

---

TEZĂ DE DOCTORAT- REZUMAT

**Analiza multivariată a legăturii  
dintre suprapondere sau obezitate  
și activarea mecanismelor  
inflamatorii**

---

Doctorand **Ioana Țaranu**

---

Conducător de doctorat Prof. dr. **Sorana D. Bolboacă**

---



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

# CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

<b>INTRODUCERE</b>	13
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	15
<b>1. Definiția, prevalența și clasificarea supraponderii și obezității infantile</b>	17
1.1. Definiția supraponderii și obezității infantile	17
1.2. Prevalența supraponderii și obezității infantile	18
1.3. Indicatori clinici ai distribuției adipozității în exces	19
<b>2. Analiza factorilor de mediu, socio-economici și genetici care influențează supraponderea și obezitatea la copii</b>	21
<b>3. Fiziopatologia mecanismelor inflamatorii în supraponderea sau obezitatea la copii</b>	23
3.1. Inflamația subclinică de grad scăzut în obezitate	23
3.2. Dislipidemia și insulino-rezistența la copiii cu suprapondere sau obezitate	24
<b>4. Analiza multivariată a legăturii dintre supraponderea sau obezitatea la copil și biomarkerii inflamatori</b>	25
4.1. Biomarkeri clasici ai inflamației în suprapondere și obezitate	25
4.2. Indici derivați ai celulelor sangvine ca indicatori inflamatori la copiii cu suprapondere sau obezitate	25
4.3. Relația dintre suprapondere sau obezitate și indicatorii inflamației la copii	26
4.3. Chitotriozidaza-1 - un nou indicator al inflamației la copiii cu suprapondere sau obezitate	27
<b>5. Complicațiile supraponderii și obezității la copil</b>	29
5.1. Metode de screening al complicațiilor supraponderii sau obezității	29
5.2. Asocierea factorilor de risc cardio-metabolic și sindromul metabolic	31
5.3. Disfuncția tiroidiană la copiii cu suprapondere sau obezitate	33
5.4. Complicații non-metabolice ale supraponderii sau obezității la copil	34
5.5. Strategii de prevenție și tratament în supraponderea sau obezitatea infantilă și complicațiile acestora	34

<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	37
<b>6. Ipoteza de lucru/obiective</b>	39
<b>7. Metodologie generală</b>	39
<b>8. Studiul 1 - Analiza longitudinală a profilului metabolic și hormonal în relație cu variația excesului ponderal la copii. Studiu-pilot monocentric</b>	41
8.1. Introducere	41
8.2. Material și metodă	41
8.3. Rezultate	42
8.4. Discuții	46
8.5. Concluzii	48
<b>9. Studiul 2 - Influența statusului ponderal asupra inflamației de grad scăzut și a funcției tiroidiene la copiii cu supraponderare sau obezitate</b>	49
9.1. Introducere	49
9.2. Material și metodă	50
9.3. Rezultate	51
9.4. Discuții	63
9.5. Concluzii	67
<b>10. Studiul 3 - Creșterea activității plasmatice a chitotriozidazei - 1 este asociată cu obezitatea la copil: rolul a două variante comune ale genei CHIT1</b>	69
10.1. Introducere	69
10.2. Material și metodă	70
10.3. Rezultate	74
10.4. Discuții	93
10.5. Concluzii	100
<b>11. Studiul 4 - Analiza longitudinală a activității plasmatice a chitotriozidazei-1 la copiii cu supraponderare sau obezitate</b>	101
11.1. Introducere	101
11.2. Material și metodă	101
11.3. Rezultate	102
11.4. Discuții	107
11.5. Concluzii	109
<b>12. Concluzii generale</b>	111
<b>13. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	113
<b>REFERINȚE</b>	115

**Cuvinte cheie:** obezitate infantilă, adipozitate abdominală, chitotriozidaza-1, indexul imuno-inflamator sistemic, raportul neutrofile-limfocite, raportul trombocite-limfocite, rezistență la insulină, dislipidemie, analiza multivariată, *dup24*, *G102S*, evaluare longitudinală.

## INTRODUCERE

Prevalența obezității în populația pediatrică a crescut la nivel global de la 2,9% la 6,8% în ultimele două decenii, contribuind la progresia mai rapidă spre un stadiu sever de obezitate la această categorie de vârstă. La nivel național, 28,3% dintre copii prezintă suprapondere, potrivit criteriilor Organizației Mondiale a Sănătății. Supraponderea și obezitatea infantilă se asociază, încă din perioada copilăriei, cu factorii de risc cardio-metabolic, precum dislipidemia, rezistența la insulină, hipertensiunea arterială și tulburările metabolismului glucidic, care contribuie la creșterea morbidității de cauză cardio-vasculară în perioada de adult tânăr.

Studiul indicatorilor inflamației la copiii cu suprapondere sau obezitate prezintă o importantă relevanță clinică deoarece mecanismele inflamatorii mediază relația dintre excesul ponderal, în special cel cu distribuție viscerală, și complicațiile obezității. Acumularea de lipide și eliberarea citokinelor de către macrofagele pro-inflamatorii la nivelul țesutului adipos contribuie la diminuarea sensibilității celulare la acțiunea insulinei, sindrom metabolic și diabet zaharat tip 2. Identificarea unor indicatori ai inflamației de grad scăzut, în stadiile incipiente ale obezității poate contribui la evaluarea și prevenția complicațiilor obezității în populația pediatrică. Dintre indicatorii inflamației cel mai frecvent utilizați în practica clinică sunt proteina C-reativă și numărul absolut al leucocitelor și al subpopulațiilor acestora, neutrofile și limfocite. Recrutarea neutrofilelor, infiltrarea cu macrofage și activarea limfocitelor sunt procese timpurii ale inflamației țesutului adipos. De asemenea, un nivel ridicat de adipozitate este asociat cu secreția leptinei, cu rol mielo-proliferativ. Prin urmare, studiul acestor celule are importanță clinică în exprimarea gradului de inflamație asociat excesului ponderal.

Expresia chitotriozidazei-1, principalul reprezentant al familiei chitinazelor la om, reflectă activitatea pro-inflamatorie a macrofagelor. Pacienții pediatrici cu intoleranță la glucoză sau adulți cu ateroscleroză, diabet zaharat tip 2 și steatoză hepatică non-alcoolică prezintă o activitate circulantă crescută a chitotriozidazei-1. Nivelul activității enzimatice prin metoda clasică, cu utilizarea 4-metilumbeliferil-chitotriozidei ca substrat, este influențat de genotipul unor variante ale genei *CHIT1*, dintre care cele mai frecvente sunt duplicația a 24 perechi de baze în exonul 10 și înlocuirea guaninei cu adenina la nivelul exonului 4 al genei *CHIT1*.

Modificările sugestive pentru hipotiroidismul subclinic, și anume creșterea izolată a concentrației hormonului tireo-stimulant (TSH), sunt mai frecvente la pacienții pediatrici cu obezitate în comparație cu cei cu greutate normală. Printre procesele inflamatorii care pot influența această relație se numără: efectul citokinelor asupra celulelor tiroidiene, inducerea unor modificări tiroidiene de tip autoimun de către limfocitele T, respectiv inhibiția acțiunii hormonului tireo-stimulant de către leptină.

