

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN
CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALA UMF CRAIOVA**

TEZĂ DE DOCTORAT

- REZUMAT -

**‘ ÎN CĂUTAREA VERIGII LIPSĂ DINTRE BOALA
ALZHEIMER ȘI DIABETUL ZAHARAT TIP 2’**

**CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:
Prof. univ. dr. MARIA MOȚA**

**DOCTORAND:
ADINA MITREA**

**Craiova
2013**



UNIUNEA EUROPEANĂ



GUVERNUL ROMÂNIEI
MINISTERUL MUNCII, FAMILIEI,
PROTECȚIEI SOCIALE ȘI
PERSOANELOR VÂRSTNICE
AMPOSDRU



Fondul Social European
POS DRU 2007-2013



Instrumente Structurale
2007-2013



MINISTERUL
EDUCAȚIEI
NAȚIONALE
OIPOSDRU



UNIVERSITATEA
DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
DIN CRAIOVA

Investește în oameni !

FONDUL SOCIAL EUROPEAN
Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane
2007 – 2013

Axa prioritară 1

**„Educația și formarea profesională în sprijinul creșterii
economice și dezvoltării societății bazate pe cunoaștere”**

Domeniul major de intervenție 1.5

„Programe doctorale și postdoctorale în sprijinul cercetării”

Titlul proiectului

***„Creșterea calității și vizibilității rezultatelor cercetării științifice a
doctoranzilor cu frecvență prin acordarea de burse doctorale”***

Contract nr: POSDRU/107/1.5/S/82705

Beneficiar

Universitatea de Medicină și Farmacie din Craiova

Cuprins

Cuvinte cheie.....	2
1. Stadiul cunoașterii	2
1.1 Insulino-rezistența periferică.....	2
1.2. Boala Alzheimer - "diabet zaharat tip 3"	2
1.3 Progranulina și implicațiile sale atât în cadrul insulino-rezistenței periferice cât și în boala Alzheimer.....	2
2. Contribuții proprii	3
2.1 Scopul studiului	3
2.2 Material și metodă	3
2.3 Markerii ai insulino-rezistenței periferice în populația studiată.....	4
2.3.1. Rezultate	4
2.3.2. Discuții.....	6
2.4. PGRN ca marker biologic de insulino-rezistență periferică.....	7
2.4.1. Rezultate	7
2.4.2. Discuții.....	7
2.5 PGRN și rolul pe care îl joacă în asocierea dintre boala Alzheimer și diabetul zaharat de tip 2.....	7
2.5.1 Rezultate	7
2.5.2 Discuții.....	8
3. Concluzii finale	9

Cuvinte cheie: boala Alzheimer, diabet zaharat tip 2, insulino-rezistență, adipokine, progranulina, circumferința pumnului, raportul C peptidului

1. Stadiul cunoașterii

1.1 Insulino-rezistența periferică

Insulino-rezistența (IR) periferică se caracterizează printr-un răspuns insuficient al organelor țintă (mușchi scheletici, ficat și țesut adipos) ca urmare a acțiunii insulinei circulante.

Cu toate că IR nu duce întotdeauna la apariția diabetului zaharat tip 2 (DZ2), ea este unul dintre mecanismele centrale implicate în acest proces. DZ2 apare atunci când indivizii insulino-rezistenți nu pot secreta cantitatea crescută de insulină necesară pentru a compensa IR. De-a lungul anilor, s-au introdus multe metode de evaluare a IR periferice, printre acestea numărându-se markerii antropometrici și biologici. Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) rămâne parametrul cel mai utilizat pentru aprecierea IR.

1.2. Boala Alzheimer - "diabet zaharat tip 3"

Boala Alzheimer (AD) este cea mai comună cauză de demență și reprezintă între 70% și 90% din totalitatea formelor de demență. De-a lungul ultimelor decade, prevalența AD sporadic a crescut, chiar după efectuarea de corecții privind longevitatea. Din ce în ce mai multe dovezi susțin conceptul că AD este o boală metabolică ce presupune alterări progresive ale capacității creierului în a utiliza glucoza periferică și în a răspunde la stimularea produsă de insulină. Această alterare a metabolismului glucidic asociată AD, justifică denumirea de "diabet zaharat tip 3", care reflectă cu acuratețe faptul că AD reprezintă o formă de diabet ce afectează selectiv creierul și care are trăsături moleculare și biochimice suprapozabile atât DZ2 cât și diabetului zaharat tip 1. Cu toate că AD pare să fie "diabet zaharat tip 3", mecanismul exact care leagă AD și DZ2 rămâne să fie descoperit cu exactitate. Studii recente s-au axat și pe rolul jucat de adipokine în acest proces, cele mai studiate fiind adiponectina, leptina și progranulina (PGRN).

