

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Studiul rolului potențial al unor variante  
genice în etiopatogenia, evoluția și  
complicațiile diabetului zaharat la copil

---

Doctorand **Csilla-Enikő Kecskes (Szabo)**

---

Conducător de doctorat **Prof.dr. Ioan Victor Pop**

---



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

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	15
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	17
<b>1. Diabet zaharat</b>	19
1.1. Definiție	19
1.2. Clasificare	19
<b>2. Diabetul zaharat tip 1</b>	21
2.1. Definiție	21
2.2. Epidemiologie	21
2.3. Etiopatogeneză	21
2.4. Diagnostic	22
2.5. Tratament	23
2.5.1. Insulinoterapia	24
2.5.2. Dieta	24
2.5.3. Exercițiu fizic	25
2.5.4. Educația pacientului și a familiei	25
2.6. Complicații	25
2.6.1. Complicații acute	25
2.6.1.1. Hipoglicemia	25
2.6.1.2. Coma ceto-acidozică	26
2.6.1.3. Alte complicații metabolice	26
2.6.1.4. Complicații acute infecțioase	26
2.6.2. Complicații cronice	26
2.6.2.1. Complicații cronice vasculare microangiopatice	27
2.6.2.1.1. Retinopatia diabetică	27
2.6.2.1.2. Nefropatie diabetică	27
2.6.2.1.3. Neuropatie diabetică	27
2.6.2.2. Complicații cronice vasculare macroangiopatice	28
2.6.2.3. Alte complicații cronice	28
2.7. Monitorizare	28
2.8. Prognostic	28
<b>3. Modificări genetice asociate DZ tip 1 la copil și adolescent</b>	29
3.1. Noțiuni de bază privind variantele (polimorfismele) genetice	29
3.2. Variante genice posibil implicate în etiopatogenia, evoluția și complicațiile DZ tip 1 la copil	32
3.2.1. Variante genice implicate în metabolismul glucidic	34
3.2.2. Variante genice implicate în metabolismul xenobioticelor, detoxifiere, metabolizare și în stressul oxidativ	35
3.2.3. Variante genice implicate în inflamație	36
<b>4. Adipokine implicate în DZ tip 1</b>	39
4.1. Adiponectina	39

4.2. TNF alfa	40
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	41
<b>1. Ipoteza de lucru/obiective</b>	43
<b>2. Metodologie generală</b>	45
<b>2.1. Lotul de studiu</b>	45
<b>2.2. Genotiparea variantelor mutante</b>	45
2.2.1 Obținerea unor gene sau fragmente de ADN	45
2.2.2. Tehnica PCR-RFLP	46
2.2.2.1. Amplificarea fragmentelor ADN prin reacția de polimerizare în lanț (PCR)	46
2.2.2.2. Digestia ADN cu enzime de restricție	47
2.2.2.3. Separarea fragmentelor de ADN	47
2.2.2.4. Detecția fragmentelor de ADN	48
<b>2.3. Variantele genice analizate</b>	48
<b>2.4. Descrierea tehnicilor de analiză moleculară</b>	49
<b>2.5. Analiza statistică</b>	50
<b>3. Studiul 1. Evaluarea frecvenței polimorfismelor din genele adiponectinei, al TNF-<math>\alpha</math> și al glutationului identificate la pacienții de vârstă pediatrică diagnosticați cu diabet zaharat tip 1</b>	53
3.1. Introducere	53
3.2. Ipoteza de lucru	53
3.3. Material și metodă	54
3.4. Rezultate	56
3.5. Discuții	59
3.6. Concluzii	60
<b>4. Studiul 2. Rolul adiponectinei și TNF-<math>\alpha</math> în patogeneza și evoluția DZ tip 1 la copii și adolescenți</b>	61
4.1. Introducere	61
4.2. Ipoteza de lucru	63
4.3. Material și metodă	63
4.4. Rezultate	65
4.5. Discuții	74
4.6. Concluzii	79
<b>5. Discuții generale</b>	81
<b>6. Concluzii generale</b>	87
<b>7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	91
<b>REFERINȚE</b>	93

**Cuvinte cheie:** diabet zaharat tip 1, copii, polimorfisme genetice, adiponectina, TNF- $\alpha$ , glutation S transferaza

## Introducere

Diabetul zaharat este o afecțiune cronică metabolică cu o incidență în creștere la nivel mondial, dar și în țara noastră, care datorită frecvenței și complicațiilor sale posibile reprezintă o problemă medicală majoră a acestui secol. Este din ce în ce mai des întâlnit în rândul copiilor și adolescenților, prezentând o creștere alarmantă în ultimele decenii.

Diabetul zaharat de tip 1 (DZ tip 1) este una dintre cele mai frecvente boli cronice autoimune la copii. Boala se caracterizează prin distrugerea celulelor beta, ducând la hiperglicemie și la o stare de insulino-dependență pe tot parcursul vieții. Deși mai multe studii au adăugat informații relevante, patogeniza complexă a bolii nu este încă complet înțeleasă. Studiile recente s-au concentrat pe mai mulți factori, inclusiv pe istoricul familial și pe predispoziția genetică (gene HLA și non-HLA), dar și pe biomarkerii din mediu și metabolici, cu scopul de a prezice dezvoltarea și progresia DZ tip 1.

