
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Riscul cardiometabolic în steatohepatita non-alcoolică din diabetul zaharat de tip 2

Doctorand **Florin-Eugen Casoinic**

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Nicolae Hâncu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOASTERII	15
1. Diabetul zaharat de tip 2 (DZT2) al adultului	17
1.1. Definiție și descriere generală	17
1.2. Epidemiologie	19
1.2.1. Prevalența diabetului	20
1.2.2. Mortalitate	21
1.3. Criterii de diagnostic	21
1.4. Ereditatea DZT2	22
1.5. Patogeneză	23
1.5.1. Patogeneza insuficienței celulelor pancreatice β	23
1.6. Dinamica diabetogenezei	26
1.7. Complexitatea diabetogenezei	26
1.8. Complicațiile microvasculare cronice	27
1.9. Complicațiile macrovasculare și factorii de risc cardiovascular	28
1.9.1. Complicații macrovasculare	28
1.9.2. Risc cardiovascular în diabetul zaharat	29
1.9.3. Risc cardiometabolic global	30
2. Ficatul gras non-alcoolic	31
2.1. Definiție și încadrare nosologică	31
2.2. Epidemiologie	32
2.3. Patogeneză	34
2.3.1. Steatoza hepatică și insulino-rezistența	34
2.3.2. Lipotoxicitatea	34
2.3.3. Stresul crescut la nivelul reticulului endoplasmatic	35
2.3.4. Interacțiunile țesutului adipos cu hepatocitele: adipocitokinele	35
2.3.5. Rolul citokinelor în FGNA și SHNA	36
2.4. Diagnosticul FGNA	43
2.4.1. Teste de laborator	43
3. Risc cardiovascular (RCV) asociat cu DZT2, FGNA și SHNA	45
3.1. Epidemiologia bolii cardiovasculare și FGNA	45
3.2. Date despre asocierea FGNA cu BCV	45
3.2.1. Scorurile de risc cardiovascular în SHNA	45
3.2.2. Studii ce evaluează boala carotidiană	46
3.2.3. Studii ce evaluează funcția cardiacă în FGNA	46
3.2.4. Studii ce evaluează disfuncția endotelială și metabolismul miocardic în FGNA	47
3.3. Patogeneza bolii cardiovasculare în FGNA	47
3.3.1. Insulino-rezistența	47
3.3.2. Țesutul adipos visceral	48
3.3.3. Inflamația	49
3.3.4. Dislipidemia	50
3.4. Osteoprotegerina și rolul său în riscul cardiovascular	50
3.5. Acidul uric și rolul său în riscul cardiovascular	51
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	53
1. Ipoteza de lucru/obiective	55
2. Metodologia generală	57
3. Studiu 1. Studiul factorilor de risc cardiovascular clasici la pacienții cu diabet zaharat de tip 2 și steatohepatită non-alcoolică: Nivelul inflamației sistemice și al markerilor de stres oxidativ	59
3.1. Introducere	59
3.2. Ipoteze și obiective	61

3.3. Materiale și metode	61
3.3.1. Pacienții	61
3.3.2. Examenul clinic	61
3.3.3. Evaluarea sindromului metabolic	63
3.3.4. Determinarea markerilor de inflamație sistemică	64
3.3.5. Determinarea markerilor serici ai balanței stresului oxidativ	64
3.3.6. Diagnosticul ficatului gras non-alcoolic	65
3.3.7. Analiza statistică	66
3.4. Rezultate	66
3.5. Discuții	88
3.6. Concluzii	95
4. Studiu 2. Studiul nivelurilor serice ale osteoprotegerinei la pacienții cu diabet zaharat de tip 2 și diferite forme de ficat gras non-alcoolic ca biomarker de risc cardiovascular	97
4.1. Introducere	97
4.2. Ipoteze și obiective	98
4.3. Materiale și metode	99
4.3.1. Pacienții	99
4.3.2. Metodologie	99
4.3.3. Analiza statistică	101
4.4. Rezultate	101
4.5. Discuții	109
4.6. Concluzii	112
5. Studiu 3. Studiul aterosclerozei carotidiene semnificative simptomatică și asimptomatică la pacienți cu DZT2 și SHNA	113
5.1. Introducere	113
5.2. Ipoteze și obiective	113
5.3. Materiale și metode	114
5.3.1. Pacienții	114
5.3.2. Măsurători clinice și de laborator	114
5.3.3. Ecografia carotidiană	115
5.3.4. Analiza statistică	116
5.4. Rezultate	116
5.5. Discuții	119
5.6. Concluzii	120
6. Concluzii generale	122
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	124
REFERINȚE	127

Cuvinte-cheie: ficat gras non-alcoolic; steatohepatită non-alcoolică; diabet zaharat de tip 2; risc cardiometabolic; markeri de inflamație sistemică cronică subclinică; markeri de stres oxidativ; osteoprotegerina; albuminuria; scorul de risc cardiovascular UKPDS; grosimea intimă-medie; ateroscleroza semnificativă carotidiană.

Referințe: 384.

Introducere

Diabetul zaharat (DZ) reprezintă o problemă de sănătate majoră la nivel mondial, fiind considerat cea mai frecventă boală cronică netransmisibilă. DZ cunoaște o evoluție de tip epidemic în paralel cu creșterea accentuată a frecvenței obezității, sedentarismului și a stilului de viață pro-risc diabetogen și pro-aterogen.

Prevalența complicațiilor cronice și comorbidităților asociate în diabet este foarte mare. Federația Internațională de Diabet (FID) estimează că peste 50% din persoanele cu diabet (în unele studii) au cel puțin o complicație în momentul diagnosticării bolii. În cazul diabetului zaharat de tip 2 (DZT2), peste 90% din pacienți prezintă suprapondere și obezitate, ceea ce demonstrează, din punct de vedere epidemiologic, asocierea dintre obezitate și instalarea diabetului.

Bolile cardiovasculare reprezintă principala cauză de mortalitate la pacienții cu diabet, îndeosebi prin boala coronariană aterosclerotică. Conform FID, persoanele adulte cu DZT2 prezintă o rată a mortalității crescută, de 2-4 ori mai mare decât la persoanele fără diabet. În plus, durata de viață la persoanele cu DZT2 se reduce cu 5 până la 10 ani comparativ cu cea a persoanelor non-diabetice, excesul de mortalitate datorându-se cu precădere bolilor cardiovasculare.

Formele majore de boală cardiovasculară (BCV) sunt reprezentate de boala coronariană aterosclerotică (BCA), accidentul vascular cerebral (AVC) și arteriopatia obliterantă aterosclerotică a membrelor inferioare, toate având ateroscleroza ca substrat patologic comun, la care se adaugă anumiți factori de risc. Moartea de cauză cardiovasculară la persoanele cu diabet atinge pragul de 75-80%, din care 50% se datorează bolii coronariene aterosclerotice, iar 15% accidentelor vasculare cerebrale. Complicațiile microvasculare cronice sunt reprezentate de retinopatie diabetică, nefropatie diabetică și neuropatie diabetică. Acestea sunt prezente frecvent, chiar în momentul diagnosticului DZT2, având o prevalență variabilă între studii. Complicațiile microvasculare cronice prezintă o evoluție subclinică, rămân cel mai frecvent nediate diagnosticate, de multe ori cu consecințe dramatice, și impun aplicarea metodelor de screening pentru depistare.

Fenomenul epidemiologic actual marcat de creșterea supraponderii, obezității și a DZT2, este amplificat prin asocierea creșterii prevalenței sindromului metabolic (SM) și ficatului gras non-alcoolic (FGNA), apreciată ca „epidemie hepatică”, cu extindere globală similară, cel mai adesea nediate diagnosticată, și încă lipsită de tratament. În prezent, se consideră că FGNA este cea mai frecventă boală hepatică din lume, cu incidență în creștere chiar și la copii, datorită creșterii epidemice a supraponderii, obezității și DZT2. Date epidemiologice au atras atenția asupra rolului central al ficatului în patologia metabolică, datorită asocierii independente a acestuia cu două dintre cele mai prevalente boli cronice – DZT2 și boala coronariană aterosclerotică. De asemenea, studiile epidemiologice la pacienții cu ficat gras non-alcoolic, au indicat că riscul de boală cardiovasculară crește semnificativ, independent de diabet și alți factori de risc. Steatohepatita non-alcoolică (SHNA) – forma severă a ficatului gras – diagnosticată prin puncție biopsie hepatică (PBH), s-a asociat cu risc de evoluție severă prin boala cardiovasculară, în multe studii longitudinale de anvergură. În plus, SHNA a fost găsită asociată cu ateroscleroza subclinică manifestată prin disfuncție endotelială, creșterea grosimii intimă-medie, a severității plăcii aterosclerotice atât la nivel carotidian cât și coronarian; asociată cu instabilitatea plăcii aterosclerotice – „placa vulnerabilă”; cu creșterea scorului de calciu al arterelor coronare; cu diminuarea rezervei de flux coronarian; și respectiv cu modificarea metabolismului energetic miocardic.

Riscul cardiometabolic – înțeles ca totalitatea factorilor de risc asociați riscului cardiovascular și celui de apariție a diabetului – se amplifică odată cu apariția, dezvoltarea și progresia steatohepatitei, având ca substrat comun insulino-rezistența periferică și hepatică.

În numeroase studii, FGNA a fost argumentat ca fiind manifestarea hepatică a SM, el însuși incluzând componente cum ar fi: obezitatea centrală, hipertensiune arterială (HTA), scăderea toleranței la glucoză/DZT2, hipertrigliceridemia, scăderea HDL colesterolului; aceste elemente se constituie fiecare în parte și toate laolaltă ca factori de risc aterosclerotic.

Dat fiind că DZ reprezintă cel mai mare rezervor de factori de risc cardiovascular cu acțiune continuă, iar apariția și dezvoltarea SHNA adaugă componentele sale inflamatorii sistemice, de stres oxidativ și anomalii metabolice, este de așteptat o creștere suplimentară a riscului cardiometabolic preexistent.

În timp ce supranutriția și obezitatea sunt fundamental implicate în dezvoltarea ficatului gras simplu, rămâne neelucidat de ce 10% din toate persoanele cu ficat gras dezvoltă fenotipul „inflamator” (i.e., SHNA). Este tot mai recunoscut că mediatorii solubili sintetizați de celulele sistemului imun (citokine, chemokine) și celulele țesutului adipos (adipocitokine) sunt implicate în FGNA, în progresia sa și în reglarea insulino-rezistenței.

Numeroase studii din literatura actuală cu privire la nivelul citokinelor și al adipocitokinelor la pacienții cu SHNA au fost realizate pe subiecți asiatici sau occidentali, fără diabet. Puține studii s-au concentrat pe pacienții diabetici cu SHNA. De cele mai multe ori, aceste studii prezintă rezultate contradictorii în ce privește citokinele, rolul lor și posibilele corelații dintre acestea și diverși parametri clinici și biochimici. Mai mult, nu există suficiente lucrări care să raporteze relația dintre citokine pro-inflamatorii și severitatea bolii hepatice reprezentată de FGNA.

Osteoprotegerina (OPG) este o proteină solubilă, membră a unei superfamilii de receptori ai factorului de necroză tumorală (TNF), care acționează ca pseudoreceptor solubil pentru activatorul receptorului factorului nuclear kappa B ligand – RANKL (*receptor-activator of nuclear factor kappa B ligand*), pentru a preveni activarea osteoclastelor și implicit resorbția osoasă. În diverse studii s-a arătat că OPG acționează ca un receptor-capcană, împiedicând activarea factorului nuclear kappa B (NF-kB), una din principalele căi pro-inflamatorii de semnalizare, în mare parte datorită inducerii expresiei genelor pro-inflamatorii cu producere de citokine, chemokine și molecule de adeziune. Acțiunea inhibitorie a NF-kB asupra căii pro-inflamatorii reprezintă o importantă componentă în reglarea metabolismului osos, dar are și efecte metabolice importante. OPG exercită, pe de o parte, o acțiune antiinflamatorie, iar pe de altă parte, o acțiune antiapoptotică prin care se împiedică moartea celulară programată. Dat fiind că ARNm al OPG este prezentă și în peretele arterial, s-a sugerat că nivelul seric crescut al OPG reflectă un conținut ridicat de OPG în peretele arterial la pacienții cu DZ. Alte studii au identificat un conținut crescut și în plăcile coronariene calcificate, acesta fiind asociat cu severitatea bolii la coronarografie și cu incidența evenimentelor cardiovasculare, independent de factorii de risc convenționali. Aceste date susțin că OPG serică cu nivel crescut reprezintă un biomarker al leziunilor aterosclerotice. În plus, niveluri crescute de OPG au fost raportate atât la pacienții cu angină instabilă, cât și la cei cu infarct miocardic acut.

Acidul uric este principalul metabolit urinar al bazelor purinice la om, iar în numeroase studii epidemiologice s-a raportat o corelație între nivelurile serice ale acidului uric și HTA, SM, boala aterosclerotică coronariană, boala cerebrovasculară, demența vasculară, preeclampsia, respectiv boala cronică renală. Niveluri ridicate ale acidului uric seric (AUS) au fost asociate cu morbiditatea și mortalitatea cardiovasculară chiar și la subiecții cu risc scăzut. Hiperuricemia indică creșterea riscului de boală coronariană precum și a incidenței și mortalității prin accident vascular cerebral, cu o rată a mortalității mai pronunțată în rândurile femeilor. Există observații care arată un efect de disfuncție endotelială al hiperuricemiei, modificări oxidative și inflamatorii induse la nivel adipocitar, precum și o acțiune protectivă obținută prin tratamentul cu alopurinol.

Pe baza acestor premise, studiul de față și-a propus examinarea relațiilor dintre nivelul citokinelor pro-și antiinflamatorii, al stresului oxidativ, și componentele riscului cardiometabolic la pacienții cu SHNA și diabet din țara noastră. Astfel, rezultatele acestui studiu vor contribui la completarea și îmbogățirea literaturii de specialitate cu date noi privind nivelul inflamației sistemice și al markerilor de stres oxidativ la pacienții cu diabet zaharat de tip 2 și steatohepatită non-alcoolică.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiu 1. Studiul factorilor de risc cardiovascular clasici la pacienții cu diabet zaharat de tip 2 și steatohepatită non-alcoolică: Nivelul inflamației sistemice și al markerilor de stres oxidativ

Obiective: Acest studiu și-a propus evaluarea profilului de risc cardiovascular, a prevalenței sindromului metabolic și a componentelor sale, evaluarea datelor demografice, clinico-biologice, precum și estimarea scorului de risc cardiovascular UKPDS și încadrarea în clase de risc. În special, studiul și-a propus evaluarea profilului inflamator sistemic (citokinele inflamatorii: IL-6, IL-1 β și TNF- α), evaluarea profilului antiinflamator (adiponectina serică), precum și evaluarea *status*-ului de stres oxidativ prin determinarea unor markeri de stres oxidativ proteic, de peroxidare lipidică, și respectiv al acidului uric seric, la pacienții cu DZT2 și SHNA.