## CONTRIBUȚII PERSONALE

Cercetarea de față și-a propus identificarea unor indicatori ai statusului inflamator la copiii cu supraponderare sau obezitate și asocierea acestora cu modificările premergătoare sindromului metabolic, precum dislipidemia și rezistența la insulină.

### **Studiul 1. Analiza longitudinală a profilului metabolic și hormonal în relație cu variația excesului ponderal la copii. Studiu-pilot monocentric**

**Scop:** evaluarea relației dintre progresia adipozității și evoluția profilului hormonal, metabolic și inflamator la copilul cu supraponderare sau obezitate.

**Obiective:** i). evaluarea în dinamică a relației dintre scorul z IMC-vârstă și respectiv, circumferința abdominală și modificările de laborator recomandate de către ghidul național pentru screening-ul complicațiilor la copiii cu supraponderare sau obezitate; ii). evaluarea în dinamică a relației dintre scorul z IMC-vârstă și respectiv, circumferința abdominală și indicatorii inflamației de grad scăzut la copiii cu supraponderare sau obezitate.

**Pacienți și metode:** S-a realizat o analiză longitudinală retrospectivă a datelor pacienților pediatrici evaluați în perioada ianuarie 2017 - martie 2019 în Clinica Pediatrie 1, Spitalul Clinic de Urgență pentru Copii din Cluj-Napoca. S-au evaluat în dinamică parametrii clinici și biochimici recomandați de ghidul național de diagnostic și tratament în obezitate la copil din 2011 la pacienții cu vârsta între 2 -17 ani cu supraponderare sau obezitate. Am evaluat indicatorii clinici (scor z IMC-vârstă, circumferință abdominală, tensiune arterială sistolică și diastolică), indicatorii inflamatori (valoarea absolută leucocite și neutrofile, proteina C-reactivă), profilul metabolic (transaminaze (AST, ALT), acid uric, glicemia matinală, concentrație trigliceride, fracțiunea de lipoproteine cu densitate înaltă (HDL) a colesterolului), valoarea insulinemiei matinale și cortizolemia.

**Rezultate:** Douăzeci și doi de pacienți pediatrici (77,3 % fete) cu mediana vârstei egală cu 13 ani (IQR, 7,25 - 15) au fost urmăriți pentru o perioadă mediană de 7,5 luni (IQR, 6,25 - 9,75). La evaluarea inițială 18 pacienți erau cu obezitate (scor z IMC-vârstă  $\geq 2$ ), dintre care 10 cu obezitate severă, iar 4 pacienți au fost supraponderali (scor z IMC-vârstă  $\geq 1$ ). Creșterea nivelului de adipozitate generalizată (scor z IMC-vârstă) și abdominală (circumferința abdominală) nu a fost semnificativă la re-evaluare. Cu toate acestea, am observat o creștere semnificativă a insulinemiei bazale de la 14,9  $\mu\text{IU/ml}$  (10,6 -25,4) la 20,5  $\mu\text{IU/ml}$  (11,4 - 33,5), însoțită de o scădere semnificativă a glicemiei matinale. La intrarea în studiu, 9% dintre copii au prezentat hiperinsulinism, iar 30% au dezvoltat hiperinsulinism la re-evaluare, în condițiile unor valori euglicemice. Scorul z IMC-vârstă s-a corelat semnificativ cu nivelul proteinei C-reactive (coeficient Spearman,  $\rho=0,70$ ,  $p=0,03$ ) la intrarea în studiu, și respectiv cu nivelul HDL-colesterol la re-evaluare (coeficient Spearman,  $\rho=-0,52$ ,  $p=0,032$ ).

**Concluzii:** Studiul de față este prima analiză a evoluției parametrilor clinici și de laborator recomandați de ghidul național pentru screeningul complicațiilor la copiii

supraponderali din România. Principalele modificări au fost progresia riscului de rezistență la insulină (nivelul insulinemiei bazale), a dislipidemiei (nivelul HDL-colesterol), precum și a inflamației de grad scăzut (nivelul proteinei C-reactive). Acești factori, care se asociază creșterii riscului cardiometabolic, pot evolua independent de acumularea de țesut adipos cu distribuție generalizată sau abdominală la copiii cu suprapondere sau obezitate fără sindrom metabolic.

## **Studiul 2. Influența statusului ponderal asupra inflamației de grad scăzut și a funcției tiroidiene la copiii cu suprapondere sau obezitate**

**Obiective:** i). evaluarea relației dintre gradul de exces ponderal și indicii derivați din subpopulațiile celulare leucocitare și trombocite (raport neutrofile-limfocite, index imuno-inflamator sistemic, raport trombocite-limfocite); ii). evaluarea relației dintre gradul de exces ponderal și indicatorii funcției tiroidiene.

**Pacienți și metode:** S-a realizat un studiu transversal cu culegere de date retrospectivă din perioada ianuarie 2017 - ianuarie 2019. Au fost incluși pacienți cu diagnosticul de suprapondere sau obezitate (Clasificare Internațională a Bolilor, E66.0 sau E66.9), cu vârsta cuprinsă între 2-18 ani evaluați în Serviciul Ambulatoriu de Endocrinologie al Spitalului Clinic de Boli Infecțioase și Clinica Pediatrie 1 a Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca. Gradul de exces ponderal a fost definit conform Organizației Mondiale a Sănătății (scorul z IMC-vârstă) ( $\geq 1$  pentru suprapondere,  $\geq 2$  pentru obezitate,  $\geq 3$  pentru obezitate severă). Indicatorii inflamatori evaluați au fost: numărul absolut al leucocitelor (LEU), neutrofilelor (NEU), limfocitelor (LIM), trombocitelor (TR), proteina C-reactivă. Pe baza acestora, s-au calculat: raportul neutrofile-limfocite (RNL-raportul dintre numărul absolut al neutrofilelor și al limfocitelor), raportul trombocite-limfocite (RTL-raportul dintre numărul absolut al trombocitelor și cel al limfocitelor), indexul imuno-inflamator sistemic (IIS-raportul dintre produsul neutrofilelor și limfocitelor și trombocite). Parametrii funcției tiroidiene au fost: hormonul tiro-stimulant (TSH) și fracțiunea liberă a tiroxinei (fT4).

**Rezultate:** Patruzeci și patru de pacienți cu suprapondere cu vârsta medie de  $12,78 \pm 2,5$  ani, 57 pacienți cu obezitate cu vârsta medie  $11,58 \pm 3,13$  ani, respectiv 41 pacienți cu obezitate severă și vârsta medie  $8,98 \pm 3,7$  au fost incluși în studiu. Pacienții cu obezitate severă au avut o vârstă semnificativ mai mică decât a celor din grupurile cu suprapondere și obezitate (test ANOVA,  $p < 0,001$ ). Nu a existat o diferență semnificativă a distribuției variabilei sex între grupuri (test Fisher,  $p = 0,468$ ).