Din acest motiv descoperirea variantelor genetice asociate diabetului de tip 1 s-a accelerat foarte mult în ultimii ani. Peste 60 de locusuri cromozomiale, în afara regiunii HLA, au fost asociați cu dezvoltarea DZ tip 1.

Identificarea factorilor genetici de risc, care joacă un rol important în perioada preclinică a DZ tip 1, poate ajuta la conceperea unor terapii, care vizează oprirea procesului autoimun și menținerea funcției celulelor beta restante.

Adiponectina este o adipokină cu proprietăți antiinflamatorii, antiaterogene și antidiabetice. Variația genetică a adiponectinei, cu afectarea funcției acesteia, ar putea juca un rol în fiziopatologia diferitelor tulburări metabolice.

În ceea ce privește varianta polimorfă a adiponectinei, atât genotipurile GG, cât și cele GT par să fie factori de protecție împotriva dezvoltării DZ tip 1.

Glutation S transferaza (GST) este o enzimă antioxidantă, care catalizează conjugarea toxinei cu glutation, neutralizând radicalii liberi, având un rol important în metabolizarea xenobioticelor, în detoxifiere și în stressul oxidativ. Stressul oxidativ este o importantă cale ce este asociată cu citotoxicitatea celulelor beta.

Izoformele GSTT1 și GSTM1 dintre polimorfismele GST au fost mai frecvent implicate în etiopatogeneza DZ tip 1.

TNF- $\alpha$  este o citokină proinflamatorie, care este strâns legată de tulburările metabolice și de diabet, fiind implicată în afectarea celulelor beta, rezultând diabetul de tip 1, rezistența la insulină asociată obezității și facilitarea formării leziunilor vasculare aterosclerotice. Varianta polimorfă TNF- $\alpha$  308A este frecventă la diabetici, determinând producție crescută de citokine, alela G fiind asociată cu producție scăzută de citokine. Rezultatele studiilor efectuate au fost divergente, unele studii arătând o posibilă asociere între variantele genice ale citokinelor și DZ tip 1, în timp ce alte studii susțin că nu ar exista nici o asociere între acestea. În consecință, este necesară continuarea investigațiilor, pentru a demonstra rolul posibil al polimorfismelor genelor citokinelor în etiopatogeneza DZ tip 1.

Secvențarea întregului genom ar permite identificarea polimorfismelor și în consecință, susceptibilitatea la diferite boli și răspunsul individual la tratament, putându-se ajunge astfel la o medicină personalizată bazată pe genomică.

În cercetarea mea din cadrul stagiului de doctorat mi-am propus analiza a patru variante genice prin metode specifice de genetică moleculară și a două adipocitokine posibil implicate în etiopatogenia, evoluția și complicațiile diabetului zaharat la copil. Studiul de față este prima cercetare în țara noastră, care evaluează rolul potențial al acestor variante genice și al acestor citokine implicate în etiopatogenia DZ tip 1, la populația pediatrică din țara noastră. Rezultatele cercetării mele ar putea aduce o contribuție modestă, dar destul de importantă referitoare la corelația și influența acestor variante genice și a acestor citokine asupra DZ tip 1 la copii și adolescenți.

Cu această cercetare am dorit să aduc o contribuție la cercetarea în domeniu, pentru cunoașterea și înțelegerea diferitelor mecanisme posibil implicate în apariția și evoluția diabetului zaharat la copii.

### **Contribuția personală**

Obiectivul principal al acestui studiu a constat în investigarea a 4 polimorfisme genetice prin metode specifice de genetică moleculară și a unor adipocitokine posibil implicate în etiopatogenia, evoluția și complicațiile diabetului zaharat la copil. Prin analiza statistică s-a precizat frecvența acestor alele la populația pediatrică studiată și s-au stabilit posibile asocieri între DZ tip 1, variantele genice și adipocitokinele studiate.

Studiul de față este unul de tip transversal, observațional, caz-control având ca scop evaluarea frecvenței polimorfismelor identificate la pacienții de vârstă pediatrică diagnosticați cu diabet zaharat.

Studiul include 72 de pacienți cu vârsta sub 18 ani, diagnosticați cu diabet zaharat tip 1, care se află în evidența Clinicii Pediatrie I, din cadrul Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca și un lot martor selecționat, randomizat, format din 90 de subiecți, fără diabet zaharat, pacienți ai aceleiași secții. Participanții la studiu au provenit dintre copiii și adolescenții care s-au prezentat pentru consultație și tratament în perioada 2015-2018.

Au fost analizate 4 variante genice divizate în trei grupe etiopatogenetice diferite, posibil implicate în diabetul zaharat tip 1 la copil.