Materiale și metode: Populația din acest studiu a inclus un număr total de 165 participanți, din care 115 pacienți consecutivi cu DZT2, unii cu SHNA, iar restul reprezentând grupul de control fără afectare hepatică, 50 de subiecți sănătoși clinic, fără antecedente personale patologice; grupul de pacienți care au fost internați, diagnosticați și aflați sub observația Clinicii Medicale IV, a inclus următoarele loturi: lotul I alcătuit din 60 de pacienți cu DZT2 și SHNA; lotul II format din 55 de pacienți cu DZT2 fără FGNA; lotul III compus din 50 de subiecți sănătoși clinic – lotul martor (control).

Subiecții sănătoși din lotul martor au fost recrutați dintre persoanele înregistrate în evidențele Policlinicii CF Cluj-Napoca, Serviciul Siguranța Circulației. Fiecărui subiect inclus în studiu i s-a efectuat o anamneză amănunțită privind date demografice, antecedente heredocolaterale și personale patologice, stil de viață, alimentație, efortului fizic, starea de fumător, respectiv consumul de alcool.

Examenul clinic a inclus: vârsta, sexul, indicatori antropometrici (greutatea, înălțimea, circumferința abdominală), s-a calculat indicele de masă corporală (IMC), s-au înregistrat următorii factori de risc cardiovascular tradiționali: istoric familial, prezența hipertensiunii, dislipidemie, diabetului, hiperuricemiei, medicația curentă (antidiabetică, antihipertensivă, hipolipemiantă, altele), precum și ancheta alimentară. HTA a fost definită astfel: TAS \geq 130 mmHg, sau TAD \geq 85 mmHg, sau tratament antihipertensiv declarat de către pacient. Pentru fiecare subiect s-a determinat traseul electrocardiografic (ECG) care a permis diagnosticul de fibrilație atrială. Pentru evaluarea prevalenței sindromului metabolic, am utilizat criteriile definiției Consensului din anul 2009 (Alberti et al). Motorul UKPDS a fost utilizat pentru evaluarea scorului de risc cardiovascular UKPDS la persoane cu DZT2, sub aspectul mortalității de cauze coronariene și cerebrovasculare.

Diagnosticul de DZT2 a fost stabilit pe baza criteriilor de definiție ADA, prin respectarea integrală a condițiilor de repaus digestiv și determinarea glicemiei bazale, hemoglobinei glicate (HbA1c), insulinemiei bazale, și *status*-ului insulino-rezistenței, apreciat cu ajutorul indexului HOMA-IR.

La toți participanții din studiu, indiferent de lot, probele de sânge s-au prelevat dimineața *à jeun*, după o perioadă de 12 ore de repaus digestiv. S-au recoltat probe de sânge pentru următoarele determinări: probele funcționale hepatice (transaminazele AST, ALT, gama GT, fosfataza alcalină), respectiv panelul profilului lipidic (colesterol total, HDL colesterol, LDL colesterolul, trigliceride).

Pentru inflamația sistemică s-au determinat: Proteina C reactivă *high sensitivity* (hs-PCR), cu valori normale cuprinse între 1-3 mg/l; fibrinogenul seric cu valori normale între 150-300 mg/dl; iar citokinele pro-inflamatorii IL-6, IL-1 β și TNF- α , au fost determinate cu ajutorul kitului sandwich ELISA, astfel: Human IL-6 DuoSet ELISA, Human IL-1 β DuoSet ELISA, respectiv Human TNF- α DuoSet ELISA. Nivelurile serice ale adiponectinei s-au determinat cu ajutorul Human Total Adiponectin/ARP 30 Quantikine ELISA kit. Toate determinările cu ajutorul kiturilor ultrasensibile au fost efectuate în probă dublă, conform instrucțiunilor firmei producătoare. Determinarea markerilor serici ai stresului oxidativ pentru nivelul de oxidare a proteinelor – proteine carbonilate, s-a efectuat cu ajutorul *Protein Carbonyl Colorimetric Assay Kit* produs de Cayman Chemical Company, iar nivelul de oxidare lipidică a fost determinat cu *8-Isoprostane EIA Kit*, care a măsurat nivelul seric al 8-isoprostanului (8-epi PGF2 α), indicator de peroxidare lipidică. S-a determinat și

nivelul malonildialdehidei serice, marker de oxidare lipidică, cu ajutorul acidului tiobarbituric, iar acidul uric seric a fost determinat spectrofotometric, prin metoda uricazei (Roche Diagnostics Corporation). Diagnosticul ficatului gras non-alcoolic a fost stabilit prin testele funcționale hepatice și ultrasonografie, cu elementele caracteristice *pattern*-ului de steatoză. În plus, au fost utilizați biomarkeri serologici precum adiponectina și IL-6 ca metodă neinvazivă pentru fenotipul pozitiv de SHNA, iar un număr redus de pacienți au avut diagnostic histologic prin PBH, cu următoarea distribuție: 12 pacienți cu steatohepatită, 8 cu steatoză simplă și 2 cu ficat normal.

Pentru analiza normalității distribuției variabilelor cantitative, am folosit testul Kolmogorov-Smirnov. Variabilele cu distribuție normală au fost reprezentate ca medie \pm deviație standard, cele cu distribuție non-normală au fost reprezentate ca mediane (quartila 1 și 3), iar variabilele categoriale (nominale) au fost exprimate ca procente și frecvență. Diferențele între mediile variabilelor cantitative continue s-au evaluat cu ajutorul testului *t Student*. Pentru variabilele cu distribuție non-gaussiană au fost utilizate teste neparametrice (Mann-Whitney U). Pentru a compara între ele diferențele dintre 3 sau mai multe grupuri, am folosit testul Anova *one-way*, pentru variabilele cantitative cu distribuție normală, iar pentru cele cu distribuție non-normală sau de tip ordinal, am utilizat testul Kruskal-Wallis. Regresia logistică univariată și multivariată a fost utilizată pentru testul factorilor de predicție independenți, cu ajutorul programului SAS 9.4. Pentru determinarea și aprecierea relației liniare dintre variabilele studiate, am utilizat testele de corelație Pearson și Spearman. O valoare a lui $p < 0,05$ a fost considerată semnificativă din punct de vedere statistic.

Rezultate: Din totalul de 165 de subiecți incluși în acest studiu, repartiția pe sexe a fost: 96 (58,18%) bărbați, și 69 (41,81%) femei. În fiecare lot, distribuția pe sexe a fost următoarea: bărbați: Lotul I - 33/60 (55,4%), lotul II - 34/55 (62,3%), lotul III (martor) - 29/50 (59,1%); femei: Lotul I - 27/60 (44,6%), lotul II - 21/55 (37,7%), lotul III (martor) - 21/50 (40,9%), iar compararea distribuției bărbați-femei indică loturi omogene din punct de vedere al distribuției pe sexe. Vârsta medie a participanților acestui studiu a fost de $58 \pm 10,1$ ani, iar vârsta medie în fiecare lot a fost: lotul I: $59 \pm 8,4$ ani; lotul II: $58,5 \pm 6,5$ ani; iar în lotul martor: $57,75 \pm 2,2$ ani, fără semnificație statistică.

Circumferința abdominală (CA) medie în lotul I (DZT2 și SHNA) a fost de $105,8 \pm 11,1$ cm; în Lotul II (DZT2) de $99,14 \pm 14,7$ cm; iar în lotul martor, CA medie a fost de $90,7 \pm 9,3$ cm, ceea ce indică diferențe semnificative din punct de vedere statistic : lotul I vs. lotul II ($p=0,031$); lotul I vs. lotul III (martor) ($p=0,011$); lotul II vs. lotul III (martor) ($p=0,022$).

Subiecții incluși în acest studiu au prezentat valori ale IMC de peste 25 kg/m^2 (supraponderali și obezi) în proporție de 88,33% (lotul I), 72,72% (lotul II) și respectiv 62% (lotul martor). Proporția de pacienți supraponderali (IMC între $25-29,9 \text{ kg/m}^2$) a fost de 45% în lotul I; de 34,54 % în lotul II; și de 56 % în lotul martor; iar proporția de pacienți obezi (IMC $> 30 \text{ kg/m}^2$) a fost de 43,33% în lotul I; de 38,18 % în lotul II; și de 6% în lotul martor (lotul III). Rezultatele arată semnificație statistică în ce privește supraponderea și obezitatea la pacienții cu DZT2 și SHNA vs. lotul II și lotul martor ($p = 0,001$ pentru lotul I vs. lotul II și respectiv $p = 0,003$ pentru lotul I vs. lotul martor).

Durata medie a diabetului zaharat a fost de 14,2 ani la pacienții cu DZT2 și SHNA (lotul I) și respectiv de 13,3 ani la pacienții cu DZT2 (lotul II), fără diferență semnificativă statistic între cele două loturi ($p = 0,067$); valoarea hipertensiunii arteriale în lotul I a fost de: TAS medie $141,5 \pm 35,4$ mmHg vs. lot II $135,6 \pm 4,7$ mmHg ($p = 0,013$) iar în lotul martor de $128,1 \pm 2,2$ mmHg ($p = 0,009$ lot I vs. lot III; $p = 0,04$ lot II vs. lot III); TAD medie în lotul I a fost de $87,2 \pm 6,1$ mmHg vs. $82,0 \pm 2,8$ mmHg în lotul II și $79,1 \pm 2,4$ în lotul martor ($p=0,035$ lot I vs. lot II; $p= 0,02$ lot I vs. lot III; $p= 0,042$ lot II vs. lot III); valorile TAS/TAD s-au situat în afara valorilor optime indicate pentru pacientul cu DZT2. Prevalența HTA pe loturi a fost de 70% în lotul I și de 56,36% în lotul II ($p = 0,01$).

Prevalența SM la subiecții din cele 3 loturi a fost: în lotul I - 54/60 pacienți (90%); în lotul II - 43/55 pacienți (78,18%); iar în lotul III - 5/50 (10%). Prevalența în funcție de numărul de elemente componente ale SM a fost următoarea : lotul I 10 pacienți (18%) cu 3 componente ale SM, 20 (37%) cu 4 componente ale SM și

24 (44%) cu 5 componente ale SM; lotul II: 21 pacienți (48,84%) cu 3 componente ale SM, 15 (34,88%) cu 4 componente ale SM și 7 (16,28%) cu 5 componente ale SM; Lotul III (martor) toți cei 5 subiecți (100%) au reunit 3 componente ale SM.

Dislipidemia aterogenă (HDL colesterol scăzut și TG crescute, raportul Reaven (TG/HDL) crescut) s-a manifestat în loturile I și II cu următoarea prevalență: lotul I = 83,5%; lotul II = 69%, $p < 0,05$. Din punct de vedere al parametrilor biochimici, în lotul I se constată o ușoară creștere a transaminazelor (AST = $59,3 \pm 3,9$; ALT = $62 \pm 6,3$) și gama GT ($68 \pm 4,5$), semnificativă față de lotul II (AST = $31 \pm 1,7$; ALT = $35 \pm 3,1$; gama GT = $45 \pm 5,2$) ($p < 0,05$). Panelul componentelor lipidice - TG crescute lotul I vs. II ($239 \pm 41,5$ vs. $174,3 \pm 22,9$; $p < 0,05$) și HDL colesterol scăzut ($36,9 \pm 4,2$ vs. $41,8 \pm 4,7$; $p < 0,05$), iar raportul Reaven, marker de insulino-rezistență (TG/HDL), a fost $6,47$ vs. $4,16$, $p < 0,05$, indică o dislipidemie aterogenă semnificativ crescută în lotul cu DZT2 și SHNA (lotul I) vs. lotul cu DZT2 fără afectare hepatică (lotul II) și lotul martor (lotul III). LDL colesterol a fost crescut semnificativ în lotul I vs. lotul II ($137,5 \pm 9,3$ vs. $125,4 \pm 2,9$; $p < 0,05$), iar fiecare dintre loturi, comparat cu lotul martor ($113,1 \pm 33$) au înregistrat semnificație statistică ($p < 0,05$). În cazul loturilor I și II, valorile componentelor lipidice sunt situate în afara valorilor optime indicate pentru pacienții cu DZT2.

Glicemia bazală a prezentat valorile medii: $148 \pm 22,25$ (lotul I), $129 \pm 14,7$ (lotul II) și $97,5 \pm 9,4$ (lotul III) iar diferențe semnificative statistic au fost observate între cele două loturi de pacienți diabetici și lotul martor ($p < 0,05$), dar fără semnificație statistică între loturile I și II ($p=0,051$). HbA1c a fost crescută în lotul I ($7,85 \pm 6,9$) vs. lotul II ($6,95 \pm 3,1$) comparativ cu lotul martor ($5,8 \pm 1,5$), cu semnificație statistică între nivelul HbA1c lot I vs. lot II ($p < 0,05$), indicând un control metabolic mai slab în lotul I de pacienți.

Indicele HOMA-IR a prezentat o distribuție non-normală a valorilor, iar distribuția pe loturi a indicat valorile cele mai mari în lotul I ($6,9$) comparativ cu lotul II ($3,45$), $p < 0,001$. Prin analiza univariată a HOMA-IR la lotul I, am găsit corelații pozitive cu IMC ($r=0,258$; $p=0,035$); cu CA ($r=0,372$; $p=0,023$); cu ALT ($r=0,302$; $p=0,02$) și gama GT ($r=0,318$; $p=0,026$). În lotul II, HOMA-IR s-a corelat pozitiv cu IMC ($r=0,203$; $p=0,04$) și CA ($r=0,311$; $p=0,035$). În ambele loturi, HOMA-IR s-a corelat pozitiv cu hs-PCR, astfel: lotul I: $r=0,384$; $p < 0,001$ și respectiv lotul II: $r=0,286$; $p=0,018$.

Analiza regresiei liniare multiple pentru HOMA-IR și factorii asociați indică hs-PCR ca fiind singurul factor independent asociat cu HOMA-IR în lotul I ($p=0,001$). Această corelație nu s-a păstrat însă în lotul II ($p=0,07$).

Scorul UKPDS de risc pentru boala coronariană aterosclerotică (BCA) în lotul I (DZT2 și SHNA) a fost de $39,04\%$ vs. $23,8\%$ ($p=0,003$), la pacienții cu DZT2 fără afectare hepatică (lotul II). Riscul de deces prin BCA a fost de $12,4\%$ (lotul I) vs. $5,9\%$ (lotul II) ($p=0,023$). Pentru riscul de AVC (accident vascular cerebral), valorile au fost $25,6\%$ (lotul I) vs. $16,4\%$ (lotul II) ($p < 0,05$), iar riscul de deces prin AVC a fost de $3,8\%$ (lotul I) vs. $1,9\%$ (lotul II) ($p < 0,05$). Aceste valori medii ale scorului de risc cardiovascular UKPDS arată că lotul I de pacienți (DZT2 și SHNA) se încadrează în clasa de risc înalt, cu semnificație statistică prezentă la comparația cu lotul II.

