

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

TEZĂ DE DOCTORAT

**MODIFICĂRI METABOLICE LA PACIENȚII
CU BOALA GAUCHER TIP 1**

REZUMAT

**Doctorand
IULIANA CRISTINA COLDEA**

**Conducător științific
PROF. DR. PAULA GRIGORESCU-SIDO**

CUPRINS

Introducere.....	4
Listă abrevieri.....	6
Partea I. Sinteza bibliografică.....	8
Capitolul I . Boala Gaucher.....	9
I.1. Epidemiologie.....	9
I.2. Genetica.....	11
I.3. Patogeneza.....	15
I.4. Diagnosticul bolii Gaucher tip 1.....	19
Capitolul II. Modificări metabolice în boala Gaucher tip 1.....	32
II.1. Dislipoproteinemia.....	32
II.1.1.Lipoproteinele plasmatice - date de fiziologie.....	32
II.1.2 Dislipoproteinemia la pacienții cu boala Gaucher tip 1.....	40
II.2. Insulinorezistența.....	43
Partea a II-a. Cercetări personale.....	50
Introducere.....	51
Materialul de studiu și metode utilizate pentru stabilirea diagnosticului specific al pacienților	51
Capitolul I. Profilul lipidic la pacienții cu boala Gaucher și la carrierii de alelă mutantă pentru boala Gaucher.....	56
I.1. Profilul lipidic la pacienții cu boala Gaucher.....	56
I.2. Profilul lipidic la carrierii de alelă mutantă pentru boala Gaucher.....	92
Capitolul II. Polimorfismul Apoproteinei E la pacienții cu boala Gaucher tip 1...102	
Capitolul III. Insulinorezistența la pacienții cu boala Gaucher tip 1.....	133
III.1. Diagnosticul și prevalența insulinorezistenței.....	133
III.2. Insulinorezistența și polimorfismul genei PPAR-γ.....	152
Concluzii generale.....	163
Bibliografie.....	167
Grant CNCSIS.....	185
Lucrări din tematica tezei de doctorat	
A. Lucrări publicate în extenso.....	186
B. Lucrări publicate în rezumat.....	187

Cuvinte cheie: boli lizozomale, boala Gaucher, lipoproteine, polimorfismul Apoproteinei E, insulinorezistența

INTRODUCERE

Boala Gaucher, cauzată de deficitul enzimatic al glucocerebrozidazei este cea mai frecventă boală de stocare lizozomală. Acumularea substratului în celulele sistemului reticulo-histiocitar conduce la instalarea unui tablou clinic multisistemic, cu evoluție și agravare progresivă. Tipul 1 de boală se caracterizează prin splenomegalie, suferință osoasă și hematologică și absența manifestărilor neurologice. Activarea macrofagică din SRH constituie veriga patogenetică principală a bolii.

Studiul de față își propune să abordeze tulburările metabolismului lipidic asociate bolii și impactul polimorfismului Apoproteinei E asupra lui. Se face o evaluare de asemenea a insuliorezistenței la pacienții cu boala Gaucher tip 1, în relație cu polimorfismul genei factorului transcripțional PPAR- α .

Partea I. Sinteza bibliografică

Tipul I – cronic sau adult de boala Gaucher – reprezintă aproximativ 85% din totalul cazurilor. Incidența în populația generală este de 1: 40 000- 1: 60 000. Are o predominanță etnică, frecvența fiind mult mai ridicată la populația de evrei Ashkenazi, unde cifrele variază între: 1:1600, 1/600 – 1/2500, 1/1000. Frecvența purtătorilor de o alelă mutantă („carrier”) - printre evreii Ashkenazi din Israel – este de \approx 4% sau - după alte surse- 1/18 și chiar de 1/13.

Gena glucocerebrozidazei (GBA) a fost identificată în regiunea cromosomală 1q21 – 1q31, structura ei fiind compusă 11 exoni și 10 introni și având o lungime de 7 Kb. Boala Gaucher are un mecanism de transmitere autosomal recesiv, manifestându-se în situația de homozigot sau heterozigot compus. Până în prezent au fost identificate peste 200 mutații diferite, uneori asociate câte 2-3, în complexe alelice. Dintre mutațiile punctiforme, patru sunt mai frecvente: N370S, L444P, 84 GG, IVS2+1. Dintre complexe alelice mai des apar Rec Ncil și Rec TL.

Patogeneza bolii. Substratul nemetabolizat se acumulează în celula Gaucher. Acesta poate proveni din histiocitele pulpei roșii a splinei, celulele Kupffer din ficat, macrofagele alveolare din plămân, osteoclaste, macrofagele din măduva hematogenă, celulele periadventițiale din spațiile Virchow-Robin ale creierului.

Hiperstimularea imună reprezintă mecanismul fiziopatologic esențial în boala Gaucher. Acumularea glicozilceramidului conduce la activarea multiplelor cascade imune și hipersecreție de citokine proinflamatorii: IL-1beta, IL-1Ra și IL-6, IL-10, TNF-alfa, activarea COX2, a secreției de PgE2, IL-8 și chemokină CCL2. Acestea dețin un rol central în rezorbția osoasă, perturbarea remodelării osoase, funcționând ca mediatori ai osteoporozei.

Diagnosticul în boala Gaucher pornește de la decelarea următoarelor semne și simptome clinice:

- *Splenomegalia*, prezentă la 90% dintre pacienți, este de cele mai multe ori moderată sau severă, atingând un volum de 5-20 ori normal;
- *Hepatomegalia* este prezentă la 70–80% dintre pacienți, poate fi moderată (volum hepatic de 1,5–2,5 ori normal) sau severă (volum de 5-7 ori normal).
- *Sindromul hemoragipar* constă în apariția unui peteșii, echimoze sau - la nivelul mucoaselor - epistaxis, gingivoragii, menometroragii
- *Sindromul anemic* se manifestă prin astenie, reducerea capacității de efort, fatigabilitate, paloare, tahicardie, polipnee.
- *Boala osoasă* este o manifestare majoră a bolii, invalidantă adeseori. Este prezentă la 75-85% dintre pacienți. Severitatea manifestărilor osoase este variabilă – de la osteopeniei asimptomatice până la impotență funcțională totală cauzată de

fracturile numeroase și deformări. Durerea osoasă poate fi cronică, recidivantă sau acută - *crize osoase*. *Necroza avasculară de cap femural* impune efectuarea artroplastiei.

Pacienții mai pot acuza o suferință pulmonară cu disfuncție ventilatorie de tip restrictiv și hipertensiune pulmonară. Retardul de creștere și cel pubertar sunt specifice vârstei de copil și adolescent. (1/2 dintre pacienți).

Pentru diagnosticul bolii Gaucher se efectuează o serie de examinări nespecifice și specifice. Din prima categorie fac parte: testele hematologice periferice și medulograma, bio-umorale, determinarea bio-markerilor serici ai bolii: chitotriozidaza, fosfataza acidă și chemokina CCL 18, explorări radiologice, imagistice: osteodensitometria și rezonanța magnetică nucleară. În cea de-a doua categorie se înscriu: determinarea activității enzimatică a beta-glucocerebrozidazei acide din leucocitele circulante sau fibroblaști și analiza mutațiilor genice prin screeningul mutațiilor mai frecvente sau secvențare genică.

Diagnosticul diferențial se face cu mai multe entități: leucemia, limfoamele, osteomielite, alte boli de teaurizare.

La pacienții cu boala Gaucher, din cauza existenței acestui status pro-inflamator permanent, subclinic, cu activarea macrofagelor care exprimă la suprafață și ulterior descarcă și în circulație apoproteina E, există o dislipoproteinemie specifică, studiată în ultimii 25 de ani.

S-au identificat tulburări ale metabolismului glucidic: creșterea producției endogene de glucoză, hiperinsulinemie bazală, însoțită de un status euglicemic. Indicele HOMA-IR a avut valori semnificativ mai mari decât martorii, chiar dacă pacienții urmau deja terapie substitutivă.

Insulinorezistența este asociată recent și cu anumite polimorfisme din structura genei factorului transcripțional PPAR- α . Un astfel de SNP constă în shift-ul citidinei cu guanina, (C \rightarrow G), ceea ce determină schimbarea prolinei cu alanină în codonul 12 al proteinei, modificare care afectează activitatea transcripțională a genelor enzimelor implicate în metabolismul lipidic. Rezultatele studiilor din literatură sunt contradictorii în acest sens, unele lucrări arată rolul pozitiv al substituției Ala \rightarrow Pro în creșterea insulinosenzitivității și reducerea riscului și a prevalenței DZ de tip II, altele dimpotrivă.

În sinteză, factorii care conduc la apariția și condiționează evoluția insulinorezistenței la pacienții cu boala Gaucher sunt de actualitate, mecanismele fiind, încă, insuficient explicate.