1.3 Progranulina și implicațiile sale atât în cadrul insulino-rezistenței periferice cât și în boala Alzheimer

Recent introdusă în familia adipokinelor, PGRN a fost menționată pentru prima dată în contextul IR de către Youn et al. în 2009. De atunci, studiile au reconfirmat rolul PGRN în IR, obezitate și DZ2.

În ceea ce privește AD, cu toate că în mai multe studii această proteină a fost propusă ca marker biologic al neurodegenerescentei caracteristică AD, rolul său în apariția acestei patologii este încă neclar și controversat.

2. Contribuții proprii

2.1 Scopul studiului

Propunem un studiu pilot ce evaluează nivelele PGRN serice precum și posibila contribuție a acestei proteine la asocierea dintre AD și DZ2. De asemenea, ne-am propus să studiem IR periferică evaluată prin parametrii clasici și PGRN serică.

Obiectivele studiului au fost:

- Evaluarea IR periferice în populația studiată utilizând markeri clasici și markeri relativ noi de IR.
- Evaluarea utilității markerilor antropometrici și biologici de IR într-o populație vârstnică.
- Evaluarea utilității PGRN ca marker al IR la subiecți vârstnici.
- Analiza cantitativă a PGRN serice la subiecți cu AD, DZ2, subiecți cu ambele patologii și un grup martor și studiul comparativ între cele 4 loturi.

2.2 Material și metodă

Studiul a fost efectuat în perioada de mobilitate externă din cadrul studiilor doctorale, septembrie 2012 - mai 2013. Subiecții înrolați în studiu au fost recrutați din Ambulatoriile de Endocrinologie și Diabet și Neurologie ale Universității Campus Bio-Medico din Roma. Studiul a avut acordul comitetului etic al Universității, iar toți subiecții incluși au citit și au semnat consimțământul informat.

Am desfășurat un studiu pilot ce a inclus 40 subiecți, după cum urmează: Lotul 1: 10 subiecți cu AD și DZ2; Lotul 2: 10 subiecți cu AD, fără DZ2; Lotul 3: 10 subiecți cu DZ2, fără AD; Lotul 4: 10 martori sănătoși.

Toți subiecții incluși în studiu au îndeplinit următoarele criterii de includere: vârsta > 60 ani; DZ2 diagnosticat de cel puțin un an, subiecții fără AD au obținut la testul minimal state evaluation (MMSE) scoruri de cel puțin 27 puncte. De asemenea, au fost respectate și criteriile de excludere stabilite: tratament anti-inflamator; corticoterapie; rata filtrării glomerulare (eRFG) calculată prin formula $CKD-EPI < 30 \text{ mL/min/1.73m}^2$; boală hepatică, istoric recent de infecție/inflamație/boală acută, istoric de neoplazii; subiecți cu DZ2 insulino-tratați; diagnosticul de DZ2 a fost exclus pe baza măsurării glicemiei a

jeun și a hemoglobinei glicate (HbA1c), ambele cu valori normale; demența a fost exclusă în urma testului MMSE doar dacă subiectul a obținut minim 27 puncte.

Datele înregistrate au inclus: date demografice (sex, vârstă); date antropometrice (greutate, înălțime, circumferința abdominală (CA), circumferința șoldului, circumferința pumnului); tratamentul curent, teste cognitive (MMSE); analize de laborator (HbA1c, glicemie a jeun, insulinemie bazala, C peptid bazal, colesterol total, colesterol HDL, trigliceride (TG), uree, creatinina, microalbuminurie, transaminaze, proteina C reactiva dozată prin metoda high sensitive (hsCRP), hemoleucogramă completă).

Au fost evaluați parametri asociați cu IR: HOMA-IR, indexul masei corpului (IMC), CA, circumferința pumnului, indexul abdomino-fesier (IAF), raportul CA/înălțime (CA/H), indexul adipozității corporale (IAC), raportul TG/HDL, indexul adipozității viscerale (IAV), raportul C peptidului care este egal cu $20 / (C \text{ peptid bazal (nmol/L)} \times \text{glicemia a jeun (mmol/L)})$. În plus, au fost efectuate și două analize speciale: dozarea PGRN serice și analiza genetică a apolipoproteinei E (Apo E).