Numărul absolut de leucocite a fost semnificativ mai crescut la pacienții cu obezitate severă decât la cei cu suprapondere și obezitate (test Mann Whitney,  $p = 0,03$ , respectiv  $p = 0,04$ ) și nu s-a asociat cu vârsta (coeficient Spearman,  $\rho = 0,13$ ,  $p = 0,07$ ) sau cu sexul (test Kruskal-Wallis,  $p = 0,81$ ). În ce privește subpopulațiile leucocitare, numărul absolut de neutrofile și limfocite a fost semnificativ mai crescut la adolescenții cu obezitate severă decât la cei cu suprapondere (test Mann Whitney,  $p = 0,005$ , respectiv test Levene,  $p = 0,02$ ). Nu au existat diferențe semnificative ale valorilor RNL, RTL, respectiv IIS între grupurile de suprapondere, obezitate, obezitate severă.

S-a observat o creștere cu tendință la semnificație a valorii TSH de la grupul cu suprapondere la cel cu obezitate și obezitate severă (test ANOVA,  $p=0,07$ ). Zece pacienți (8,19%) au prezentat o creștere izolată a TSH, iar patru (3,36%) au prezentat o valoare crescută a TSH și scăzută a FT4. Nu a existat o corelație semnificativă între indicatorii inflamatori și parametrii funcției tiroidiene.

**Concluzii:** Creșterea numărului absolut al leucocitelor și al subpopulațiilor leucocitare, neutrofile și limfocite, cu gradul adipozității la copil sugerează inițierea proceselor inflamatorii de grad scăzut. Studii recente susțin implicarea leptinei în proliferarea liniei mieloide, precum și rolul acestor celule în medierea inflamației la nivelul țesutului adipos. Aceste rezultate prezintă relevanță clinică, fiind ușor accesibile în practica medicală. O tendință la hipotiroidism subclinic la copiii cu exces ponderal sugerează modificări timpurii ale funcției tiroidiene la această categorie, posibil mediate de inflamația de nivel scăzut.

### **Studiul 3. Creșterea activității plasmatice a chitotriozidazei-1 este asociată cu obezitatea la copil: rolul a două variante comune ale genei CHIT1**

**Scop:** evaluarea activității plasmatice a chitotriozidazei-1 ca indicator al inflamației de grad scăzut la copiii cu suprapondere sau obezitate

**Obiective:** i). evaluarea asocierii activității plasmatice a chitotriozidazei-1 și a indicatorilor inflamatori folosiți în practica clinică cu nivelul adipozității la copil; ii). evaluarea relației dintre activitatea plasmatică a chitotriozidazei-1 și genotipurile dup24 și G102S ale genei CHIT1 la copiii cu grade diferite de exces ponderal; iii). evaluarea rolului scorului z IMC-vârstă, a variantelor dup24, G102S, respectiv a vârstei și sexului în predicția variabilității activității plasmatice a chitotriozidazei-1.

**Pacienți și metode:** S-a realizat un studiu transversal cu culegere de date consecutivă care a inclus pacienți pediatrici evaluați în perioada septembrie 2019 - iulie 2020 în Serviciul Ambulatoriu de Endocrinologie al Spitalului Clinic de Boli Infecțioase, Clinica Pediatrie 1 și Compartimentul de Genetică Medicală ale Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca. Au fost incluși pacienți cu vârsta cuprinsă între 5-18 ani care au prezentat suprapondere sau obezitate conform criteriilor OSM pentru populația pediatrică. Grupul control a inclus pacienți sănătoși cu greutate normală ( $<1$  scor z IMC-vârstă). S-a evaluat nivelul de adipozitate prin scorul z IMC-vârstă potrivit OSM, circumferința abdominală, raportul circumferință abdominală/șolduri, precum și prin procentul de țesut adipos și non-adipos măsurate prin bio-impedanță electrică. Activitatea plasmatică a chitotriozidazei-1 (CHIT1) s-a măsurat prin metoda fluorometrică folosind 4-metillumbeliferil-chitotriozida ca substrat al reacției și fiind exprimată în nanomoli de substrat hidrolizat per mililitru per oră. De asemenea, s-au evaluat următorii indicatori inflamatori: fibrinogenul (FBG), proteina C-reactivă (PCR), feritina (FER), numărul total de leucocite (LEU) și viteza de sedimentare a hematiilor (VSH). Analiza genetică a genei CHIT1 a inclus reacția de polimerizare în lanț (RPL), separarea fragmentelor amplificate în gel de agaroză și confirmarea prin secvențiere Sanger a duplicației a 24 perechi de baze din exonul 10 (dup24), respectiv analiza de discriminare alelică RPL în timp real pentru polimorfismul G102S.

**Rezultate:** Treizeci și doi pacienți de sex masculin cu o vârstă medie de  $11,93 \pm 3,18$  ani și, respectiv 32 pacienți de sex feminin cu o vârstă medie de  $12,44 \pm 3,59$  ani au format subgrupurile de exces ponderal: 10 pacienți cu suprapondere, 33 pacienți cu obezitate și 21 pacienți cu obezitate severă. Pacienții din grupul control (3 fete și 4 băieți) au avut o vârstă mediană de 13,15 ani (IQR, 10,54-16,86). Gradul de exces ponderal nu a fost influențat de sex (test Fisher,  $p=0,06$ ), dar rata obezității severe a fost semnificativ mai mare la pacienții cu vârsta mai mică comparativ cu cea a obezității (test Mann Whitney,  $p<0,01$ ).

Activitatea plasmatică a chitotriozidazei-1 a fost semnificativ mai crescută la pacienții cu obezitate și obezitate severă comparativ cu pacienții cu greutate normală (test Mann Whitney,  $p=0,02$ ). În ceea ce privește asocierea dintre indicatorii inflamatori și nivelul de adipozitate, activitatea plasmatică a CHIT1 s-a corelat pozitiv cu scorul z IMC-vârstă (coeficient Spearman,  $\rho=0,376$ ,  $p=0,002$ ,) și raportul circumferință abdominală/șolduri (coeficient Spearman,  $\rho=0,273$ ,  $p=0,037$ ), respectiv nivelul fibrinogenului seric s-a asociat pozitiv cu circumferința abdominală/șolduri (coeficient Spearman,  $\rho=0,61$ ,  $p=0,03$ ).

Distribuția alelică a *dup24* și, respectiv *G102S*, nu a fost diferită între subgrupurile studiate (test exact al lui Fisher pentru echilibrul Hardy-Weinberg,  $p=0,35$ , respectiv  $p=0,06$ ). Pacienții heterozigoți pentru *dup24* au prezentat o activitate plasmatică a CHIT1 semnificativ mai scăzută decât pacienții homozigoți sănătoși (test Mann Whitney,  $p=0,02$ ). Nu a existat o asociere între genotipul variantei *G102S* și activitate plasmatică a CHIT1 (test Kruskal-Wallis,  $p=0,24$ ).

Scorul z IMC-vârstă și genotipul *dup24* și *G102* sunt predictorii semnificativi ai variabilității plasmatice a chitotriozidazei-1 în modelul de regresie multivariată care a evaluat și influența sexului, vârstei și duratei de la debutul excesului ponderal.