Materialul global de studiu este reprezentat de un lot de 43 de pacienți cu boala Gaucher tip 1, aflați în evidența Centrului de Patologie Genetică – Clinica Pediatrie I Cluj-Napoca. Dintre cei 43 pacienți, 32 pacienți se află sub tratament cronic substitutiv enzimatic (TSE) cu Imiglucerase (Cerezyme^R), 11 pacienți fiind netratați.

Metodele utilizate pentru stabilirea diagnosticului specific au fost reprezentate de dozarea enzimatică a GBA, printr-o metodă fluorimetrică, ce utilizează un substrat artificial și diagnosticul molecular, al mutațiilor genei β -glucocerebrozidazei, care s-a efectuat: fie prin tehnica PCR sau PCR *mismatch*, urmată de detecție prin digestie enzimatică, fie prin secvențiere directă.

Partea a II-a. Cercetări personale

Capitolul I.1. abordează problematica profilului lipidic la pacienții cu boala Gaucher.

Materialul a fost reprezentat de cei 43 de pacienți Gaucher tip 1, dintre care 32 au fost tratați și 11 netratați cu Imiglucerase.

Metoda de lucru a constat în urmărirea următorilor parametri : colesterol total, HDL, LDL-colesterol și trigliceride, apreciate în dinamică, în prezența sau absența

terapieii. Parametri au fost corelați cu indicii de severitate ai bolii : gradul de anemie, trombocitopenie, organomegalia (exprimate prin volumul hepatic și splenic), chitotriozidaza și scorul de severitate Zimran.

Rezultatele au arătat că pacienții cu boala Gaucher prezintă, în absența terapiei o dislipoproteinemie caracterizată prin:

a. Hipocolesterolemie totală (60% dintre ei) care se corelează direct cu numărul de trombocite și invers cu volumul splenic;

b. Scăderea valorii HDL-colesterolului (la 68% dintre ei), cu o valoare de -12% din LIN (-15% în formele mai grave, -5% în formele mai puțin grave).

c. Scăderea valorii LDL-colesterolemiei la 54% dintre pacienți, cu o valoare medie situată la -5% din LIN, care se corelează invers cu splenomegalia și direct cu numărul de trombocite;

d. Hipertrigliceridemie, identificată la 40% dintre ei, cu o valoare medie în grupul formelor mai severe, de +3% față de LSN.

Sub terapia de substituție enzimatică aceste modificări se ameliorează în felul următor:

a. Colesterolul total crește cu 29% față de LIN astfel: se normalizează la 6 luni, ajunge la o valoare semnificativ mai mare la 18 luni de TSE, iar prevalența hipocolesterolemiei totale scade semnificativ tot după 18 luni de TSE.

b. HDL-colesterolul crește cu +55% față de LIN astfel: se normalizează la 6 luni de TSE, crește semnificativ după 1 an de TSE, iar prevalența hipo-HDL colesterolemiei scade semnificativ după 1 an de TSE, ameliorând astfel potențialul risc aterosclerotic

c. LDL-colesterolul crește cu +35% față de LIN astfel: se normalizează la 6 luni de TSE, atinge pragul de semnificație la 18 luni de TSE, iar prevalența hipo-LDL-colesterolemiei scade semnificativ la 1 an de tratament.

d. Trigliceridemia scade cu 29% față de LSN astfel: se normalizează la 6 luni de TSE, atingând pragul de semnificație la 1 an de TSE, iar prevalența hipertrigliceridemiei scade semnificativ după 1 an de terapie.

La pacienții netratați dinamica este nesemnificativă pentru toți cei 4 parametri studiați. Aceasta hipocolesterolemie totală demonstrată la pacienții Gaucher, cu valoare redusă a HDL-colesterolului și hipertrigliceridemie asociată ar putea constitui un factor de risc aterosclerotic, potențial care se reduce semnificativ sub TSE.

Capitolul I.2. analizează profilul lipidic la carrierii de alelă mutantă pentru boala Gaucher.

Materialul de studiu a fost constituit din 23 de carrieri pentru o alelă mutantă pentru boala Gaucher, reprezentat de 23 de părinți ai acestor pacienți (8 bărbați și 15 femei).

Metoda de lucru a fost aceeași cu cea utilizată la capitolul I.1.

Rezultatele evidentiază la carrierii de alelă mutantă pentru boala Gaucher un profil lipidic caracterizat de: valori ale colesterolemiei, fracțiunii HDL, LDL semnificativ mai mari atât față de pacienții netratați, dar și față de cei tratați, statusul hipolipidic persistând astfel, comparativ cu carrierii, și după o perioadă de 4 ani de tratament. Trigliceridemia la carrieri are o valoare intermediară între tratați (mai mică) și netratați (mai mare), confirmând tendința la hipertrigliceridemie a acestora din urmă.

Profilul lipidic al carrierilor de mutație N370S nu diferă semnificativ față de cel al purtătorilor de L444P.

Capitolul II abordează rolul apoproteinei E în generarea tulburărilor metabolismului lipidic, descrise mai sus. În cadrul acestui capitol, am studiat următoarele:

- nivelele serice al Apoproteinei E la pacienții cu boala Gaucher tip 1, comparativ cu martori și evoluția sub terapie de substituție enzimatică a concentrației de ApoE;

- distribuția variantelor alelice ale ApoE la pacienții cu boală Gaucher tip 1, comparativ cu populația generală din România și din alte zone geografice;

- influența pe care variantele alelice ale ApoE o au asupra profilului lipidic la acești pacienți, în prezența și respectiv absența terapiei specifice.

Materialul de studiu a fost constituit din 41 de pacienți cu boala Gaucher tip 1. Dintre aceștia, un număr de 31 pacienți au beneficiat de TSE, pe o perioadă medie de $3,93 \pm 1,12$ ani, iar restul de 10 pacienți au fost netratați și monitorizați pe o perioadă medie de $3.45 \pm 2,42$ ani.

Metoda de lucru a constat în evaluarea mai multor parametri:

- fracțiunile lipidice: colesterol seric, fracțiunile HDL, și trigliceridele serice au fost determinate prin metode enzimatice.

- fenotipul ApoE, respectiv nivelul seric al apoproteinei E a fost determinat printr-o tehnică ELISA

- genotipul ApoE, respectiv identificarea variantelor alelice, s-a efectuat printr-o metodă de amplificare genică tehnica PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragments Length Polymorphism).

Rezultatele au arătat că la pacienții cu boala Gaucher, s-au identificat, cu caracter prioritar după cunoștința noastră, trei genotipuri distincte ale ApoE: $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ și $\epsilon 2/\epsilon 3$, cu o distribuție asemănătoare celei din populația generală și din România.

Apo E a avut valori crescute în special la pacienții cu genotip $\epsilon 2/\epsilon 3$, în timp la cei cu $\epsilon 3/\epsilon 4$ nivelele serice au fost inițial mai mici decât martorii și decât la pacienții cu genotip sălbatic $\epsilon 3/\epsilon 3$. Pacienții netratați au valori semnificativ mai mari ale ApoE decât cei tratați.

Pacienții cu genotip $\epsilon 2/\epsilon 3$ au o valoare a trigliceridemie și LDL-cholesterolemiei mai mare decât LSN, după 3 ani de TSE, modificare care se ameliorează ulterior sub tratament, în paralel cu creșterea semnificativă a HDL-cholesterolemiei.

Aceleași efecte benefice ale terapiei de substituție sunt vizibile și la pacienții cu genotip $\epsilon 3/\epsilon 3$ și $\epsilon 3/\epsilon 4$, care au valori normale ale parametrilor lipidici la 3 ani de tratament, spre deosebire de cei netratați, la care există un status hipolipidic global. Nivelul HDL a fost semnificativ mai mare la pacienții cu genotip $\epsilon 2/\epsilon 3$ față de genotipul sălbatic $\epsilon 3/\epsilon 3$, contracarând efectul negativ al hipertrigliceridemie și hiper-LDL-cholesterolemiei la aceștia.

Corelarea directă cu fracțiunile colesterolului pentru genotipul $\epsilon 2/\epsilon 3$ și inversă pentru $\epsilon 3/\epsilon 4$ atrag atenția asupra unui posibile implicări diferite în metabolizarea lipoproteinelor a celor două izoproteine ale ApoE: E2/E3 și respectiv E3/E4; dată fiind diferența de structură ne putem aștepta la o interacțiune de suprafață cu diverse molecule, adezivitate și - în consecință - funcționalitate diferită a variantelor proteice, rezultate din existența acestui polimorfism genic.

Capitolul III.1. abordează diagnosticul și prevalența insulinorezistenței la pacienții cu boala Gaucher. Studiul este efectuat în secțiune transversală și compară insulinorezistența la pacienții cu boala Gaucher tip 1, tratați substitutiv enzimatic și netratați, utilizând modelul HOMA.

Materialul a fost constituit din 36 pacienți diagnosticați specific cu boala Gaucher tip 1, aflați în evidența Centrului de Patologie Genetică - Clinica Pediatrie 1 Cluj.