- Polimorfismul 276G>T de la nivelul genei ADIPOQ
- Polimorfismele genei GSTM1 (alela nulă M1)
- Polimorfismele genei GSTT1 (alela nulă T1)
- Polimorfismul -308A/G al genei TNF- $\alpha$ . (rs 1800629)

Analiza variantelor genice studiate a necesitat utilizarea unor tehnici de investigație genetică moleculară conform unor protocoale actuale și bine definite, reprezentate de extracția și izolarea ADN, amplificarea prin reacția PCR a ADN, utilizând primeri specifici, digestia enzimatică, separarea fragmentelor și electroforeza segmentelor de interes.

Prezentul studiu a fost aprobat de Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” din Cluj-Napoca, România, iar consimțământul informat al pacienților și al reprezentanților lor legali a fost obținut, în scris, înaintea includerii în studiu și a fost realizat în concordanță cu Declarația de la Helsinki.

## **Studiu 1. Evaluarea frecvenței polimorfismelor din genele adiponectinei, ale TNF- $\alpha$ și ale glutationului identificate la pacienții de vârstă pediatrică diagnosticați cu diabet zaharat tip 1**

### **Ipoteza de lucru:**

Scopul prezentului studiu constă în oferirea unor informații privind variantele genetice prezentate de pacienții cu diabet zaharat tip 1 în cadrul populației pediatrice românești.

### **Material și metodă:**

S-a realizat un prim studiu de tip transversal, observațional, caz-control, având ca scop evaluarea frecvenței polimorfismelor identificate la pacienții de vârstă pediatrică diagnosticați cu diabet zaharat, care se află în evidența Clinicii Pediatrie I, din cadrul Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca. În acest studiu au fost incluse 72 cazuri: 45% pacienți de sex masculin și 55% pacienți de sex feminin și un grup control format din 90 de pacienți sub 18 ani, care s-au prezentat pentru diferite afecțiuni, care nu aveau legătură cu diabetul.

Diabetul zaharat tip 1 a fost diagnosticat pe baza unuia dintre următoarele criterii: hiperglicemie peste 126 mg/dl (valoare bazală, preprandială), măsurată la cel puțin două determinări, o valoare a hemoglobinei glicate (HbA1C) peste 6,5% sau o valoare întâmplătoare, postprandială a glicemiei mai mare de 200 mg/dl, la un pacient care prezenta simptome clasice de hiperglicemie.

S-au obținut date clinice, paraclinice, s-a extras și s-a izolat ADN-ul, după care s-a efectuat genotiparea genelor de interes. Totodată s-au determinat și concentrațiile plasmatiche ale adipokinelor și s-a efectuat analiza statistică a datelor obținute.

### **Rezultate:**

**Adiponectina:** Analiza concentrației serice a adiponectinei a indicat valori mai crescute la sexul masculin decât la sexul feminin la pacienții cu diabet (medie  $\pm$  SD: 14,28  $\pm$  3,78  $\mu$ g/l vs. 14,22  $\pm$  3,28  $\mu$ g/l,  $p < 0,04$ ) și la pacienții diagnosticați cu fenomen Dawn, comparativ cu ceilalți pacienți, independent de sex (14,25  $\pm$  3,71  $\mu$ g/l vs. de 13,97  $\pm$  3,45  $\mu$ g/l,  $p < 0,03$ ). Doar 9 pacienți diabetici (12,5%) au prezentat niveluri serice de adiponectină  $< 10 \mu$ g/l și complicații minore legate de ateroscleroză. Nivelul seric al adiponectinei s-a corelat pozitiv cu HbA1c ( $r = 0,39$ ,  $p < 0,001$ ) (12,5%) și cu nivelul seric al HDL colesterolului ( $r = 0,8$ ,  $p < 0,001$ ).

Concentrația serică a adiponectinei a fost, de asemenea, mai mare la pacienții cu genotip GT comparativ cu genotipurile GG și TT (GT 14,41  $\pm$  3,73  $\mu$ g/mL,  $p = 0,024$ ; GG 14,21  $\pm$  3,69  $\mu$ g/ml,  $p = 0,025$ ; TT 14,32  $\pm$  3,75  $\mu$ g/mL,  $p = 0,021$ ).

**GSTM și GSTT:** Analizând posibilitatea unei legături între GSTT și un eventual risc asociat pentru dezvoltarea diabetului zaharat, s-a constatat asocierea genotipului T+ ( $p < 0,001$ ) cu o predispoziție pentru DZ tip 1, conferind un risc de 3,2 ori mai crescut. În plus, s-a observat o asociere a polimorfismului GSTT prin prezentul genotip cu niveluri crescute de HbA1c ( $p = 0,031$ ).

S-a asociat o predispoziție crescută a genotipului (M-/T +) pentru DZ tip 1 ( $p=0,002$ ), conferind un risc de 3,651 ori mai crescut ( $p = 0,008$ ).