Nivelul seric al IL-6 în lotul I a fost de $134,83 \pm 57,18$ pg/ml vs. $55,68 \pm 18,29$ pg/ml în lotul II, indicând creșteri de peste 11 ori valoarea normală în lotul I, și de aproape 5 ori în lotul II, cu semnificație de stare inflamatorie sistemică. Creșteri similare s-au găsit și în cazul IL-1 β și TNF- α în loturile I și II vs. lotul martor, cu valorile cel mai mult crescute în lotul I (DZT2 și SHNA): IL-1 β (lotul I: $73,45 \pm 15,11$ pg/ml vs. $22,07 \pm 9,17$ pg/ml lotul II, $p=0,001$); TNF- α (lotul I: $60,88 \pm 12,31$ pg/ml vs. $18,81 \pm 7,25$ pg/ml lotul II, $p=0,021$). Adiponectina serică a atins valori de $3950,5 \pm 954$ ng/ml în lotul I vs. lotul II (6745 ± 1122 ng/ml, $p=0,002$).

La analiza univariată, în lotul I, nivelul seric al IL-6 s-a corelat pozitiv cu parametrii clinici (CA, IMC, durata/vechimea diabetului, HTA) și de laborator (TG, LDL colesterol, ALT, HbA1c, și indicele HOMA-IR); nivelul IL-6 s-a dovedit a fi în corelație pozitivă și cu scorul de risc cardiovascular UKPDS; IL-6 s-a corelat negativ

cu valorile HDL colesterol și adiponectinei. La analiza multivariată, IL-6 a fost semnificativ și independent asociată cu factorii următori: durata/vechimea diabetului, IMC, HOMA-IR și scorul UKPDS (în lotul I), iar în lotul II, IL-6 a fost semnificativ și independent asociată cu HOMA-IR și scorul UKPDS (cf. Tabel I).

Tabel I. Analiza multivariată între IL-6 și variabilele clinice și biochimice în loturile studiate

Variabile	Lotul I (DZT2 și SHNA)		Lotul II (DZT2)		Lotul III (Martor)	
	β	p	β	p	β	p
IMC (kg/m ²)	$\beta = 0,331$	p < 0,001	$\beta = 0,091$	p (ns)	$\beta = 0,083$	p (ns)
Durata/vechimea DZT2 (ani)	$\beta = 0,273$	p < 0,001	$\beta = 0,073$	p (ns)	$\beta = 0,089$	p (ns)
HOMA-IR index	$\beta = 0,221$	p < 0,001	$\beta = 0,219$	p < 0,001	$\beta = 0,078$	p (ns)
Scorul UKPDS	$\beta = 0,248$	p < 0,001	$\beta = 0,253$	p < 0,001	-	-

La analiza univariată, în lotul I nivelul seric al IL-1 β s-a corelat pozitiv cu parametrii clinici următori: IMC, CA, ALT, AST, gama GT, LDL colesterol, HTA, precum și cu indicele HOMA-IR; nivelul IL-1 β nu s-a corelat semnificativ cu scorul de risc cardiovascular UKPDS (r = 0,119; p > 0,05). La analiza multivariată, în lotul I nivelul seric al IL-1 β a fost semnificativ asociat cu creșterea IMC ($\beta = 0,415$; p < 0,001) și gama GT ($\beta = 0,326$; p < 0,001). În lotul II nu s-au găsit corelații semnificative statistic între nivelul seric al IL-1 β și parametrii clinici și de laborator studiați (cf. Tabel II).

Tabel II. Analiza multivariată între IL-1 β și variabilele clinice și biochimice în loturile studiate

Variabile	Lotul I (DZT2 și SHNA)		Lotul II (DZT2)		Lotul III (Martor)	
	β	p	β	p	β	p
IMC (kg/m ²)	$\beta = 0,415$	p < 0,001	$\beta = 0,191$	p (ns)	$\beta = 0,110$	p (ns)
Gama GT (UI/L)	$\beta = 0,326$	p < 0,001	$\beta = 0,189$	p (ns)	$\beta = 0,173$	p (ns)

La analiza univariată, în lotul I nivelul seric al TNF- α s-a corelat pozitiv cu parametrii clinici următori: IMC, CA, HTA, AST, ALT, gama GT, HbA1c, durata/vechimea diabetului și respectiv HOMA-IR. TNF- α nu s-a corelat cu: trigliceride, HDL-col, LDL-col, glicemia bazală și respectiv scorul de risc cardiovascular UKPDS. În lotul II, TNF- α s-a corelat pozitiv cu parametrii clinici următori: IMC, CA, HTA, HbA1c și respectiv durata/vechimea diabetului. La analiza multivariată dintre TNF- α și parametrii clinici și de laborator, în lotul I nivelul seric al TNF- α a fost semnificativ asociat cu următorii factori: CA, AST, ALT, HbA1c și durata/vechimea diabetului, iar în lotul II, numai CA, HbA1c și durata/vechimea diabetului au fost asociate cu nivelul seric al TNF- α (cf. Tabel III).

Tabel III. Analiza multivariată între TNF- α și variabilele clinice și biochimice în loturile studiate

Variabile	Lotul I (DZT2 și SHNA)		Lotul II (DZT2)		Lotul III (Martor)	
	β	p	β	p	β	p
AST (UI/L)	$\beta = 0,412$	p < 0,001	$\beta = 0,18$	p (ns)	$\beta = 0,12$	p (ns)
ALT (UI/L)	$\beta = 0,346$	p < 0,001	$\beta = 0,16$	p (ns)	$\beta = 0,09$	p (ns)
CA (cm)	$\beta = 0,376$	p < 0,001	$\beta = 0,254$	p < 0,001	$\beta = 0,11$	p (ns)
HbA1c (%)	$\beta = 0,167$	p < 0,001	$\beta = 0,650$	p < 0,001	$\beta = 0,12$	p (ns)
Durata/vechimea DZT2 (ani)	$\beta = 0,655$	p < 0,001	$\beta = 0,431$	p < 0,001	$\beta = 0,15$	p (ns)

La analiza univariată, în lotul I nivelul seric al adiponectinei s-a corelat negativ cu parametrii clinici următori: IMC, CA, HbA1c, LDL-col, scorul de risc cardiovascular UKPDS și respectiv indicele HOMA-IR. În lotul II, numai IMC, CA și HbA1c au fost asociate negativ cu nivelul seric al adiponectinei. La analiza multivariată, în lotul I nivelul seric al adiponectinei s-a corelat negativ cu parametrii clinici următori: IMC, scorul de risc cardiovascular UKPDS și indicele HOMA-IR, dar numai cu IMC în lotul II (cf. Tabel IV).

Tabel IV. Analiza multivariată între adiponectină și variabilele clinice și biochimice în loturile studiate

Variabile	Lotul I (DZT2 și SHNA)		Lotul II (DZT2)		Lotul III (Martor)	
	β	p	β	p	β	p
IMC (kg/m ²)	$\beta=-0,54$	$p < 0,001$	$\beta=-0,65$	$p < 0,001$	$\beta=-0,14$	p (ns)
HOMA-IR index	$\beta=-0,345$	$p < 0,001$	$\beta=-0,13$	p (ns)	$\beta=-0,10$	p (ns)
Scorul UKPDS	$\beta=-0,249$	$p < 0,001$	$\beta=-0,11$	p (ns)	$\beta=-0,09$	p (ns)

Nivelul seric al hs-PCR, în lotul I, la analiza univariată s-a corelat pozitiv cu parametrii clinici următori: vârsta, IMC, CA, AST, ALT, HbA1c, și scorul de risc cardiovascular UKPDS, iar în lotul II, nivelul seric al hs-PCR s-a corelat pozitiv cu: vârsta, IMC, CA, HbA1c și scorul de risc cardiovascular UKPDS. La analiza multivariată, în lotul I nivelul seric al hs-PCR s-a corelat pozitiv cu vârsta, IMC și scorul de risc cardiovascular UKPDS, iar în cazul pacienților din lotul II, nivelul seric al hs-PCR s-a corelat pozitiv cu vârsta și IMC (cf. Tabel V).

Tabel V. Analiza multivariată între hs-PCR și variabilele clinice și biochimice în loturile studiate

Variabile	Lotul I (DZT2 și SHNA)		Lotul II (DZT2)		Lotul III (Martor)	
	β	p	β	p	β	p
Vârsta (ani)	$\beta = 0,252$	$p < 0,001$	$\beta = 0,225$	$p < 0,001$	$\beta = 0,063$	p (ns)
IMC (kg/m ²)	$\beta = 0,293$	$p < 0,001$	$\beta = 0,331$	$p < 0,001$	$\beta = 0,091$	p (ns)
Scorul UKPDS	$\beta = 0,112$	$p < 0,001$	$\beta = 0,011$	p (ns)	-	-

Markeri de stres oxidativ au fost determinați în toate cele 3 loturi studiate. Determinarea nivelurilor de proteine carbonilate a găsit pentru fiecare lot următoarele valori: lotul I (DZT2 și SHNA): $1,112 \pm 0,42$ nmol/dl; lotul II (DZT2): $0,508 \pm 0,35$ nmol/dl; lotul III (martor): $0,417 \pm 0,38$ nmol/dl.

La analiza univariată, în lotul I nivelul seric al proteinelor carbonilate s-a corelat pozitiv cu parametrii clinici următori: vârsta, HTA, HbA1c, indicele HOMA-IR, durata/vechimea diabetului și scorul de risc cardiovascular UKPDS. În lotul II, nivelul seric al proteinelor carbonilate s-a corelat pozitiv cu parametrii clinici următori: vârsta, HTA, HbA1c și durata/vechimea diabetului. La analiza multivariată, în lotul I nivelul seric al proteinelor carbonilate a fost corelat pozitiv cu parametrii clinici următori: HbA1c, durata/vechimea diabetului și scorul de risc cardiovascular UKPDS. În lotul II, nivelul seric al proteinelor carbonilate s-a corelat pozitiv numai cu HbA1c și durata/vechimea diabetului (cf. Tabel VI).

Tabel VI. Analiza multivariată între proteinele carbonilate și variabilele clinice și biochimice în loturile studiate

Variabile	Lotul I (DZT2 și SHNA)		Lotul II (DZT2)		Lotul III (Martor)	
	β	p	β	p	β	p
HbA1c (%)	$\beta=0,78$	$p < 0,001$	$\beta=0,67$	$p < 0,001$	$\beta=0,05$	p (ns)
Durata/vechimea DZT2 (ani)	$\beta=0,77$	$p < 0,001$	$\beta=0,65$	$p < 0,001$	$\beta=0,14$	p (ns)
Scorul UKPDS	$\beta=0,77$	$p < 0,001$	$\beta=0,19$	p (ns)	-	-

Determinarea malonilaldehidei (MDA) serice indică următoarele valori medii: lotul I: $6,181 \pm 1,81$ ng/ml; lotul II: $4,258 \pm 1,54$ ng/ml; lotul III: $2,393 \pm 1,75$ ng/ml. La comparația celor 3 loturi între ele, am observat diferențe semnificative statistic între toate loturile ($p = 0,002$ pentru lot I vs. lot II; $p = 0,001$ pentru lot I vs. lot III; și $p = 0,005$ pentru lot II vs. lot III). Lotul I prezintă valorile MDA cele mai crescute, urmat de lotul II și de lotul martor.

La analiza univariată, în lotul I nivelul seric al MDA s-a corelat pozitiv cu parametrii clinici următori: vârsta, gama GT, trigliceride și LDL-col. În lotul II, nivelul seric al MDA s-a corelat pozitiv cu parametrii clinici următori: vârsta, trigliceride și LDL-col. În lotul III (martor), nivelul seric al MDA s-a corelat cu vârsta. La analiza multivariată, atât în lotul I cât și în lotul II, nivelul seric al MDA s-a corelat pozitiv cu valorile trigliceridelor serice (cf. Tabel VII).

Tabel VII. Analiza multivariată între MDA și variabile clinice și biochimice în loturile studiate

Variabilă	Lotul I (DZT2 și SHNA)		Lotul II (DZT2)		Lotul III (Martor)	
	$\beta=0,345$	$p < 0,001$	$\beta=0,332$	$p < 0,001$	$\beta=0,13$	p (ns)
Trigliceride (mg/dl)						

Determinarea 8-isoprostanului seric, indicator de peroxidare lipidică, a fost efectuată în toate cele trei loturi, iar valorile medii au fost: lotul 1: 338,6 ± 98,5 pg/ml; lotul 2: 269,92 ± 88,7 pg/ml; lotul 3: 195,94 ± 45,3 pg/ml. La comparația între ele, am observat diferențe semnificative statistic între toate cele 3 loturi studiate ($p = 0,014$ pentru lot I vs. lot II; $p = 0,001$ pentru lot I vs. lot III; $p = 0,028$ pentru lot II vs. lot III). La analiza univariată, în lotul I nivelul seric de 8-isoprostan s-a corelat pozitiv cu parametrii clinici următori: vârsta, LDL-col, HTA și indicele HOMA-IR; iar în lotul II, nivelul seric de 8-isoprostan s-a corelat pozitiv cu vârsta, LDL-col și HTA. La analiza multivariată, în lotul I nivelul seric de 8-isoprostan s-a corelat pozitiv cu vârsta și LDL-col, iar în lotul II, s-a corelat numai cu vârsta (cf. Tabel VIII).

Tabel VIII. Analiza multivariată între 8-isoprostan și variabilele clinice și biochimice în loturile studiate

Variabile	Lotul I (DZT2 și SHNA)		Lotul II (DZT2)		Lotul III (Martor)	
	$\beta=0,55$	$p < 0,001$	$\beta=0,67$	$p < 0,001$	$\beta=0,09$	p (ns)
Vârsta (ani)						
LDL-col (mg/dl)	$\beta=0,33$	$p < 0,001$	$\beta=0,25$	p (ns)	$\beta=0,11$	p (ns)

Matricea intercorelațiilor între variabilele luate în studiu este prezentată în Tabelul IX, indicând că la pacienții cu DZT2 și SHNA există o stare inflamatorie sistemică și un status pro-oxidativ mult crescut pe linia proteică și a peroxidării lipidice, precum și sub aspectul hiperuricemiei (cf. Tabel IX).

