

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„VICTOR BABEȘ” DIN TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
Departamentul Morfologie Microscopică**

MIHĂILESCU ALEXANDRA-MARIA



**VARIAȚII POLIMORFICE LA COPILUL CU OBEZITATE
ȘI REZISTENȚĂ LA INSULINĂ**

REZUMAT

Conducător științific

PROF. UNIV. DR. PUIU MARIA

**Timișoara
2022**

I. INTRODUCERE

Creșterea prevalenței obezității infantile și comorbidităților asociate constituie una dintre cele mai importante probleme de sănătate publică actuală. Conform Organizației Mondiale a Sănătății, în 2019, 38 de milioane de copii sub 5 ani și 340 de milioane de copii și adolescenți (5-19 ani) erau supraponderali sau obezi.

Patogeneza obezității implică interacțiuni complexe între factori genetici, comportamentali și de mediu. Prevalența crescută a obezității infantile poate fi atribuită atât consumului de alimente înalt calorice și stilului de viață sedentar, tipare proprii epocii moderne, cât și tulburărilor metabolice sau endocrine și factorilor genetici predispozanți. În numeroase publicații s-a demonstrat faptul că unele persoane sunt mai susceptibile decât altele în a deveni supraponderale.

Am ales ca temă pentru cercetarea doctorală evaluarea variațiilor polimorfice la copilul cu obezitate și rezistență la insulină, datorită impactului pe care cele două condiții medicale îl pot avea asupra sănătății micilor pacienți. Dezvoltarea și promovarea fără precedent a alimentației de tip fast-food și înlocuirea jucatului în aer liber cu alternativa comodă a utilizării ecranelor, în principal a jocurilor pe calculator, reprezintă două exemple care au contribuit major, din punct de vedere comportamental, la creșterea prevalenței obezității infantile. De asemenea, contextul recent al pandemiei cu virusul SARS-CoV-2 a accentuat impactul factorilor obezogeni prin restricționarea activităților școlare și sportive.

În cadrul proiectului „Utilizarea modelelor nutrigenomice pentru personalizarea tratamentelor dietetice în obezitate”, acronim NUTRIGEN, desfășurat în cadrul Disciplinei de Genetică a Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” Timișoara, am avut posibilitatea de a evalua un număr mare de copii cu obezitate și suprapondere, determinând pentru aceștia atât variante genetice asociate obezității, parametrii sanguini biochimici și metabolici, cât și pattern-urile defectuase proprii stilului lor de viață.

În contextul facilitării prevenției riscurilor asociate obezității cu debut pediatric, în ultimii ani s-au intensificat eforturile pentru identificarea genelor implicate în mecanismele moleculare ale bolii, în încercarea de a identifica precoce indivizii cu risc genetic crescut. De asemenea, studiile au implicat și urmărirea interacțiunii dintre susceptibilitatea genetică și modificările generate de stilul de viață.

Relația dintre obezitate și rezistența la insulină este evidentă. Insulina este un reglator al biologiei adipocitare, structură celulară cu cea mai mare sensibilitate la insulină, promovând depozitarea trigliceridelor la nivelul adipocitelor, stimulând transportul de glucoză, sinteza trigliceridelor (lipogeneza), precum și inhibarea lipolizei. Aceasta crește, de asemenea, absorbția acizilor grași derivați din lipoproteinele circulante prin stimularea activității lipoprotein lipazei la nivelul țesutului adipos. Efectele metabolice ale insulinei sunt mediate de o gamă largă de acțiuni specifice care implică funcția proteinelor și expresia genelor implicate.

Studii epidemiologice arată că riscul pentru rezistența la insulină și diabet cresc pe măsură ce conținutul de grăsime corporală, evaluat prin indicii de masă corporală (IMC) crește. Țesutul adipos acționează ca un organ endocrin. Depozitele centrale (intra-abdominale) de grăsime reprezintă o precondiție pentru riscul instalării insulinorezistenței, diabetului de tip 2 și bolilor cardiovasculare, acestea fiind mai active din punct de vedere lipolitic.

Mentținerea greutateii corporale depinde de trei componente strâns interconectate: aportul de alimente, consumul de energie și adipogeneza, orice modificare la nivelul genelor implicate în aceste mecanisme având consecințe importante pentru fenotip.