**TNF- $\alpha$ :** La analiza polimorfismului **-308 A/G** al **TNF $\alpha$** , s-a constatat o frecvență semnificativ mai mare a genotipului TNF-alfa GG ( $p = 0,004$ , OR = 0,830, IC 95% 0,601-0,976) la martori, iar în ceea ce privește frecvențele alelelor, la grupul de studiu s-a evidențiat o creștere semnificativă a frecvenței alelei TNF-alfa G ( $p = 0,005$ , SAU 0,789, IC 95% 0,579– 0,956).

Gena variabilă 308G/A TNF-alfa a fost asociată cu un risc de 1,056 ori mai mic de a dezvolta sindrom metabolic ( $p = 0,003$ ); corelându-se negativ cu profilul lipidic ( $r = -0,42$ ,  $p < 0,02$ ). Genotipul TNF-alfa GG s-a corelat pozitiv cu HbA1c ( $r = 0,21$ ,  $p < 0,01$ ).

### **Concluzii:**

Alela G a AdipoQ, precum și alela G a TNF- $\alpha$ , par să prezinte un efect protector împotriva dezvoltării DZ tip 1. Izoforma de tip T1 sălbatică a GST, precum și genotipul M1 null T1 prezent, constituie factori de risc pentru dezvoltarea DZ tip 1 în populația pediatrică studiată.

## **Studiu 2. Rolul adiponectinei și factorului de necroză tumorală-alfa în patogeneza și evoluția diabetului zaharat tip 1 la copii și adolescenți**

### **Ipoteza de lucru**

Scopul acestui studiu a constat în investigarea rolului unor citokine specifice, precum adiponectina și TNF- $\alpha$ , în patogeneza și evoluția DZ tip 1 la copii și adolescenți, în identificarea posibilelor corelații între valorile de laborator și riscul de apariție și evoluția DZ tip 1.

### **Material și metodă**

S-a efectuat un studiu transversal, observațional, caz-control, comparând copiii și adolescenții cu DZ tip 1 cu un grup de control fără diabet, aflați în evidența Clinicii Pediatrie I din cadrul Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca, România.

Grupul de studiu a inclus 52 de pacienți diagnosticați cu DZ tip 1, (42,3% de sex masculin, 57,7% de sex feminin), cu vârsta cuprinsă între 1-18 ani și un grup de control cu 66 de subiecți fără diabet. Diagnosticul de DZ tip 1 s-a bazat pe criteriile clinice clasice și biochimice cunoscute.

Pe baza valorilor de referință ale laboratorului nostru, pacienții au fost clasificați în două categorii: cu risc scăzut pentru ateroscleroză și insulinorezistență, dacă nivelul adiponectinei s-a situat  $> 10 \mu\text{g/ml}$  și cel al TNF- $\alpha \leq 8,1 \text{ pg/ml}$  sau, respectiv, cu risc ridicat, în caz contrar

### **Rezultate**

Cele doua grupuri au avut niveluri de adiponectină statistic similare ( $\mu\text{g/ml}$ , mediană: 13,57, interval = 6,82 până la 26,61 vs 13,85, interval = 7,05 până la 22,31,  $p =$

0,774) și o proporție similară de pacienți cu risc ridicat sau mediu pe baza valorilor adiponectinei (19,2 % vs. 15,2%, SAU = 1,33,  $p = 0,625$ ). Doar 9 pacienți cu DZ tip 1 (17,3%) au prezentat niveluri de adiponectină  $<10 \mu\text{g/mL}$ , corespunzând riscului de severitate medie pentru ateroscleroză și doar unul dintre acești pacienți a avut niveluri de adiponectină  $< 7 \mu\text{g/mL}$ , corespunzător unui risc ridicat de ateroscleroză.

Pacienții cu DZ tip 1 au avut niveluri semnificativ mai ridicate de TNF- $\alpha$  în comparație cu martorii (pg/ml, mediană: 9,7, interval = 5,3 până la 27,1 vs 7,1, interval = 5,6 până la 15,5,  $p < 0,001$ ) și o proporție semnificativ mai mare de pacienți cu risc crescut pe baza valorilor TNF-alfa (80,8%, vs. 12,1%, OR = 30,45,  $p < 0,001$ ).

42 de pacienți cu diabet zaharat (80,67%) au prezentat concentrații mari ( $\geq 8,1$  pg/ml) de TNF- $\alpha$  în comparație cu martorii.

Niciuna dintre genele studiate nu a prezentat diferențe semnificative în distribuția genotipului între cazuri și martori.

Valorile adiponectinei nu au fost corelate semnificativ cu valorile TNF- $\alpha$  în niciunul dintre cele două grupuri. La pacienții cu DZ tip 1, valorile mai mari ale adiponectinei și TNF- $\alpha$  au fost corelate semnificativ cu vârsta mai mică la includerea în studiu și la debutul DZ tip 1. În plus, TNF- $\alpha$  a prezentat corelații negative semnificative cu vârsta la debutul bolii autoimune și cu nivelurile HDL colesterolului.