Tabel IX. Corelațiile markerilor inflamatori și ai stresului oxidativ la pacienții cu DZT2 și SHNA

	IL-6 (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	Adiponectina (ng/ml)	hs-Proteina C reactivă (mg/l)	Fibrinogen (mg/dl)	Proteina carbonilată (nmol/dl)	MDA (ng/ml)	8-isoprostan (pg/ml)	Acid uric seric (mg/dl)
IL-6 (pg/ml)	-	0,412	0,345	-0,289	0,478	0,018	0,375	0,276	0,189	0,153
IL-1 β (pg/ml)	0,412	-	0,165	-0,310	0,211	0,376	0,145	0,137	0,146	0,678
TNF- α (pg/ml)	0,345	0,165	-	-0,440	0,610	0,103	0,237	0,376	0,354	0,149
Adiponectina (ng/ml)	-0,289	-0,310	-0,440	-	-0,166	-0,231	-0,376	-0,111	-0,354	-0,264
hs-Proteina C reactivă (mg/l)	0,478	0,211	0,610	-0,166	-	0,016	0,459	0,365	0,264	0,238
Fibrinogen (mg/dl)	0,018	0,376	0,103	-0,231	0,016	-	0,014	0,089	0,116	0,124
Proteina carboni- lată (nmol/dl)	0,375	0,145	0,237	-0,376	0,459	0,014	-	0,305	0,143	0,200
MDA (ng/ml)	0,276	0,137	0,376	-0,111	0,365	0,089	0,305	-	0,471	0,460
8-isoprostan (pg/ml)	0,189	0,146	0,354	-0,354	0,264	0,116	0,143	0,471	-	0,134
Acid uric seric (mg/dl)	0,153	0,678	0,149	-0,264	0,238	0,124	0,200	0,460	0,134	-

Nivelul acidului uric seric în loturile studiate, precum și prevalența sa pe sexe, în fiecare lot, a fost următoarea: lotul I – pacienți cu DZT2 și SHNA: $7,10 \pm 1,65$ mg/dl ($7,73 \pm 1,18$ la bărbați (B); și $6,29 \pm 1,04$ la femeii (F)); lotul II – pacienți cu DZT2: $5,58 \pm 1,48$ mg/dl ($5,69 \pm 0,77$ la B; $5,014 \pm 0,43$ la F); Lotul III - martor: $4,74 \pm 1,02$ mg/dl. S-au evidențiat câteva diferențe semnificative statistic între loturi, la ambele sexe, și anume: lotul I B vs. lotul II B: $7,73 \pm 1,18$ vs. $5,69 \pm 0,77$, $p < 0,001$; lotul I B vs. lotul III (martor): $7,73 \pm 1,18$ vs. $4,74 \pm 1,02$, $p < 0,001$; lotul II B vs. lotul III (martor): $5,69 \pm 0,77$ vs. $4,74 \pm 1,02$, $p - ns$; lotul I F vs. lotul II F: $6,29 \pm 1,04$ vs. $5,014 \pm 0,43$, $p < 0,05$; lotul I F vs. lotul III (martor): $6,29 \pm 1,04$ vs. $4,74 \pm 1,02$, $p < 0,05$; lotul II F vs. lotul III (martor): $5,014 \pm 0,43$ vs. $4,74 \pm 1,02$, $p - ns$.

La analiza univariată, în lotul I nivelul seric al acidului uric s-a corelat pozitiv cu parametrii clinici următori: vârsta, IMC, CA, trigliceride, LDL-col, HTA, HbA1c, indicele HOMA-IR, durata/vechimea diabetului și scorul de risc cardiovascular UKPDS; iar în lotul II, nivelul seric al acidului uric s-a corelat pozitiv cu parametrii clinici următori: vârsta, IMC, CA, trigliceride, LDL-col, HTA, HbA1c, indicele HOMA-IR și durata/vechimea diabetului. În lotul III (martor) am observat corelații pozitive între acidul uric seric și vârstă, IMC, CA, trigliceride și LDL-col. La analiza multivariată, în lotul I nivelul seric al acidului uric s-a corelat pozitiv cu parametrii clinici următori: IMC, trigliceride și HbA1c; iar în lotul II, numai cu trigliceridele serice (cf. Tabel X).

Tabel X. Analiza multivariată între acidul uric seric și variabilele clinice și biochimice în loturile studiate

Variabile	Lotul I (DZT2 și SHNA)		Lotul II (DZT2)		Lotul III (Martor)	
	$\beta=0,46$	$p < 0,001$	$\beta=0,16$	p (ns)	$\beta=0,12$	p (ns)
IMC (kg/m ²)	$\beta=0,46$	$p < 0,001$	$\beta=0,16$	p (ns)	$\beta=0,12$	p (ns)
Trigliceride (mg/dl)	$\beta=0,31$	$p < 0,001$	$\beta=0,54$	$p < 0,001$	$\beta=0,07$	p (ns)
HbA1c (%)	$\beta=0,22$	$p < 0,001$	$\beta=0,10$	p (ns)	$\beta=0,09$	p (ns)

La analiza multivariată, în lotul I steatohepatita non-alcoolică a fost semnificativ asociată cu nivelul crescut al acidului uric seric ($\beta = 0,341$; $p < 0,05$), independent de vârstă ($p = 0,70$), sex ($p = 0,40$), IMC ($p = 0,30$), HTA ($p = 0,20$) și durata/vechimea diabetului ($p = 0,12$).

Concluzii

➤ Persoana cu DZT2 și SHNA:

- are vârsta medie de $59 \pm 8,4$ ani;
- prezintă obezitate (IMC mediu = $30,8$ kg/m²; CA = $105,8$ cm);
- este mai sedentară;
- prezintă dislipidemie aterogenă (TG crescute, HDL colesterol scăzut, LDL colesterol crescut);
- prezintă insulino-rezistență crescută (TG/HDL crescut, indice HOMA-IR crescut);
- prezintă cel mai adesea HTA (70%) și valori necontrolate;
- prezintă sindrom metabolic sever (90%), cel mai adesea cu 4 și 5 elemente componente (81%);
- prezintă un scor de risc cardiovascular UKPDS foarte crescut (BCA-39% și deces prin BCA-12,4%; AVC-25,6% și deces prin AVC-3,8%);
- face parte din clasa de risc cardiovascular înalt;
- prezintă un control slab al diabetului (valoare medie HbA1c de 7,85%);
- prezintă un nivel crescut al AST/ALT asociat cu nivelul crescut al TNF- α ; și creștere a gama GT asociată cu nivelul crescut al IL-1 β ;
- prezintă un nivel seric crescut al hs-PCR, asociat independent cu HOMA-IR;
- prezintă inflamație cronică subclinică și creștere a IL-6 asociată cu creșterea IMC, durata/vechimea diabetului, HOMA-IR și scorul de risc CV UKPDS.

- **La persoanele cu DZT2 și SHNA s-a constatat că:**
 - prezintă niveluri serice crescute de citokine pro-inflamatorii (IL-6, IL-1 β , TNF- α) și niveluri serice de adiponectină scăzute, cu protecție antiinflamatorie sistemică și hepatică redusă;
 - IL-6 este asociată independent cu: durata/vechimea diabetului, IMC, HOMA-IR și scorul de risc CV UKPDS;
 - IL-1 β este asociată independent cu IMC și gama GT;
 - TNF- α este asociat independent cu: durata/vechimea diabetului, CA, AST/ALT, HbA1c;
 - prezintă creșteri ale markerilor de stres oxidativ al proteinelor și peroxidării lipidice.
- **Persoanele cu DZT2 și SHNA prezintă o prevalență mare a hiperuricemiei;**
 - bărbații prezintă valori medii crescute ale acidului uric seric, comparativ cu femeile (7,73 mg/dl B vs. 6,29 mg/dl F) și respectiv o prevalență mai mare (65% B vs. 48% F).
- **Asocierea DZT2 cu SHNA produce o stare de inflamație cronică subclinică, cu implicații asupra riscului cardiometabolic global și impact asupra progresiei și severității bolii hepatice.**
- **Asocierea DZT2 cu SHNA încadrează pacientul în clasa de risc foarte înalt, cu un necesar de management clinic intens, precoce și multifactorial eficient.**

Studiu 2. Studiul nivelurilor serice ale osteoprotegerinei la pacienții cu diabet zaharat de tip 2 și diferite forme de ficat gras non-alcoolic ca biomarker de risc cardiovascular

Obiective: Scopul acestui studiu a fost de a investiga nivelurile serice ale OPG și semnificația acestora la un grup de pacienți cu DZT2 și FGNA în diferite grade de severitate, comparativ cu un grup echivalent de subiecți sănătoși (grup de control), precum și relația dintre aceste niveluri serice, afectarea hepatică și corelația cu factorii de risc cardiovascular clasici, la această categorie de pacienți.

Materiale și metode: În acest studiu transversal au fost incluși 150 de subiecți, din care 110 pacienți consecutivi cu DZT2 și 40 subiecți clinic sănătoși și echivalenți pacienților, alcătuind lotul martor. Grupul de pacienți diabetici a fost împărțit în 3 loturi: lotul 1: 35 pacienți cu DZT2 și steatohepatită non-alcoolică (SHNA); lotul 2: 38 pacienți cu DZT2 și steatoză simplă (SS); lotul 3: 37 pacienți cu DZT2 fără afectare hepatică (ficat normal). Diagnosticul afectării hepatice a utilizat ultrasonografia, testele hepatice, indexul de ficat gras, precum și un panel de biomarkeri serologici, predictorii ai fenotipului de SHNA pozitiv. Un număr redus de pacienți cu DZT2 ($n = 22$) au avut diagnostic histologic prin puncția biopsie hepatică (PBH), cu următoarea distribuție: 12 prezentau steatohepatită, 8 steatoză simplă și 2 ficat normal. Au fost determinați indicatori antropometrici și parametri clinici, biochimici, iar măsurarea serică bazală a OPG a fost efectuată prin tehnica ELISA sandwich.

Rezultate: Valoarea medie pentru nivelul seric al OPG la pacienții diabetici ($n = 110$) a fost $1894,33 \pm 334,66$ pg/ml, semnificativ mai mare comparativ cu cea găsită în lotul martor ($n = 40$), unde nivelul seric al OPG a fost de 1355 ± 212 pg/ml ($p < 0,001$). Cea mai mare valoare medie a nivelurilor serice ale OPG a fost găsită în lotul 1 de pacienți (cu DZT2 și SHNA) (2237 ± 455 pg/ml, $p < 0,001$), semnificativă statistic la compararea cu fiecare dintre celelalte grupuri de pacienți cu diabet zaharat (lot 1 vs. lot martor; lot 2 vs. lot martor; lot 3 vs. lot martor). În lotul 1, OPG serică s-a corelat pozitiv cu: vârsta ($r = 0,38$; $p = 0,013$); circumferința abdominală ($r = 0,391$; $p = 0,031$); hipertensiunea ($r = 0,451$; $p = 0,03$); glicemia bazală ($r = 0,341$; $p = 0,012$); hs-PCR ($r = 0,47$; $p = 0,02$); fibrinogenul ($r = 0,25$; $p = 0,03$); IL-6 ($r = 0,776$; $p = 0,02$); NT-proBNP ($r = 0,301$; $p = 0,027$); prezența nefropatiei diabetice – microalbuminuria ($r = 0,219$; $p = 0,012$) și macroalbuminuria ($r = 0,451$; $p = 0,021$); și respectiv cu scorul mediu de risc cardiovascular UKPDS ($r = 0,42$; $p = 0,001$). Corelații negative s-au găsit între nivelurile serice ale OPG și eRFG ($r = -0,29$; $p = 0,019$), respectiv adiponectina ($r = -0,478$; $p = 0,022$). OPG nu s-a corelat cu următorii parametri: sex ($r = 0,012$; $p = 0,55$); IMC ($r = 0,345$; $p = 0,067$); transaminazele crescute ($r = 0,245$; $p = 0,06$); și nici cu HbA1c ($r = 0,06$; $p = 0,58$).

Concluzii: Concentrația serică de OPG este semnificativ mai crescută la subiecții cu DZT2 comparativ cu lotul martor, iar prezența FGNA și SHNA tinde să crească și mai mult valorile OPG. Corelațiile ating magnitudinea cea mai ridicată la pacienții cu DZT2 și SHNA (lotul 1). Nivelul seric al OPG la persoanele cu DZT2 și SHNA se corelează cu nefropatia diabetică, NT-proBNP, nivelul markerilor serici de inflamație cronică subclinică, și respectiv cu scorul mediu de risc cardiovascular UKPDS, întărind astfel rolul OPG ca potențial biomarker pentru riscul de boală cardiovasculară la această categorie de pacienți.

Studiu 3. Studiul aterosclerozei carotidiene semnificative simptomatică și asimptomatică la pacienți cu DZT2 și SHNA

Obiective: Scopul acestui studiu a urmărit evaluarea prevalenței și severității aterosclerozei carotidiene – simptomatică sau asimptomatică – la pacienții *high-risk* cu diabet zaharat de tip 2 și steatohepatită non-alcoolică, în comparație cu pacienții cu diabet zaharat de tip 2, cu ficat normal.

Materiale si metode: Acest studiu transversal a inclus 107 pacienți consecutivi cu DZT2, cu fenotip de SHNA pozitiv, și 110 pacienți consecutivi cu DZT2 fără afectare hepatică (grupul de control). Metode neinvazive precum ultrasonografia, teste funcționale hepatice și biomarkeri serologici, au fost utilizate pentru stabilirea diagnosticului de FGNA și SHNA. La examinarea ultrasonografică a ficatului, pacienții diabetici din grupul de control nu au prezentat afectare hepatică sau modificări caracteristice FGNA, și nici modificări ale testelor de laborator. Ecografia la nivel carotidian s-a efectuat la ambele grupuri de pacienți, alături de o serie de teste biochimice (transaminaze hepatice, glicemia bazală, HbA1c, panelul lipidic, hs-PCR) și determinarea unui panel de biomarkeri serologici, indicativi de SHNA (citokina pro-inflamatorie IL-6, și cea antiinflamatorie – adiponectina).

Rezultate: În grupul de studiu (DZT2 și SHNA) unde pacienții au prezentat un control slab al diabetului și o durată a DZT2 mai mare de 10 ani, am identificat 34 de pacienți (31,78%) cu stenoză carotidiană semnificativă simptomatică și asimptomatică, vs. 11 pacienți (10%) din grupul de control (DZT2 fără afectare hepatică), $p < 0,001$. Prevalența aterosclerozei carotidiene non-obstructive a fost de asemenea semnificativ diferită din punct de vedere statistic, în cele două grupuri de pacienți cu diabet zaharat (61,68% [grupul de studiu] vs. 42,73% [grupul de control]; $p = 0,001$). Ateroscleroza carotidiană a fost prezentă la 100 de pacienți (93,45%) din grupul de studiu (DZT2 și SHNA), și respectiv la 58 de subiecți (52,73%) din grupul de control. De asemenea, s-a evidențiat un nivel ridicat al hs-PCR, cu semnificație statistică, la pacienții din grupul de studiu (DZT2 și SHNA), care au prezentat ateroscleroză carotidiană simptomatică și asimptomatică, comparativ cu pacienții din grupul de control (DZT2 fără afectare hepatică).

