
TEZĂ DE DOCTORAT (REZUMAT)

Modelarea evoluției în timp a diabetului zaharat tip 1 cu ajutorul biomarkerilor activării macrofagelor

Doctorand **Ancuța Cutaș**

Conducător de doctorat **Prof.dr. Andrei Achimaș-Cadariu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	11
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Diabetul zaharat o problemă majoră de sănătate	15
1.1. Epidemiologie	15
1.2. Definiție	16
1.3. Clasificarea diabetului zaharat	16
2. Diabetul zaharat tip 1	17
2.1. Definiție	17
2.2. Epidemiologia diabetului zaharat tip 1	17
2.3. Factori de risc	18
2.4. Anticorpilor specifici	19
2.5. Patogeneză	19
3. Diabetul zaharat tip 2	23
3.1. Definiție	23
3.2. Epidemiologia diabetului zaharat tip 2	23
3.3. Factori de risc	23
3.4. Patogeneză	24
4. Complicațiile diabetului zaharat	27
4.1. Complicațiile acute ale diabetului zaharat	27
4.2. Complicațiile cronice ale diabetului zaharat	27
4.3. Neuropatia periferică	29
4.4. Nefropatia diabetică	30
4.5. Retinopatia diabetică	31
5. Statusul inflamator	33
5.1. Definiție	33
5.2. Biomarkerii inflamației	33
5.3. Biomarkerii inflamației cronice	37
5.3.1 Chitotriozidaza	37
5.3.2 Neopterină	40
5.4. Alți markeri utili-ADMA	42
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru	47
2. Metodologie generală	48
3. Studiul 1 - Răspunsul inflamator și evoluția în timp a complicațiilor cronice la pacienții cu diabet zaharat tip 1 și tip 2	49
3.1. Introducere	49

3.2. Ipoteza de lucru	50
3.3. Material și metodă	50
3.4. Rezultate	51
3.5. Discuții	61
3.6. Concluzii	64
4. Studiul 2 - Evaluarea chitotriozidazei și a neopterinei ca markeri ai evoluției complicațiilor la pacienții cu diabet zaharat tip 1	65
4.1. Introducere	65
4.2. Ipoteza de lucru	67
4.3. Material și metodă	67
4.4. Rezultate	68
4.5. Discuții	90
4.6. Concluzii	92
5. Studiul 3 - Activitatea ADMA la pacienții cu diabet zaharat tip 1 și complicații cronice microvasculare prezente	95
5.1. Introducere	95
5.2. Ipoteza de lucru	96
5.3. Material și metodă	96
5.4. Rezultate	97
5.5. Discuții	104
5.6. Concluzii	105
7. Concluzii generale	107
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	109
REFERINȚE	111

Cuvinte cheie: diabet zaharat, inflamatie, complicații microvasculare, chitotriozidaza, neopterină, dimetilarginina asimetrică

1. INTRODUCERE

Diabetul zaharat reprezintă una dintre cele mai importante probleme de sănătate publică, cu implicații atât pe plan social cât și economic. Această patologie cunoaște o răspândire exponențială la nivel global anual. Hiperglicemia cronică contribuie la apariția complicațiilor determinând o creștere a morbidității și mortalității asociate acestei patologii. În evoluția diabetului, complicațiile cronice afectează diverse sisteme și organe prin mecanisme fiziopatologice complexe. Statusul inflamator cronic specific acestei patologii este implicat în mecanismele fiziopatologice complexe premergătoare apariției complicațiilor cronice diabetice.

Chitotriozidaza și neopterină sunt doi biomarkeri ai activării macrofagelor care joacă un rol important în activarea imunologică și a statusului inflamator.

Dimetilarginina asimetrică este un inhibitor endogen al sintetazei oxidului nitric și un marker important al disfuncției endoteliale.

Cercetarea de față a vizat determinarea acestor biomarkeri la pacienții cu diabet zaharat tip 1 și contribuția acestora la apariția și evoluția complicațiilor cronice microvasculare.