Factorii ereditari acoperă un procent de 30% până la 50% din variația IMC-ului. Formele monogenice de obezitate determină fenotipuri cu hiperfagie și obezitate morbidă și variante sindromice cu tablou clinic complex. Elucidarea modului în care genetica influențează patogeneza obezității este crucială. Formele sindromice și monogenice de obezitate infantilă pot oferi indicii despre genele și căile metabolice care ar trebui vizate de o abordare terapeutică specifică.

Obezitatea monogenică este cauzată de mutații de la nivelul unei singure gene. Majoritatea acestor gene sunt implicate în calea leptină-melanocortină, ce constituie cel mai important reglator al aportului alimentar. Acestea codifică leptina (LEP), receptorul leptinei (LEPR), receptorul melanocortinei 4 (MC4R), proopiomelanocortina (POMC) și factorul neurotrofic derivat cerebral (BDNF). Pacienții cu forme de obezitate monogenică și forme sindromice de obezitate (Prader Willi, Biedl Bardet și Alström) prezintă fenotipuri severe cu hiperfagie și obezitate morbidă.

Posibilitatea de a detecta loci cauzali pentru formele poligenice de obezitate infantilă crește pe măsura extinderii eșantionului studiilor de asociere genomică GWAS (genome-wide association studies). Acestea facilitează identificarea de loci noi pentru determinarea variantelor genetice asociate cu obezitatea.

Factorii genetici joacă, de asemenea, un rol esențial în rezistența la insulină. Substratul receptorului de insulină 1 (*IRS1*) este implicat în calea de semnalizare a insulinei. Reglatorul glucokinazei (*GCKR*) codifică o proteină care inhibă glucokinaza, implicată în reglarea stocării glucozei în ficat. Variante ale genei *FTO* sunt puternic asociate cu creșterea IMC-ului și afectarea sensibilității la insulină. Variante ale genei *TCF7L2* sunt asociate cu riscul de a dezvolta rezistență la insulină și diabet zaharat tip 2. Mutațiile N-acetiltransferazelor 1 și 2 (*NAT1* și *NAT2*) afectează sensibilitatea la insulină. Concentrațiile scăzute ale factorului de creștere de tip insulinic 1 (IGF-1) sunt asociate cu o reducere a sensibilității la insulină.

Adițional, țesutul adipos al indivizilor obezi este infiltrat cu celule mononucleare ce întrețin o stare de inflamație cronică. Adipokinele (TNF- α , rezistină, IL-6, inhibitor al activatorului de plasminogen-1, angiotensinogen) sunt proinflamatorii și protrombotice, contribuind prin mecanism propriu la rezistența la insulină și aterogeneză.

În ultimul deceniu, domeniul geneticii a îmbogățit cunoașterea pe tema obezității cu date axate pe interacțiunea dintre genele care predispun la obezitate și factorii de mediu, comportamentul individual și mediul înconjurător modulând epigenetic contribuția la obezitate. Cu toate acestea, până în momentul de față, modul în care preferințele alimentare și activitatea fizică afectează expresia genelor prin mecanisme epigenetice nu este pe deplin cunoscut pentru a putea fi utilizat în scopul prevenției și tratamentului personalizat.

Obiceiurile alimentare s-au schimbat în ultimele decenii, mai ales odată cu modelul alimentar occidental, unde raportul dintre consumul de acizi grași omega 3 polinesaturați (n-3 PUFA) și acizii grași omega 6 (n-6 PUFA) s-a schimbat în defavoarea consumului de n-3 PUFA. Rolul benefic al aportului de n-3 PUFA este pe deplin documentat în literatura de specialitate, în special în prevenția obezității și complicațiilor asociate. Studiul variațiilor polimorfe pentru

genele implicate în metabolismul acizilor grași poate constitui o valoroasă țintă de cercetare în prevenția obezității infantile.

Nivelurile de acizi grași polinesaturați cu lanț lung (LC-PUFA) sunt influențate atât de factori nutriționali, cât și de factori genetici. Aceștia pot fi obținuți direct din dietă sub formă de acid arahidonic (ARA), acid eicosapentaenoic (EPA) și acid docosahexaenoic (DHA) sau sub formă de n-6, n-3 PUFA (acid linoleic (LA), alfa-linolenic (ALA) și apoi sintetizați endogen cu intervenția genelor care specifică desaturaze (*FADS*) și a genelor elongării (*ELOVL*). Variațiile polimorfice ale acestora impactează nivelurile de PUFA, influențând astfel statusul ponderal. Astfel, aceste gene au roluri cheie în biosinteza și metabolismul LC-PUFA (*FADS1*, *FADS2* și *ELVOL2*, *ELVOL5*).