Concluzii: Pacienții cu DZT2 și SHNA, comparativ cu cei cu DZT2 fără afectare hepatică, prezintă o prevalență crescută a aterosclerozei carotidiene severe, cu frecvență mai mare a leziunilor aterosclerotice semnificative – simptomatice și asimptomatice. La această categorie de pacienți (DZT2 și SHNA), nivelul inflamației cronice subclinice (hs-PCR) este foarte ridicat și se asociază cu severitatea leziunilor aterosclerotice, subliniind necesitatea unui *screening* activ pentru diagnosticarea leziunilor macroangiopatice la nivel carotidian, dar și în alte teritorii vasculare (coronare, artere periferice), urmat de un management clinic precoce, intensiv și multifactorial eficient.

Concluzii generale:

➤ Persoana cu DZT2 și SHNA:

- Prezintă obezitate abdominală și un stil de viață preponderent sedentar;
- Prezintă dislipidemie aterogenă, trigliceride crescute și HDL colesterol scăzut;
- Prezintă indicatori de insulino-rezistență crescuți;
- Prezintă hipertensiune arterială cu valori necontrolate;
- Prezintă sindrom metabolic sever, cumulând cel mai adesea 4-5 componente de diagnostic de SM;
- Prezintă un scor estimat de risc cardiovascular foarte crescut pentru BCA și AVC, și risc înalt de mortalitate prin ambele cauze;
- Face parte din clasa de risc cardiovascular foarte înalt;
- Are un control nesatisfăcător al DZT2 (HbA1c = 7,85%);
- Prezintă o creștere a testelor funcționale hepatice (AST/ALT) care se corelează cu nivelul crescut al gama GT, IL-6, TNF- α și IL-1 β ;
- Prezintă un nivel seric al hs-PCR puternic corelat cu HOMA-IR;
- Nivelul seric al IL-6 se corelează cu: durata/vechimea diabetului, HOMA-IR și scorul de risc cardiovascular UKPDS;

- **Persoanele cu DZT2 și SHNA:**
 - Prezintă niveluri serice crescute de citokine pro-inflamatorii (IL-6, IL-1 β , TNF- α) cu semnificație de inflamație cronică sistemică și hepatică;
 - Prezintă niveluri serice de adiponectină scăzute, cu protecție antiinflamatorie sistemică și hepatică redusă;
 - Nivelul seric al IL-6 este un factor asociat independent cu: durata/vechimea diabetului, IMC, HOMA-IR și scorul de risc cardiovascular UKPDS;
 - Nivelul seric al IL-1 β este asociat independent cu: obezitatea abdominală și gama GT;
 - Nivelul seric al TNF- α est asociat independent cu durata/vechimea diabetului, obezitatea abdominală, transaminazele hepatice și gradul de control al diabetului;
 - Prezintă markeri de stres oxidativ în exces, atât pe linia oxidării proteinelor – proces de carbonilare – cât și sub aspectul peroxidării lipidelor;
 - Prezintă o prevalență mare a hiperuricemiei, cu valori medii mai mari la bărbați decât la femei, și prevalență mai crescută comparativ cu populația control;
- Asocierea DZT2 cu SHNA generează o stare de inflamație cronică subclinică cu implicații asupra riscului cardiometabolic global și impact asupra progresiei și severității afectării hepatice;
- Asocierea DZT2 cu SHNA încadrează pacientul în clasa de risc cardiovascular foarte înalt, necesitând un management clinic precoce, intens și multifactorial eficient;
- Nivelul seric al OPG este semnificativ crescut la pacienții cu DZT2 și SHNA, și se corelează pozitiv și independent cu factori de risc cardiovascular (microalbuminuria și macroalbuminuria), markeri ai inflamației cronice subclinice (hs-PCR, IL-6), hipoadiponectinemia și markeri ai disfuncției miocardice (NT-proBNP);
- La pacienții cu DZT2 și SHNA, creșterea serică a OPG se corelează independent cu scorul de risc cardiovascular UKPDS;
- Nivelul seric crescut al OPG la pacienții cu DZT2 și SHNA, prin corelațiile pozitive cu factori de risc cardiovascular validați, demonstrează potențialul osteoprotegerinei ca biomarker pentru riscul de BCV;
- La pacienții cu DZT2 și SHNA, afectarea macroangiopatică aterosclerotică a carotidelor prezintă o prevalență crescută și este mai severă;
- Leziunile aterosclerotice carotidiene semnificative simptomatice și asimptomatice sunt mai frecvente;
- Pacienții cu DZT2 și SHNA cu prevalență crescută a macroangiopatiei aterosclerotice carotidiene cumulează un număr mare de factori de risc cardiovascular tradiționali (obezitate abdominală, HTA, control scăzut al valorilor tensionale, dislipidemie, stil de viață sedentar);
- Prevalența și severitatea crescută a aterosclerozei carotidiene se asociază cu un nivel ridicat al inflamației sistemice cronice subclinice (hs-PCR, fibrinogen, IL-6) și valori mult scăzute ale adiponectinemiei;
- Severitatea leziunilor aterosclerotice și prevalența crescută la nivel carotidian necesită un *screening* activ de diagnosticare a macroangiopatiei carotidiene, dar și cu localizare coronariană și periferică, urmată de un management clinic precoce, intens și multifactorial eficient.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Teza își dovedește originalitatea prin conturarea profilului de risc cardiovascular al pacientului cu DZT2 și SHNA sub aspect clinic și biologic, descriind modificări sistemice precum inflamația cronică subclinică reprezentată de citokinele pro-inflamatorii IL-6, IL-1 β și TNF- α ; diminuarea protecției antiaterogene prin hipoadiponectinemie; creșterea markerilor de stres oxidativ cu efect asupra structurilor proteice prin procesul de carbonilare și peroxidarea lipidică (determinarea 8-isoprostanului) – toate aceste modificări exercitând un impact asupra riscului cardiometabolic global și generând morbiditate și mortalitate cardiovasculară însemnate, în rândurile acestor pacienți.

Pentru prima dată se studiază nivelurile serice ale osteoprotegerinei la pacienții cu DZT2 și SHNA și se demonstrează că niveluri serice crescute ale OPG se corelează semnificativ și independent cu nivelul micro- și macroalbuminuriei, cu nivelul NT-proBNP seric – marker de disfuncție miocardică, cu scorul de risc cardiovascular UKPDS, argumente care susțin astfel valoarea osteoprotegerinei ca biomarker seric pentru boala cardiovasculară aterosclerotică.

În plus, utilitatea practică a tezei se evidențiază prin argumentarea pragmatică a necesității de *screening* activ al plăcilor aterosclerotice carotidiene la pacienții cu DZT2 și SHNA, unde severitatea și extinderea macroangiopatiei se explică prin amplificarea riscului cardiometabolic rezultat din asocierea factorilor de risc cardiovascular clasici cu modificarea parametrilor funcționali hepatici, cu creșterea componentelor de inflamație cronică subclinică, cu diminuarea protecției antiaterogene datorită hipoadiponectiniei, și respectiv cu creșterea stresului oxidativ.

DOCTORAL DISSERTATION ABSTRACT

Cardiometabolic risk in non-alcoholic steatohepatitis and type 2 diabetes mellitus

Doctoral student **Florin-Eugen Casoinic**

Doctoral supervisor **Prof. Dr. Nicolae Hâncu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
LITERATURE REVIEW	15
1. Type 2 diabetes mellitus (DMT2) in adults	17
1.1. Definition and overview	17
1.2. Epidemiology	19
1.2.1. Prevalence	20
1.2.2. Mortality	21
1.3. Diagnosis criteria	21
1.4. Heredity of DMT2	22
1.5. Pathogenesis	23
1.5.1. Pathogenesis of pancreatic β cell failure	23
1.6. Dynamics of diabetogenesis	26
1.7. Complexity of diabetogenesis	26
1.8. Chronic microvascular complications	27
1.9. Macrovascular complications and cardiovascular risk factors	28
1.9.1. Macrovascular complications	28
1.9.2. Cardiovascular risk in diabetes mellitus	29
1.9.3. Global cardiometabolic risk	30
2. Non-alcoholic fatty liver disease	31
2.1. Definition and nosological classification	31
2.2. Epidemiology	32
2.3. Pathogenesis	34
2.3.1. Hepatic steatosis and insulin resistance	34
2.3.2. Lipotoxicity	34
2.3.3. Stress at the endoplasmic reticulum level	35
2.3.4. Interactions between adipose tissue and hepatocytes: adipocytokines	35
2.3.5. Role of cytokines in NAFLD and NASH	36
2.4. NAFLD diagnosis	43
2.4.1. Laboratory tests	43
3. Cardiovascular risk (CVR) associated with DMT2, NAFLD, and NASH	45
3.1. Epidemiology of cardiovascular disease and NAFLD	45
3.2. Association of NAFLD with CVD: findings	45
3.2.1. Cardiovascular risk in NASH	45
3.2.2. Studies on carotid disease	46
3.2.3. Studies on cardiac function in NAFLD	46
3.2.4. Studies on endothelial dysfunction and myocardial metabolism in NAFLD	47
3.3. Pathogenesis of cardiovascular disease in NAFLD	47
3.3.1. Insulin resistance	47
3.3.2. Visceral fat	48
3.3.3. Inflammation	49
3.3.4. Dyslipidemia	50
3.4. Osteoprotegerin and cardiovascular risk	50
3.5. Uric acid and cardiovascular risk	51
PERSONAL CONTRIBUTIONS	53
1. Hypotheses / specific aims	55
2. General methodology	57
3. Study 1. Traditional cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes and non-alcoholic steatohepatitis: The level of systemic inflammation and oxidative stress markers	59
3.1. Introduction	59
3.2. Assumptions and objectives	61

3.3. Materials and methods	61
3.3.1. Patients	61
3.3.2. Clinical examination	61
3.3.3. Assessment of the metabolic syndrome	63
3.3.4. Determination of the markers of systemic inflammation	64
3.3.5. Determination of serum markers of oxidative stress balance	64
3.3.6. Diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease	65
3.3.7. Statistical analysis	66
3.4. Results	66
3.5. Discussion	88
3.6. Conclusions	95
Study 2. Serum osteoprotegerin levels in patients with type 2 diabetes and various forms of non-alcoholic fatty liver, as a biomarker for risk of cardiovascular disease	97
4.1. Introduction	97
4.2. Assumptions and objectives	98
4.3. Materials and methods	99
4.3.1. Patients	99
4.3.2. Method	99
4.3.3. Statistical analysis	101
4.4. Results	101
4.5. Discussion	109
4.6. Conclusions	112
5. Study 3. Symptomatic and asymptomatic significant carotid atherosclerosis in patients with DMT2 and NASH	113
5.1. Introduction	113
5.2. Assumptions and objectives	113
5.3. Materials and methods	114
5.3.1. Patients	114
5.3.2. Clinical and laboratory measurements	114
5.3.3. Carotid ultrasound	115
5.3.4. Statistical analysis	116
5.4. Results	116
5.5. Discussion	119
5.6. Conclusions	120
6. General conclusions	122
7. Originality and innovative contributions of the dissertation	124
REFERENCES	127

Keywords: non-alcoholic fatty liver disease; non-alcoholic steatohepatitis; type 2 diabetes mellitus; cardiometabolic risk; markers of chronic subclinical systemic inflammation; markers of oxidative stress; osteoprotegerin; albuminuria; UKPDS cardiovascular risk score; intima-media thickness; significant carotid atherosclerosis.

References: 384.

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a major health problem worldwide, and is considered the most common chronic non-communicable disease. DM epidemic is developing in parallel with the sharp rise in obesity prevalence, sedentary and diabetogenic and pro-atherogenic risk lifestyle.

The prevalence of chronic complications and comorbidities associated with diabetes is very high. The International Diabetes Federation (IDF) estimates that over 50% of people with diabetes (in some studies) have at least one complication of the disease at diagnosis. In type 2 diabetes mellitus (DMT2), over 90% of patients are overweight and obese, which indicates, from an epidemiological standpoint, the association between obesity and the onset of diabetes.

Cardiovascular disease is the leading cause of mortality in patients with diabetes, especially by atherosclerotic coronary disease. According to IDF, the adult persons with DMT2 exhibit 2 to 4 times higher mortality than those without diabetes. In addition, life expectancy in people with DMT2 is reduced by 5 to 10 years compared to non-diabetics, the excess mortality being due primarily to cardiovascular disease.

The main manifestations of cardiovascular disease (CVD) are in the form of coronary arterial disease (CAD), stroke, and peripheral arterial disease. All of these forms of CVD share atherosclerosis as a common pathological substrate in combination with additional risk factors.

Mortality from cardiovascular cause in people with diabetes reaches 75-80%, of which 50% is due to atherosclerotic coronary artery disease, and 15% to strokes. Chronic microvascular complications are represented by diabetic retinopathy, diabetic nephropathy, and diabetic neuropathy. They are often present, even at the time of DMT2 diagnosis, with variable prevalence between studies. Chronic microvascular complications have a subclinical evolution, most frequently remain undiagnosed, often with dramatic consequences, and require appropriate screening methods.

The current epidemiological phenomenon, marked by increasing overweight status, obesity, and DMT2, is amplified by associating the growing prevalence of metabolic syndrome (MS) with that of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), regarded as a "liver epidemic" with similar global expansion, often undiagnosed, and as yet without treatment.

Currently, it is considered that NAFLD is the most common liver disease in the world, with increasing incidence even in children, due to the epidemic of overweight, obesity, and DMT2. Epidemiological data draws attention to the central role that liver plays in the metabolic pathology, thanks to its independent association with two of the most prevalent chronic diseases, namely DMT2 and atherosclerotic coronary disease.

Moreover, epidemiological studies in patients with non-alcoholic fatty liver indicated that the risk of cardiovascular disease increases significantly, independent of diabetes and other risk factors. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) – the severe form of NAFLD and diagnosed by liver biopsy – was associated with risk of rapid progression of cardiovascular disease, in several large longitudinal studies. In addition, NASH was found to be associated with subclinical atherosclerosis manifested by endothelial dysfunction, increased intima-media thickness, and atherosclerotic plaques, at both carotid and coronary level; associated with the instability of atherosclerotic plaque – the "vulnerable plaque"; with the increase of calcium score of coronary arteries; with the decrease of coronary flow reserve; and with the change of myocardial energetic metabolism, respectively.

Cardiometabolic risk – defined as the sum of the risk factors associated with cardiovascular risk and the risk of diabetes onset – is amplified with the emergence, development and progression of steatohepatitis, with whom it shares the insulin resistance, both peripheral and hepatic.

In multiple studies, it was argued that NAFLD is the hepatic manifestation of MS itself, which includes components such as central obesity, hypertension (HT), impaired glucose tolerance/DMT2, hypertriglyceridemia, or low HDL cholesterol; these elements are considered individually and all together as atherosclerosis risk factors.