**Concluzii:** Activitatea plasmatică a chitotriozidazei-1 crește cu gradul de adipozitate cu distribuție generalizată (scor z IMC-vârstă) și abdominală (raport circumferință abdominală/ șolduri) la copil. Accentuarea excesului ponderal, exprimat prin scorul z IMC-vârstă, prezice o creștere a nivelului circulant al chitotriozidazei-1 la copil. Aceste rezultate sugerează că inflamația de grad scăzut este prezentă la copiii cu exces ponderal înainte de instalarea sindromului metabolic. Considerând importanța adipozității abdominale în creșterea riscului cardiometabolic, asocierea nivelului plasmatic al chitotriozidazei-1 cu raportul circumferință abdominală/șolduri, susține rolul procesului inflamator de la nivelul țesutului adipos visceral în medierea complicațiilor metabolice ale supraponderiei sau obezității la copil.

Analiza a două variante comune ale genei CHIT1, *dup24* și *G102S*, sugerează că prezența alelei *dup24*, respectiv a alelelor T mutante a *G102S*, determină o scădere a activității enzimatică a CHIT1 atunci când se utilizează 4-metilumbeliferil-chitotriozida ca substrat al reacției. Cu toate acestea, gradul de adipozitate reprezintă principalul predictor asupra activității enzimatică a CHIT1. Prin urmare, activitatea plasmatică a chitotriozidazei-1 poate fi un indicator sensibil al activității macrofagelor cu rol pro-inflamator de la nivelul țesutului adipos.



#### **Studiul 4. Analiza longitudinală a activității plasmatice a chitotriozidazei-1 la copiii cu suprapondere sau obezitate**

**Scop:** evaluarea în dinamică a relației dintre gradul inflamației și modificările metabolice și hormonale la copiii cu suprapondere sau obezitate.

**Obiective:** i). evaluarea evoluției în timp a nivelului plasmatic al chitotriozidazei-1 în relație cu modificarea indexului HOMA-IR și a raportului trigliceride/HDLc (c-cholesterol), ca indicatori ai rezistenței la insulină și dislipidemie, la copiii cu suprapondere sau obezitate; ii). testarea acestei asocieri în relație cu progresia indicatorilor adipozității și a stadiului pubertar.

**Pacienți și metode:** Am realizat o analiză longitudinală prospectivă asupra unui subgrup de pacienți din studiul 3 cu suprapondere sau obezitate și care au fost re-evaluați în perioada octombrie 2019 - iulie 2020 în Serviciul Ambulatoriu de Endocrinologie al Spitalului Clinic de Boli Infecțioase, Cluj-Napoca. Fiecare pacient a primit de la medicul curant endocrinolog recomandări referitoare la alimentație și activitate fizică. Indicatorii clinici ai adipozității evaluați au fost: scorul z IMC-vârstă, circumferința abdominală, raportul circumferință abdominală/șolduri și raportul circumferință abdominală/talie. Dezvoltarea pubertară s-a obiectivat prin stadializarea Tanner (I-V). S-au măsurat în dinamică activitatea plasmatică a chitotriozidazei-1, precum și indicatorii riscului de insulino-rezistență: indicele HOMA-IR și raportul TG/HDLc.

**Rezultate:** Douăzeci și nouă de pacienți pediatrici (16 fete), prezentând exces ponderal, cu mediana vârstei de 11,42 ani (IQR, 8,83-13,33) la intrarea în studiu, au fost incluși în analiză. Valoarea mediană a perioadei de urmărire a fost de 7 luni (IQR, 5-8,5). Stadiul pubertar nu a progresat semnificativ între cele două evaluări (48,3% pacienți în stadiul pre-pubertar, respectiv 51,72% în stadiul pubertar la evaluarea inițială) (test McNemar,  $p=0,26$ ).

La includerea în studiu, circumferința abdominală s-a asociat cu indicatorii HOMA-IR și raportul TG/HDLc (coeficient Spearman,  $\rho=0,49$ ,  $p=0,01$ , respectiv  $\rho=0,41$ ,  $p=0,03$ ).

Reducerea gradului de adipozitate generalizată (scorul z IMC-vârstă), respectiv abdominală (circumferința abdominală, raportul circumferință abdominală/șolduri și raportul circumferință abdominală/talie) nu a fost semnificativă între cele două evaluări (test Wilcoxon,  $p>0,05$ ). Activitatea plasmatică a chitotriozidazei-1 a scăzut semnificativ, de la o valoare mediană de 100 (IQR, 70-130) nmol/mL/h la 80 (IQR, 40-105) nmol/mL/h la a doua evaluare (test Wilcoxon,  $p=0,02$ ). În paralel, raportul TG/HDLc s-a redus semnificativ la re-evaluare, de la o valoare mediană de 2,16 (IQR, 1,44-3,62), la 0,54 (IQR, 0,45-0,81) (test Wilcoxon,  $p<0,001$ ).

**Concluzii:** Diminuarea nivelului inflamației de grad scăzut la copiii cu exces ponderal fără sindrom metabolic, exprimat prin activitatea plasmatică a chitotriozidazei-1, are loc concomitent cu scăderea riscului de rezistență la insulină și a dislipidemie, exprimate prin raportul trigliceride/HDL-cholesterol. Activitatea plasmatică a chitotriozidazei-1 reprezintă un potențial indicator al riscului metabolic mai sensibil decât indicatorii clinici ai excesului ponderal cu distribuție generalizată sau abdominală.

## Concluzii generale

1. Analiza longitudinală relevă modificări semnificative ale insulinemiei și glicemiei matinale la copiii cu suprapondere și obezitate care nu prezintă complicații; 30% dintre aceștia au prezentat valori crescute ale insulinemiei.
2. Creșterea insulinemiei s-a asociat în special cu gradul de adipozitate abdominală, exprimată prin circumferința abdominală.
3. Raportul neutrofile/limfocite, raportul trombocite/limfocite și, respectiv, indicii imuno-inflamator sistemic nu s-au asociat cu modificări ale excesului ponderal la copiii cu suprapondere sau obezitate.
4. Numărul absolut al limfocitelor a crescut semnificativ de la categoria de suprapondere la obezitate și obezitate severă.
5. Scăderea fracțiunii HDL-colesterolului și creșterea trigliceridelor plasmatice reprezintă primele modificări din cadrul dislipidemiei la copiii cu suprapondere sau obezitate.
6. Există o tendință a creșterii concentrației plasmatice a hormonului tireo-stimulant (TSH) odată cu gradul de exces ponderal (obezitate severă vs. suprapondere) la copii, ceea ce sugerează debutul hiper-tireotropinemiei izolate non-autoimune.
7. Scorul z IMC-vârstă reprezintă un predictor pentru creșterea activității plasmatice a chitotriozidazei-1 independent de genotipul *dup24* și *G102S* de la nivelul genei *CHIT1*, de sex și vârstă, și, respectiv, de durata de timp de la debutul excesului ponderal.
8. Activitatea plasmatică a chitotriozidazei-1 și nivelul plasmatic al fibrinogenului se asociază cu raportul circumferință abdominală/circumferință șolduri, în timp ce proteina C-reactivă, feritina, numărul absolut al leucocitelor și viteza de sedimentare a hematiilor nu s-au modificat cu gradul de obezitate.
9. Procentul țesutului adipos, respectiv al țesutului non-adipos evaluate prin bioimpedanță electrică nu s-au asociat cu gradul de adipozitate, respectiv cu markerii inflamatori la copii.
10. Statusul heterozigot pentru *dup24* al genei *CHIT1* s-a asociat cu o scădere semnificativă a activității plasmatice a chitotriozidazei-1, când se utilizează 4-metilumbeliferil-chitotriozida ca substrat al reacției.
11. 21,13% dintre pacienți au fost heterozigoți pentru *dup24* din gena *CHIT1* și 4,23% homozigoți, în timp ce 57,75% dintre copii au fost heterozigoți și 12,68% au fost homozigoți pentru alela T a polimorfismului *G102S* din gena *CHIT1*.
12. Raportul trigliceride/HDL-colesterol este un indicator al dislipidemiei și rezistenței la insulină și se asociază cu supraponderea și obezitatea la copil.
13. O scădere în dinamică a activității plasmatice a chitotriozidazei-1 se asociază cu o îmbunătățire a sensibilității la insulină, exprimată prin reducerea raportului trigliceride/HDL-colesterol, la copiii cu obezitate.

## Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Statusul inflamator în supraponderea sau obezitatea infantilă este asociat cu apariția scăderii sensibilității la insulină și dislipidemiei, modificări metabolice precoce

care preced sindromul metabolic. Cercetarea de față sugerează că activitatea plasmatică a chitotriozidazei-1 reprezintă un indicator al acestor modificări la copii.

Primul studiu din cadrul cercetării noastre reprezintă prima analiză longitudinală a indicatorilor clinici, metabolici și hormonal recomandați de protocolul național pentru diagnosticul, tratamentul și screening-ul complicațiilor obezității la copiii din România. Principalele modificări în dinamică identificate au fost creșterea insulinemiei și anomaliile metabolismului lipidic. Am evidențiat astfel nevoia utilizării unor indicatori ai inflamației mai sensibili decât proteina C-reactivă și numărul absolut al leucocitelor. De asemenea, evaluarea indicilor bazați pe numărul absolut al leucocitelor, limfocitelor și neutrofilelor, precum și a trombocitelor, reprezintă prima analiză a acestor potențiali indicatori ai inflamației la copiii cu exces ponderal. Importanța clinică a celui de-al doilea studiu rezidă și în accesibilitatea hemoleucogramei ca examinare de rutină.

În cadrul cercetărilor doctorale am raportat pentru prima dată asocierea dintre activitatea plasmatică a chitotriozidazei-1 și gradul de adipozitate la copii. Printr-un model de regresie multivariată, am confirmat capacitatea predictivă a nivelului de adipozitate asupra variabilității activității plasmatice a chitotriozidazei-1, în contextul ajustării genotipului a două variante comune ale genei CHIT1, a sexului, vârstei și a duratei de timp de la debutul excesului ponderal. Utilizarea indicatorilor clinici pentru diferențierea adipozității cu distribuție generalizată de cea abdominală reprezintă un alt element de originalitate. Astfel, am identificat o relație între activitatea plasmatică a chitotriozidazei-1 și nivelul de adipozitate abdominală. De asemenea, am realizat prima evaluare în dinamică a nivelului circulant al chitotriozidazei-1, identificând o asociere între statusul inflamator și progresia anomaliilor lipidice și a rezistenței la insulină la copiii cu supraponderare și obezitate.

Rezultatele acestei cercetări susțin importanța indicatorilor care să reflecte inflamația mediată de macrofagele de la nivelul țesutului adipos. Studii ulterioare sunt necesare pentru validarea activității plasmatice a chitotriozidazei-1 în relație cu activitatea locală a moleculelor pro-inflamatorii eliberate de către macrofagele din țesutul adipos.

---

Ph.D. THESIS - SUMMARY

Multivariate Analysis of the  
Relationship between  
Overweight or Obesity and the  
Activation of  
Inflammatory Mechanisms

---

Ph.D. Student **Ioana Țaranu**

---

Ph.D. Thesis Coordinator Prof. Dr. **Sorana D. Bolboacă**

---



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

# CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	13
<b>STATE OF THE ART</b>	15
<b>1. Definition, prevalence and classification of childhood overweight and obesity</b>	17
1.1. Childhood overweight and obesity definition	17
1.2. The prevalence of childhood overweight and obesity	18
1.3. Clinical indicators for the adiposity distribution	19
<b>2. Analysis of the environmental, socioeconomic and genetic contributors to overweight and obesity in children</b>	21
<b>3. Pathophysiology of the inflammatory mechanisms in childhood overweight or obesity</b>	23
3.1. Subclinical low-grade inflammation in obesity	23
3.2. Dyslipidemia and insulin resistance in children with overweight and obesity	24
<b>4. Multifactorial analysis of the relationship between overweight or obesity and the inflammatory markers in children</b>	25
4.1. Classical markers of inflammation in overweight and obesity	25
4.2. Blood cells-derived indices as inflammatory markers in overweight and obese children	25
4.3. Relationship between overweight or obesity and the inflammatory markers in children	26
4.3. Human chitotriosidase-1 - a novel inflammatory marker in children with overweight and obesity	27
<b>5. The complications of childhood overweight and obesity</b>	29
5.1. Screening tools for overweight and obesity complications in children	29
5.2. Clustering of cardiometabolic risk factors and metabolic syndrome in children	31
5.3. Thyroid dysfunction in children with overweight or obesity	33
5.4. Non-metabolic complications of childhood overweight and obesity	34
5.5. Prevention and treatment strategies of the pediatric overweight and obesity and related complications	34
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	37
<b>6. General research aim</b>	39
<b>7. General methodology</b>	39

<b>8. Study 1. A Romanian single-center pilot study: longitudinal analysis of the metabolic and hormonal outcomes according to weight variation in children</b>	41
8.1. Introduction	41
8.2. Materials and methods	41
8.3. Results	42
8.4. Discussion	46
8.5. Conclusion	48
<b>9. Study 2. The effect of the weight status over the inflammatory markers and thyroid function in pediatric patients with overweight and obesity</b>	49
9.1. Introduction	49
9.2. Patients and methods	50
9.3. Results	51
9.4. Discussion	63
9.5. Conclusion	67
<b>10. Study 3. Increased Circulating Chitotriosidase Activity Is Associated with Childhood Obesity: The Role of Two Common Variants of the CHIT1 Gene</b>	69
10.1. Introduction	69
10.2. Patients and Methods	70
10.3. Results	74
10.4. Discussion	93
10.5. Conclusion	100
<b>11. Study 4. Longitudinal analysis of the CHIT1 plasma activity in pre-pubertal and pubertal pediatric patients with obesity</b>	101
11.1. Introduction	101
11.2. Patients and Methods	101
11.3. Results	102
11.4. Discussion	107
11.5. Conclusion	109
<b>12. General Conclusions</b>	111
<b>13. Originality and innovative contribution to the field of our research</b>	113
<b>REFERENCES</b>	115

**Keywords:** childhood obesity, abdominal adiposity, chitotriosidase-1, systemic immune-inflammatory index, neutrophils-to-lymphocytes ratio, platelets-to-lymphocytes ratio, insulin resistance, dyslipidemia, multivariate analysis, *dup24*, *G102S*, longitudinal analysis.