Pe calea n-6 PUFA, acidul arahidonic (ARA) este sintetizat din acidul linoleic (LA) pe parcursul a trei etape enzimatiche, două de desaturare ce implică genele *FADS2* și *FADS1* și una de elongare în care are rol gena *ELOVL5*.

Pentru calea n-3 PUFA, acidul alfa-linolenic (**ALA**) necesită șapte etape enzimatiche pentru a sintetiza DHA, trei etape de desaturare (*FADS2*, *FADS1*), două de elongare (*ELOVL5*, *ELVOL2*) și una de β -oxidare.

Gena *FADS2* (prin intermediul D6D) are rol în etapa inițială de desaturare ce transformă n-6 LA și n-3 ALA în acidul gama (γ)-linolenic (GLA), respectiv acidul stearidonic (SDA). De asemenea, intervine specific la finalul biosintezei n-3 PUFA, pentru sinteza DHA.

Anumite variații polimorfice ale genelor fosfatidiletanolamină N-metiltransferază (*PEMT*) și metilen tetrahidrofolat reductaza (*MTHFR*) implicate în sinteza fosfolipidelor pot influența de asemenea statutul PUFA. Fosfatidilcolina (PhC) este cel mai frecvent fosfolipid din membrana celulară, fiind sintetizată fie prin calea Citidină 5'-difosfocolină (CDP-colină), fie prin conversia fosfatidiletanolaminei de către fosfatidiletanolamin-N-metiltransferază, care influențează excesul anumitor PUFA în structura fosfolipidelor. Gena *PEMT* este foarte polimorfă, literatura de specialitate indicând faptul că unele polimorfisme ar putea avea o semnificație funcțională pentru unii indivizi, determinând creșterea susceptibilității pentru ficatul gras nonalcoolic (NAFLD) atunci când aportul alimentar de colină este scăzut. Gena *MTHFR* poate avea, de asemenea, impact asupra nivelului de omega-3 PUFA, probabil influențând sinteza S-adenozil metioninei (SAM), care la rândul său influențează compoziția fosfolipidică PUFA.

Compoziția în acizi grași a eritrocitelor reflectă compoziția în acizi grași a altor organe. Prin urmare, nivelurile de acizi grași din membranele eritrocitelor ar putea fi biomarkeri potențial relevanți pentru evaluarea statusului PUFA în corpul uman și ar putea îmbunătăți evaluarea homeostaziei PUFA. Acestea adaugă informații relevante despre rolurile pe care PUFA le-ar putea avea în tulburări metabolice asociate obezității și subliniază legături între aportul alimentar și diverse variații genetice.

II. OBIECTIVE TEZĂ

Teza este structurată în trei studii care urmăresc obiectivele științifice esențiale:

Studiul 1. Evaluarea asocierii dintre variantele genei *FADS2* și nivelurile plasmatice libere ale acizilor grași polinesaturați (PUFA) la copiii supraponderali și obezi, luând în considerare aportul alimentar.

Am ales să mă axez pe această temă științifică deoarece dezechilibrul dintre aportul de PUFA și modul în care aceștia sunt metabolizați poate genera dezechilibre metabolice precursorare obezității și patologiilor asociate, disfuncții care vizează funcția organelor vitale. PUFA sunt asimilați prin dietă și sintetizați endogen din moleculele lor precursorare (acidul linoleic pentru omega-6 și acidul alfa-linolenic pentru omega-3). Mai multe gene pot influența statutul PUFA în organism. Gena *FADS2* codifică una dintre enzimele care catalizează sinteza PUFA, iar variațiile genice ale acesteia modifică structura fosfolipidică a acizilor grași la nivel sanguin.

Studiul 2. Al doilea studiu s-a concentrat pe dezvoltarea și validarea unei metode LC-MS/MS pentru cuantificarea PUFA din plasmă, în formele libere și totale, folosind o procedură simplificată care nu necesită derivatizare chimică.