2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În momentul de față la nivel global există 463 de milioane de persoane cu diabet zaharat. Se estimează că în anul 2045 vor fi 700 de milioane de persoane cu diabet. În Europa s-a evidențiat o creștere substanțială față de estimările din anul 2000, ajungându-se în 2019 la un număr de 59,3 milioane de persoane cu diabet, prevalența fiind în creștere. Printre cele mai afectate zone, cu o prevalență de peste 8,8% și o proporție de 20,7% de pacienți nedignosticați aflându-se și România. Studiul PREDATORR (Studiu național privind diabetul, prediabetul, excesul de greutate, obezitatea, dislipidemia, hiperuricemia și prevalența bolii cronice a rinichiului în România) a arătat o prevalență totală a diabetului zaharat în rândul populației adulte cu vârsta cuprinsă între 20 și 79 de ani, de 11,6%, dintre care 2,4% nu au fost anterior diagnosticate.

Diabetul zaharat (DZ) este o patologie metabolică cu multiple etiologii. Este un sindrom heterogen caracterizat prin hiperglicemie cronică (bazală și/sau postprandială), care se poate asocia cu modificări ale metabolismului lipidic, proteic, hidro-electrolitic, respectiv energetic. În evoluția diabetului zaharat statusul hiperglicemic rezultat în urma unui control inadecvat poate duce la două tipuri de complicații: complicații acute și complicații cronice. Complicațiile cronice ale diabetului afectează diverse organe și sisteme și sunt responsabile de majoritatea morbidităților și mortalității asociate bolii. Acestea pot fi clasificate în complicații vasculare și non-vasculare. Cele microvasculare sunt reprezentate de neuropatie, retinopatie și nefropatie iar cele macrovasculare sunt reprezentate de boală coronariană, arteriopatie, boală cerebrovasculară. Complicațiile non-vasculare includ gastropareza, infecțiile și manifestările dermatologice. Riscul de apariție al complicațiilor cronice este direct proporțional cu nivelul crescut al glucozei din sânge. Screeningul complicațiilor cronice se realizează în funcție de tipul de diabet. La pacienții cu diabet zaharat tip 1 screeningul este recomandat la 5 ani după momentul diagnosticului iar la cei cu diabet zaharat tip 2, imediat după diagnostic.

Inflamația reprezintă un proces patologic, o reacție de apărare a organismului, caracterizat prin leziuni sau distrugerea țesuturilor cauzate de o varietate de reacții citologice și chimice la stimulii dăunători. Aceasta poate fi acută sau cronică. Inflamația acută este caracterizată printr-un raspuns prompt de apărare al organismului iar inflamația cronică este considerată a fi rezultatul implicării persistente a sistemului imunitar înăscut și dobândit, morfopatologic fiind definită prin prezența limfocitelor, macrofagelor și celulele plasmatică în țesuturi. În fiziopatologia complicațiilor cronice statusul inflamator joacă un rol important la pacienții cu diabet zaharat. Chitotriozidaza și neopterină sunt doi biomarkeri ai activării macrofagelor capabili să detecteze inflamația nedecelabilă prin markerii folosiți în practica clinică curentă. Dimetil arginina asimetrică este un biomarker al disfuncției endoteliale, cunoscut ca si predictor al riscului cardiovascular.

3. CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul 1. Răspunsul inflamator și evoluția în timp a complicațiilor cronice la pacienții cu diabet zaharat tip 1 și tip 2

Rezultatele acestui studiu au fost raportate în revista International Journal of Diabetes in Developing Countries.

Ipoteza de lucru: Scopul acestui studiu a fost să evidențieze asocierea dintre statusul inflamator (reflected prin valoarea proteinei C reactive), controlul diabetului (evaluat prin valoarea HbA1c) și evoluția în timp a diabetului zaharat de tip 1 și tip 2 (indicat de durata bolii, de timpul mediu până la debutul complicațiilor microvasculare și de riscul lor de apariție).

Material și metodă: Studiul a fost unul retrospectiv, observațional, în care au fost incluși 192 de subiecți diagnosticați și urmăriți la Centrul de Diabet Zaharat, Nutriție și Boli Metabolice, din Cluj-Napoca, România, între ianuarie 2018 și februarie 2019. Dintre aceștia, 138 au fost cu diabet zaharat tip 1 și 54 au fost cu diabet zaharat tip 2. Colectarea datelor s-a realizat utilizând fișele de observație ale pacienților. Pentru analiza statistică a datelor am folosit IBM SPSS V25. Pentru testarea normalității distribuției seriei statistice am utilizat testul Kolmogorov-Smirnov.