## INTRODUCTION

The prevalence of obesity in the pediatric population has increased globally from 2.9% to 6.8% in the last two decades, contributing to the faster progression to a severe stage of obesity in this age group. In Romania, 28.3% of children are overweight according to World Health Organization criteria. Childhood overweight and obesity are associated with cardiometabolic risk factors, such as dyslipidemia, insulin resistance, arterial hypertension and disorders of carbohydrate metabolism, which contribute to an increased cardiovascular morbidity in young adults.

The study of inflammatory indicators in overweight or obese children has important clinical relevance because the inflammatory mechanisms mediate the relationship between excess weight, especially the visceral adiposity, and the obesity complications. The accumulation of lipids and the release of cytokines by pro-inflammatory macrophages in the adipose tissue contribute to a decrease of sensitivity to the action of insulin, metabolic syndrome and type 2 diabetes. The identification of indicators for low-grade inflammation in the early stages of obesity might contribute to the assessment and prevention of obesity complications in the pediatric population. Among the indicators of inflammation most commonly used in clinical practice are C-reactive protein and the absolute number of leukocytes and their subpopulations, namely neutrophils and lymphocytes. Neutrophil recruitment, macrophage infiltration and lymphocyte activation are early processes of adipose tissue inflammation. Likewise, a high level of adiposity is associated with leptin secretion, which has a myelo-proliferative action. Therefore, the study of these cell types has clinical importance in expressing the degree of inflammation associated with bodyweight excess.

The expression of chitotriosidase-1, the main representative of the chitinases family in humans, reflects the pro-inflammatory activity of macrophages. Pediatric patients with glucose intolerance or adults with atherosclerosis, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease have elevated circulating chitotriosidase-1 activity. When measured with the classic method, using 4-methylumbelliferyl chitotrioside as a substrate, the level of enzyme activity is influenced by the genotype of some variants of the *CHIT1* gene. The most common are the duplication of 24 base pairs in exon 10 and the guanine to adenine replacement in exon 4 of the *CHIT1* gene.

Changes suggestive of subclinical hypothyroidism, such as an isolated increase in the concentration of thyroid-stimulating hormone (TSH), are more common in obese pediatric patients compared to normal-weight patients. Among the inflammatory processes, the effect of cytokines on thyroid cells, the induction of thyroid autoimmune changes by T lymphocytes, and the inhibition of the thyroid-stimulating hormone action by leptin, may influence the thyroid disturbances.

## PERSONAL CONTRIBUTIONS

The present research aimed to identify indicators of the inflammatory status in children with overweight or obesity and their association with the changes which preceded the metabolic syndrome, such as dyslipidemia and insulin resistance.

### **Study 1. A Romanian single-center pilot study: longitudinal analysis of the metabolic and hormonal outcomes according to weight variation in children**

**Purpose:** to evaluate the relationship between the progression of adiposity and the evolution of the hormonal, metabolic and inflammatory profile in children with overweight or obesity.

**Objectives:** i). evaluation of the dynamic relationship between BMI-for-age z score and abdominal circumference with the laboratory changes recommended by the national guideline for the screening of complications in children with overweight or obesity; ii). assessment of the dynamic relationship between BMI-for-age z score and abdominal circumference with indicators of low-grade inflammation in overweight or obese children.

**Patients and methods:** A retrospective longitudinal analysis of the medical data concerning pediatric patients evaluated between January 2017 and March 2019 in the Pediatric Clinic 1, Children's Emergency Clinical Hospital in Cluj-Napoca, was conducted. The changes of clinical and biochemical parameters recommended by the 2011 national guideline for diagnosis and treatment of childhood obesity in patients aged 2-17 years with overweight or obesity were evaluated. We included clinical indicators (BMI-for-age z score, waist circumference, systolic and diastolic blood pressure), inflammatory indicators (absolute number of leukocytes and neutrophils, C-reactive protein), metabolic profile (transaminases, uric acid, morning blood glucose, triglyceride concentration, high-density lipoprotein (HDL) fraction of cholesterol, basal insulinemia and cortisolemia).

**Results:** Twenty-two pediatric patients (77.3% girls) with a median age of 13 years (IQR, 7.25 - 15) were followed for a median period of 7.5 months (IQR, 6.25 - 9.75). At the baseline evaluation, 18 patients were obese (BMI-for-age z score  $\geq 2$ ), of which 10 were severely obese, and 4 patients were overweight (BMI-for-age z score  $\geq 1$ ). The increase in the generalized (BMI-for-age z score) and abdominal adiposity (waist circumference) was not significant. However, we observed a significant increase in basal insulinemia from 14.9  $\mu\text{IU/ml}$  (10.6-25.4) to 20.5  $\mu\text{IU/ml}$  (11.4-33.5), accompanied by a decrease significant increase in morning glycaemia. At the baseline, 9% of the children presented with hyperinsulinism, and 30% developed hyperinsulinism over time, in conditions of euglycaemic values.



The BMI-for-age z score was significantly correlated with the C-reactive protein level (Spearman coefficient,  $\rho=0.70$ ,  $p=0.03$ ) at the baseline, and with the HDL-cholesterol level at the follow-up (Spearman coefficient,  $\rho=-0.52$ ,  $p=0.032$ ).

**Conclusion:** The present study is the first analysis of the evolution of clinical and laboratory parameters recommended by the national guideline for the screening of complications in children with overweight from Romania. The main changes were a progression of the risk of insulin resistance (basal insulinemia), dyslipidemia (HDL cholesterol level), and of low-grade inflammation (C-reactive protein level). We showed that these factors, which are associated with increased cardiometabolic risk, might evolve independently of the accumulation of adipose tissue in overweight or obese children without metabolic syndrome.

### **Study 2. The effect of the weight status over the inflammatory markers and thyroid function in pediatric patients with overweight and obesity**

**Objectives:** i). evaluation of the relationship between the degree of bodyweight excess and indices derived from leukocyte and platelet cell subpopulations (neutrophils-to-lymphocytes ratio, systemic immune-inflammatory index, platelets-to-lymphocytes ratio); ii). evaluation of the relationship between the degree of overweight and thyroid function indicators

**Patients and methods:** A cross-sectional study was conducted with retrospective collection of medical data from January 2017 to January 2019. Patients with a diagnosis of overweight or obesity (International Classification of Diseases, E66.0 or E66.9) were included, aged between 2-18 years evaluated in the outpatient Endocrinology Service of the Clinical Hospital for Infectious Diseases and the Pediatric Clinic 1 of the Emergency Clinical Hospital for Children, Cluj-Napoca. The degree of overweight was defined according to the World Health Organization (BMI-age z score) ( $\geq 1$  for overweight,  $\geq 2$  for obesity,  $\geq 3$  for severe obesity). The evaluated inflammatory indicators were: absolute number of leukocytes (LEU), neutrophils (NEU), lymphocytes (LIM), platelets (TR), C-reactive protein. We calculated: the neutrophils-to-lymphocytes ratio (NLR-the ratio between the absolute number of neutrophils and lymphocytes), the platelets-to-lymphocytes ratio (PLR-the ratio between the absolute number of platelets and that of lymphocytes), the systemic immune-inflammatory index (SII-the ratio between the product of neutrophils and lymphocytes and platelets). Thyroid function parameters were thyroid-stimulating hormone (TSH) and free thyroxine fraction (fT4).