Given that DM is the largest reservoir of cardiovascular risk factors with continuous action, and the emergence and development of NASH which adds components of systemic inflammation, oxidative stress, and metabolic disorders, a further increase of the preexistent cardiometabolic risk is expected. While overnutrition and obesity are fundamentally involved in the emergence of simple fatty liver disease, it remains unclear why 10% of all people with fatty liver develop the "inflammatory" phenotype (i.e., NASH). It is increasingly acknowledged that the cell-synthesized soluble mediators of the immune system (cytokines, chemokines) and fat cells (adipocytokines) are involved in NAFLD, its progression, and in the regulation of insulin-resistance.

In the current literature, a great number of studies on the level of cytokines and adipocytokines in patients with NASH were conducted on Asian and Western subjects without diabetes. Few studies have focused on diabetic patients with NASH. And most often, these studies present conflicting evidence regarding cytokines, their role, and their possible correlations with various clinical and biochemical parameters. Moreover, very few studies have addressed the link between pro-inflammatory cytokines and the severity of liver disease represented by NAFLD.

Osteoprotegerin (OPG) is a soluble protein, belonging to a superfamily of receptors of the tumor necrosis factor (TNF), acting as soluble pseudoreceptor for the receptor activator of ligand nuclear factor kappa B - RANKL (receptor-activator of nuclear factor kappa B ligand), to prevent the activation of osteoclasts and thus bone resorption. In various studies, it was noted that OPG acts as a decoy receptor, preventing the activation of nuclear factor kappa B (NF-kB), one of the main signaling proinflammatory pathways, mainly due to induction of proinflammatory gene expression, with production of cytokines, chemokines, and adhesion molecules.

The inhibitory action of NF-kB on proinflammatory pathway is an important part in the regulation of bone metabolism, but it also exerts significant metabolic effects. On the one hand, OPG exerts an anti-inflammatory action and, on the other hand, an anti-apoptotic action that prevents the programmed cell death.

Since OPG mRNA is present also in the arterial wall, it was suggested that increased serum levels of OPG reflect a high OPG content in the arterial wall, in patients with diabetes. Other studies have identified an increased content of OPG in the calcified coronary plaques as well, and this presence has been associated with the severity of coronary artery disease and the incidence of cardiovascular events, independent of conventional risk factors. This data indicates that increased levels of serum OPG represent a biomarker of atherosclerotic lesions. Moreover, increased levels of OPG have been reported both in patients with unstable angina, and in patients with acute myocardial infarction.

Uric acid is the main urinary metabolite of purine in humans, and numerous epidemiological studies reported a correlation between serum uric acid levels and hypertension, metabolic syndrome (MS), atherosclerotic coronary artery disease, cerebrovascular disease, vascular dementia, preeclampsia, and chronic kidney disease. High levels of serum uric acid (SUA) were associated with cardiovascular morbidity and mortality even in low-risk subjects. Hyperuricemia indicates an increased risk of coronary heart disease and the incidence of, and mortality by stroke, with higher mortality rate among women. A number of studies suggest that hyperuricemia has various effects such as endothelial dysfunction, oxidative and inflammatory changes induced at the adipocyte level, as well as a protective action as a result of allopurinol treatment.

Based on these premises, the present study sought to examine the links between the pro- and anti-inflammatory cytokines, oxidative stress, and components of cardiometabolic risk in patients with NASH and diabetes, in our country. The results of this study will contribute to completing and enriching the literature with new data on the level of the markers of systemic inflammation and of oxidative stress, in patients with type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic steatohepatitis.

PERSONAL CONTRIBUTIONS

Study 1. Traditional cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes and non-alcoholic steatohepatitis: The level of systemic inflammation and oxidative stress markers

Objectives: This study has sought to assess the cardiovascular risk profile, the prevalence of metabolic syndrome and its components, the demographic, clinical and biological data, and to estimate the UKPDS cardiovascular risk score, with categorization in risk classes. In addition, the study examined the systemic inflammatory profile (inflammatory cytokines: IL-6, IL-1 β , and TNF- α), the antiinflammatory profile (serum adiponectin), and the status of the oxidative stress, by determining some markers of protein oxidative stress, lipid peroxidation, and markers of oxidative stress of serum uric acid, respectively, in patients with DMT2 and NASH.

Materials and Methods: The population in this study included 165 participants, of which 115 consecutive patients with DMT2, some with NASH, and the rest representing the control group, without liver disease, 50 clinically healthy subjects without personal pathological antecedents. The segment of patients who were hospitalized, diagnosed and under observation of Clinica Medicala IV, included the following groups: group I consisted of 60 patients with NASH and DMT2; group II consisted of 55 patients with DMT2 and without NAFLD; and group III consisted of 50 clinically healthy subjects – the control group.

Healthy subjects in the control group were recruited from among persons recorded in the CF Cluj-Napoca Polyclinic, Traffic Safety Service. For each subject included in the study, we recorded a detailed history on their demographics, family history and personal pathological antecedents, lifestyle, diet, exercise, smoking status, and alcohol consumption, respectively.

The clinical examination included: age, sex, anthropometric indicators (weight, height, waist circumference), we calculated the body mass index (BMI), were recorded the following traditional cardiovascular risk factors: family history, presence of hypertension, dyslipidemia, diabetes, hyperuricemia, current medication (antidiabetic, antihypertensive, lipid-lowering, other), and the food survey. Hypertension was defined as: SBP \geq 130 mmHg, or DBP \geq 85 mmHg, or antihypertensive treatment declared by patient. For each subject was determined the electrocardiographic route (ECG), which allowed for the diagnosis of atrial fibrillation. To assess the prevalence of metabolic syndrome, we used the definition criteria from the 2009 Consensus (Alberti et al). The UKPDS engine was used to assess the UKPDS cardiovascular risk score in people with DMT2, relative to mortality by coronary and cerebrovascular causes.

The diagnosis of DMT2 was established on the basis of the ADA definition criteria, in due observance of fasting, and determination of fasting plasma glucose, glycated hemoglobin (HbA1c), basal insulinemia, and the status of insulin resistance measured by means of HOMA-IR index.

For all study participants, blood samples were collected in the morning, *à jeun*, after 12 hours of digestive rest. Blood samples were collected for the following determinations: liver function tests (transaminase, AST, ALT, gamma GT, alkaline phosphatase), and the panel of the lipid profile (total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol, triglycerides).

For systemic inflammation, were determined the following: high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), with normal values in the range of 1-3 mg/l; serum fibrinogen with normal values in the range of 150-300 mg/dl; and the pro-inflammatory cytokines, IL-6, IL-1 β and TNF- α , were determined using the ELISA sandwich kit, as follows: Human IL-6 DuoSet ELISA, Human IL-1 β DuoSet ELISA, Human TNF- α DuoSet ELISA. Serum adiponectin levels were determined by means of the Total Human adiponectin/ARP 30 Quantikine ELISA kit. All determinations using ultrasensitive kits were performed in dual sample, following the instructions of the manufacturing company.

Determination of serum markers of oxidative stress for protein oxidation – protein carbonyl, was done using the Protein Carbonyl Colorimetric Assay Kit, produced by Cayman Chemical Company, and the level of lipid oxidation was determined by means of 8-Isoprostane EIA Kit, which has measured the 8-

isoprostane serum levels (8-epi-PGF 2 α), an indicator of lipid peroxidation. The serum malondialdehyde level, a marker of lipid oxidation, was determined by means of thiobarbituric acid, and serum uric acid was determined spectrophotometrically, by the method of uricase (Roche Diagnostics Corporation).

The diagnosis of non-alcoholic fatty liver was established by liver function tests and ultrasound, with the characteristic elements of the pattern for steatosis. In addition, were used serological biomarkers such as adiponectin and IL-6, as a noninvasive method for the positive phenotype for NASH, and a small number of patients had histologic diagnosis by liver biopsy, with the following distribution: 12 patients with steatohepatitis, 8 with simple steatosis, and 2 with normal liver.

To analyze the normality of distribution for quantitative variables, we used the Kolmogorov-Smirnov test. Variables with normal distribution were represented as mean \pm standard deviation, those with non-normal distribution were represented as median (quartile 1 and 3), and categorical variables (nominal) were expressed as percentages and frequency. Differences between the means for the continue quantitative variables were assessed using the Student t test. For the variables with non-Gaussian distribution, were used non-parametric tests (Mann-Whitney U test). To compare the differences between three or more groups, we used the one-way ANOVA test for quantitative variables with normal distribution, and for those with non-normal distribution or ordinal, we used the Kruskal-Wallis test. Univariate and multivariate logistic regression was used to test the predictive independent factors, using SAS 9.4. To determine the linear relationship between the study variables, we used the Pearson and Spearman correlation tests. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results: Of the 165 subjects included in this study, the gender distribution was: 96 (58.18%) men and 69 (41.81%) women. In each group, gender ditributor was as follows: Men: Group I - 33/60 (55.4%), group II - 34/55 (62.3%), group III (control) - 29/50 (59.1%); Women: Group I - 27/60 (44.6%), group II - 21/55 (37.7%), group III (control) - 21/50 (40.9%); when comparing the gender distribution (men-women), the study groups were found homogeneous. The average age of participants in this study was 58 ± 10.1 years, and the average age in each group were: group I: 59 ± 8.4 years; group II: 58.5 ± 6.5 years; and in the control group: 57.75 ± 2.2 years, without statistical significance.

The average waist circumference (WC) in group I (DMT2 and NASH) was 105.8 ± 11.1 cm; in group II (DMT2) it was 99.14 ± 14.7 cm; and in the control group, the average WC was 90.7 ± 9.3 cm, which indicates statistically significant differences: group I vs. group II ($p = 0.031$); group I vs. group III (control) ($p = 0.011$); group II vs. group III (control) ($p = 0.022$).

Subjects included in this study had BMI values over 25 kg/m^2 (overweight and obese) at a rate of 88.33% (group I), 72.72% (group II) and 62% (control group). The proportion of overweight patients (BMI = $25 - 29.9 \text{ kg/m}^2$) was 45% in group I; 34.54% in group II; and 56% in the control group; and the proportion of obese patients (BMI $> 30 \text{ kg/m}^2$) was 43.33% in group I; 38.18% in group II; and 6% in the control group (group III). The results show statistical significance for overweight and obesity in the patients with DMT2 and NASH vs. the second group and the control group ($p = 0.001$ for group I vs. group II; and $p = 0.003$ for group I vs. control group).

The average duration of diabetes was 14.2 years in patients with DMT2 and NASH (group I), and 13.3 years in DMT2 patients (group II), with no statistically significant difference between groups ($p = 0.067$). The mean hypertension value in group I was 141.5 ± 35.4 mmHg SBP vs. 135.6 ± 4.7 mmHg in group II ($p = 0.013$), and in the control group the mean SBP was 128.1 ± 2.2 mmHg ($p = 0.009$ group I vs. group III; and $p = 0.04$ group II vs. group III). The mean value for DBP in group I was 87.2 ± 6.1 mmHg vs. 82.0 ± 2.8 mmHg in group II and control group 79.1 ± 2.4 ($p = 0.035$ group I vs. group II; $p = 0.02$ group I vs. group III; $p = 0.042$ group II vs. Group III). The values for SBP/DBP were outside the range of optimal values indicated for the patients with DMT2. The prevalence of hypertension by groups was 70% in group I, and 56.36% in group II ($p = 0.01$).

Atherogenic dyslipidemia (low HDL cholesterol and elevated TGO, Reaven ratio (TG/HDL) increased) was manifested in groups I and II with the following prevalence: group I = 83.5%; group II = 69%, $p < 0.05$. In

terms of biochemical parameters, in group I, there was a slight increase in transaminases (AST = 59.3 ± 3.9 ; ALT = 62 ± 6.3) and gamma GT (68 ± 4.5), yet statistically significant compared to group II (AST = 31 ± 1.7 ; ALT = 35 ± 3.1 ; gamma GT = 45 ± 5.2) ($p < 0.05$). The panel lipid components – increased levels of TG in group I vs. II (239 ± 41.5 vs. 174.3 ± 22.9 ; $p < 0.05$) and low HDL cholesterol (36.9 ± 4.2 vs. 41.8 ± 4.7 ; $p < 0.05$), and the Reaven ratio, a marker of insulin resistance (TG/HDL) was 6.47 vs. 4.16, $p < 0.05$ – indicates a significantly increased atherogenic dyslipidemia in the patients with DMT2 and NASH (group I) vs. DMT2 patients without liver impairment (group II) and control group (group III). LDL cholesterol was significantly increased in group I vs. Group II (137.5 ± 9.3 vs. 125.4 ± 2.9 ; $p < 0.05$), and each group of patients, compared with the control group (113.1 ± 33) showed statistical significance ($p < 0.05$). For groups I and II, the values for lipid components are outside the range of optimum values indicated for patients with DMT2.

Fasting plasma glucose had the following average values: 148 ± 22.25 (group I), 129 ± 14.7 (group II) and 97.5 ± 9.4 (group III), and statistically significant differences were observed between the two groups of diabetic patients and the control group ($p < 0.05$), but no statistical significance between groups I and II ($p = 0.051$). HbA1c was higher in group I (7.85 ± 6.9) vs. group II (6.95 ± 3.1), compared with controls (5.8 ± 1.5), with statistical significance between HbA1c level in group I vs. group II ($p < 0.05$), indicating a weaker metabolic control in patients from group I.

HOMA-IR index displayed non-normal distribution, and the distribution by groups indicated higher values in group I (6.9) than in group II (3.45), $p < 0.001$. By univariate analysis for HOMA-IR in group I, we found positive correlations with BMI ($r = 0.258$; $p = 0.035$); with WC ($r = 0.372$; $p = 0.023$); ALT ($r = 0.302$; $p = 0.02$), and gamma GT ($r = 0.318$; $p = 0.026$). In group II, HOMA-IR was positively correlated with BMI ($r = 0.203$; $p = 0.04$) and WC ($r = 0.311$; $p = 0.035$). In both groups, HOMA-IR was positively correlated with hs-CRP, as follows: group I: $r = 0.384$; $p < 0.001$; and group II: $r = 0.286$; $p = 0.018$, respectively.

Multiple linear regression analysis for HOMA-IR and the associated variables, indicates hs-CRP as the only independent factor associated with HOMA-IR, in group I ($p = 0.001$). However, this correlation was not preserved in group II ($p = 0.07$).

UKPDS risk score for coronary atherosclerotic disease (CAD) in group I (DMT2 and NASH) was 39.04% vs. 23.8% ($p = 0.003$) in DMT2 patients without liver impairment (group II). The risk of death from CAD was 12.4% (group I) vs. 5.9% (group II) ($p = 0.023$). The risk of stroke was 25.6% (group I) vs. 16.4% (group II) ($p < 0.05$), and the risk of death from stroke was 3.8% (group I) vs. 1.9% (group II) ($p < 0.05$). These average values of UKPDS cardiovascular risk score suggest that group I of patients (DMT2 and NASH) falls in the high risk class, with statistical significance when compared to group II.

