs12720071 (3813 A>G), rs754387 (23866A>C), rs806368 (4894 C>T).

Nu s-au înregistrat accidente si incidente pe parcursul desfasurarii 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 610 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 18.5-24.9 Kg/m²), fara tratament antidiabetic, echilibrati numai prin masuri de optimizare a stilului de viata. Lot 2: pacienti diagnosticati cu DZ tip 2, obezi (IMC≥30Kg/m²), fara tratament antidiabetic, echilibrati numai prin masuri de optimizare a stilului de viata. Lot 3: subiecti fara tulburari ale metabolismului glucidic, obezi (IMC≥30Kg/m²). Lot 4: Lotul control constituit din subiecti fara tulburari ale metabolismului glucidic, normoponderali (IMC 18.5-24.9 Kg/m²).

Datele obtinute in aceasta faza a grantului sugereaza ca subiectii cu sindrom metabolic, definit conform criteriilor NCEP-ATPIII, au prezentat niveluri crescute ale leptinei, raportului trigliceride/HDL colesterol, HOMA-IR, circumferintei abdominale, IMC-ului si niveluri scazute ale adiponectinei si raportului adiponectina/leptina. De asemenea, rezultatele acestui studiu au indicat faptul ca raportul adiponectina/leptina s-a corelat mai bine cu componentele sindromului metabolic decat adiponectina si leptina separat. Studiul actual a indicat ca subiectii cu diabet zaharat si prediabet (alterarea glicemiei a jeun si/sau scaderea tolerantei la glucoza) au avut niveluri crescute ale raportului trigliceride/HDL colesterol, HOMA-IR, circumferintei abdominale, IMC-ului si niveluri mai scazute ale adiponectinei si raportului adiponectina/leptina.

Analiza statistica a rezultatelor acestui studiu a sugerat ca raportul adiponectina/leptina poate fi un marker al insulinoresistentei mai util decat

HOMA-IR la subiecții cu sindrom metabolic, cât și la subiecții cu alterarea metabolismului glucidic.

Metode standard de statistică genetică au fost utilizate pentru a verifica echilibrul Hardy-Weinberg. Analiza distribuției genotipurilor pentru polimorfismele genei CNR1 a indicat prezența genotipului mutant al polimorfismului rs1049353 în procent de 58.42% și a genotipului mutant al polimorfismului rs806381 în procent de 45.76%.

Pentru polimorfismul rs806381 frecvența alelelor A/G a fost de 0.65294/0.34706, pentru polimorfismul rs1049353 frecvența alelelor A/G a fost de 0.77647/0.22353, iar pentru polimorfismul rs754387 frecvența alelelor C/A a fost de 0.69412 / 0.30588.

Genotipurile AA (variante mutante) ale polimorfismelor RS1049353 și RS806381 ale genei CNR1, gena ce codifică receptorii endocanabinoizi CB1, s-au întâlnit predominant la subiecții cu alterarea metabolismului glucidic (diabet zaharat, alterarea glicemiei a jeun, toleranță scăzută la glucoză) asociată supraponderiei sau obezității ($IMC > 25 \text{ Kg/m}^2$).

Variabilele fenotipice au fost testate pentru distribuție normală folosind testul Kolmogorov-Smirnov ce a indicat lipsa distribuției normale pentru variabilele glicemie și trigliceride. Testul ANOVA a fost folosit pentru a compara mediile variabilelor fenotipice cu distribuție normală (circumferința abdominală, IMC, colesterol, HDL-colesterol, LDL-colesterol) pe diferite genotipuri, iar pentru celelalte variabile s-a folosit testul Kruskal-Wallis. Valori semnificativ crescute ($p < 0.05$) ale circumferinței abdominale și ale IMC-ului s-au decelat la subiecții cu genotip mutant al polimorfismelor rs1049353 și rs806381 (Fig1).

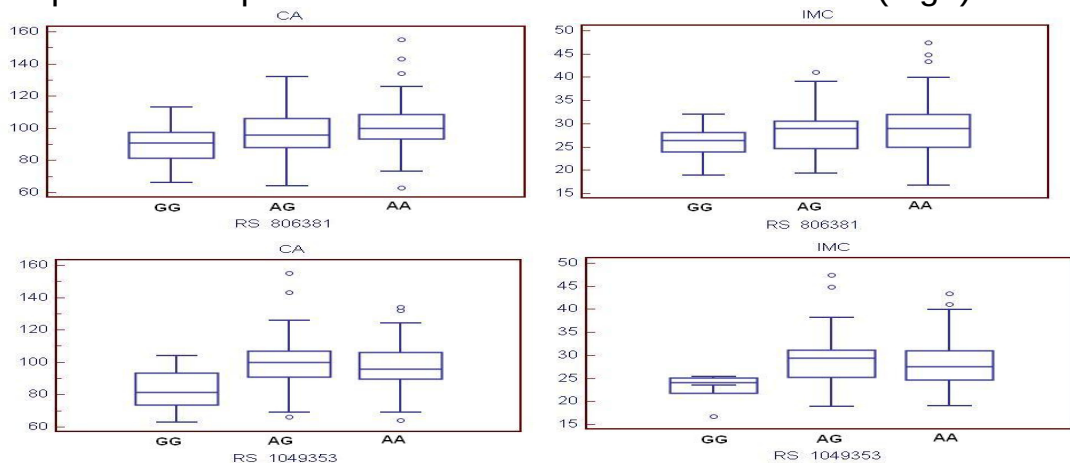


Fig. 1 Box plot ce evidențiază distribuția Circumferinței abdominale și IMC-ului în funcție de genotip.