**Results:** Forty-four overweight patients with an average age of  $12.78 \pm 2.5$  years, 57 obese patients with an average age of  $11.58 \pm 3.13$  years, and 41 patients with severe obesity and an average age of  $8.98 \pm 3.7$  were included in the study. Patients with severe obesity were significantly younger than patients with overweight and obesity (ANOVA test,  $p < 0.001$ ). There was no significant difference in the distribution of the sex variable across the groups (Fisher test,  $p = 0.468$ ).

The absolute number of leukocytes was significantly higher in patients with severe obesity than in those with overweight and obesity (Mann Whitney test,  $p=0.03$  and  $p=0.04$ , respectively) and was not associated with age (Spearman coefficient,  $\rho=0.13$ ,  $p=0.07$ ) or with gender (Kruskal-Wallis test,  $p=0.81$ ). Regarding the leukocyte subpopulations, the absolute number of neutrophils and lymphocytes was significantly higher in adolescents with severe obesity than in those with overweight (Mann Whitney test,  $p=0.005$ , and Levene test,  $p=0.02$ ). There were no significant differences in the NLR, PLR, and SII values between the overweight, obesity, and severe obesity groups.

An increase in the TSH value was observed from the overweight to the obese and severely obese group with a tendency to significance (ANOVA test,  $p=0.07$ ). Ten patients (8.19%) had an isolated TSH increase, and four (3.36%) had an elevated TSH and low FT4. There was no significant correlation between inflammatory indicators and thyroid function parameters.

**Conclusion:** The increase of the absolute number of leukocytes and leukocyte subpopulations, neutrophils and lymphocytes, with the degree of adiposity in children suggests the initiation of low-grade inflammatory processes. Recent studies support the involvement of leptin in myeloid lineage proliferation, as well as the role of these cells in mediating inflammation in adipose tissue. These results have clinical relevance, being easily accessible in medical practice. A trend toward subclinical hypothyroidism in overweight children suggests early changes in thyroid function in this category, possibly mediated by low-grade inflammation.

### **Study 3. Increased Circulating Chitotriosidase Activity Is Associated with Childhood Obesity: The Role of Two Common Variants of the CHIT1 Gene**

**Purpose:** evaluation of plasma chitotriosidase-1 activity as an indicator of low-grade inflammation in overweight or obese children

**Objectives:** i). evaluation of the association of chitotriosidase-1 plasma activity and inflammatory indicators used in clinical practice with the level of adiposity in children; ii). evaluation of the relationship between the plasma activity of chitotriosidase-1 and the dup24 and G102S genotypes of the *CHIT1* gene in children with different degrees of bodyweight excess; iii). evaluation of the role of BMI-for-age z score, dup24, G102S variants, respectively age and gender in predicting the variability of plasma activity of chitotriosidase-1.

**Patients and methods:** A cross-sectional study was conducted with consecutive data collection which included pediatric patients evaluated between September 2019 and July 2020 in the outpatient Endocrinology Service of the Clinical Hospital for Infectious Diseases, Pediatric Clinic 1 and the Department of Medical Genetics of the Clinical Hospital of Emergency for Children Cluj-Napoca. Patients aged 5–18 years who were overweight or obese according to the OSM criteria for the pediatric population were included. The control group included healthy patients with normal weight ( $<1$  BMI-for-age z score). The level of adiposity was assessed by BMI-for-age z score according to

OSM criteria, waist circumference, waist circumference/hip ratio, and as by the adipose and non-adipose tissue percentage measured by electrical bio-impedance. The plasma activity of chitotriosidase-1 (CHIT1) was measured by the fluorometric method using 4-methylumbelliferyl-chitotrioside as the reaction substrate and being expressed in nanomoles of substrate hydrolyzed per milliliter per hour. The following inflammatory indicators were also evaluated: fibrinogen (FBG), C-reactive protein (CRP), ferritin (FER), total leukocyte count (LEU) and erythrocyte sedimentation rate (ESR). Genetic analysis of the *CHIT1* gene included polymerase chain reaction (PCR), separation of amplified fragments in agarose gel, and confirmation by Sanger sequencing of the 24 base pair duplication in exon 10 (dup24), respectively real time-PCR allelic discrimination analysis for the G102S polymorphism.

**Results:** Thirty-two boys with an average age of  $11.93 \pm 3.18$  years and 32 girls with an average age of  $12.44 \pm 3.59$  years formed the bodyweight subgroups: 10 overweight patients, 33 obese patients and 21 severely obese patients. Patients in the control group (3 girls and 4 boys) had a median age of 13.15 years (IQR, 10.54-16.86). The overweight degree was not influenced by sex (Fisher test,  $p=0.06$ ), but the rate of severe obesity was significantly higher in younger patients compared to obese patients (Mann Whitney test,  $p<0.01$ ).

Plasma activity of chitotriosidase-1 was significantly higher in obese and severely obese patients compared to normal weight patients (Mann Whitney test,  $p=0.02$ ). Regarding the association between inflammatory indicators and adiposity level, CHIT1 plasma activity was positively correlated with BMI-for-age zscore (Spearman coefficient,  $\rho=0.376$ ,  $p=0.002$ ) and waist circumference/hip ratio (Spearman coefficient,  $\rho=0.273$ ,  $p=0.037$ ). The serum level of fibrinogen was positively associated with abdominal/hip circumference (Spearman coefficient,  $\rho=0.61$ ,  $p=0.03$ ).

The allelic distribution of dup24 and G102S were not different between the weight subgroups (Fisher's exact test for Hardy-Weinberg equilibrium,  $p=0.35$  and  $p=0.06$ ). Patients heterozygous for dup24 showed significantly lower plasma CHIT1 activity than healthy homozygous patients (Mann Whitney test,  $p=0.02$ ). There was no association between the G102S variant genotype and CHIT1 plasma activity (Kruskal-Wallis test,  $p=0.24$ ). BMI-for-age z score and dup24 and G102 genotype are significant predictors of plasma chitotriosidase-1 variability in the multivariate regression model which also assessed the influence of sex, age and duration since the onset of overweight.

**Conclusion:** Plasma activity of chitotriosidase-1 increases with the degree of adiposity with generalized (BMI-for-age z score) and abdominal (waist circumference/ hip ratio) distribution in children. Overweight progression, expressed by BMI-for-age z score, predicts an increase in the circulating level of chitotriosidase-1 in children. These results suggest that low-grade inflammation is present in overweight children before the onset of metabolic syndrome. Considering the importance of abdominal adiposity in increasing cardiometabolic risk, the association of chitotriosidase-1 plasma level with the waist circumference/hip ratio supports the role of the inflammatory process

at the level of visceral adipose tissue in mediating the metabolic complications of overweight or obesity in children.

The two common variants in *CHIT1* gene analysis, dup24 and G102S, suggests that the presence of the dup24 allele and the mutant T alleles of G102S cause a decrease in the enzymatic activity of CHIT1 when 4-methylumbelliferyl chitotrioside is used as the reaction substrate. However, the degree of adiposity is the main predictor of CHIT1 enzyme activity. Therefore, the plasmatic activity of chitotriosidase-1 can be a sensitive indicator of the activity of macrophages with a proinflammatory role in adipose tissue.

#### **Study 4. Longitudinal analysis of the CHIT1 plasma activity in pre-pubertal and pubertal pediatric patients with obesity**

**Aim:** assessment of the relationship between the inflammation degree progression and metabolic and hormonal changes in overweight or obese children.