Datele înregistrate au fost prelucrate statistic cu ajutorul software-ului Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 17.00 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

2.3 Markeri ai insulino-rezistenței periferice în populația studiată

2.3.1. Rezultate

IR a fost evaluată utilizând HOMA-IR, dar și markeri antropometrici și biologici raportați în literatura de specialitate. În studiul nostru, am găsit diferențe semnificative statistic între cele 4 grupuri privind CA ($p=0,007$), IMC ($p=0,021$), IAC ($p=0,005$), IAF ($p=0,025$), CA/H ($p=0,004$), raportul C peptidului ($p=0,002$) și hsCRP ($p=0,032$). S-a constatat, că deși nu au existat diferențe semnificative statistic între cele 4 loturi, subiecții cu DZ2 (cu și fără AD) au avut valori ale HOMA-IR mai mari decât restul subiecților. Același trend s-a observat și la restul parametrilor investigați la care nu s-au găsit diferențe semnificative statistic.

Având în vedere aspectele prezentate anterior, am reîmpărțit populația studiată în 2 loturi, în funcție de prezența DZ2. Am constatat că pentru loturile nou formate, atât în cazul HOMA-IR ($p=0,049$) cât și în cazul parametrilor antropometrici studiați există diferențe semnificative statistic între cele 2 loturi.

Corelațiile semnificative statistic dintre HOMA-IR și restul parametrilor investigați sunt prezentate în tabelul 2.1 pentru întregul lot și pentru subiecții cu DZ2.

Tabel 2.1. Corelațiile semnificative statistic ale HOMA-IR cu restul parametrilor studiați

Parametrul studiat	Valoarea P	
	Întregul lot (n=40)	Lotul DZ2 (n=20)
CA (cm)	<0,001	0,014
Circumferința pumnului (cm)	0,033	NS
IMC(Kg/m ²)	0,001	NS
IAC (%)	0,002	NS
IAF	0,025	NS
CA/H	0,001	NS
C peptid (ng/mL)	<0,001	0,001
Raportul C peptidului	<0,001	0,001

NS nesemnificativ statistic

Analiza ariilor de sub curba ROC a fost utilizată pentru a evalua utilitatea parametrilor antropometrici și biologici prezentați anterior ca predictorii independenți ai IR (evaluată prin HOMA-IR), atât pentru întregul lot cât și în cazul subiecților cu DZ2. În studiul nostru, CA (aria=0,755, p=0,017), IMC (aria=0,780, p=0,009), IAC (aria=0,760, p=0,015), CA/H (aria=0,755, p=0,017), C peptid (aria=0,943, p<0,001) și raportul C peptidului (aria=0,912, p<0,001) au fost predictorii independenți ai IR. Am constatat că în cazul CA, IMC, IAC, CA/H și C peptid valorile crescute sunt predictorii ai IR, în timp ce pentru raportul C peptidului, sunt predictive valorile scăzute. În cazul subiecților cu DZ2, analiza ariei de sub curba ROC a evidențiat ca predictorii independenți doar C peptidul (aria=0,934, p=0,002) și raportul C peptidului (aria=0,923, p=0,002).

Circumferința pumnului, parametru antropometric recent asociat cu IR, a fost analizată în relație cu toți ceilalți parametri. Așa cum am precizat anterior, circumferința pumnului s-a corelat cu HOMA-IR, dar nu a fost predictor independent al IR. Tabelul 2.2 prezintă corelațiile semnificative ale circumferinței pumnului cu restul parametrilor studiați.

Tabel 2.2. Corelațiile semnifictive statistic ale circumferinței pumnului cu restul parametrilor studiați

Parametrul studiat	Valoarea P	
	Întregul lot (n=40)	Lotul DZ2 (n=20)
CA (cm)	<0,001	0,018
IMC (Kg/m ²)	<0,001	<0,001
IAC (%)	0,013	NS
IAF	0,003	NS
WHtR	0,002	NS
C peptid (ng/mL)	<0,001	0,003
Raportul C peptidului*	0,004	NS

*corelație negativă NS ne semnificativ statistic

Ținând cont de faptul că IR, obezitatea și DZ2 sunt factori de risc pentru boala cronică de rinichi (BCR), am analizat relațiile dintre parametrii studiați și eRFG calculată prin metoda CKD-EPI. S-au găsit corelații negative semnificative statistic între eRFG și circumferința pumnului ($p=0,017$), C peptid ($p=0,007$), TG/HDL ($p=0,008$) și IAV ($p=0,011$). Analiza ariei de sub curba ROC a arătat că toți acești parametri au fost predictorii independenți ai BCR, definită ca $eGFR < 60 \text{ mL/min/1.73m}^2$. În plus, la subiecții cu DZ2, eRFG a fost corelată negativ cu circumferința pumnului ($p=0,009$) și C peptid ($p=0,007$).