## Concluzii

Rezultatele noastre au arătat că pacienții diabetici și martorii sănătoși au avut niveluri de adiponectină statistic similare și a existat o proporție similară de pacienți cu risc crescut/mediu pe baza valorilor adiponectinei. Nivelurile de TNF- $\alpha$  au fost semnificativ mai mari la subiecții cu DZ tip 1 comparativ cu grupul de control. De asemenea, la pacienții cu DZ tip 1 a existat o proporție semnificativ mai mare de pacienți cu risc crescut pe baza valorilor TNF- $\alpha$ . Mai mult, la pacienții cu DZ tip 1, valorile mai ridicate ale adiponectinei și TNF- $\alpha$  au fost corelate semnificativ cu vârstele mai mici la includerea în studiu și la debutul diabetului zaharat. Prin urmare, TNF- $\alpha$  poate servi ca marker suplimentar al diabetului și poate oferi informații valoroase despre căile patogenetice și reglarea evoluției bolii, ducând la dezvoltarea unor noi strategii imunoterapeutice.

## Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Lucrarea de față este primul studiu din țara noastră care are ca scop principal evaluarea rolului potențial al unor variante genice în apariția și evoluția DZ tip 1 la copii și adolescenți. Până în momentul actual nu există date referitoare la frecvența acestor polimorfisme la pacienții pediatrici cu DZ.

Totodată, este primul studiu care a evaluat implicațiile adipocitokinelor, în special ale adiponectinei și ale TNF- $\alpha$ , în patogeneza și în evoluția DZ tip 1 la copii și adolescenți și a coroborat polimorfismele citokinelor cu valorile serice ale acestora și cu evoluția bolii la copii și adolescenți.

Rezultatele acestui studiu oferă informații importante legate de cele 4 polimorfisme investigate privind particularitățile genetice ale populației pediatrice din țara noastră,



corelarea lor cu valorile serice ale celor 2 adipocitokine, dar și date comparative raportate la datele din literatura de specialitate.

În final, rezultatele studiului oferă informații utile despre legătura și influența acestor variante genice asupra DZ tip 1 la copii și adolescenți.

---

PhD THESIS SUMMARY

Study of the potential role of several genic variants in the etiopathogenesis, evolution and complications of diabetes mellitus in children

---

Doctorand **Csilla-Enikő Kecskes (Szabo)**

---

Conducător de doctorat **Prof.dr. Ioan Victor Pop**

---



# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	15
<b>PRESENT STAGE OF KNOWLEDGE</b>	17
<b>1. Diabetes mellitus</b>	19
1.1. Definition	19
1.2. Classification	19
<b>2. Type 1 Diabetes mellitus</b>	21
2.1. Definition	21
2.2. Epidemiology	21
2.3. Etiopathogenesis	21
2.4. Diagnosis	22
2.5. Treatment	23
2.5.1. Insulinotherapy	24
2.5.2. Diet	24
2.5.3. Physical exercise	25
2.5.4. Patient and family education	25
2.6. Complications	25
2.6.1. Acute complications	25
2.6.1.1 Hypoglycemia	25
2.6.1.2. Keto – acidotic coma	26
2.6.1.3. Other metabolic complications	26
2.6.1.4. Acute infectious complications	26
2.6.2. Chronic complications	26
2.6.2.1. Chronic microangiopathic vascular complications	27
2.6.2.1.1. Diabetic retinopathy	27
2.6.2.1.2. Diabetic nephropathy	27
2.6.2.1.3. Diabetic neuropathy	27
2.6.2.2. Chronic macroangiopathic vascular complications	28
2.6.2.3. Other chronic complications	28
2.7. Monitoring	28
2.8. Prognosis	28
<b>3. Genetic changes involved in type 1 DM in children and adolescents</b>	29
3.1. Basic notions regarding genic variants (polymorphisms)	29
3.2. Genic variants possibly involved in the etiopathogenesis, evolution and complications of type 1 DM in children	32
3.2.1. Genic variants involved in glucidic metabolism	34
3.2.2. Genic variants involved in metabolism of xenobiotics; detoxification, metabolism in oxidative stress	35
3.2.3. Genic variants involved in inflammation	36