Metoda nouă constituie o alternativă îmbunătățită la metodele existente bazate pe cromatografie gazoasă, oferind un protocol mai rapid de cuantificare al acizilor grași. Metoda clasică de cuantificarea PUFA utilizează cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă (GS-MS), efectuată în urma derivatizării esterilor metilici și cromatografie în fază gazoasă și detecție cu ionizare în flacără (GS-FID). Cromatografia lichidă-spectrometria de masă (LC-MS) a apărut mai recent. Odată cu utilizarea ionizării prin electrospray (ESI), acizii grași tind să ionizeze în mod negativ, având specificitate scăzută. Prin urmare, derivatizarea chimică a avut rolul de a îmbunătăți detecția ESI-LC-MS, neajunsul metodei fiind reprezentat de necesitatea introducerii unor pași suplimentari în protocolul de lucru.

Studiul 3. Identificarea unor potențiali biomarkeri relevanți pentru evaluarea homeostaziei PUFA prin evaluarea nivelurilor de acizi grași din membranele eritrocitelor (RBC) în relație cu aportul alimentar și variațiile genetice din obezitatea infantilă.

Al treilea studiu a evaluat asocieria dintre polimorfismele nucleotidice ale genelor *PEMT* și *MTHFR* și nivelurile de acizi grași omega-3 și omega-6 de la nivelul eritrocitelor, la copiii cu obezitate.

De asemenea a fost evaluată compoziția în acizi grași a PhC derivate prin intermediul căii *PEMT*.

III. MATERIAL ȘI METODĂ

1. Lotul de studiu

Întregul studiu a implicat criterii de eligibilitate extrem de riguroase. Din cunoștințele noastre, ale întregii echipe implicate în desfășurarea acestui studiu, tematica de cercetare abordată reprezintă prima evaluare de acest tip din țara noastră, conferind date prețioase cu utilitate clinică și oferind noi perspective în nutrigenetică și nutrigenomică.

Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică al Universității de Medicină și Farmacie „Victor Babeș” (6/20.06.2016), din Timișoara, România. Toate prevederile menționate în Declarația de la Helsinki au fost respectate, punând pe primul plan sănătatea și interesul pacientului.

Numărul participanților copii în lotul de studiu a variat între 196 (pentru studiile 1 și 3) și 200 (pentru studiul 2) de copii, cu vârste cuprinse între 7 și 18 ani. Cohorta a fost mixtă, incluzând atât fete cât și băieți, pentru a putea obține date și a avea concluzii valide pentru ambele sexe. Fiecare recrutare a presupus o anamneză amănunțită, evaluare clinică generală a obezității ce a inclus măsurători antropometrice, evaluare paraclinică și consulturi interdisciplinare la nevoie.

Criteriile de includere au fost: copii cu obezitate ($IMC > +2$ SD referința WHO), cu vârste cuprinse între 7-18 ani. Criteriile de excludere au fost reprezentate de prezența unor patologii incompatibile cu desfășurarea studiului, și anume: neoplazii, boli autoimune, boli psihiatrice, coagulopatii, obezitate de cauză endocrină, hipotalamică sau sindromică.

2. Evaluarea clinică

S-au efectuat măsurători antropometrice, conform ghidurilor internaționale în vigoare. Greutatea și înălțimea au fost măsurate cu ajutorul unui cântar electronic cu un taliometru. Măsurătorile pentru înălțime și greutate au fost înregistrate la cel mai apropiat 0,5 cm și respectiv 0,5 kg. IMC a fost calculat după formula menționată anterior.

Circumferința taliei a fost măsurată cu o benzi antropometrice flexibile, la cel mai apropiat 0,1 cm, în ortostatism, la punctul mediu dintre capătul cutiei toracice și vârful creastei iliace. Circumferința șoldului a fost măsurată în jurul celei mai largi porțiuni a șoldului.

3. Ancheta alimentară

Aportul alimentar a fost determinat utilizând metoda “24-hour dietary recall”, existând 4 sesiuni de evaluare pentru fiecare participant, la intervale a câte 8 zile. Pentru participanții cu vârsta mai mică de 13 ani, anchetele dietetice au fost efectuate în prezența părintelui. Setul de anchete a presupus chestionarea informațiilor alimentare în patru zile non-consecutive, dintre care o zi de weekend, prima anchetă alimentară desfășurându-se în momentul recrutării participantului copil. Prin colectarea datelor s-au obținut informații despre tipurile de alimente consumate, cantități, intervalul orar pentru consumul respectiv și aportul hidric de pe parcursul acelei zile.