Rezultate: În studiu am inclus 192 de subiecți din care 138 cu diabet zaharat tip 1 (71,9%) și 54 cu diabet zaharat tip 2 (28,10%). Vârsta medie a pacienților în momentul recoltării a fost de 22,41 ani($\pm 9,75$) pentru cei cu DZ1 iar pentru cei cu DZ2 a fost de 64,22 ani($\pm 8,92$). Durata medie de evoluție a diabetului la pacienții cu DZ tip 1 a fost de 9,95 ani ($\pm 8,52$) iar la pacienții cu DZ tip 2 de 14,37 ani($\pm 8,35$). Valoarea mediană a HbA1c la DZ tip 1 a fost 7,85% iar la DZ tip 2 a fost 8,74%. Valoarea mediană a PCR la DZ1 a fost 1,34 mg/dl iar la DZ2 a fost 1,44 mg/dl. La nivelul celor două grupuri am observat diferențe semnificative statistic între: vârstele pacienților, durata de evoluție a diabetului și HbA1c ($p < 0,01$, Mann-Whitney U Test). Nu au fost diferențe semnificative statistic între valorile serice ale PCR ale celor două loturi. În studiul nostru am evidențiat diferențe semnificative statistic la pacienții cu DZ tip 1, între valorile HbA1c și prezența nefropatiei, retinopatiei și neuropatiei. În ceea ce privește nivelul seric al PCR la pacienții cu DZ1 am observat diferențe semnificative statistic în relație cu complicațiile microvasculare și prezența hipertensiunii, exceptând neuropatia. În lotul pacienților cu DZ tip 2 semnificația statistică a parametrilor în relație cu complicațiile microvasculare și hipertensiunea arterială nu a fost atinsă. Între cele două tipuri de diabet au existat diferențe semnificative statistic între valorile HbA1c la pacienții cu nefropatie diabetică stadiul I. Valorile PCR au prezentat diferențe semnificative statistic la pacienții cu retinopatie. Neuropatia diabetică în relație cu HbA1c și PCR nu a atins semnificația statistică la nivelul celor două loturi.

Studiul de față arată că există un risc mai mare de apariție al complicațiilor la pacienții cu DZ tip 2 față de cei cu DZ tip 1. Riscul relativ de apariție al nefropatiei a fost de 1,87 (95%CI 1,58-1,98) ori mai mare la pacienții cu DZ tip 2 decât la cei cu DZ tip 1. Pentru retinopatia diabetică riscul relativ a fost de 2,38) ori mai mare (95% CI 1,42-3,93 iar pentru neuropatie de 3,66 ori mai mare (95%CI 2,98-3,82) la DZ tip 2 față de DZ tip 1. Am observat o diferență semnificativă statistic între durata evoluției și prezența complicațiilor microvasculare (nefropatie, neuropatie, retinopatie) la pacienții cu DZ tip 1. A fost observată o corelație pozitivă, semnificativ statistică între valorile parametrilor biologici (HbA1c și PCR) și durata de evoluție a diabetului la

pacienții cu diabet zaharat tip 1. Această corelație pozitivă s-a menținut și la întregul lot de pacienți dar nu și pentru pacienții cu diabet zaharat tip 2.

Concluzii: Studiul de față a demonstrat existența unei corelații între valorile PCR și durata evoluției diabetului zaharat de tip 1, acestea fiind direct proporționale. Pacienții cu DZ tip 1 și o valoare mai crescută a HbA1c au prezentat mai frecvent nefropatie avansată, retinopatie și neuropatie periferică iar cei cu valori crescute ale PCR au prezentat mai frecvent nefropatie avansată și retinopatie. La pacienții cu DZ tip 2 nu s-au observat asocieri semnificative statistic între valorile HbA1c respectiv PCR și complicațiile microvasculare dar retinopatia diabetică a fost mai frecventă la cei cu o durată mai lungă a evoluției diabetului. Evoluția diabetului a fost mai scurtă până la apariția nefropatiei în cazul celor cu DZ tip 1 iar retinopatia și neuropatia au avut o evoluție asemănătoare în timp pentru cele două tipuri de diabet.