<b>4. Adipokines involved in type 1 DM</b>	39
4.1. Adiponectin	39
4.2. TNF- alpha	40
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	41
<b>1. Hypothesis of work/aims</b>	43
<b>2. General methodology</b>	45
<b>2.1. Study group of patients</b>	45
<b>2.2. Genotyping of mutant variants</b>	45
2.2.1 Obtaining several genes or DNA fragments	45
2.2.2. PCR-RFLP technique	46
2.2.2.1. Amplification of DNA fragments by polymerase chain reaction (PCR)	46
2.2.2.2. DNA digestion by restriction enzymes	47
2.2.2.3. Separation of DNA fragments	47
2.2.2.4. Detection of DNA fragments	48
<b>2.3. Genic variants analysed</b>	48
<b>2.4. Description of molecular analysis techniques</b>	49
<b>2.5. Statistic analysis</b>	50
<b>3. Study1. Evaluation of identified polymorphisms frequency in the genes of adiponectin, TNF-<math>\alpha</math> and glutathion in pediatric patients diagnosed with type 1 diabetes mellitus</b>	53
3.1. Introduction	53
3.2. Hypothesis of work	53
3.3. Materials and methods	54
3.4. Results	56
3.5. Discussion	59
3.6. Conclusions	60
<b>4. Study 2. Role of adiponectin and TNF-<math>\alpha</math> in the pathogenesis and evolution of type 1 DM in children and adolescents</b>	61
4.1. Introduction	61
4.2. Hypothesis of work	63
4.3. Materials and methods	63
4.4. Results	65
4.5. Discussions	74
4.6. Conclusions	79
<b>5. General discussions</b>	81
<b>6. General conclusions</b>	87
<b>7. Originality and inovative contributions of the thesis</b>	91
<b>REFERENCES</b>	93

**Key words :** type 1 diabetes mellitus, children, genetic polymorphisms, adiponectin, TNF- $\alpha$ , glutathion S transferase

## **Introduction**

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disease with increasing incidence worldwide as well as in our country. Due to its prevalence and possible complications DM represents a major medical challenge of the present century. It is more and more frequently recorded in children and adolescents with an alarmingly rapid increase during the past decades.

Type 1 diabetes mellitus (DM type 1) is one the most frequent chronic autoimmune diseases in childhood. The disease is characterised by distruction of pancreatic beta cells, leading to hyperglycemia and insulindependence lasting all life long. Although several research studies provided relevant iinformations, the complex pathophysiology of the disease is not yet completely understood. Recent studies focused on several factors, including family history and genetic predisposition (HLA and non – HLA genes), but also on environmental factors and metabolic biomarkers in order to predict outcome and progression of DM type 1.

For this reason description of genetic variants associated with DM type 1 have been significantly accelerated in the past years. Over 60 chromosomic loci, excepting HLA region, have been strongly related to development of DM type 1.

Identification of genetic risk factors involved in the preclinical stage of DM type1 can contribute to development of new therapies aiming downregulation of the autoimmune process and preservation of restant beta cell function.

Adiponectin is an adipokine with antiinflammatory, antiatherogenic and antidiabetic properties. Genetic variability of adiponectin, influencing its function could have a role in the pathophysiology of different metabolic disorders.

Regarding polymorphic variants of adiponectin, both GG and GT genotypes seem to represent protective factors againts development of DM type 1.

Glutathion S transferase (GST) is an antioxidant enzyme which catalyses toxin conjugation with glutathion, neutralises free radicals, having thus an important role in metabolization of xenobiotics, as well as in detoxification and in oxidative stress. Oxidative stress is closely correlated with citotoxicity of beta cells.

Out of GST polymorphisms, GSTT1 and GSTM1 izoforms were more often involved in the etiopathogenesis of DM type 1.

TNF- $\alpha$  is a proinflammatory cytokine, strongly correlated with metabolic disorders and diabetes, causing impaired beta cell function, insulono-resistance in obesity and atherosclerotic vascular damage. The polymorphic variant 308A of TNF- $\alpha$  is frequent in diabetes, inducing increased cytokine production, while G allele is associated with reduced cytokine synthesis. Different research studies provided discordant results, some claiming a possible correlation between genetic variants of citokines and DM type 1, while other studies do not sustain these conclusions.

Subsequently, further investigations in this field of research are required in order to assess the possible role of genetic polymorphisms of cytokines in the etiopathogenesis of DM type 1.

Sequencing of the entire human genome would allow identification of polymorphisms and, subsequently, would highlight susceptibility to different diseases and individual response to therapy, which would finally lead to personalised medicine based upon genomics.

The aim of my research doctoral study was analysis of four genetic variants by specific methods of molecular genetics and assessment of two adipocytokines, possibly involved in etiopathogenesis, evolution and complications of type 1 DM in children. The present study is the first research in our country which evaluates the potential role of these genetic variants and these cytokines in the etiopathogenesis of type 1 DM in the pediatric population in Romania. Results of my research could provide a modest, but rather important contribution regarding influence of these genetic variants and cytokines on type 1 DM in children and adolescents.

With this study I wished to play a small part in the research targeting this very important domain in order to better understand the various mechanisms possibly involved in onset and outcome of DM in children.

### **Personal contribution**

The main goal of the present study consisted in assessment of 4 genetic polymorphisms by specific methods of molecular genetics, as well as of several adipocytokines possibly involved in the etiopathogenesis, outcome and complications of DM in children. Statistic analysis established frequency of these alleles in the pediatric population assessed in this study and pointed out possible correlations between DM type 1 and the studied genic variants and adipocytokines.

The present study is a transversal, observational, case –control study which aimed to establish frequency of identified polymorphisms in pediatric patients diagnosed with DM.