Dintre aceștia, 30 pacienți au primit tratament de substituție enzimatică cu Imiglucerase, timp de $3,96 \pm 1,23$ ani, iar 6 pacienți, au fost netratați și monitorizați, din momentul diagnosticului specific, pe o perioadă medie de $2,5 \pm 1,51$ ani.

Metoda de aprecierea insulinorezistenței și a insulinosensitivității a recurs la modelul clasic HOMA (homeostasis model assessment of insulin resistance), introdus de Matthews în 1985. Insulinemia s-a determinat prin electrochemiluminiscență, iar glicemia prin metode enzimatiche.

Insulinorezistența, respectiv insulinosensitivitatea au fost apreciate doar în condiții bazale, prin următorii parametri, ale căror formule de calcul sunt detaliate în lucrare: HOMA-IR (homeostasis model assessment-insulin resistance), Log HOMA-IR, QUICKI (quantitative insulin sensitivity check index), IRI (insulin resistance index).

Secreția pancreatică de insulină a fost evaluată bazal, prin calculul indicelui HOMA-B. Corelarea parametrilor s-a făcut cu SSI actual, greutatea pacienților, durata terapiei, durata bolii (global) și durata bolii preterapeutic, la pacienții tratați.

Rezultatele arată că insulinorezistența, apreciată prin modelul HOMA, a avut o prevalență de 6,66% în grupul pacienților cu boala Gaucher tip 1 tratați. Indicii de insulinorezistență au fost superiori în grupul pacienților tratați comparativ cu pacienții netratați. Studiul nostru a adus, în premieră, informații legate de insulinosensitivitate, apreciată prin indicele QUICKI, care a fost – în concordanță cu indicii de insulinorezistență - mai mică la pacienții tratați decât cei netratați.

Valorile parametrilor de insulinorezistență s-au corelat direct cu durata de TSE, mai puternic decât cu SSI pentru cei tratați. La cei netratați insulinorezistența a scăzut cu durata de evoluție a bolii și s-a corelat de nivel mediu cu un marker de severitate : chitotriozidaza.

Există un hiperinsulinism relativ al pacienților tratați comparativ cu cei netratați, dovedit prin valori superioare ale insulinemiei bazale și indicelui HOMA-B. Valorile insulinemiei plasmatiche se corelează liniar cu durata de TSE, mai puternic decât cu SSI, ceea ce ar explica parțial rezultatul, aparent paradoxal, că la pacienții cu SSI mai mic, tratați, insulinemia este mai mare.

La pacienții netratați, valorile insulinemiei se corelează cu tendința la suprapondere, însă glicemia scade cu aceasta, arătând o bună receptivitate periferică la insulină. Pe de altă parte, la 10% dintre pacienții tratați, s-a identificat glicemie bazală modificată.

Din studiul nostru rezultă că durata de evoluție a bolii respectiv cea de terapie sunt factorii care influențează mai puternic insulinorezistența decât markerii de severitate, respectiv SSI și chitotriozidaza sau greutatea pacienților.

La pacienții cu boala Gaucher tip 1, tratați de aproximativ 4 ani cu Imiglucerase, prezintă un risc crescut de apariție a insulinorezistenței periferice și de hiperinsulinism reactiv. *Riscul se augmentează cu cât se prelungeste tratamentul și poate conduce la tulburări ale metabolismului glucidic, de tipul glicemiei bazale modificate, acesta putând constitui un posibil efect advers al terapiei cronice cu Imiglucerase ! Desigur sunt necesare studii ulterioare care să investigheze mai exact acest aspect.*

Capitolul III. 2. abordează eventualul rol pe care polimorfismul Pro12Ala, din structura factorului transcripțional PPAR- γ îl poate juca în predictibilitatea insulinorezistenței, la pacienții cu boala Gaucher.

Materialul de studiu a fost constituit din 36 pacienți cu boala Gaucher tip 1. Dintre aceștia, 30 pacienți (grup A) au primit tratament de substituție enzimatică cu Imiglucerase, timp de $3,96 \pm 1,23$ ani. Am notat cu A₁ cei 26 pacienți la care s-a identificat genotip Pro12Pro și cu A₂ cei 4 pacienți care prezentau un genotip Ala12X (fie Pro12Ala, fie Ala12Ala). Grupul B a fost format din 6 pacienți netratați și

monitorizați, din momentul diagnosticului specific, pe o perioadă medie de $2,5 \pm 1,51$ ani.

Metoda de lucru a constat în determinarea glicemiei, a insulinemiei și calcularea parametrilor HOMA după metodele descrise anterior. Pentru determinarea polimorfismului Pro12Ala la nivelul genei activatorului transcripțional PPAR- γ s-au utilizat 2 tehnici: PCR-RFLP și ARMS-PCR. Rezultatele au fost superpozabile 100%.

Rezultatele arată că prevalența alelei "protectoare" Ala este de 7% la pacienții cu boala Gaucher tip1, procent net inferior populației generale și asemănător cu procentul de la populația diabetică și obeză de diverse etnii (caucaziană sau arabică), fapt ce ar putea constitui un factor important în generarea insulinorezistenței periferice la acești pacienți.

Rezultatele studiului nostru au arătat – la pacienții tratați – o diminuare semnificativă a insulinorezistenței și o creștere a insulinosensitivității la carrierii de alelă Ala, comparativ cu cei cu Pro12Pro. Există de asemenea un hiperinsulinism relativ al carrierilor de Pro12Pro, comparativ cu purtătorii de 12Ala.

Diferența tratați – netratați, în ceea ce privește insulinorezistența, este și mai evidentă dacă se compară parametri în cadrul aceluiași genotip, respectiv Pro12Pro. Pacienții tratați, cu același genotip au totuși indicii de insulinorezistență semnificativ mai mari decât cei netratați, iar insulinosensitivitatea (indicele QUICKI) semnificativ mai mică.

Profilul lipidic nu a fost influențat semnificativ de existența alelelei Ala.

La pacienții cu boala Gaucher tip 1 tratați substitutiv, prezența unei aminoacide Ala, în poziția 12 a lanțului polipeptidic al factorului de transcripție PPAR- γ 2, reprezintă un element de "protector", care diminuează semnificativ insulinorezistența periferică și scade riscul de hiperinsulinism reactiv, fără a determina apariția de modificări dislipidemice semnificative.

CONCLUZII GENERALE

1. Pacienții cu boala Gaucher prezintă, în absența terapiei o **dislipoproteinemie** caracterizată prin: hipocolesterolemie totală – la 60% dintre pacienți - corelată direct cu numărul de trombocite și invers cu volumul splenic; scăderea valorii HDL-colesterolului – la 68%; scăderea valorii LDL-colesterolemiei – la 54%, corelată invers cu splenomegalia și direct cu numărul de trombocite; hipertrigliceridemie, la 40% dintre pacienți.

Sub terapia de substituție enzimatică (TSE) aceste modificări se ameliorează: toate fracțiunile se normalizează după 6 luni de TSE, iar diferențele față de valoarea inițială devin semnificative după 12 luni, pentru HDL și trigliceride și, respectiv, la 18 luni pentru colesterol total și LDL.

Hipocolesterolemia totală existentă la pacienții Gaucher, cu valoare redusă a HDL-colesterolului și hipertrigliceridemie asociată ar putea constitui un factor de risc aterogen, potențial care se reduce semnificativ sub TSE.

La pacienții netratați dinamica celor 4 parametri, ce conturează dislipidemia, este ne semnificativă în timp.

2. Carrierii de alelă patogenă pentru boala Gaucher au prezentat un profil lipidic caracterizat de: colesterolemie, HDL, LDL semnificativ mai mari față de pacienții netratați și tratați.

Statusul hipolipidic, în raport cu carrierii sănătoși, persistă la pacienți și după o perioadă de 4 ani de tratament substitutiv. Profilul lipidic al carrierilor de N370S nu diferă semnificativ față de cel al purtătorilor de L444P.

3. La pacienții cu boala Gaucher s-au identificat, cu caracter prioritar după cunoștința noastră, **trei genotipuri distincte ale ApoE**: $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ și $\epsilon 2/\epsilon 3$, având o distribuție asemănătoare celei din populația generală și din România. Apo E a avut valori crescute în special la pacienții cu genotip $\epsilon 2/\epsilon 3$, în timp la cei cu $\epsilon 3/\epsilon 4$ nivelele serice au fost inițial mai mici decât martorii și decât la pacienții cu genotip sălbatic $\epsilon 3/\epsilon 3$.

Pacienții netratați au valori semnificativ mai mari ale ApoE decât cei tratați.

Pacienții cu genotip $\epsilon 2/\epsilon 3$ au o valoare a trigliceridemieii și LDL-cholesterolemiei mai mare decât LSN, după 3 ani de TSE, modificare care se ameliorează ulterior sub tratament, în paralel cu creșterea semnificativă a HDL-cholesterolemiei. Efectele benefice ale terapiei de substituție sunt vizibile și la pacienții cu genotip $\epsilon 3/\epsilon 3$ și $\epsilon 3/\epsilon 4$, care au valori normale ale parametrilor lipidici la 3 ani de tratament, spre deosebire de cei netratați, la care există un status hipolipidic global.