4. Evaluare paraclinică

S-au recoltat probe biologice (sânge venos periferic) prin puncție venoasă. Probele de sânge au fost prelevate dimineața, după minim 8-10 ore de post, în vacutainere sterile.

4.1. Analiza hematologică și biochimică

Hemoleucograma completă a fost evaluată folosind citometrie flux și citochimie de către un laborator medical acreditat ISO 15189, acționând ca partener extern.

S-a efectuat analiza biochimică pentru determinarea colesterolului total, a lipoproteinelor cu densitate ridicată (HDL), a trigliceridelor (TGL), a concentrațiilor plasmatice totale de aspartat aminotransferază (AST), alanin-aminotransferază (ALT) și proteină C reactivă (CRP) utilizând

echipamentul Vitros Orto-clinic 350 (Ortho Clinical Diagnostics Inc, Raritan, NJ, SUA), conform protocoalelor producătorului. Homocisteina (HC) a fost măsurată prin metoda ELISA utilizând un spectrofotometru Epoch Microplate (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SUA).

Evaluarea modelului homeostatic pentru rezistența la insulină (HOMA-IR) a fost calculat utilizând formula: $\text{Homa-IR} = \text{insulină à jeun } (\mu\text{U/l}) \times \text{glicemie à jeun } (\text{mmol/l}) / 22,5$

4.2. Cuantificarea acizilor grași

Pentru analiza acizilor grași din plasmă, a fost dezvoltată și validată o metodă nouă, care a utilizat mai puțini pași în procesul de pregătire a probelor. Metoda a oferit o cuantificare rapidă, precisă, sensibilă și simultană a acizilor grași omega 3 (acidul linolenic, eicosapentaenoic și docosahexaenoic) și acizilor grași omega 6 (acizi arahidonic și linoleic) folosind metoda analitică de cromatografie lichidă - spectrometrie de masă în tandem (LC-MS/MS).

4.3. Analiza polimorfismelor ADN

Tehnica de analiză a polimorfismelor ADN a presupus secvențierea de nouă generație utilizând un panel ce permite evaluarea a 55 de polimorfisme unice (SNP) în 14 gene implicate în patogenia dislipidemiei, ficatului gras non-alcoolic și bolilor cardiovasculare. A fost utilizată platforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA, SUA) conform protocolului producătorului. Cele 55 de polimorfisme genetice (cu frecvența mare conform cu "1000 Genomes Project"), relevante metabolic pentru dezechilibrele din cadrul obezității sunt: *ABCB4* (rs1149222, rs2071645, rs31672, rs4148811, rs9655950, rs1202283), *APOC3* (rs2854117), *CHDH* (rs12676, rs2289209, rs4563403, rs4687591, rs6807783, rs7634578, rs881883), *CHKB* (rs1557502, rs1557503, rs470117, rs7238), *FADS2* (rs2526678, rs526126), *MTHFD1* (rs10135928), *MTHFR* (rs1801133, rs2066471, rs4846048, rs4846052, rs7525338, rs868014), *SCD* (rs11557927, rs11599710, rs12247426, rs2167444, rs7849), *SLC44A1* (rs10120572, rs10820799, rs193008, rs328006, rs440290, rs443094, rs7018875), *STAT3* (rs9891119), *PCYT1A* (rs1580820), *PCYT1B* (rs4898190), *PEN1* (rs1109859, rs12103822, rs16961845, rs4244593, rs4479310, rs7214988, rs7946, rs8068641, rs936108, rs13342397, rs6502603), *PNPLA3* (rs2281135, rs738409).

IV. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Studiul 1

Am identificat diferențe semnificative ale distribuției nivelului pentru DHA între genotipurile rs526126 *FADS2*. Genotipul GC a prezentat niveluri mai mari ale acizilor grași comparativ cu genotipul CC. Am identificat diferențe statistic semnificative ($p < 0.05$) între nivelul plasmatic pentru DHA ale genotipurilor GC și CC, în special la aporturi de EPA și DHA sub valoarea medie (3.45 mg pentru EPA și 10.56 mg pentru DHA).