Acest studiu a demonstrat existența unei legături directe între inflamația sistemică, reflectată de valorile proteinei C-reactive și progresia în timp a diabetului de tip 1. La acești pacienți, valorile mai mari ale HbA1c au indicat nefropatie mai avansată, retinopatie și neuropatie periferică, în timp ce concentrații crescute de PCR predispun la forme severe de nefropatie și retinopatie. La pacienții cu diabet zaharat de tip 2, nu a fost găsită nicio semnificație statistică între biomarkerii studiați și apariția de complicații microvasculare, deși retinopatia diabetică a fost mai frecventă la subiecții cu o evoluție mai lungă a bolii. Nefropatia diabetică s-a dovedit a apărea mai devreme la pacienții cu diabet zaharat tip 1, în timp ce retinopatia și neuropatia periferică au avut un model similar de apariție în timp pentru cele două tipuri de pacienți diabetici.

Studiul 2. Evaluarea chitotriozidazei și a neopterinei ca markeri ai evoluției complicațiilor la pacienții cu diabet zaharat tip 1

Rezultatele acestui studiu au fost raportate în revista *Diagnostics*.

Ipoteza de lucru: Scopul acestui studiu a fost de a evalua o posibilă asociere dintre statusul inflamator reflectat de valorile circulante ale chitotriozidazei și neopterinei și complicațiile cronice microvasculare dar și modelarea evoluției în timp a acestora până la apariția acestora la pacienții cu diabet zaharat tip 1.

Material și metodă: Acest studiu a fost unul observațional, transversal, care a inclus 82 de subiecți cu diabet zaharat tip 1. Pacienții au fost selectați consecutiv de la Centrul de Diabet Zaharat, Nutriție și Boli Metabolice, Cluj-Napoca, între ianuarie 2018 și noiembrie 2019. Diagnosticul de diabet zaharat și al complicațiilor cronice a fost stabilit în conformitate cu criteriile Asociației Americane de Diabet. Colectarea datelor s-a realizat utilizând fișele de observație ale pacienților și prin recoltarea a 2ml de sânge pentru dozarea biomarkerilor. Analiza statistică a datelor a fost realizată folosind IBM SPSS V25. Pentru testarea normalității distribuției seriei statistice am utilizat testul Kolmogorov-Smirnov, iar ulterior analiza statistică am realizat-o cu ajutorul testelor non-parametrice (Mann-Whitney U Test, Kruskal-Wallis).

Rezultate: În studiu au fost incluși 82 de persoane cu diabet zaharat tip 1 dintre care 44 (53,66%) au fost bărbați. Neuropatia a fost prezentă la 58,54% iar retinopatia la 60,98% pacienți. Stadiile bolii renale cronice au fost prezente după cum urmează: 75,61% au prezentat stadiul A1, 19,51% stadiul A2 și 4,88% stadiul A3. Doar 7 (15,9%) pacienți de sex masculin și 8 (21,05%) de sex feminin urmau tratament cu insulină prin infuzie continuă subcutanată (pompă de insulină), ceilalți fiind sub tratament cu insulină în regim basal-bolus. Media de vârstă a pacienților incluși în studiu a fost de 44 ani ($\pm 13,39$), cu un indice de masă corporală de 25,65

kg/m²(±4,37). Valoarea medie a hemoglobinei glicate a fost de 8,85% (±1,78), iar vechimea diabetului a fost de 20 ani (q1=13; q3=31). Media ratei filtrării glomerulare a fost de 97,27 mL/min/1,73 m² (±20,68), mediana raportului albuminurie/creatininurie a fost de 10,86 mg/dL (q1=5,03; q3=28,68), media glicemiei la momentul recoltării a fost de 173 mg/dL (q1=124; q3=219), media insulinei administrate per kilogram corp a fost de 0,71 UI/kgc (±0,26), iar valoarea medie a LDL-colesterolului a fost de 107,49 mg/dL (±33,33). Valoarea mediană a chitotriozidazei serice a fost de 147,5 nmol/mL/h (Q1=80; Q2=240), iar cea a neopterinei serice a fost de 9,31 ng/mL (q1=6,18; q2=16,03). Hemoleucograma a evidențiat o valoare medie a hemoglobinei de 14,27 mg/dL (±1,8), un număr de 262,4*10⁹ trombocite/L (±61,94) și un număr de 7,03*10⁹ leucocite/L (±2,13). Statusul de fumător a fost întâlnit la 12 (14,63%) pacienți de sex masculin și la 10 (12,20%) de sex feminin. Dintre patologii asociate, bolile inflamatorii cronice au fost prezente la 23,17% dintre pacienți.