Corelarea ApoE cu fracțiunile colesterolului este directă pentru genotipul $\epsilon 2/\epsilon 3$ și inversă pentru $\epsilon 3/\epsilon 4$, fapt ce atrage atenția asupra unui posibile implicări diferite în metabolizarea lipoproteinelor a celor două izoproteine ale ApoE: E2/E3 și respectiv E3/E4.

4. **Insulinorezistența** a avut o prevalență de 6,66% în grupul pacienților cu boala Gaucher tip 1 tratați. Indicii de insulinorezistență au fost superiori în grupul pacienților tratați comparativ cu pacienții netratați. Insulinosenzitivitatea (indicele QUICKI) a fost mai mică la pacienții tratați, decât cei netratați. Din studiul nostru rezultă că durata de evoluție a bolii respectiv cea de terapie sunt factorii care influențează mai puternic insulinorezistența decât markerii de severitate, respectiv SSI și chitotrioizidaza. Există un hiperinsulinism relativ al pacienților tratați comparativ cu cei netratați, dovedit prin valori superioare ale insulinemiei bazale și indicelui HOMA-B. Valorile insulinemiei plasmatice se corelează liniar cu durata de TSE, mai puternic decât cu SSI.

Greutatea pacienților nu influențează glicemia la cei aflați sub TSE, însă la pacienții netratați aceasta conduce la creșterea insulinemiei, fără însă a da disglucemie. La pacienții Gaucher tratați, prevalența glicemiei bazale modificate a fost de 10%, după 4 ani de TSE.

5. Prevalența alelei "protectoare" Ala a **factorului de transcripție PPAR- γ** este de 7% la pacienții cu boala Gaucher tip1, procent net inferior populației generale și asemănător cu procentul de la populația diabetică și obeză de diverse etnii (caucaziană sau arabică).

În ceea ce privește impactul polimorfismului Pro12Ala al genei PPAR- γ asupra insulinorezistenței, rezultatele noastre au arătat o diminuare semnificativă a insulinorezistenței și o creștere a insulinosenzitivității al carrierilor de alelă Ala, tratați, comparativ cu cei de Pro12Pro tot tratați, care au prezentat un hiperinsulinism relativ.

Modificările tratați ("insulinorezistenți") vs netratați ("insulinosenzibili") sunt mai evidente în cadrul aceluiași genotip, Pro12Pro.

Profilul lipidic nu a fost influențat semnificativ de prezența genotipului de existența alelei 12Ala. Se poate afirma că, la pacienții cu boala Gaucher tip 1 tratați substitutiv, prezența unei aminoacid Ala, în poziția 12 a lanțului polipeptidic al factorului de transcripție PPAR- $\gamma 2$, reprezintă un element "protector", ce diminuează semnificativ insulinorezistența periferică și scade riscul de hiperinsulinism reactiv, fără să determine apariția unei dislipidemii.

CURRICULUM VITAE



Informații personale

Nume, prenume

CRISTINA COLDEA

Adresa

Str. Maresal Ion Antonescu, 6, apt. 181, Cluj-Napoca, Romania

Telefon

+40722676738

E-mail

crisrina.coldea@yahoo.com

Data nașterii

15-03-1976

Sex

Feminin

Post dorit

Tipul jobului

Full Time

Obiectiv profesional

Activitate de îngrijire a sănătății într-un sistem medical profesionist și performant. Extinderea cunoștințelor teoretice în Medicină, cu un interes special în cercetarea clinică din Genetică și ariile conexe: Biostatistică și Informatică Medicală.

Domenii de activitate

Cercetare, Sănătate

Locații dorite

Cluj-Napoca, București

Experiență de muncă

Nivel de carieră

Senior level (peste 5 ani)

Experiență de muncă

10 ani

Experiență pe domenii

Sănătate - 10 ani

Cercetare - 5 ani

Experiență de management

Un proiect de cercetare de 2 ani, ca și Project Manager

Post

Doctorand cu frecvență

Perioada

2004-11 <> 08.2009

Numele angajatorului

Centrul de Patologie Genetică, Clinica Pediatrie I, Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Haieganu", Cluj-Napoca, Romania

Departament

Cercetare

Post

Medic specialist Pediatrie

Perioada

2007-10 <> prezent

Numele angajatorului

Spitalul Clinic Județean de Urgență pentru Copii Cluj – contract de gărzi
Centrul Medical "Unirea" Cluj – din iunie 2008 - prezent

Post

Medic rezident, consultant in Pediatrie și Genetică Medicală

Perioada

2006-10 <> 2007-08

Numele angajatorului

Universitatea Liberă din Bruxelles, Centrul de Genetică Umană afiliat și Spitalul Universitar pentru Copii "Regina Fabiola", Bruxelles, Belgia

Post

Medic rezident Pediatrie

Perioada

2002-01 <> 2004-01

Numele angajatorului

Spitalul Clinic Județean de Urgență pentru Copii Cluj

Post

Medic stagiar

Perioada

2001-01 <> 2001-12

Numele angajatorului

Spitalul Clinic Județean de Urgență Cluj

Educație și formare medicală

Educație în curs

Perioada

Instituția

Oraș

Domeniul Major

Descriere (specializare)

Doctorat

Anul de studiu: 5 (ultimul)

Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Haieganu"

Cluj Napoca, Romania

Științe Medicale

"MODIFICĂRI METABOLICE LA PACIENȚII CU BOALA GAUCHER TIP 1"

Conducător științific : Prof. Dr. Paula Grigorescu-Sido

Diploma obținută

Perioada

Instituția

Oraș

Domeniul Major

Descriere

Formare postuniversitară

2006 - 2007

Universitatea Liberă din Bruxelles

Bruxelles

Pediatrie – Genetică Medicală

Bursă Specială Internațională – FOSFOM

Diploma obținută

Perioada

Instituția

City

Descriere

Doctor-medic, absolvent de studii universitare

1994 - 2000

Universitatea de Medicină și Farmacie "Iuliu Haieganu"

Cluj Napoca, România

Facultatea de Medicină Generală

Competențe personale

Limbi străine

Permis de conducere

Calificare

Engleză - Avansat; Franceză - Avansat;

Da, categoria B

- Diagnosticul și urmărirea pacienților cu diverse sindroame genetice (dismorfologie) și boli ereditare de metabolism.

- Implicare activă în programe naționale de sănătate: "Tratamentul Bolii Gaucher" și "Programul Național pentru Boli rare "

- Colectarea de informații și actualizarea periodică a unor baze de date medicale internaționale (Registrul International Gaucher) sau naționale (Registrul Național de Boli Rare)

- Asistență medicală pediatrică la nivel terțiar, diagnostic și tratament al pacienților de vârstă pediatrică (0 -18 ani), pentru diverse condiții acute sau cronice; monitorizare pe termen mediu și lung a acestora

- efectuarea unui examen ecografic general

- statistică medicală, download de date pentru cercetarea medicală.

Activitate științifică

Cursuri de perfecționare

- 10 cursuri de perfecționare medicală postuniversitară (9 naționale and 1 internațional) – subiecte: Cardiologie pediatrică, Creșterea copilului, Diabetologie pediatrică, Genetică Medicală, Boli Lizozomale, Ultrasonografie Generală, Metodologie Cercetării Științifice Medicale, Pedagogie medicală

Conferințe de formare

- 18 conferințe de formare: 11 naționale and 7 internaționale în: Pediatrie, Genetică Medicală, Perinatologie, Boli Lizozomale, Boala Gaucher

Lucrări publicate – 26 lucrări

- 7 lucrări comunicate ca și poster sau prezentare orală: 4 naționale și 3 internaționale. Subiecte: Pediatrie, Boli Rare, Dismorfologie, Boala Gaucher, Displazii scheletice.