**Objectives:** i). evaluation of the change of plasma level of chitotriosidase-1 in relation with the change in the HOMA-IR index and the triglyceride/HDLc (c cholesterol) ratio, as indicators of insulin resistance and dyslipidemia, in overweight or obese children; ii). description of this association in relation to the progression of adiposity indicators and pubertal stage.

**Patients and methods:** We performed a prospective longitudinal analysis on a subgroup of patients from study 3 with overweight or obesity and who were re-evaluated between October 2019 and July 2020 in the outpatient Endocrinology Service of the Clinical Hospital for Infectious Diseases, Cluj-Napoca. Each patient received recommendations regarding nutrition and physical activity from the endocrinologist. We assessed the clinical indicators of adiposity: BMI-for-age z score, abdominal circumference, abdominal circumference/hip ratio and abdominal circumference/waist ratio. Pubertal development was measured by Tanner staging (IV). The plasma activity of chitotriosidase-1 and the indicators of insulin resistance: the HOMA-IR index and the TG/HDLc ratio, were dynamically measured.

**Results:** Twenty-nine overweight pediatric patients (16 girls) with a median age of 11.42 years (IQR, 8.83-13.33) at study baseline were included in the analysis. Median follow-up was 7 months (IQR, 5–8.5). The pubertal stage did not progress significantly between the two evaluations (48.3% patients in the pre-pubertal stage, respectively 51.72% in the pubertal stage at the initial evaluation) (McNemar test,  $p=0.26$ ).

At the baseline, waist circumference was associated with HOMA-IR indicators and TG/HDLc ratio (Spearman coefficient,  $\rho=0.49$ ,  $p=0.01$ , and  $\rho=0.41$ ,  $p=0.03$ ). The reduction in the degree of generalized adiposity (BMI-for-age z score), and in abdominal adiposity (waist circumference, waist circumference/hip ratio and waist circumference/height ratio) was not significant between the two evaluations (Wilcoxon test,  $p>0.05$ ). Plasma chitotriosidase-1 activity decreased significantly, from a median value of 100 nmol/mL/h (IQR, 70-130) to 80 nmol/mL/h (IQR, 40-105) at the follow-up (Wilcoxon test,  $p=0.02$ ). Simultaneously, the TG/HDLc ratio was

significantly reduced at follow-up, from a median value of 2.16 (IQR, 1.44-3.62), to 0.54 (IQR, 0.45-0.81) (Wilcoxon test,  $p < 0.001$ ).

**Conclusion:** The decrease of low-grade inflammation level in overweight children without metabolic syndrome, expressed by the plasma activity of chitotriosidase-1, occurs simultaneously with the decrease in the risk of insulin resistance and dyslipidemia, expressed by the triglyceride/HDL-cholesterol ratio. Plasma activity of chitotriosidase-1 represents a potential more sensitive indicator of metabolic risk than clinical indicators of the bodyweight excess with generalized or abdominal distribution.

## General Conclusions

1. Longitudinal analysis revealed significant changes of the fasting insulin and glucose level in overweight and obese children without obesity-related complications. In 30% of overweight children, an elevated insulinemia was found.
2. The rise of the fasting insulin level was particularly associated with the abdominal adiposity as expressed by the waist circumference.
3. Neutrophils-to-lymphocytes ratio, platelets-to-lymphocytes ratio, and the systemic immune-inflammation index were not associated with body weight changes in overweight and obese children.
4. The differential peripheral white blood cells, namely lymphocytes absolute counts, increased significantly from overweight to obese and extremely obese pediatric patients.
5. The earliest signs of dyslipidemia in overweight and obese children are a HDL-cholesterol decrease and an increased plasma triglycerides level.
6. Thyroid-stimulating hormone concentration tended to increase from overweight to extremely obese children, suggesting an onset of the isolated non-autoimmune hyperthyrotropinemia in these patients.
7. BMI-for-age z score significantly predicted an increase in the plasma chitotriosidase activity independently of the 24-base pair duplication in exon 10 and the G102S polymorphism of the CHIT1 gene, age, sex, and time since weight gain.
8. Plasma chitotriosidase activity and fibrinogen levels were associated with the waist-to-hip ratio in pediatric patients, while human C-reactive protein, ferritin, white blood cells levels, and erythrocyte sedimentation rate did not increase with the obesity degree.
9. Bioelectrical impedance parameters, the adipose tissue and the free fat mass percentages, did not change with obesity degree or the inflammatory markers in children.
10. Heterozygosity for the dup24 of the CHIT1 gene was associated with a significant decrease in the enzymatic activity when using 4-methylumbelliferyl-chitotrioside as a substrate.
11. 21.13% of the patients were heterozygous for the 24-base pair duplication in CHIT1 gene and 4.23% homozygous, while 57.75% of children were heterozygous and 12.68% were homozygous for the T allele of the G102S polymorphism in CHIT1 gene.

12. Triglycerides-to-high-density lipoprotein cholesterol ratio is an indicator of dyslipidemia and insulin resistance and is associated with childhood overweight and obesity.
13. A decrease of the circulating CHIT1 activity at follow-up is associated with an improvement in the insulin resistance, as reflected by the reduction in the triglycerides-to-high-density lipoprotein cholesterol ratio, in children with obesity.

### **Originality and innovative contribution to the field of our research**

Inflammatory status in childhood overweight or obesity is associated with the onset of decreased insulin sensitivity and dyslipidemia, early metabolic changes that precede the metabolic syndrome. The present research suggests that plasma chitotriosidase-1 activity is an indicator of these changes in children.

The first study of our research represents the first longitudinal analysis of the clinical, metabolic and hormonal indicators recommended by the national protocol for the diagnosis, treatment and screening of obesity complications in children from Romania. The main changes identified were an increase in insulinemia and lipid metabolism abnormalities. We thus highlighted the need to use more sensitive indicators of inflammation than C-reactive protein and the absolute number of leukocytes. Also, the evaluation of indices based on absolute counts of leukocytes, lymphocytes, and neutrophils, as well as platelets, represents the first analysis of these potential indicators of inflammation in overweight children. The clinical importance of the second study also lies in the accessibility of the blood count as a routine examination.

During the doctoral research, we reported for the first time the association between the plasma activity of chitotriosidase-1 and the degree of adiposity in children. By using a multivariate regression model, we confirmed the predictive capacity of the adiposity level on the variability of plasma activity of chitotriosidase-1, while adjusting for the genotype of two common variants of the CHIT1 gene, sex, age and time since the onset of bodyweight excess. The use of clinical indicators to differentiate adiposity with generalized distribution from abdominal adiposity represents another element of originality. Thus, we identified a relationship between the plasma activity of chitotriosidase-1 and the level of abdominal adiposity. We also performed the first evaluation of the changes in circulating level of chitotriosidase-1, identifying an association between the inflammatory status and the progression of lipid abnormalities and insulin resistance in overweight and obese children. The results of this research support the importance of indicators that reflect macrophage-mediated inflammation in adipose tissue. Further studies are required to validate the plasma activity of chitotriosidase-1 in relation to the local activity of proinflammatory molecules released by macrophages in adipose tissue.