La compararea lotului în funcție de repartitia pe sexe a pacienților nu s-au observat diferențe semnificative statistic în ceea ce privește prezența sau absența complicațiilor microvasculare dar nici a celorlalți parametri urmăriți la pacienții cu diabet zaharat tip 1. La nivelul întregului lot există o diferență semnificativă din punct de vedere statistic între activitatea enzimatică a CHIT la pacienții cu neuropatie și retinopatie, comparativ cu cei fără aceste complicații, dar această diferență dispăre în cazul microalbuminuriei, indiferent de stadiul său evolutiv. În ceea ce privește nivelul seric al neopterinei, nu s-au obținut rezultate semnificative statistic pentru niciuna dintre complicațiile cronice prezente. Pentru verificarea diferențelor dintre valorile markerilor la lotul de pacienți care au avut neuropatie față de cei care nu au avut am folosit testul Mann-Whitney U pentru eșantioane independente care a avut o probabilitate mai mică de 0,001 pentru chitotriozidază și o probabilitate de 0,645 pentru neopterină. Pentru verificarea diferențelor dintre valorile markerilor la lotul de pacienți care au avut retinopatie față de cei care nu au avut am folosit testul Mann-Whitney U pentru eșantioane independente care a avut o probabilitate de 0,003 pentru chitotriozidază și o probabilitate de 0,157 pentru neopterină. Pentru verificarea diferențelor dintre valorile markerilor la lotul de pacienți aflați în diferite stadii ale microalbuminuriei în funcție de raportul albuminurie/creatininurie am folosit testul Kruskal-Wallis pentru eșantioane independente care a avut o probabilitate de 0,132 pentru chitotriozidază și o probabilitate de 0,720 pentru neopterină. La nivelul întregului lot, există o diferență semnificativă din punct de vedere statistic între activitatea enzimatică a chitotriozidazei circulante la pacienții fumători cu diabet tip 1 și cei nefumători dar nu am observat astfel de diferențe între pacienții cu boli inflamatorii asociate și cei fără (testul Mann-Whitney U pentru eșantioane independente a avut probabilitatea 0,238). În cazul neopterinei, semnificația statistică nu se păstrează. Bolile inflamatorii existente nu influențează semnificativ din punct de vedere statistic valorile celor doi biomarkeri. Diferențele activității enzimatice a chitotriozidazei la pacienții nefumători cu diabet de tip 1 a atins pragul semnificației statistice pentru neuropatie și retinopatie, dar nu și pentru microalbuminurie. În cazul neopterinei, diferențele nu au fost semnificative din punct de vedere statistic pentru niciuna dintre complicațiile cronice.

La testarea diferențelor de distribuție a valorilor chitotriozidazei pentru apariția neuropatiei în cadrul grupului de pacienți nefumători a relevat diferențe semnificative