- 19 lucrări publicate în volumele de rezumate ale conferințelor sau în reviste medicale de specialitate: 8 naționale și 11 internaționale. Subiecte: Pediatrie, Genetică, Boli Rare, Boli Lizozomale, Boli Metabolice, Boala Gaucher

- Lucrări publicate din tematica tezei de doctorat:

1. **C Coldea**, P Grigorescu-Sido, V Cret, C Al-Khzouz, C Denes. Tulburări ale metabolismului lipidic la pacienții cu boala Gaucher. Articol. Revista de Medicină și Farmacie Targu-Mures – Orvosi es Gyogyszereszeti Szemle, 2008, 54 (Suppl 3) : 139-142

2. **C Coldea**, RA Popp, A Trifa, A Zimmermann, C Al-Khzouz Al. Craciun, P Grigorescu-Sido. Articol. "Polimorfismul Apolipoproteinei E la pacienții cu boala Gaucher tip 1". Clujul Medical. 2009. Vol. 82, Nr. 4: 586-590

3. **Coldea C**, Grigorescu-Sido A, Popa V, Creț V, Grigorescu-Sido P. "Dislipoproteinemia la pacienții cu boala Gaucher tip 1". Poster. Al 7-lea Congres Național de Pediatrie, Galați, Sept 2005, Vol. Res. pg: 259

4. **Coldea C**, Grigorescu-Sido P, Zimmermann A, Cret V, Popa V. "Tulburări ale metabolismului lipidic la pacienții Gaucher". Poster. Al 2lea Congres Național de Genetică Medicală, Cluj-Napoca, Sept 2006, Vol. Res. pg: 73

5. **C Coldea**, A Zimmermann, C Al-Khzouz, RA Popp, Al Craciun, P Grigorescu-Sido. "Polimorfismul Apolipoproteinei E la Pacienții Români cu boala Gaucher". Poster. The 6th Symposium on Lysosomal Storage Disorders, Barcelona, Spain. Martie 2009. **Prize for Best Poster**

6. **C Coldea**, A Zimmermann, C Al-Khzouz, RA Popp, Al Craciun, P Grigorescu-Sido. Dislipoproteinemia în boala Gaucher: nou studiu pe 44 pacienți români. Poster. Eur J Hum Genet. 2009 May; 17 (suppl 2): 352. **Fellowship for European Society of Human Genetics, Vienna, Austria**

7. **C Coldea**, A Zimmermann, C Al-Khzouz, RA Popp, A Trifa, Al. Craciun, P Grigorescu-Sido. Dislipidemia in Romanian Gaucher Disease Patients. Poster. Congresul Balcanic pentru Boli Rare, Cluj-Napoca, Iunie 2009

8. **C Coldea**, A Zimmermann, C Al-Khzouz, Al Craciun, AP Trifa, P Grigorescu-Sido. Polimorfismul ApoE la pacienții români cu boala Gaucher tip 1. Poster. Conferința Națională de Genetică Medicală, Sibiu, 2009 Sept. Vol res. pg.69

9. **C Coldea**, A Zimmermann, C Al-Khzouz, R Anghel Popp, AP Trifa, Al Craciun, P Grigorescu-Sido. Dislipidemia in boala Gaucher. Poster. Al 9-lea Congres Național de Pediatrie, cu participare internațională. Iași. 2009, Oct. Vol res. pg.229-230

Burse și Premii

- 2002 – **Premiul Special al Decanului** – Medicalis –Congresul National al Studenților și Tinerilor Medici

- 2006 / 2007 – **Bursă FOSFOM** – 1 an bursă de formare medicală, acordată de Universitatea Liberă din Bruxelles, Belgia

- 2009 Martie – **Premiul pentru cel mai bun Poster** - Al 6lea Simpozion de Boli de Stocare Lizozomală, Barcelona, Spania;

-2009 Mai – **Fellowship** – Conferința Societății Europene de Genetică Umană, Vienna, Austria

Programe de Cercetare

- Studiu Clinic "Răspunsul terapeutic la Imiglucereză pentru un prim grup de pacienți cu boala Gaucher în România" – Cordonator: Prof. Dr. Paula Grigorescu-Sido, "Centrul de Patologie Genetică – Clinica Pediatrie I", UMF "Iuliu Hatieganu", Cluj-Napoca

- **Proiect de Cercetare: TD 303/2008 "Modificări Endocrine și Metabolice în Boala Gaucher", finanțat de CNCSIS** (Consiliul Național de Cercetare Științifică din Învățământul Superior, MEN). **Project Manager: Cristina Coldea, MD.**

Notă. Proiect clasat pe poziția 1, cu maxim de puncte, în competiția de granturi, destinată tinerilor doctoranzi din România.,

Afilieri profesionale:

- Membru al Societății Române de Pediatrie – din 2006

- Membru al Societății Române de Genetică Medicală– din 2006

- Membru al Societății Belgiene de Genetică Medicală– din 2007

- Membru al Societății Europene de Genetică Umană – din 2007

Informații Adiționale

Sunt dispusă să ma relochez in țară sau în străinătate.

**UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
"IULIU HAIEGANU" CLUJ-NAPOCA**

DOCTORATE THESIS

**METABOLIC CHANGES IN TYPE 1
GAUCHER DISEASE PATIENTS**

ABSTRACT

**PhD Candidate
IULIANA CRISTINA COLDEA**

**Scientific Coordinator
Prof. Dr. PAULA GRIGORESCU-SIDO**

CONTENTS

Introduction.....	4
Abbreviations.....	6
Part I. Bibliography synthesis.....	8
Chapter I . Gaucher Disease	9
I.1. Epidemiology.....	9
I.2. Genetics.....	11
I.3. Pathogenesis.....	15
I.4. Diagnosis of type 1 Gaucher disease.....	19
Chapter II. Metabolic changes in type 1 Gaucher disease.....	32
II.1. Dyslipoproteinemia.....	32
II.1.1. Plasma lipoproteins - physiology.....	32
II.1.2 Dyslipoproteinemia in type 1 Gaucher disease patients.....	40
II.2. Insulin resistance.....	43
Part II. Personal Researches.....	50
Introduction.....	51
Material and methods utilized for establishing the specific diagnosis of the patients.....	51
Chapter I. Lipid profile in Gaucher disease patients and in carriers for a mutant allele of Gaucher disease	56
I.1. Lipid profile in Gaucher disease patients.....	56
I.2. Lipid profile in carriers for a mutant allele of Gaucher disease.....	92
Capitolul II. Apoprotein E polymorphism in type 1 Gaucher disease patients	102
Capitolul III. Insulin resistance in type 1 Gaucher disease.....	133
III.1. Diagnosis and prevalence of insulin resistance.....	133
III.2. Insulin resistance and polymorphism of the PPAR- γ gene	152
General Conclusions.....	163
Bibliography.....	167
CNCSIS Research Program	185
Published works from the doctorate theme	
C. Works published is extenso.....	186
D. Works published in abstracts.....	187

Key words: lysosomal storage disorders, Gaucher disease, lipoproteins, Apoprotein E polymorphism, insulin resistance

INTRODUCTION

Gaucher disease, caused by the enzymatic glucocerebrosidase deficiency is the most common lysosomal storage disorder. The substrate storage within the cells of the reticuloendothelial (RES) system leads to a multisystemic clinical picture, evolving with progressive worsening. Type 1 of the disease is characterized by spleno-hepatomegaly, hematologic and bone disease, but absence of neurological impairment. Macrophagic activation represents the main element of pathogenesis.

Our study investigates the lipid metabolism changes associated with Gaucher disease and also the impact of Apoprotein E polymorphism over this metabolic status. We have also performed an evaluation of insulin resistance, related with the polymorphism of PPAR- α gene.

Part I. Bibliography synthesis

Type 1 – cronic or adult of Gaucher disease – represents 85% approximately from total cases. Incidence within general population is 1: 40 000 – 1: 60 000. It has an ethnic peak of prevalence 1: 450 - 1: 1500 among Askenazi Jews population (variable figures here from 1:1600, 1/600 – 1/2500, 1/1000, depending on author). The carrier frequency among Ashkenazi Jews from Israel is 4% up to 1/18 or even 1/13.

Glucocerebrosidase (GBA) gene was mapped on the 1q21 – 1q31 band. Its structure contains 11 exons and 10 introns, with a total length of 7 Kb. Gaucher disease is inherited by an autosomal recessive pattern, being clinically expressed when homozygous or compound heterozygous estate occurs. More than 200 mutations have been identified up to present, sometimes associated in allelic complexes. Four of the punctiform mutations are more frequent: N370S, L444P, 84GG, IVS2+1. Among the allelic complexes, two of them: RecNCil and RecTL are more often encountered.

Pathogenesis of the disease. The substrate – glycosilceramide - which is not metabolized properly is stored within Gaucher cells, macrophages derived from the hystiocites of the red pulp of the spleen, Kupffer cells from the liver, pulmonary alveolar macrophages, bone marrow, brain periadventitial cells.

The immune hyperstimulation represents the main physiopathological mechanism in Gaucher disease. Glucosylceramide storage leads to activation of multiple immune cascades and pro-inflammatory cytokines secretion: IL-1 β , IL-1Ra, IL-6, IL-10, TNF- α , COX-2, PgE2, IL-8, CCL2 chemokine. This substances play a central role in bone resorption, perturbing bone remodeling process and functioning as osteoporosis mediators.