Serum level of IL-6 in group I was 134.83 ± 57.18 to pg/ml vs. 55.68 ± 18.29 pg/ml in group II, indicating an increase of more than 11 times the normal value in group I, and an increase of almost 5 times the normal value in group II, thus indicating the state of systemic inflammation. Similar increases were found also for IL-1 β and TNF- α in groups I and II vs. controls, with values which increased the most in group I (DMT2 and NASH): IL-1 β (group I: 73.45 ± 15.11 pg/ml vs. 22.07 ± 9.17 pg/ml group II, $p = 0.001$); TNF- α (group I: 60.88 ± 12.31 pg/ml vs. 18.81 ± 7.25 pg/ml group II, $p = 0.021$). Serum adiponectin reached the level of 3950.5 ± 954 ng/ml in group I vs. group II (6745 ± 1122 ng/ml, $p = 0.002$).

In group I, univariate analysis indicates that serum levels of IL-6 was positively correlated with clinical parameters (WC, BMI, duration of diabetes, hypertension) and laboratory parameters (TG, LDL cholesterol, ALT, HbA1c, and HOMA-IR index); IL-6 serum level was found positively correlated with UKPDS cardiovascular risk score; IL-6 correlated negatively with HDL cholesterol and adiponectin. Multivariate analysis indicates that serum IL-6 was significantly and independently associated with the following factors: duration of diabetes, BMI, HOMA-IR index, and UKPDS risk score (in group I), while in group II, serum IL-6 was significantly and independently associated with HOMA-IR index and UKPDS risk score (Table I).

Table I. Results of multivariate analysis between IL-6 and clinical and biochemical variables

Variable	Group I (DMT2 and NASH)		Group II (DMT2)		Group III (Controls)	
	β	p	β	p	β	p
BMI (kg/m ²)	$\beta = 0.331$	$p < 0.001$	$\beta = 0.091$	p (ns)	$\beta = 0.083$	p (ns)
Duration of diabetes (years)	$\beta = 0.273$	$p < 0.001$	$\beta = 0.073$	p (ns)	$\beta = 0.089$	p (ns)
HOMA-IR index	$\beta = 0.221$	$p < 0.001$	$\beta = 0.219$	$p < 0.001$	$\beta = 0.078$	p (ns)
UKPDS score	$\beta = 0.248$	$p < 0.001$	$\beta = 0.253$	$p < 0.001$	-	-

Univariate analysis indicates that in group I, IL-1 β serum levels were positively correlated with the following clinical parameters: BMI, WC, ALT, AST, gamma GT, LDL cholesterol, hypertension, and HOMA-IR index; IL-1 β serum levels did not correlate significantly with the UKPDS cardiovascular risk score ($r = 0.119$; $p > 0.05$). Multivariate analysis shows that in group I, IL-1 β serum levels were significantly associated with increased BMI ($\beta = 0.415$; $p < 0.001$) and gamma GT ($\beta = 0.326$; $p < 0.001$). In group II, we found no statistically significant correlation between IL-1 β serum levels and clinical and laboratory parameters studied here (Table II).

Table II. Results of multivariate analysis between IL-1 and clinical and biochemical variables

Variable	Group I (DMT2 and NASH)		Group II (DMT2)		Group III (Controls)	
	β	p	β	p	β	p
BMI (kg/m ²)	$\beta = 0.415$	$p < 0.001$	$\beta = 0.191$	p (ns)	$\beta = 0.110$	p (ns)
GGT (UI/L)	$\beta = 0.326$	$p < 0.001$	$\beta = 0.189$	p (ns)	$\beta = 0.173$	p (ns)

Univariate analysis suggests that in group I, the serum level of TNF- α was positively correlated with the following clinical parameters: BMI, WC, hypertension, AST, ALT, gamma GT, HbA1c, duration of diabetes, and HOMA-IR index, respectively. Serum level of TNF- α did not correlate with: triglycerides, HDL cholesterol, LDL cholesterol, fasting plasma glucose, and UKPDS cardiovascular risk score, respectively. In group II, serum level of TNF- α was positively correlated with the following clinical parameters: BMI, WC, hypertension, HbA1c, and duration of diabetes. Multivariate analysis indicates that the serum level of TNF- α was significantly associated with the following factors: WC, AST, ALT, HbA1c, and duration of diabetes, while in group II, only WC, HbA1c, and duration of diabetes were found associated with the serum level of TNF- α (Table III).

Table III. Results of multivariate analysis between TNF- α and clinical and biochemical variables

Variable	Group I (DMT2 and NASH)		Group II (DMT2)		Group III (Controls)	
	β	p	β	p	β	p
AST (UI/L)	$\beta = 0.412$	$p < 0.001$	$\beta = 0.18$	p (ns)	$\beta = 0.12$	p (ns)
ALT (UI/L)	$\beta = 0.346$	$p < 0.001$	$\beta = 0.16$	p (ns)	$\beta = 0.09$	p (ns)
WC (cm)	$\beta = 0.376$	$p < 0.001$	$\beta = 0.254$	$p < 0.001$	$\beta = 0.11$	p (ns)
HbA1c (%)	$\beta = 0.167$	$p < 0.001$	$\beta = 0.650$	$p < 0.001$	$\beta = 0.12$	p (ns)
Duration of DMT2 (years)	$\beta = 0.655$	$p < 0.001$	$\beta = 0.431$	$p < 0.001$	$\beta = 0.15$	p (ns)

Univariate analysis indicates that the serum level of adiponectin in group I was negatively correlated with the following clinical parameters: BMI, WC, HbA1c, LDL cholesterol, UKPDS cardiovascular risk score, and HOMA-IR index, respectively. In group II, only BMI, WC, and HbA1c were negatively associated with the serum level of adiponectin. Multivariate analysis shows that the serum level of adiponectin in group I was negatively correlated with the following clinical parameters: BMI, UKPDS cardiovascular risk score, and HOMA-IR index, and solely with BMI, in group II (Table IV).

Table IV. Results of multivariate analysis between adiponectin and clinical and biochemical variables

Variable	Group I (DMT2 and NASH)		Group II (DMT2)		Group III (Controls)	
	β	p	β	p	β	p
BMI (kg/m ²)	$\beta=-0.54$	$p < 0.001$	$\beta=-0.65$	$p < 0.001$	$\beta=-0.14$	p (ns)
HOMA-IR index	$\beta=-0.345$	$p < 0.001$	$\beta=-0.13$	p (ns)	$\beta=-0.10$	p (ns)
UKPDS score	$\beta=-0.249$	$p < 0.001$	$\beta=-0.11$	p (ns)	$\beta=-0.09$	p (ns)

Univariate analysis shows that in group I, the serum level of hs-CRP was positively correlated with the following clinical parameters: age, BMI, WC, AST, ALT, HbA1c, and UKPDS cardiovascular risk score, while in group II, the serum level of hs-CRP was positively correlated with age, BMI, WC, HbA1c, and UKPDS cardiovascular risk score. Multivariate analysis indicates that in group I, the serum levels of hs-CRP was positively correlated with age, BMI, and the UKPDS cardiovascular risk score, and in group II, the serum levels of hs-CRP was positively correlated with age and BMI (Table V).

Table V. Results of multivariate analysis between hs-CRP and clinical and biochemical variables

Variable	Group I (DMT2 and NASH)		Group II (DMT2)		Group III (Controls)	
	β	p	β	p	β	p
Age (years)	$\beta = 0.252$	$p < 0.001$	$\beta = 0.225$	$p < 0.001$	$\beta = 0.063$	p (ns)
BMI (kg/m ²)	$\beta = 0.293$	$p < 0.001$	$\beta = 0.331$	$p < 0.001$	$\beta = 0.091$	p (ns)
UKPDS score	$\beta = 0.112$	$p < 0.001$	$\beta = 0.011$	p (ns)	-	-

Markers of oxidative stress were determined in all the three groups. Determination of the serum levels of protein carbonyl yielded, for each group, the following values: group I (DMT2 and NASH): 1.112 ± 0.42 nmol/dl; group II (DZT2): 0.508 ± 0.35 nmol/dl; group III (control): 0.417 ± 0.38 nmol/dl.

Univariate analysis shows that in group I, serum level of protein carbonyl was positively correlated with the following clinical parameters: age, hypertension, HbA1c, HOMA-IR index, duration of diabetes, and UKPDS cardiovascular risk score. In group II, serum level of protein carbonyl was positively correlated with age, hypertension, HbA1c, and duration of diabetes. Multivariate analysis indicates that in group I, the serum level of protein carbonyl was positively correlated with the following clinical parameters: HbA1c, duration of diabetes, and UKPDS cardiovascular risk score. In group II, the serum level of protein carbonyl was positively correlated solely with HbA1c and the duration of diabetes (Table VI).

Table VI. Results of multivariate analysis between protein carbonyl and clinical and biochemical variables

Variable	Group I (DMT2 and NASH)		Group II (DMT2)		Group III (Controls)	
	β	p	β	p	β	p
HbA1c (%)	$\beta=0.78$	$p < 0.001$	$\beta=0.67$	$p < 0.001$	$\beta=0.05$	p (ns)
Duration of DMT2 (years)	$\beta=0.77$	$p < 0.001$	$\beta=0.65$	$p < 0.001$	$\beta=0.14$	p (ns)
UKPDS score	$\beta=0.77$	$p < 0.001$	$\beta=0.19$	p (ns)	-	-

Determination of serum malondialdehyde (MDA) yielded the following mean values: group I: 6.181 ± 1.81 ng/ml; group II: 4.258 ± 1.54 ng/ml; group III: 2.393 ± 1.75 ng/ml. When the three groups were compared, we observed statistically significant differences in all groups ($p = 0.002$ for group I vs. group II; $p = 0.001$ for group I vs. group III; and $p = 0.005$ for group II vs. group III). Group I displayed the highest (most increased) MDA values, followed by group II and the control group. Univariate analysis indicates that in group I, serum level of MDA was positively correlated with the following clinical parameters: age, gamma GT, triglycerides, and LDL cholesterol. In group II, the serum level of MDA was positively correlated with age, triglycerides, and LDL cholesterol. In group III (control), MDA serum level correlated with age. Multivariate analysis shows that in both group I and group II, MDA serum levels were positively correlated with triglyceride serum levels (Table VII).

Table VII. Results of multivariate analysis between MDA and clinical and biochemical variables

Variable	Group I (DMT2 and NASH)		Group II (DMT2)		Group III (Controls)	
	$\beta=0.345$	$p < 0.001$	$\beta=0.332$	$p < 0.001$	$\beta=0.13$	p (ns)
Triglycerides (mg/dl)						

Determination of 8-isoprostane levels, an indicator of lipid peroxidation, was carried out in all the three groups, and the mean values were: group 1: 338.6 ± 98.5 pg/ml; group 2: 269.92 ± 88.7 pg/ml; group 3: 195.94 ± 45.3 pg/ml. When the three groups were compared with each other, we found statistically significant differences for all the three groups ($p = 0.014$ for group I versus group II; $p = 0.001$ for group I versus group III; $p = 0.028$ for group II vs. group III). The univariate analysis indicates that in group I, 8-isoprostane serum level was positively correlated with age, LDL cholesterol, HOMA-IR index, and hypertension; while in group II, 8-isoprostane serum level was positively correlated with age, LDL cholesterol, and hypertension. Multivariate analysis, shows that in group I, 8-isoprostane serum level was positively correlated with age and LDL cholesterol, and in group II, it was solely correlated with age (Table VIII).

Table VIII. Results of multivariate analysis between 8-isoprostane and clinical and biochemical variables

Variable	Group I (DMT2 and NASH)		Group II (DMT2)		Group III (Controls)	
	$\beta=0.55$	$p < 0.001$	$\beta=0.67$	$p < 0.001$	$\beta=0.09$	p (ns)
Age (years)						
LDL Cholesterol (mg/dl)	$\beta=0.33$	$p < 0.001$	$\beta=0.25$	p (ns)	$\beta=0.11$	p (ns)

The matrix of intercorrelations between the study variables is presented in Table IX, indicating that in patients with DMT2 and NASH, there is a systemic inflammatory state and a pro-oxidative status significantly increased in regard to protein oxidation, lipid peroxidation, and hyperuricemia (Table IX).

Table IX. Correlations of oxidative stress and inflammatory markers in patients with NASH and DMT2

	IL-6 (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	Adiponectin (ng/ml)	hsC-reactive protein (mg/l)	Fibrinogen (mg/dl)	Protein Carbonyl (nmol/dl)	MDA (ng/ml)	8-isoprostane (pg/ml)	Serum uric acid (mg/dl)
IL-6 (pg/ml)	-	0.412	0.345	-0.289	0.478	0.018	0.375	0.276	0.189	0.153
IL-1 β (pg/ml)	0.412	-	0.165	-0.310	0.211	0.376	0.145	0.137	0.146	0.678
TNF- α (pg/ml)	0.345	0.165	-	-0.440	0.610	0.103	0.237	0.376	0.354	0.149
Adiponectin (ng/ml)	-0.289	-0.310	-0.440	-	-0.166	-0.231	-0.376	-0.111	-0.354	-0.264
hsC-reactive protein (mg/l)	0.478	0.211	0.610	-0.166	-	0.016	0.459	0.365	0.264	0.238
Fibrinogen (mg/dl)	0.018	0.376	0.103	-0.231	0.016	-	0.014	0.089	0.116	0.124
Protein Carbonyl (nmol/dl)	0.375	0.145	0.237	-0.376	0.459	0.014	-	0.305	0.143	0.200
MDA (ng/ml)	0.276	0.137	0.376	-0.111	0.365	0.089	0.305	-	0.471	0.460
8-isoprostane (pg/ml)	0.189	0.146	0.354	-0.354	0.264	0.116	0.143	0.471	-	0.134
Serum uric acid(mg/dl)	0.153	0.678	0.149	-0.264	0.238	0.124	0.200	0.460	0.134	-

The level of serum uric acid in the three groups and its prevalence by gender in each group was as follows: group I - patients with NASH and DMT2: 7.10 ± 1.65 mg/dL (7.73 ± 1.18 in males (M) and 6.29 ± 1.04 in women (W)); group II - patients with DMT2: 5.58 ± 1.48 mg/dl (5.69 ± 0.77 M; 5.014 ± 0.43 W); Group III - control: 4.74 ± 1.02 mg/dl. We found a number of statistically significant differences between groups, in both sexes, namely: group I M vs. group II M: 7.73 ± 1.18 vs. 5.69 ± 0.77 , $p < 0.001$; group I M vs. group III (control): 7.73 ± 1.18 vs. 4.74 ± 1.02 , $p < 0.001$; group II M vs. group III (control): 5.69 ± 0.77 vs. 4.74 ± 1.02 , $p - ns$; group I W vs. group II W: 6.29 ± 1.04 vs. 5.014 ± 0.43 , $p < 0.05$; group I W vs. group III (control): 6.29 ± 1.04 vs. 4.74 ± 1.02 , $p < 0.05$; and group II W vs. group III (control): 5.014 ± 0.43 vs. 4.74 ± 1.02 , $p - ns$.