Studiul 1 a indentificat o puternică asociere între prezența rs-ului 526126 *FADS2* și nivelurile plasmatice pentru DHA. Acest lucru poate fi explicat prin faptul că DHA este produsul final al cascadei de desaturare și, prin urmare, este mai probabil să fie influențat de activitatea

FADS2. Mai mult decât atât, nivelurile plasmatice de DHA liber au fost mai mari decât ALA și EPA, ceea ce duce la concluzia că o cantitate semnificativă de DHA este sintetizată endogen, pe lângă aporturile exogene. Diferențele au fost și mai evidente atunci când aporturile alimentare de EPA și DHA au fost scăzute, conducând la ipoteza că activitatea *FADS2* este dependentă de acestea și că prezența alelei minore (G) rs526126 poate duce la creșterea activității de desaturare.

Studiul 2

Această metodă a avut ca scop principal dezvoltarea unei metode de cuantificare a acizilor grași fără necesitatea derivatizării. Aceasta ar fi necesitat pași suplimentari în protocolul de pregătire. Metodele publicate anterior care au folosit derivați de ester dimetilaminoetil (DMAE) au furnizat limite de detecție în intervalul femtomolar scăzut, necesitând pași suplimentari de incubare și extracție, adăugând o mai mare amploare protocolului. Deși derivatizarea oferă o sensibilitate de neegalat, metoda noastră a demonstrat că PUFA din plasma umană pot fi cuantificați în mod fiabil fără derivatizare. În comparație cu metodele GS-MS și GS-FID, care necesită o rulare analitică de aproximativ 20 de minute, metoda noastră este semnificativ mai scurtă, cu o durată de numai 6,5 minute, având ca rezultat eficientizarea timpului de lucru și creșterea productivității.

Studiul 3

Între grupurile determinate pe baza genotipului *PEMT* am identificat diferențe semnificative între sexe pentru hemoglobină, zIMC și nivelurile de ALA și LA din hematii, toate valorile fiind mai mari la participanții de sex masculin. Genotipurile GG și GA, comparativ cu genotipul AA pentru *PEMT* rs1109859, au fost asociate pozitiv cu nivelurile de DHA și EPA eritrocitar. Acest lucru este în acord cu constatările anterioare, sugerând că fosfatidilcolina (PhC) sintetizată prin calea *PEMT* conține în principal PUFA (în principal ARA și DHA) în timp ce calea CDP-colinei formează fosfatidilcolină care conține acizi grași saturați cu lanț mediu. Rezultatele noastre întăresc și mai mult ipoteza conform căreia compoziția acizilor grași în fosfatidilcolină derivată din calea *PEMT* este diferită de cea obținută prin calea CDP-colină.

Nivelurile PUFA eritrocitare au fost, de asemenea, asociate pozitiv cu rs4846052 *MTHFR*. Deși mecanismul încă trebuie clarificat, rezultatele noastre sugerează că rs4846052 *MTHFR* influențează nivelurile de PUFA în membranele eritrocitare, genotipul TT fiind asociat cu niveluri mai mari de PUFA în eritrocite comparativ cu cel al genotipurilor TC și TT.

V. CONCLUZII

Studiul 1

Rezultatele acestui studiu au indicat faptul că polimorfismul genei *FADS2* are impact asupra nivelului plasmatic liber al acizilor grași n-3 PUFA, în mod specific la aporturi mai mici de EPA și DHA. Am constatat că prezența alelei minore rs526126 în gena *FADS2* a fost asociată cu niveluri plasmatice mai ridicate de DHA liber, diferențele fiind mai evidente atunci când aportul alimentar de n-3 PUFA a fost scăzut. Cu toate acestea, sunt necesare cercetări

suplimentare pentru a confirma amploarea acestei asocieri și dacă alela minoră rs526126 are sau nu un rol protector la subiecții cu aport scăzut de n-3 PUFA.

În lotul de studiu, nivelurile plasmatice pentru DHA liber au fost mai mari decât cele pentru ALA și EPA, rezultând faptul că o cantitate semnificativă de DHA este sintetizată la nivel endogen, suplimentar aportului exogen. Diferențele au fost și mai evidente atunci când aporturile alimentare de EPA și DHA au fost scăzute, conducând la ipoteza că activitatea *FADS2* este dependentă de acestea și că prezența alelei minore (G) rs526126 duce la creșterea activității de desaturare.