Diagnosis in Gaucher disease relies onto the following signs and symptoms:

- Splenomegaly – encountered in 90% of patients, is mostly moderate or severe, reaching a volume of 5 -20 times than normal;
- Hepatomegaly is present in 70 – 80% of patients, can be moderate (liver volume is 1,5-2,5 times than normal) or severe (volume of 5 – 7 times than normal);
- Bleeding syndrome – petechiae, ecchymosis, or, on the mucous membranes: epistaxis, gingival bleedings, menometrorrhagiae.
- Anemic syndrome – asthenia, reduced effort capacity, fatigability, palor, tachycardia, polypnea.
- Bone disease is a major sign of the condition, often causing disability. It's present in 75 – 85% of the patients. Severity of bone signs is variable, ranging from

asymptomatic osteopenia up to total functional disability, caused by fractures and deformity. Bone pain can be chronic, recurrent or acute – bone crisis. The avascular necrosis of the femoral head requires hip arthroplasty.

Patients can show a lung disease with obstructive ventilatory dysfunction and pulmonary hypertension. Growth retardation and puberty delay are specific for childhood and adolescent. (half of the patients).

For diagnosis of Gaucher disease some unspecific and specific test are required. To the first category belongs: the hematological exam, bone marrow examination, seric bio-markers assay (chitotriosidase, acid phosphatase, chemokine CCL 18), bone radiographic examination, DXA and MRI. The second category includes: glucocerebrosidase enzymatic assay from serum or fibroblasts culture and mutation analysis either by screening or by seeking the most frequent mutations.

Differential diagnosis is made with several entities: leukemia, lymphomas, osteomyelitis.

In Gaucher patients, due to existence of a permanent, subclinical pro-inflammatory status, a syndrome of macrophages activation is present, with overexpression of Apoprotein E on the cellular surface and secondary dyslipoproteinemia, which has been studied in the last 25 years.

Insulin resistance is associated with changes of glucose metabolism: increased basal glucose production, basal hyperinsulinemia, accompanied by an euglycemic status. HOMA-IR index had significantly higher values compared to the controls, even in treated patients.

Insulin resistance was recently correlated with few polymorphisms of PPAR- α genes. One of this single nucleotide polymorphism (SNP) is the shift of C with G (C \rightarrow G), which determines changing of proline with alanine in codon 12 of the protein. This shift interacts with the transcriptional activity of the genes coding the enzymes regulating the lipid metabolism. In the literature, results are contradictory: some studies are showing the positive role of substitution of Ala \rightarrow Pro in increasing the insulin sensitivity and reducing the risk and prevalence of type 2 diabetes, other studies, on the contrary. All factors that lead to and influence insulin resistance in Gaucher disease patients are very actual subject for research, insufficiently explained by now.

Material for study was represented by a group of 43 type 1 Gaucher patients, followed in the Center of Genetics Pathology – First Pediatric Clinic Cluj-Napoca. Among them, 32 patients were receiving enzyme replacement therapy (ERT) with Imiglucerase and 11 were not treated.

Methods utilized for specific diagnosis were fluorimetric enzymatic assay of seric glucocerebrosidase, incubated with an artificial substrate and the molecular diagnosis of the GBA gene mutations, performed either by PCR or PCR mismatch technique, followed by detection by enzymatic digestion or by direct sequencing.

Part II. Personal Researches

Chapter 1.1. studies the lipid profile in patients with Gaucher disease.

Material was a represented by a group of 43 patients with type 1 Gaucher disease, among whom 32 treated with ERT and 11 non-treated.

Method consisted in determination of seric fractions: cholesterol, HDL, LDL-cholesterol and tryglicerides, evaluated dinamically, with or without therapy. All parameters were correlated with disease's severity indices: anemia, trombocytopenia, organomegaly (quantified by liver and spleen volumetry), chitotriosidase and Zimran's severity score index (SSI).

Results showed that type 1 Gaucher patients presented – in absence of ERT – a specific dyslipoproteinemia characterized by:

a. Total hypocoesterolemia – 60% - directly correlated with platelet count and inversely correlated with spleen volume;

b. Decreased HDL-cholesterol - 68% - with an average value of -12% beneath lower limit normal (LLN) (-15% in more severe forms, and -5% in mild forms);

c. Decreased LDI-cholesterol – 54% - with an average value of – 5% beneath LLN, which correlated directly with platelet count and inversely with splenomegaly.

d. Hypertriglyceridemia – 40% - with an average value, within the severe forms, of +3% above upper limit normal (ULN).

ERT ameliorates this changes namely:

a. Total cholesterol raises with +29% compared with LLN: it normalizes at 6 months of ERT and reaches a significantly greater value at 18 months of ERT. Prevalence of hypo-cholesterolemia decreases significantly at 18 months of ERT.

b. HDL-cholesterol raises with 55% compared with LLN: it normalizes at 6 months and raises significantly at 1 year of ERT. Prevalence of hypo-HDL-cholesterolemia decreases significantly at 1 year of ERT;

c. LDL-cholesterol raises with +35% compared with LLN: it normalizes at 6 months of ERT and reaches a significant threshold at 18 months of ERT. Prevalence of hypo-LDL-cholesterolemia significantly reduces after 1 year of ERT.

d. Trygliceridemia decreases with 29% compared with ULN: it normalizes at 6 months of ERT and reaches a significant point at 1 year of ERT. Prevalence of hypertriglyceridemia decreases significantly at 1 year of ERT.

In untreated patients dynamic is not significant for all the four parameters studied. This total hypocoesterolemia, accompanied by hypo-HDL-cholesterolemia and hypertriglyceridemia demonstrated in Gaucher disease patients may be a potential pro-atherogenic factor that improves with ERT.

Chapter I.2. analyzes the lipid profile in carriers for a mutant allele of Gaucher disease.

Material for study was represented by a group of 23 carriers of a mutant allele for Gaucher disease, all being parents of Gaucher patients.

Method utilized was the same as showed in chapter I.1.

Results revealed that carriers for a mutant allele of Gaucher disease have a lipid profile characterized by total cholesterol, HDL, LDI cholesterol fractions significantly greater than both untreated and treated patients. The hypolipidic status persists in patients, compared with healthy carriers, even after 4 years of ERT. Tryglicerides showed an intermediate value in carriers, between treated patients and untreated, which confirms the tendency of hypertriglyceridemia of the latter ones.

The lipid profile of carriers of N370S mutation did not showed significant values from those in L444P carriers.

Chapter II analyzes the apoprotein E's role in causing the changes of the lipids profile depicted above. In this section, the following subjects were studied:

- seric levels of Apoprotein E in Gaucher patients, compared with controls and the outcome after ERT;

- distribution of Apo E allelic variants in type 1 Gaucher patients, compared with general Romanian population and other geographic areas;

- the impact of ApoE polymorphism onto the lipids profile in these patients, with or without specific therapy.

Material consisted in 41 type 1 Gaucher patients. From these, 31 patients received ERT, for an average period of $3,93 \pm 1,12$ years. The other 10 patients did not receive ERT and they were monitored for $3,45 \pm 2,42$ years.

Method consisted in evaluating the parameters:

- lipoprotein fractions: total cholesterol, HDL, tryglicerides determined by enzymatic methods; LDL was calculated by Friedwald formula;
- apoprotein E phenotype, meaning the seric level of apoproteinE, was assessed by an ELISA formula;
- Apoprotein E genotype - identifying the allelic variants of ApoE gene -was performed by PCR-RFLP technique (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragments Length Polymorphism).

Results showed – for the first time to our knowledge – three distinct genotypes of Apoprotein E: $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ and $\epsilon 2/\epsilon 3$, with a similar distribution as in general Romanian population.

ApoE had increased values, especially in patients with $\epsilon 2/\epsilon 3$ genotype, while patients with $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotype had lower levels of Apo E, compared with controls and with those patients, carrying the wild allele $\epsilon 3/\epsilon 3$. Untreated patients had significantly higher levels of Apoprotein E than treated ones.

Patients carrying the genotype $\epsilon 2/\epsilon 3$ showed a trygliceridemia and LDL-cholesterolemia higher than ULN, after 3 years of ERT, changing subsequently ameliorated under ERT, along with significantly raising the HDL level.

The same positive effects of ERT are visible in patients with $\epsilon 3/\epsilon 3$ and $\epsilon 3/\epsilon 4$ genotype, which showed normal values of lipid parameters after 3 years of ERT, opposite to untreated patients who showed a global hypolipidic status.

HDL had showed higher levels in patients carrying $\epsilon 2/\epsilon 3$ genotype, compared with those carrying the wild type $\epsilon 3/\epsilon 3$, antagonizing the negative effect of hypertrygliceridemia and hyper-LDL-cholesterolemia in these patients.

Direct correlation between the cholesterol fractions for genotype $\epsilon 2/\epsilon 3$ and inverse correlation for $\epsilon 3/\epsilon 4$ carriers draw attention of a possible different implication in lipoproteins metabolism of those two isoforms of ApoE : E2/E3 and E3/E4. Due to the different structure we can predict a different surface interaction with molecules, different adhesivity and, subsequently, different functionality of these proteins resulted by this SNP of ApoE gene.