Univariate analysis shows that in group I, the level of serum uric acid was positively correlated with the following clinical parameters: age, BMI, WC, triglycerides, LDL cholesterol, hypertension, HbA1c, HOMA-IR index, duration of diabetes, and UKPDS cardiovascular risk score; while in group II, the serum uric acid was positively correlated with the following clinical parameters: age, BMI, WC, triglycerides, LDL cholesterol, hypertension, HbA1c, HOMA-IR index, and duration of diabetes. In group III (control), we found positive correlations between serum uric acid and age, BMI, WC, triglycerides, and LDL cholesterol. Multivariate analysis indicates that in group I, the serum uric acid level was positively correlated with BMI, triglycerides, and HbA1c; while in group II, solely with serum triglycerides (Table X).

Table X. Results of multivariate analysis between serum uric acid and clinical and biochemical variables

Variable	Group I (DMT2 and NASH)		Group II (DMT2)		Group III (Controls)	
	β	p	β	p	β	p
BMI (kg/m ²)	$\beta=0.46$	$p < 0.001$	$\beta=0.16$	p (ns)	$\beta=0.12$	p (ns)
Triglycerides (mg/dl)	$\beta=0.31$	$p < 0.001$	$\beta=0.54$	$p < 0.001$	$\beta=0.07$	p (ns)
HbA1c (%)	$\beta=0.22$	$p < 0.001$	$\beta=0.10$	p (ns)	$\beta=0.09$	p (ns)

Conclusions:

➤ Patients with DMT2 and NASH:

- have an average age of 59 ± 8.4 years;
- exhibit obesity (average BMI = 30.8 kg/m²; WC = 105.8 cm);
- are more sedentary;
- exhibit atherogenic dyslipidemia (high TG, low HDL cholesterol, high LDL cholesterol);
- have increased insulin resistance (TG/HDL ratio increased, HOMA-IR index increased);
- frequently have uncontrolled hypertension (70%);
- have severe metabolic syndrome (90%), mostly with 4 and 5 components (81%);
- exhibit a significantly increased UKPDS cardiovascular risk score (CAD-39% and death from CAD 12.4%, stroke-25.6% and death from stroke 3.8%);
- are classified as high risk for cardiovascular disease;
- have poor diabetes control (average HbA1c of 7.85%);
- are found with a high level of AST/ALT associated with an increased level of TNF- α ; and an increase of gamma GT associated with increased levels of IL-1 β ;
- are found with high serum levels of hs-CRP, independently associated with HOMA-IR index;
- include chronic subclinical inflammation and an increase in IL-6 associated with the increase of BMI, duration of diabetes, HOMA-IR index, and UKPDS cardiovascular risk score.

- **This study indicates that patients with DMT2 and NASH:**
 - tend to display elevated serum levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF- α), and lower serum levels of adiponectin, with reduced systemic and hepatic anti-inflammatory protection;
 - IL-6 is independently associated with: duration of diabetes, BMI, HOMA-IR index, and UKPDS CV risk score;
 - IL-1 β is independently associated with BMI and gamma GT;
 - TNF- α is independently associated with: duration of diabetes, WC, AST/ALT, and HbA1c;
 - exhibit increased levels of markers of oxidative stress in regard to protein oxidation and lipid peroxidation;
- **People with DMT2 and NASH** tend to display high prevalence of hyperuricemia:
 - men exhibited increased levels of serum uric acid compared to women (7.73 mg/dl M vs. 6.29 mg/dl W), with higher prevalence in men than in women (65% M vs. 48% W).
- **The association of DMT2 with NASH** results in a state of chronic subclinical inflammation, with implications on global cardiometabolic risk, and impact on progression and severity of liver disease.
- **The association of DMT2 with NASH** places the patient in the class of very high risk, requiring an early, intensive, multifactorial, and effective clinical management.

Study 2. Serum osteoprotegerin levels in patients with type 2 diabetes and various forms of non-alcoholic fatty liver, as a biomarker for risk of cardiovascular disease

Objectives: The purpose of this study was to investigate the OPG serum levels and their meaning in a group of diabetic patients with NAFLD in various degrees of severity, compared to a control group; and the links between OPG serum levels and the degree of liver injury, besides the correlations between OPG serum levels and the cardiovascular risk factors in this category of patients.

Materials and methods: This cross-sectional study included 150 subjects among which 110 were consecutive patients with DMT2, and 40 were healthy controls. The patient population (N = 110) was divided into three groups: group 1 – patients with DMT2 and NASH (n = 35); group 2 – patients with DMT2 and NAFLD (n = 38), and group 3 – patients with DMT2, without liver disease (i.e., normal liver) (n = 37). The diagnosis for liver injury was performed by means of liver function tests, ultrasonography, the index of fatty liver, and a panel of serological biomarkers – predictors of NASH phenotype. Anthropometric indicators, clinical and biochemical parameters were determined; the measurement of basal serum OPG was performed via the sandwich ELISA protocol.

Results: The mean value for serum OPG level in the diabetic patients (n = 110) was 1894.33 \pm 334.66 pg/ml, significantly higher compared to control population (n = 40), where the level of serum OPG was 1355 \pm 212 pg/ml ($p < 0.001$). The highest mean value of serum OPG levels was found in the group of patients with DMT2 and NASH (group 1)(2237 \pm 455 pg/ml, $p < 0.001$), statistically significant when compared with every other group of diabetic patients. In group 1 of patients with DMT2 and NASH, the serum OPG level was positively correlated with: age ($r = 0.38$; $p = 0.013$); waist circumference ($r = 0,391$; $p = 0.031$); hypertension ($r = 0.451$, $p = 0.03$); fasting plasma glucose ($r = 0.341$; $p = 0.012$); hs-CRP ($r = 0.47$; $p = 0.02$); fibrinogen ($r = 0.25$; $p = 0.03$); IL-6 ($r = 0.776$; $p = 0.02$); NT-proBNP ($r = 0.301$; $p = 0.027$); diabetic nephropathy – microalbuminuria ($r = 0.219$; $p = 0.012$) and macroalbuminuria ($r = 0.451$; $p = 0.021$); and with the average UKPDS cardiovascular risk score ($r = 0.42$; $p = 0.001$), respectively. Negative correlations were found between serum OPG levels and eGFR ($r = -0.29$; $p = 0.019$), and adiponectin ($r = -0.478$; $p = 0.022$), respectively. No correlations were found between OPG and the following parameters: gender ($r = 0.012$; $p = 0.55$), BMI ($r = 0,345$; $p = 0.067$), liver transaminases ($r = 0.245$; $p = 0.06$), and HbA1c ($r = 0.06$; $p = 0.58$).

Conclusions: The OPG serum concentration is significantly higher in diabetic patients compared with controls, as the presence of NAFLD and NASH tends to increase further the OPG values. The correlations reach the highest magnitude in the group of patients with DMT2 and NASH (group 1), as serum OPG correlates with diabetic nephropathy, NT-proBNP, the level of serum markers of chronic subclinical inflammation, and with the average UKPDS cardiovascular risk score, strengthening this way the role of OPG as a potential biomarker for the risk of cardiovascular disease, in this particular group of patients.

Study 3. Symptomatic and asymptomatic significant carotid atherosclerosis in patients with DMT2 and NASH

Objectives: The aim of this study sought to assess the prevalence and severity of carotid atherosclerosis – symptomatic or asymptomatic – in high-risk patients with type 2 diabetes mellitus (DMT2) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH), compared to patients with type 2 diabetes and normal liver.

Materials and methods: This cross-sectional study included 107 consecutive patients with DMT2 and NASH phenotype positive (study group), and 100 consecutive patients with DMT2, normal liver (control group). Noninvasive methods such as ultrasound, liver function tests, and a panel of serological biomarkers were used for the diagnosis of NAFLD and NASH. The controls were diabetic patients without criteria for fatty liver disease. In both groups, carotid ultrasound was performed along with a set biochemical tests (hepatic liver tests, fasting plasma glucose, HbA1c, a panel of lipid components, hs-CRP, and a panel of serological biomarkers for NASH phenotype, namely, IL-6 and adiponectin).

Results: Of the total patients from the study group (DMT2 and NASH), with long duration of diabetes (more than 10 years) and poor metabolic control, 34 patients (31.78%) had significant carotid stenosis (both symptomatic and asymptomatic) vs. 11 patients (10%) in the control group (DMT2, normal liver), $p < 0.001$.

The prevalence of non-obstructive carotid atherosclerosis was also significantly different in the two groups of diabetic patients (61.68% [study group] vs. 42.73% [control group]; $p = 0.001$). Carotid atherosclerosis was present in 100 patients (93.45%) from the study group (DMT2 and NASH), and in 58 subjects (52.73%) from the control group (DMT2, normal liver).

High levels of hs-CRP, with statistical significance, were found in patients from the study group (DMT2 and NASH) who had carotid atherosclerosis, both symptomatic and asymptomatic, compared with the subjects in the control group (DMT2, normal liver).

Conclusions: In type 2 diabetes mellitus patients with non-alcoholic steatohepatitis, the prevalence of CAD is higher than in controls, and the severe atherosclerotic lesions are more frequent in this high-risk group of patients. High levels of hs-CRP are linked to the severity of atherosclerotic lesions, and this situation requires an intensive and multifactorial management of the global cardiovascular risk. Patients with DMT2 and NASH, compared to those with DMT2 and normal liver, display a high prevalence of severe carotid atherosclerosis, with higher frequency of significant atherosclerotic lesions – symptomatic and asymptomatic. In this category of patients (DMT2 and NASH), the level of chronic subclinical inflammation (hs-CRP) is very high and is associated with the severity of atherosclerotic lesions, stressing the need for active screening with identification of macroangiopathic lesions at carotid level and in other vascular territories (coronary, peripheral arteries), followed by an early, intensive, multifactorial, and effective clinical management.

General Conclusions:

- **Patients with DMT2 and NASH are characterized by:**
 - abdominal obesity and mainly a sedentary lifestyle;
 - atherogenic dyslipidemia, high triglycerides, and low HDL cholesterol;
 - increased levels for insulin resistance;
 - uncontrolled hypertension;
 - severe metabolic syndrome;
 - very high risk score for CAD and stroke;
 - high mortality risk from CAD and stroke;
 - belonging to the class of very high cardiovascular risk;
 - poor DMT2 control (HbA1c = 7.85%);
 - increased liver function tests (AST/ALT) correlated with increased levels of gamma GT, IL-6, TNF- α , and IL-1 β ;
 - a level of serum hs-CRP strongly correlated with HOMA-IR index;
 - a level of serum IL-6 associated with: the duration of diabetes, HOMA-IR index, and UKPDS cardiovascular risk score;
- **Furthermore, this research shows that patients with DMT2 and NASH:**
 - Exhibit elevated serum levels of proinflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β , TNF- α) indicative of hepatic and systemic chronic inflammation;
 - Exhibit low levels of serum adiponectin, with decreased hepatic and systemic anti-inflammatory protection;
 - IL-6 serum level is a factor independently associated with: the duration of diabetes, BMI, HOMA-IR index, and UKPDS cardiovascular risk score;
 - IL-1 β serum level is independently associated with abdominal obesity and gamma GT;
 - TNF- α serum level is independently associated with: duration of diabetes, abdominal obesity, liver transaminases, and the degree of control of diabetes;
 - Exhibit excessive levels of markers of oxidative stress, both in regard to protein oxidation - carbonylation process - and in terms of lipid peroxidation;
 - Exhibit a high prevalence of hyperuricemia, with mean values higher in men than in women, and an increased prevalence compared with the control population;
- The association of DMT2 with NASH generates a state of chronic subclinical inflammation with implications on global cardiometabolic risk and progression and severity of liver disease;
- The association of DMT2 with NASH places the patient in the class of very high cardiovascular risk, requiring an early, highly efficient and multifactorial clinical management;
- The serum OPG level is significantly increased in patients with DMT2 and NASH, and is positively and independently correlated with cardiovascular risk factors (microalbuminuria and macroalbuminuria), markers of chronic subclinical inflammation (hs-CRP, IL-6), hipoadiponectinemia, and markers of myocardial dysfunction (NT-proBNP);
- In patients with DMT2 and NASH, increased serum OPG is independently correlated with UKPDS cardiovascular risk score;
- The increased serum OPG level in patients with DMT2 and NASH, by positive correlations with conventional cardiovascular risk factors, demonstrates the potential of osteoprotegerin as biomarker for the risk of CVD;
- In patients with DMT2 and NASH, atherosclerotic macroangiopathy of carotid is highly prevalent and more severe;
- Significant atherosclerotic carotid lesions – symptomatic and asymptomatic – are more common;

- Patients with DMT2 and NASH, with increased prevalence of atherosclerotic macroangiopathy of the carotid, accumulate a large number of traditional cardiovascular risk factors (abdominal obesity, hypertension, low control of blood pressure, dyslipidemia, sedentary lifestyle);
- The prevalence and increased severity of carotid atherosclerosis is associated with a high level of chronic subclinical inflammation (hs-CRP, fibrinogen, IL-6) and low values of adiponectin serum levels;
- The severity of atherosclerotic lesions and increased prevalence at carotid level, requires an active screening with identification of macroangiopathic lesions at carotid level and in other vascular territories (coronary, peripheral arteries), followed by an early, intensive, multifactorial, and effective clinical management.

Originality and innovative contributions of the dissertation

This doctoral dissertation proves its originality by describing the clinical and laboratory cardiovascular risk profile of patients with DMT2 and NASH, by describing systemic changes such as chronic subclinical inflammation with elevation of proinflammatory cytokines (IL-6, IL-1 β , and TNF- α) and low levels of anti-inflammatory adipocytokines (adiponectin), the increase in markers of oxidative stress at protein levels (protein carbonylation) and lipid peroxidation (8-isoprostane, MDA levels). All these laboratory changes have a significant impact on the overall cardiometabolic risk in this population of patients with DMT2 and NASH, and are associated with high morbidity and mortality from cardiovascular cause.

This work is innovative in that it studies for the first time the osteoprotegerin serum levels in patients with NASH and DMT2. Findings of this study revealed significant and independent positive correlations between OPG serum levels and elevated micro- and macroalbuminuria, NT-proBNP (a serum marker of myocardial dysfunction), UKPDS cardiovascular risk score in patients with DMT2 and steatohepatitis, supporting the role of OPG as biomarker for the risk of atherosclerotic cardiovascular disease.

With regard to implications for clinical practice, this research emphasizes the importance of active screening of carotid plaques in patients with DMT2 and NASH, where the frequency and severity of carotid atherosclerotic disease is very high; these patients cumulate multiple cardiovascular risk factors and increased levels of chronic subclinical inflammation, oxidative stress, along with decreased levels of anti-atherogenic serum adiponectin.