pentru testul Mann-Whitney U pentru eșantioane independente, $p < 0,001$, în timp ce valorile neopterinei nu au fost semnificativ statistic diferit distribuite, $p = 0,325$. Atunci când am verificat același fenomen în cadrul pacienților fumători aceste diferențe au dispărut: testul Mann-Whitney U pentru eșantioane independente a avut $p = 0,185$ pentru chitotriozidază și $p = 0,484$ pentru neopterină. Practic statusul inflamator indus de fumat maschează diferențele datorate apariției fenomenelor inflamatorii induse de neuropatie. La testarea diferențelor de distribuție a valorilor chitotriozidazei pentru apariția retinopatiei în cadrul grupului de pacienți nefumători a relevat diferențe semnificative pentru testul Mann-Whitney U pentru eșantioane independente, $p = 0,016$, în timp ce valorile neopterinei nu au fost semnificativ statistic diferit distribuite, $p = 0,183$. Atunci când am verificat același fenomen în cadrul pacienților fumători aceste diferențe au dispărut: testul Mann-Whitney U pentru eșantioane independente a avut $p = 0,548$ pentru chitotriozidază și $p = 0,446$ pentru neopterină. Practic statusul inflamator indus de fumat maschează diferențele datorate apariției fenomenelor inflamatorii induse de neuropatie. La testarea diferențelor de distribuție a valorilor chitotriozidazei între stadiile microalbuminuriei în funcție de raportul albuminurie/creatininurie în cadrul grupului de pacienți nefumători nu am evidențiat diferențe semnificative prin testul Kruskal-Wallis pentru eșantioane independente, $p = 0,171$ și la fel am observat și pentru valorile neopterinei care au fost semnificativ statistic diferit distribuite, $p = 0,371$. Când am verificat același fenomen în cadrul pacienților fumători nu am reușit să identificăm diferențe: testul Mann-Whitney U pentru eșantioane independente a avut $p = 0,961$ pentru chitotriozidază și $p = 0,835$ pentru neopterină. Practic statusul inflamator indus de fumat maschează diferențele datorate apariției fenomenelor inflamatorii induse de neuropatie.

La testarea acurateței diagnostice a celor doi biomarkeri la pacienții cu neuropatie, chitotriozidazei a fost superioară neopterinei, cu o arie de sub curbă de 0,843 (AUC=0,842) și un interval de încredere asociat cuprins între 0,727-0,959 ($p < 0,001$). Dintre cei doi biomarkeri ai activării macrofagelor, doar chitotriozidaza se corelează pozitiv semnificativ statistic, direct proporțional, cu durata de evoluție a diabetului. Neopterina în schimb nu se corelează semnificativ statistic cu durata evoluției afecțiunii. Niciunul din cei doi biomarkeri nu atinge pragul semnificației statistice în ceea ce privește corelația cu hemoglobina glicată sau cu doza de insulină administrată. La ambele categorii de pacienți (fumători și nefumători) s-a observat o corelație moderată, pozitivă, semnificativă din punct de vedere statistic între activitatea enzimatică a chitotriozidazei și vechimea diabetului. Vârsta pacienților și raportul albuminurie/creatininurie s-a corelat pozitiv, semnificativ din punct de vedere statistic cu biomarkerul inflamator, doar la nefumători. O altă corelație care a atins semnificația statistică la nefumători a fost cea negativă, dintre nivelul CHIT1 și rata filtrării glomerulare.

Durata de timp scursă de la momentul diagnosticului de diabet zaharat și până la apariția complicațiilor cronice microvasculare în cazul pacienților înrolați în studiu, a fost de aproximativ 27 de ani până la apariția neuropatiei și retinopatiei. Evoluția în timp a microalbuminuriei a avut un traiect ascendent, între 20 și 29 de ani pentru cele trei stadii ale microalbuminuriei.

La nivelul întregului lot de pacienți s-au evidențiat diferențe semnificative din punct de vedere statistic între timpul scurs de la diagnosticul diabetului zaharat până la apariția neuropatiei și retinopatiei, semnificație care se pierde însă pentru

stadializarea microalbuminuriei. În lotul pacienților fumători, nu s-au evidențiat diferențe semnificative din punct de vedere statistic între timpul scurs de la diagnostic până la apariția complicațiilor microvasculare, excepție făcând doar neuropatia. În lotul pacienților nefumători, s-a obținut o înaltă semnificație statistică între vechimea diabetului și prezența tuturor complicațiilor microvasculare. Timpul scurs până la apariția neuropatiei la pacienții nefumători a fost de aproximativ 30 de ani în timp ce la fumători complicația a apărut mai repede, în speță la 22,05 ani. Același fenomen l-am evidențiat și în cazul retinopatiei dar aici la fumători nu am avut semnificație statistică și de aceea am reprezentat grafic doar cazul nefumătorilor. Pentru microalbuminurie de primul stadiu al bolii a apărut în medie după 21 de ani de evoluție. Timpul scurs între momentul diagnosticului și apariția complicațiilor a atins semnificația statistică pentru toate complicațiile microvasculare la pacienții nefumători. Conform rezultatelor obținute chitotriozidaza ar putea fi folosită ca și biomarker de identificare a pacienților cu neuropatie, cu o arie de sub curba de 0,863 și un interval de încredere de 95% 0,727-0,959, $p=0,000$. Referitor la celelalte complicații microvasculare, chitotriozidaza la fel ca și neopterină nu a atins pragul semnificației statistice.