2.3.2. Discuții

Atunci când interpretăm rezultatele studiului nostru, trebuie să ținem cont în primul rând de faptul că a fost realizat pe un lot de subiecți vârstnici (media de vârstă 74.6 ± 4.9 ani) și pe un număr mic de subiecți. Din câte știm, până în prezent nu a fost realizat un alt studiu care să evalueze utilitatea circumferinței pumnului ca marker de IR la vârstnici, deși acest parametru s-a dovedit a fi un bun predictor al diabetului și al sindromului metabolic în populația adultă. Deși în studiul nostru circumferința pumnului nu a fost predictor al IR, ea a fost corelată cu HOMA-IR.

În ceea ce privește parametrii biologici, doar C peptidul și raportul C peptidului, parametru nou introdus în literatură s-au corelat cu HOMA-IR atât în cazul studierii întregului lot, cât și la subiecții cu DZ2. Mai mult decât atât, cei doi au fost predictorii independenți ai IR.

Un rezultat interesant obținut în cadrul studiului nostru este calitatea de predictor independent al BCR pe care am determinat-o în urma analizei circumferinței pumnului.

2.4. Progranulina ca marker biologic de insulino-rezistență periferică

2.4.1. Rezultate

Dat fiind posibilul rol pe care PGRN îl are în etiopatogenia AD, pentru a evita orice eroare, am decis ca în evaluarea PGRN și a raportului PGRN/kg ca markeri biologici de IR periferică să luăm în considerare doar subiecții cu DZ fără AD și lotul martor. S-a găsit o corelație semnificativă statistic între PGRN și HOMA-IR ($p=0,043$) doar la subiecții cu DZ2. În plus, nivelurile serice ale PGRN au fost mai mari la subiecții insulino-rezistenți comparativ cu cei care au avut HOMA-IR $<2,6$, dar această diferență nu a fost semnificativă statistic ($p=0.059$). În continuare am comparat valorile PGRN la subiecții cu DZ2 insulino-rezistenți, subiecții non-insulino-rezistenți cu DZ2 și lotul martor, unde am găsit diferențe semnificative statistic ($p=0,007$), explicate în cadrul analizei pos-hoc pe seama diferenței semnificative dintre subiecții insulino-rezistenți cu DZ2 și lotul martor ($p=0,005$).

Analiza statistică separată în funcție de sex a arătat că nu există diferențe semnificative între sexe, dar s-a găsit o corelație semnificativă între PGRN și HOMA-IR doar la femei ($p=0,046$).

Singurul rezultat semnificativ statistic obținut în urma analizei PGRN/kg a evidențiat valori semnificativ mai mari ale acestui parametru la femei ($p=0,048$).

2.4.2. Discuții

Subliniem încă o dată importanța interpretării rezultatelor obținute în contextul studiului nostru, într-o populație vârstnică și pe un număr redus de subiecți. În studiul nostru, PGRN a fost corelată cu HOMA-IR la subiecții cu DZ2. În plus, am găsit o corelație între PGRN și HOMA-IR la populația feminină luată în studiu.

2.5 Progranulina și rolul pe care îl joacă în asocierea dintre boala Alzheimer și diabetul zaharat de tip 2

2.5.1 Rezultate

Am determinat cantitativ PGRN serică la subiecții incluși în studiu. Cum PGRN aparține familiei adipokinelor, fiind sintetizată și de către țesutul adipos, am evaluat și raportul PGRN/kg. Tabelul 2.3 prezintă valorile celor 2 parametri la loturile studiate.

Tabel 2.3. Valorile PGRN și PGRN/kg la loturile studiate (datele sunt prezentate ca medie±deviație standard)

Parametru	AD+DZ2 n=10	AD n=10	DZ2 n=10	Lot martor n=10
PGRN (ng/mL)*	87,23±19,16	105,64±33,4	132,88±36,6	99±22,87
PGRN/kg*	1,21±0,29	1,7±0,5	1,65±0,53	1,51±0,5

* variabilele deviază semnificativ de la distribuția normală

PGRN a prezentat o distribuție anormală, fapt ce ne-a determinat să transformăm logaritmice această variabilă pentru a o aduce la distribuție normală. Testul ANOVA aplicat noii variabile a găsit o diferență semnificativă statistic între cele 4 loturi ($p=0,01$). Analiza pos-hoc a explicat această valoare prin prisma diferenței semnificative statistice existente între valorile PGRN dintre subiecții cu AD și DZ2 și subiecții doar cu DZ2 ($p=0,006$). Cu toate că PGRN serică a fost mai mare la subiecții cu DZ2 comparativ cu lotul martor, această diferență nu a fost semnificativă statistic. Testele non-parametrice Kruskal-Wallis ($p=0,028$) urmat de testul Mann-Whitney care au luat în calcul valorile inițiale, au confirmat rezultatele prezentate anterior.