Evidentierea corelatiei polimorfismelor CNR1 cu fenotipul metabolic 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.

c) Măsura în care rezultatele au fost difuzate (articole cărți, comunicări, participări la conferințe) alte constatări;

Au fost publicate si sustinute lucrari la manifestari stiintifice de profil ce au abordat teme din cadrul grantului:

1. Maria Mota, Simona Popa, Robert Dinu, Camelia Stanciulescu, Eugen Mota. **Adiponectin, leptin levels and adiponectin-leptin ratio in obese subjects: correlations with insulin resistance.** Diabetes. 2009; 58(1), A350, ISSN 0012-1797. [ISI].
2. Daniela Braicu, Cristina Pritulescu, Dragos Alexandru, Maria Mota. **The assessment of subclinic atherosclerosis objected through IMT in normal and dislipidemic patients with various degrees of glucose tolerance.** Romanian Journal of Internal Medicine. 2009; 47(3). ISSN 1220-4749 [PubMed- MEDLINE].
3. Tomina Popescu, Maria Mota. Dyslipidemia and hypertension in patients with type 2 diabetes and retinopathy. Romanian Journal of Internal Medicine. 2009; 47(3). ISSN 1220-4749 [PubMed-MEDLINE].
4. Maria Mota, Simona Popa, Robert Dinu, Camelia Stanciulescu, Eugen Mota. **Adiponectin, leptin levels and adiponectin-leptin ratio in obese subjects: correlations with insulin resistance.** Presentare poster. American Diabetes Association 69th Scientific Sessions. New Orleans, 2009.
5. Simona Popa, Robert Dinu, Camelia Stanciulescu, Mihaela Bicu, Eugen Mota, Maria Mota. **Correlation between adiponectin-leptin ratio, adipokines and insulin resistance in patients with type 2 diabetes and prediabetes.** XV International Symposium on Atherosclerosis - Boston, 2009
6. Robert Dinu, Simona Popa, Camelia Stanciulescu, Eugen Mota, Maria Mota. **The relation between adipokines, adiponectin-leptin ratio and the metabolic syndrome.** XV International Symposium on Atherosclerosis - Boston, 2009.

7. Maria Mota, Simona Popa, Robert Dinu **Mecanisme moleculare în sindromul metabolic: contribuția adipocitokinelor. Conferinta.** Congresul National al Asociației Medicale Romane - Bucuresti, 2009.
8. Robert Dinu, Simona Popa, Mihaela Bicu, Maria Mota. **Corelația adipokinelor și a markerilor de insulinorezistență la subiecții cu obezitate abdominală.** Prezentarea poster. Congresul National al Asociației Medicale Romane - Bucuresti, 2009.
9. Robert Dinu, Simona Popa, Diana Protasiewicz, Isabela Silos, Eugen Mota, Maria Mota, Amelia Bârcă, Mihai Cruce. **Corelația dintre adipokine și parametrii metabolici la subiecții cu obezitatea abdominală.** Prezentare orală. Zilele UMF Craiova 2009.
10. Maria Mota. **Insulinorezistența, la pacienții obezi, și corelațiile acesteia cu: leptina, adiponectina, raportul adiponectină/leptină.** Prezentare orală. Zilele UMF Craiova 2009.

În cadrul acestei faze a grantului toți membri echipei, în mod special **tinerii cercetatori au fost angrenați permanent în activitatea de documentare** în concordanță cu tematica grantului, în diseminarea rezultatelor grantului la manifestări științifice naționale și internaționale și în elaborarea rapoartelor de etapă și a lucrărilor științifice.

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

Fondurile alocate pe anul 2009 pentru cercetare în cadrul acestui grant, au fost utilizate pentru achiziționarea de materiale consumabile, reactivi, kituri și pentru salarizarea membrilor echipei de cercetare implicați în această etapă a grantului.

S-au efectuat stagii de documentare-cercetare (Simona Popa și Robert Dinu la The 5th EASD Robert Turner Course in Clinical Research into Diabetes 2009) și au fost finanțate participările membrilor echipei de cercetare la manifestări științifice de profil naționale și internaționale, efectuate în vederea diseminării rezultatelor grantului:

- „69th American Diabetes Association Scientific Sessions” New Orleans 2009 - Prof Univ. Maria Mota
- Congresul Societății Romane de Diabet, Sinaia, 2009 - Prof Univ. Maria Mota, Simona Popa, Robert Dinu
- „XV International Symposium on Atherosclerosis”, Boston 2009.