Studiul 1 a identificat o puternică asociere între rs526126 *FADS2* și nivelurile plasmatice pentru DHA. Acest lucru poate fi explicat prin faptul că DHA este produsul final al cascadei de desaturare și, prin urmare, este mai probabil să fie influențat de activitatea *FADS2*.

Multiplele beneficii ale aportului de n-3 PUFA sunt bine cunoscute, inclusiv efectul antiobezitate, numeroase studii de specialitate propunând îmbogățirea alimentelor în acizi grași omega 3, soluție utilă pe termen lung la aportul cronic scăzut de n-3 PUFA secundar dietei occidentale.

Studiul 2

Metoda dezvoltată și validată descrisă oferă o procedură de extracție simplificată fără necesitatea derivatizării și o cuantificare LC-MS/MS, rapidă și reproductibilă. Este potrivită pentru cuantificarea acizilor grași n-3 și n-6 din plasma umană, atât sub formă liberă, cât și totală. Datorită faptului că derivatizarea nu este necesară, prepararea probei necesită mai puțin timp. LC-MS/MS s-a dovedit semnificativ mai rapid decât metodele GS-MS publicate anterior. Combinând acești doi factori, fluxul de lucru propus necesită mai puțin timp decât GS-MS existent și metodele LC-MS. Metoda poate fi utilizată pentru a evalua modificările metabolismului acizilor grași, care au implicații în obezitate, diabet zaharat de tip 2, rezistența la insulină și interrelația cu alte căi metabolice.

Studiul 3

Variațiile genetice ale *PEMT* (rs1109859) și *MTHFR* (rs4846052) au fost asociate cu modificări în conținutul de PUFA din membranele eritrocitare. Această constatare sugerează că statutul genetic al *PEMT* și *MTHFR* poate contribui la homeostazia PUFA și, prin urmare, ar putea contribui la statusul PUFA la copiii cu obezitate.

ARA, EPA, DHA și nivelurile de LA din eritrocite au fost semnificativ diferite între grupurile de participanți copii cu rs1109859 *PEMT* și grupurile cu rs4846052 *MTHFR*. Deși mecanismul trebuie clarificat în continuare, rezultatele noastre sugerează că rs4846052 *MTHFR* influențează nivelurile de PUFA din membranele eritrocitare, genotipul TT fiind asociat cu niveluri mai mari de PUFA comparativ cu genotipurile TC și TT. Genotipurile GG și GA, în comparație cu genotipul AA pentru rs1109859 *PEMT* au fost asociate cu niveluri mai mari de DHA și EPA la nivel eritocitar, sugerând faptul că PhC sintetizată pe calea *PEMT* este înalt calitativă comparativ cu PhC obținută pe calea CDP-colinei.

Astfel, nivelurile de PUFA eritrocitare s-au asociat semnificativ cu aceste două SNP-uri sugerând faptul că la copiii cu obezitate, variabilitatea genetică ar putea avea rol predictiv pentru compoziția de PUFA de la nivel eritrocitar.

Prezenta teză însumează rezultate cu valoare științifică deosebită pe tema analizei variațiilor genetice implicate în metabolismul acizilor grași polinesaturați (PUFA) la copilul cu obezitate. Acestea contribuie la întregirea cunoștințelor actuale în domeniul cercetat, oferind totodată noi orizonturi de evaluare în special cu rol predictiv, cu scopul de a preîntâmpina instalarea comorbidităților asociate obezității (rezistența la insulină, diabetul zaharat de tip II, ficatul gras non-alcoolic și bolile cardio-vasculare).

Pe baza datelor preliminare deja existente, ipoteza științifică analizată ce implică metabolismul nutrienților implicați în biologia donatorilor de metil reprezintă o prețioasă cale de abordare terapeutică în dislipidemie și rezistența la insulină. Variațiile genetice aparținând acestor căi metabolice pot crea deficiențe funcționale nutriționale și metabolice care afectează transportul și metabolismul lipidelor, iar interesul pentru abordarea metodelor de predicție și modelare prin intermediul unor semnături genetice asociate obezității, constituie un reper de o utilitate științifică valoroasă.

Cuvinte cheie: obezitate pediatrică, rezistență la insulină, PUFA, *FADS2*, *PEMT*, *MTHFR*, LC-MS;