Luând în considerare faptul că purtătorii alelei $\epsilon 4$ au un risc de două ori mai mare de a dezvolta AD, am analizat relația dintre PGRN serică și genotipul Apo E, dar nu au fost identificate diferențe semnificative statistice ale PGRN în funcție de prezența $\epsilon 4$.

Analiza PGRN/kg a fost de asemenea realizată cu ajutorul testelor non-parametrice pentru valorile inițiale și testul ANOVA urmat de analiza pos-hoc care au fost aplicate în urma transformării logaritmice. S-au obținut diferențe semnificative statistice între subiecții cu AD și DZ2 și cei cu AD ($p=0,023$), precum și între subiecții cu AD și DZ2 și cei cu DZ2 ($p=0,049$).

Găsim interesant faptul că deși nu s-au evidențiat diferențe semnificative statistice ale PGRN între subiecții cu AD și DZ2 și cei cu AD, atunci când am analizat raportul PGRN/kg, am găsit valori semnificativ mai mari la subiecții cu AD.

2.5.2. Discuții

În interpretarea rezultatelor prezentate trebuie să ținem seama că aceste date au fost obținute în urma unui studiu pilot care a încercat să elucideze câteva aspecte legate de asocierea AD – DZ2. Din cunoștințele noastre, până în prezent toate studiile care au evaluat PGRN și rolul său în AD nu au ținut cont de parametrii metabolismului glucidic sau de prezența DZ2.

Unul dintre rezultatele cele mai interesante obținute în acest studiu este faptul că deși PGRN este un marker de IR la subiecții cu DZ2, atunci când DZ2 este asociat cu AD, nivelul PGRN este semnificativ statistic mai mic. În ceea ce privește rezultatele studierii PGRN la subiecții cu AD, acestea sunt comparabile cu datele descrise în literatură.

Deși la o primă vedere rezultatele prezentate sunt surprinzătoare, nu putem trece cu vederea faptul că studii recente prezintă rezultate comparabile în cazul analizei adiponectinei și leptinei, care la subiecții cu AD par a avea un rol opus față de cel pe care îl joacă la subiecții cu DZ2.

3. Concluzii finale

- În studiul nostru, raportul C peptidului, parametru nou asociat cu IR, a fost cel mai bun predictor independent al IR (evaluată cu HOMA-IR).
- Circumferința pumnului, parametru antropometric ușor de măsurat, neinfluențat de îmbrăcăminte și status prandial, a fost un marker bun de IR într-o populație vârstnică, fapt ce ne face să sugerăm includerea acestuia în practica clinică.
- Raportul C peptidului, TG/HDL, IAV și circumferința pumnului au fost predictori independenți ai BCR. Cu toate acestea, trebuie să remarcăm faptul că TG/HDL și IAV sunt influențați de tratamentul anti-lipemiant iar raportul C peptidului este destul de costisitor de determinat, în timp ce circumferința pumnului este cel mai ușor de introdus în practica clinică. Trebuie să ținem seama că acesta este, din cunoștințele noastre, primul studiu care evaluează relația dintre circumferința pumnului și BCR, astfel că studii ample, cross-secționale și prospective, sunt necesare pentru a confirma rezultatele noastre și pentru a determina valori cut-off ce pot avea aplicabilitate clinică.
- Diferența semnificativă statistic privind PGRN serică găsită între subiecții cu AD și DZ2 și cei care au doar DZ2, precum și diferențele semnificative în ceea ce privește raportul PGRN/kg între subiecții cu AD și DZ2 și cei cu AD, respectiv DZ2, ne fac să credem că PGRN joacă un rol în asocierea dintre aceste 2 patologii. Cu toate acestea, rezultatele noastre provin dintr-un studiu pilot, astfel încât studii viitoare asociate cu studii fundamentale poate vor clarifica rolul și mecanismul prin care PGRN, dar și alte adipokine, influențează această asociere.