Chapter III. 1 analyzes the diagnosis methods and prevalence of insulin resistance in Gaucher patients. We performed a cross-sectional study, comparing the insulin resistance in Gaucher patients treated and non-treated, by utilizing the HOMA model.

Material was represented by 36 patients, specifically diagnosed with Gaucher disease, followed in the Center of Genetic Pathology – First Pediatric Clinic, Cluj-Napoca. Thirty patients received ERT with Imiglucerase for $3,96 \pm 1,23$ years while 6 patients did not, being monitored for $2,5 \pm 1,51$ years.

Method of evaluating the insulin resistance consisted in HOMA method (homeostasis model assessment of insulinresistance), described by Matthews in 1985. Basal insulinemia was assessed by electrochemiluminiscence, and seric glucose by enzymatic method.

Insulin resistance and *insulin sensitivity* were evaluated only in basal estate, by calculating the following parameters: HOMA-IR (homeostasis model assessment – insulin resistance), log HOMA-IR, QUICKI (quantitative insulin sensitivity check index), IRI (insulin resistance index). Formulas are detailed in the paper.

Pancreatic secretion of insulin was also assessed in basal estate, by calculating the HOMA-B index. Correlation of these parameters was made with SSI,

weight, ERT duration, global disease duration and pre-ERT duration of the disease (in treated patients).

Results showed that insulin resistance, appreciated by HOMA model, had a prevalence of 6,66% in treated patients. Insulin resistance indices had higher values in treated patients, compared with untreated ones. Our study has brought new information upon insulin sensitivity, appreciated by QUICKI index, which was – concordant - lower in treated Gaucher patients, compared with untreated.

For the treated patients, insulin resistance parameters correlated directly with ERT duration, stronger than with SSI. For the untreated patients insulin resistance decreased with global duration of the disease and correlated intermediately with chitotriosidase.

Treated patients showed a relative hyperinsulinism compared with those untreated, proven by higher values of basal insulinemia and HOMA-B index. Insulinemia correlated directly with ERT duration, stronger than with SSI, explaining partially the result that treated patients, with lower SSI, had higher (!) basal insulinemia.

In untreated patients, basal insulinemia correlated with overweight tendency, while basal glucose decreases with it, proving a good peripheral receptivity in insulin, in absence of ERT. On the other hand, 10% of treated patients showed modified fasting glucose level.

From our study we can draw the conclusion that global duration of the disease and ERT duration are more powerful influencing factors on insulin resistance than severity markers, SSI and chitotriosidase, respectively.

Type 1 Gaucher patients treated for 4 years with Imiglucerase showed an increased risk of peripheral insulin resistance and reactive hyperinsulinism. The risk is increasing with the ERT duration and may lead to glucose metabolism disorders, such as modified basal glucose level. This could be a possible side effect of long time therapy with Imiglucerase. Of course, other studies are necessary to investigate further on the results we found here.

Chapter III.2. analyzes the potential role of polymorphism Pro12Ala of PPAR- α transcriptional factor in predicting the insulin resistance of the Gaucher disease patients.

Material consisted in a group of 36 patients with type 1 Gaucher disease. Thirty of them (group A) received ERT with Imiglucerase for $3,96 \pm 1,23$ ani. We divided the A group into 2 subgroups: A1- 26 patients – genotyped as Pro12Pro and A2 – 4 patients – genotyped as Ala12X (either Pro12 Ala or Ala12Ala). Group B was constituted by 6 untreated patients, monitored for a period of $2,5 \pm 1,51$ years.

Method consisted in assessing the basal glucose level, basal insulinemia and calculating the HOMA parameters, after techniques and formulas described above. For identifying the Pro12Ala polymorphism of the PPAR- α gene, 2 methods have been utilized: PCR-RFLP and ARMS-PCR. Results were 100% superposable.

The results showed that prevalence of „protective” allele Ala is 7% among Gaucher patients, value inferior compared with general population and similar with that reported in obese and diabetic population of different origins (caucasian or arabian). Thus, Pro12Ala polymorphism might be a factor that contributes to peripheral insulin resistance in these patients.

In treated Gaucher patients results of our researches showed a significantly lower insulin resistance and a higher insulin sensitivity in 12Ala carriers, compared with wild genotype Pro12Pro. These „wild-type” patients showed also a relative basal hyperinsulinism.

Difference between treated and untreated patients, in what concerns the insulin-resistance, is more obvious if we compare parameters within the same genotype, Pro12Pro. Treated patients have had all insulin resistance indices significantly higher than untreated ones and insulinsensitivity (QUICKI) significantly lower.

Lipid profile was not influenced by the existence of the Ala allele in 12th position.

In type 1 Gaucher patients receiving ERT, the presence of one allele in the 12th position of the polypeptidic chain, of the transcriptional factor PPAR- α , represents a „protective” factor, which significantly decreases peripheral insulin resistance and the risk for reactiv hyperinsulinism, without generating dyslipidemia.

GENERAL CONCLUSIONS

1. Gaucher patients – when not receiving ERT – showed a **specific dyslipoproteinemia**, characterized by: total hypocholesterolemia – 60% - directly correlated with platelets count and inversely with spleen volume; low level of HDL-cholesterolemia – 68%; low level of LDL-cholesterolemia – 54%, inversely correlated with splenomegaly and directly with platelets count; hypertriglyceridemia – 40% patients.

ERT have improved these metabolic changings: total cholesterol normalized after 6 months, reaching a significantly higher level after 18 months; HDL-cholesterol level normalized after 6 months, reaching a significantly higher level after 1 year of ERT; LDL-cholesterol level normalized after 6 months, reaching a significantly higher value after 18 months of ERT; trygliceridemia decreases, reaching a normal value after 6 months of ERT and a significantly higher level after 1 year of ERT.

This lipid profile showed by Gaucher disease patients, with total hypocholesterolemia, low level of HDL and hiper-trygliceridemia could represent a potential pro-atherogenic factor, significantly improved by ERT.

In untreated patients this four parameters are not significantly changed in time.

2. **Healthy carriers of Gaucher allele** showed a lipid profile characterized by: total cholesterol, HDL, LDL, trygliceridemia significantly higher compared to patients, both treated and untreated.

The global hypolipid status persists in patients even after 4 years of ERT, compared with carriers. Lipid profile of N370S carriers is not significantly different by that found in carriers with L444P mutation.

3. In Gaucher patients we have identified, first time to our knowledge, three different **ApoE genotypes**: $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ and $\epsilon 2/\epsilon 3$, with a distribution similar to the general population and population from Romania. ApoE showed increased levels especially in $\epsilon 2/\epsilon 3$ carriers, while in $\epsilon 3/\epsilon 4$ carriers levels of ApoE have been initially lower than controls and patients with wild genotype $\epsilon 3/\epsilon 3$.

Untreated patients showed significantly higher levels of ApoE than treated patients.

Carriers with $\epsilon 2/\epsilon 3$ genotype had trygliceridemia and LDL-cholesterolemia higher than ULN, after 3 years of ERT, changing that ameliorates afterwards under ERT, along with raising the HDL-cholesterolemia. The ERT benefits are also visible in $\epsilon 3/\epsilon 3$ and $\epsilon 3/\epsilon 4$ carriers, these showing normal lipid profile after 3 years of therapy. In untreated patients a global hypolipidic status persists.

Correlation between the ApoE level and the cholesterol fractions is a direct one for the $\epsilon 2/\epsilon 3$ genotype and inverse one for $\epsilon 3/\epsilon 4$ carriers. This fact may take us to a conclusion that there might be a different implication in lipoprotein metabolism of these two isoforms of Apoprotein E: E2/E3 and E3/E4 respectively.

4. **Insulin resistance** had a prevalence of 6,66% among treated type 1 Gaucher patients. Insulin resistance indices showed superior values in treated patients, compared with untreated patients. Insulin sensitivity (QUICKI index) has been lower in treated patients than in untreated ones. From our study results that global disease duration and ERT duration are factors that influenced the insulin resistance stronger than severity markers (SSI and chitotriosidase). There is a relative hyperinsulinism of treated patients over untreated (superior basal insulin levels and HOMA index.) Plasma levels of insulinemia correlated directly with ERT duration, stronger than with SSI.

Patients' weight does not influence basal glucose when treated, but when not treated, overweight leads to a raise of a basal insulinemia, without dysglycemia. Thus, in treated Gaucher patients the prevalence of increased basal glucose was 10%, after 4 years of ERT.

5. Prevalence of "**protective**" **allele Ala, of the transcription factor PPAR- γ** is 7% in type 1 Gaucher patients, which is inferior to the general population and similar with different origin diabetic and obese population (caucasian and Arabic).

The polymorphism Pro12Ala of the PPAR-gamma gene has an impact on insulin resistance in Gaucher patients. Our results have showed an important decrease of insulin resistance and increase of insulin sensitivity in treated Ala carriers, compared with Pro12Pro carriers, which showed also an relative hyperinsulinism. The difference between treated (insulin resistant) and untreated (insulin sensitive) patients are more obvious among carriers of the same genotype Pro12Pro.