The study group included 72 patients, younger than 18 years, diagnosed with DM type 1, in the medical evidence of Pediatric Clinic I of the Emergency Clinical Hospital for Children in Cluj-Napoca. The control group was selectioned, randomized and consisted of 90 subjects, without DM, also in the evidence of the same institution. The participants in the study were recruited among children and adolescents who were brought to the clinic for assessment and treatment in the period 2015-2018.

4 genic variants were analysed, included in three different etiopathogenetic groups, possibly involved in DM type 1 in children.

- Polymorphism 276G>T on ADIPOQ gene
- Polymorphisms of GSTM1 gene (null allele M1)
- Polymorphisms of GSTT1 gene (null allele T1)
- Polymorphism -308A/G of TNF- $\alpha$  gene (rs 1800629)

Analysis of genic variants required use of molecular genetics investigation techniques in accordance with actual, well defined protocols, represented by DNA extraction and isolation, DNA amplification by PCR, using specific primers, enzymatic digestion, separation of fragments and electrophoresis of targeted sequences.

The present research study was approved by the University of Medicine and Pharmacy „Iuliu Hațieganu” in Cluj-Napoca, Romania, and the informed consent of the patients and their legal representatives was previously obtained, in writing, before enrolment in the study, in concordance with the Helsinki Declaration.

## **Study 1. Evaluation of frequency of polymorphisms of adiponectin, TNF- $\alpha$ and glutathion genes identified in pediatric patients diagnosed with DM type 1**

### **Study hypothesis:**

The goal of the present study consisted in providing information about genetic variants in patients with DM type 1 in the Romanian pediatric population.

### **Materials and methods:**

A first transversal, observational, case – control study was carried out with the aim to establish frequency of identified polymorphisms in pediatric patients diagnosed with DM type 1, in the evidence of Pediatric Clinic 1 from the Emergency Clinical Hospital for Children Cluj-Napoca. The study group included 72 cases: 45% male patients and 55% female patients, while the control group consisted of 90 patients aged below 18 years, referred to the clinic for different diseases, not related to diabetes.

DM type 1 was diagnosed based upon one of the following criteria: hyperglycemia over 126 mg/dL (baseline, before meals), persisting at at least two measurements, glicated hemoglobin (HbA1C) over 6,5% or a random, postmeal blood glucose level over 200 mg/dL, in patient with classic symptoms of hyperglycemia.

Clinical and paraclinical data were obtained, DNA was extracted and isolated, followed by genotyping of targeted genes. In the same time plasmatic levels of adipokines were established and statistic analysis of obtained data was carried out.

### **Results:**

**Adiponectin:** Assessment of serum concentrations of adiponectin indicated higher values in males than in females in diabetic patients (average  $\pm$  SD:  $14,28 \pm 3,78$   $\mu$ g/L vs.  $14,22 \pm 3,28$   $\mu$ g/L,  $p < 0,04$ ) and in patients with Dawn phenomenon as compared to the other patients regardless to gender ( $14,25 \pm 3,71$   $\mu$ g/L vs.  $13,97 \pm 3,45$   $\mu$ g/L,  $p < 0,03$ ). Only 9 diabetic patients (12,5%) had adiponectin level  $< 10$   $\mu$ g/L and minor complications related to atherosclerosis. Serum level of adiponectin correlated positively with HbA1c ( $r = 0,39$ ,  $p < 0,001$ ) (12,5%) and with serum level of HDL cholesterol ( $r = 0,8$ ,  $p < 0,001$ ).

Serum concentration of adiponectin was also higher in patients with GT genotype as compared to GG and TT genotypes (GT  $14,41 \pm 3,73$   $\mu$ g/mL,  $p = 0,024$ ; GG  $14,21 \pm 3,69$   $\mu$ g/mL,  $p = 0,025$ ; TT  $14,32 \pm 3,75$   $\mu$ g/mL,  $p = 0,021$ ).

**GSTM și GSTT:** Considering a possible correlation between GSTT and a predisposing risk for developing DM, T+ genotype ( $p < 0,001$ ) was found as being strongly associated with predisposition for DM type 1, pinpointing a 3.2 times higher risk.

Moreover, GSTT polymorphism of this genotype was also correlated with high HbA1c levels ( $p = 0,031$ ).

Predisposition for DM type 1 was also closely correlated with (M-/T +) genotype ( $p = 0,002$ ), providing a 3.651 times higher risk ( $p = 0,008$ ).

**TNF-alpha:** The analysis of -308 A/G polymorphism of *TNF $\alpha$* , revealed a significantly higher frequency of GG genotype of TNF-alpha ( $p = 0,004$ , OR = 0,830, IC 95% 0,601-0,976) in the control group, while regarding allele frequencies, in the study group G allele of TNF-alpha ( $p = 0,005$ , OR 0,789, IC 95% 0,579– 0,956) occurred more often, the figures being statistically significant.

Variable gene 308G/A of TNF-alpha was associated with a 1.056 times lower risk for developing metabolic syndrome ( $p = 0,003$ ); a negative correlation with lipid profile was also recorded ( $r = -0,42$ ,  $p < 0,02$ ). GG genotype of TNF-alpha correlated positively with HbA1c ( $r = 0,21$ ,  $p < 0,01$ ).

### **Conclusions:**

G allele of AdipoQ, as well as G allele of TNF- $\alpha$ , seem to provide protection against development of DM type 1. T1 wild isoform of GST and M1 null T1 genotype represent risk factors for development of DM type 1 in the assessed pediatric population.

## **Study 2. Role of adiponectin and tumor necrosis factor -alpha in the pathogenesis and evolution of diabetes mellitus type 1 in children and adolescents**

### **Study hypothesis**

The aim of the present study consisted in assessment of the role of specific cytokines, as adiponectin and TNF- $\alpha$ , in the pathophysiology and outcome of DM type 1 in children and adolescents, in identification of possible correlations between results of laboratory tests and the risk for onset and evolution of DM type 1

### **Materials and methods**

A transversal, observational, case-control study was carried out, comparing children and adolescents with DM type 1 with a control group, without diabetes, in medical evidence of Pediatric Clinic 1 from the Emergency Clinical Hospital for Children Cluj-Napoca, Romania. The study group included 52 patients diagnosed with DM type 1 (42,3% male, 57,7% female), aged between 1-18 years and a control group with 66 subjects without diabetes. Diagnosis of diabetes was based upon classic clinical and biochemical criteria.

On the basis of reference values of our laboratory patients were included in two categories: low risk for atherosclerosis and insulin resistance, if adiponectin level was  $> 10 \mu\text{g/mL}$  and TNF- $\alpha \leq 8,1 \text{ pg/mL}$  or, with high risk, otherwise.



## **Results**

The two groups had statistically identical adiponectin levels ( $\mu\text{g/mL}$ , average: 13,57, interval = 6,82 up to 26,61 vs 13,85, interval = 7,05 up to 22,31,  $p = 0,774$ ) and a similar proportion of patients with high or medium risk based upon adiponectin levels (19,2 % vs. 15,2%, OR = 1,33,  $p = 0,625$ ). Only 9 patients with DM type 1 (17,3%) had adiponectin levels  $<10 \mu\text{g/mL}$ , corresponding to medium severity risk for atherosclerosis and just one of these patients had adiponectin levels  $< 7 \mu\text{g/mL}$ , corresponding to high risk for atherosclerosis.

Patients with DM type 1 had significantly higher TNF- $\alpha$  levels as compared to controls ( $\text{pg/mL}$ , average: 9,7, interval = 5,3 up to 27,1 vs 7,1, interval = 5,6 up to 15,5,  $p < 0,001$ ) and a significantly higher proportion of high risk patients based upon TNF-alpha levels (80,8%, vs. 12,1%, OR = 30,45,  $p < 0,001$ ).

42 diabetic patients (80,67%) had high TNF- $\alpha$  concentrations ( $\geq 8,1 \text{ pg/mL}$ ), as compared to controls.

None of the studied genes revealed significant differences of genotype distribution between cases and controls.

Adiponectin levels were not significantly correlated with TNF- $\alpha$  levels in none of the two groups. In patients with DM type 1 higher levels of adiponectin and TNF- $\alpha$  were significantly correlated with younger age at enrollement in the study and at onset of DM type 1. Moreover, TNF- $\alpha$  had significant negative correlations with age at onset of autoimmune diseases and with HDL cholesterol levels.

## **Conclusions**

Our results revealed that both diabetic patients and healthy controls had statistically similar adiponectin levels and there was a similar proportion of high/medium risk based upon adiponectin levels. TNF- $\alpha$  levels were significantly higher in diabetic patients than in controls. Moreover, in patients with DM type 1 a significantly higher proportion of high risk patients was recorded, based upon TNF- $\alpha$  levels. In addition, in patients with DM type 1 higher levels of adiponectin and TNF- $\alpha$  were significantly correlated with younger age at study enrollement and at onset of diabetes. In conclusion, TNF- $\alpha$  can serve as an additional marker of diabetes and can provide valuable information about pathogenetic pathways and regulation of the course of disease, leading to development of new immunotherapeutic strategies.

## **Originality and contributions of the thesis**

The present scientific research is the first study in Romania with the main goal of assessing the potential role of several genic variants in onset and evolution of DM type 1 in children and adolescents. Up to the present moment there are no available data regarding the frequency of these polymorphisms in diabetic pediatric patients.

In the same time, this is the first study which have assessed involvement of adipocytokines, specifically of adiponectin and of TNF- $\alpha$ , in the pathogenesis and course of

DM type 1 in children and adolescents and have correlated polymorphisms of cytokines with their serum levels and with evolution of diabetes in pediatric patients.

Results of the present research provide important information about the 4 polymorphisms investigated, regarding genetic particularities of the pediatric population of our country, also correlating these polymorphisms with serum levels of the two adipocytokines. The study presents significant comparative data from the scientific medical literature.

Finally, the results of the study offer useful information about correlations and influences of these genic variants in DM type 1 in children and adolescents.