The lipid profile was not significantly changed by the genotype of PPAR-gamma factor, e.g the presence of Ala allele.

Concisely, in treated type 1 Gaucher disease patients, the presence of an Ala aminoacid in the 12th position of polypeptidic chain, of the PPAR- γ transcriptional factor, represents a "protective" element, which decreases significantly the peripheral insulin resistance and the the risk of reactive hyperinsulinism, without causing significant dyslipidemia.

CURRICULUM VITAE



Personal Information

First/Last name **CRISTINA COLDEA**
Address Maresal Ion Antonescu, 6, apt. 181, Cluj-Napoca, Romania
Mobile phone +40722676738
Email cristina.coldea@yahoo.com
Birth date 15-03-1976
Sex Female

Desired job

Job type Full Time
Professional objective Working in highly performant medical environment and health system.
Expanding theoretical knowledge in Medicine, with special interest in clinical research in Genetics and connected areas: Biostatistics and Medical Informatics.
Activity domain Health, Research
Desired job locations Cluj-Napoca, Bucharest

Work experience

Career level **Senior-level (over 5 years)**
Work experience **10 years**
Experience by domains **Health - 10 years**
Research - 5 years
Management experience **Project Manager in a 2 years Research Program**

Job **Postgraduate MD**
Period 2004-11 <> 08.2009
Name of the employer Center of Medical Genetics, First Pediatric Clinic, University of Medicine and Pharmacy, Cluj-Napoca, Romania
Department Research

Job **Specialist Physician**
Period 2007-10 <> present
Name of the Employer Emergency Clinical Children's Hospital Cluj – ER shifts
Medical Center "Unirea" Cluj – beginning with June 2008

Job **Resident Physician and Consultant MD**
Period 2006-10 <> 2007-08
Name of the employer Pediatric and Medical Genetics Dept., Royal Universitary Children's Hospital "Queen Fabiola" Brussels, Belgium

Job **Pediatrics resident**
Period 2002-01 <> 2004-01
Name of the employer Children's Clinical Hospital, Cluj-Napoca

Job **Internship**
Period 2001-01 <> 2001-12
Name of the employer County Clinical Hospital of Cluj-Napoca

Education and training

Education in progress

Period

Institution

City

Major

Description (specialization)

Doctorship

Year of study : 5 (last one)

University of Medicine and Pharmacy " Iuliu Hatieganu »

Cluj Napoca, Romania

Medical Sciences

"METABOLIC CHANGES IN TYPE I GAUCHER DISEASE PATIENTS"

Scientific coordinator : Prof. Dr. Paula Grigorescu-Sido

Obtained diploma

Period

Institution

City

Major

Description (specialization)

Postuniversity degree

2006 - 2007

Free University of Brussels

Brussels

Pediatrics –Medical Genetics

Special International Fellowship – FOSFOM Scholarship

Obtained diploma

Period

Institution

City

Description (specialization)

Medical Doctor, University (graduate)

1994 - 2000

University of Medicine and Pharmacy " Iuliu Hatieganu »

Cluj Napoca

Faculty of General Medicine

Personal skills and competences

Foreign Languages

Driving license

Skills

English - Advanced; French - Advanced;

Yes

Diagnosis and follow-up of patients with different genetic syndromes (dysmorphology) and inherited metabolic diseases.

- Part of official programs such as "Treatment for Gaucher disease" and "National Program for Rare Diseases in Romania" - active member;
- Collecting and updating medical data in a worldwide / national medical databases of patients with special conditions: Gaucher Registry and National Rare Diseases Registry
- Pediatric medical care, diagnosis and treatment of patients with acute or chronic conditions (short and long time follow-up and monitoring)
- Performing general ultrasound exam
- Medical statistics, data download for medical purposes.

Scientific activity

Training courses

- 9 postuniversity training courses (8 national and 1 international) – subjects: Pediatric Cardiology, Child's Growth, Diabetes, General Medical Genetics, Lysosomal Storage Diseases, General Ultrasonography, Methodology of Scientific Medical Research

Training Conferences

- 11 National Conferences and 7 international Conferences in: Pediatrics, Medical Genetics, Perinatology, Lysosomal Storage Diseases, Gaucher Disease

Published works – 26 papers published

- 7 Papers communicated as poster or oral presentation: 4 nationally and 3 internationally. Topics: Pediatrics, Rare Diseases, Dysmorphology, Gaucher disease, Skeletal Dysplasias.

- 19 Papers published in conferences' abstract volumes and medical journals: 8 nationally and 11 internationally. Topics: Pediatrics, Genetics, Rare diseases, Lysosomal Storage Diseases, Metabolic Disorders, Gaucher disease

- Papers published from the PhD's theme:

1. **C Coldea**, P Grigorescu-Sido, V Cret, C Al-Khzouz, C Denes. Changes of lipids metabolism in patients with Gaucher Disease. Article. Revue of Medicine and Pharmacy Targu-Mures – Orvosi es Gyogyszereszeti Szemle, 2008, 54 (Suppl 3) : 139-142
2. **C Coldea**, RA Popp, A Trifa, A Zimmermann, C Al-Khzouz Al. Craciun, P Grigorescu-Sido. Article. "Polymorphism of Apolipoprotein E Gene among Gaucher type 1 Patients". Clujul Medical. 2009. Vol. 82, Nr. 4: 586-590
3. **Coldea C**, Grigorescu-Sido A, Popa V, Cret V, Grigorescu-Sido P. "Dislipoproteinemia in Type I Gaucher Disease Patients". Poster. The 7th National Congress of Pediatrics, Galați, Sept 2005, Abstr. pg: 259
4. **Coldea C**, Grigorescu-Sido P, Zimmermann A, Cret V, Popa V. "Lipid Disorders in Gaucher Disease Patients". Poster. The 2nd National Congress of Medical Genetics, Cluj-Napoca, September 2006, Abstr. pg: 73
5. **C Coldea**, A Zimmermann, C Al-Khzouz, RA Popp, Al Craciun, P Grigorescu-Sido. "Polymorphism of Apolipoprotein E Gene among Romanian Gaucher Patients". Poster. The 6th Symposium on Lysosomal Storage Disorders, Barcelona, Spain. Mars 2009. **Prize for Best Poster**
6. **C Coldea**, A Zimmermann, C Al-Khzouz, RA Popp, Al Craciun, P Grigorescu-Sido. Dyslipoproteinemia in Gaucher disease: new study over 44 Romanian Patients. Poster. Eur J Hum Genet. 2009 May; 17 (suppl 2): 352. **Fellowship in European Conference of Human Genetics, Vienna, Austria**
7. **C Coldea**, A Zimmermann, C Al-Khzouz, RA Popp, A Trifa, Al. Craciun, P Grigorescu-Sido. Dyslipidaemia in Gaucher disease patients. Poster. Balkanic Congress for Rare Diseases, Cluj-Napoca, June 2009
8. **C Coldea**, A Zimmermann, C Al-Khzouz, Al Craciun, AP Trifa, P Grigorescu-Sido. ApoE Polymorphism in Type 1 Gaucher Patients. Poster. National Conference for Medical Genetics, Sibiu, 2009 Sept. Vol res. pg. 69
9. **C Coldea**, A Zimmermann, C Al-Khzouz, R Anghel Popp, AP Trifa, Al Craciun, P Grigorescu-Sido. Dyslipidaemia in Romanian Gaucher patients. Poster. The IX-th National Congress of Pediatrics, with International Participation. Iași. 2009, Oct. Vol res. pg.229-230

Bourses and Prizes

- 2002 – **Special Dean's Prize** – Medicalis –National Congress for Medical Students and Young Doctors
- 2006 / 2007 – **FOSFOM scholarship** – 1 year training fellowship awarded by Free University of Brussels, Belgium
- 2009 March – **Poster prize** - The 6th Symposium on Lysosomal Storage Disorders, Barcelona, Spain;
- 2009 May – **Fellowship** – European Society of Human Genetics Conference, Vienna, Austria

Research Projects

- Clinical study "Therapeutical Response to Imiglucerase for the First Group of Romanian Gaucher Disease Patients " – Coordinator: Prof. Paula Grigorescu-Sido, "Center of Human Genetics - First Pediatric Clinic", UMF "Iuliu Hatieganu", Cluj-Napoca

- **National Research Project: TD 303/2008** "Endocrine and Metabolic Changes in Type I Gaucher Disease", financed by "National Committee for Scientific Research for the Higher Education". **Project Manager: Cristina Coldea, MD.**

Note. This project was ranked *the first one*, with *maximum score*, in the national competition for young PhD students.

Professional affiliations:

- Member of Romanian Society of Pediatrics – since 2006
- Member of Romanian Society of Medical Genetics – since 2006
- Member of Belgian Society of Human Genetics – since 2007
- Member of European Society of Human Genetics – since 2007

Additional Information

I am willing to relocate in the country and abroad.