Concluzii: Potrivit rezultatelor noastre, perioada de timp scursă între momentul diagnosticului și apariția complicațiilor microvasculare a fost mai îndelungată la pacienții nefumători, față de cei fumători. Durata de evoluție a diabetului zaharat de tip 1 până la apariția complicațiilor microvasculare a fost afectată semnificativ de prezența fumatului care nu numai că a alterat statusul inflamator dar a redus timpul de evoluție spre complicații a bolii. În concluzie, acest studiu a demonstrat existența unei legături între amploarea statusului inflamator, cuantificată prin activitatea enzimatică a chitotriozidazei serice și apariția complicațiilor microvasculare, în special neuropatia și retinopia. Nivelul seric al chitotriozidazei a prezentat o evoluție ascendentă o dată cu trecerea timpului demonstrând ipoteza noastră de cercetare conform căreia statusul inflamator al pacientului cu diabet zaharat de tip 1 are o evoluție continuu ascendentă în sensul agravării sale. La pacienții nefumători, chitotriozidaza circulantă a evoluat crescător odată cu trecerea timpului, cu progresia microalbuminuriei și cu declinul ratei filtrării glomerulare, în timp ce la fumători a fost observată doar prezența unei corelații pozitive cu evoluția în timp a bolii. În schimb studiul nostru nu a putut să evidențieze variații semnificative ale celuilalt marker, neopterină, nici în funcție de apariția complicațiilor microvasculare și nici în funcție de progresia naturală a bolii.

Studiul 3. Activitatea ADMA la pacienții cu diabet zaharat tip 1 și complicații cronice microvasculare prezente

Ipoteza de lucru: Scopul acestui studiu a fost de a evalua legătura dintre variațiile nivelului inhibitorului endogen al oxidului nitric (ADMA) și complicațiile microvasculare la pacienții cu diabet zaharat tip 1.

Material și metodă: Studiu de față a fost unul observațional, transversal în care au fost incluși 82 de subiecți cu diabet zaharat tip 1. Pacienții incluși în studiu au fost selectați în perioada ianuarie 2018-noiembrie 2019 din Centrul de Diabet Zaharat, Nutriție și Boli Metabolice, Cluj-Napoca.

Rezultate: În studiu au fost incluși 82 de persoane cu diabet zaharat tip 1. 53,66% au fost bărbați, 46,34% au fost femei. Complicațiile microvasculare au fost prezente în cadrul lotului după cum urmează: 58,54% au prezentat neuropatie, 60,98% retinopatie

și 75,61% se aflau deja în stadiul I al bolii renale cronice (microalbuminurie <30 mg/g).

Pacienții au avut în medie 44 ani ($\pm 13,39$), 26% erau fumători activi, 78% au avut hemoglobina glicată >7,5%, 35,37% au prezentat hipercolesterolemie, 62,2% aveau LDL-colesterolul >100mg/dl, 34,15% erau cunoscuți cu hipertensiune arterială și 23,7% sufereau de alte boli inflamatorii cronice. Rata filtrării glomerulare a fost de 97,27ml/min/1,73m² ($\pm 20,68$), mediana raportului albuminurie/creatinurie a fost 10,86 mg/dl (q1=5,03; q3=28,68), media glicemiei în momentul recoltării a fost 173 mg/dl (q1=124; q3=219), media insulinei administrate per kilogram corp a fost de 0,71UI/kgc ($\pm 0,26$). Hemoleucograma pacienților a evidențiat o valoare medie a hemoglobinei de 14,27mg/dl ($\pm 1,8$), trombocite 262,4*10⁹/L ($\pm 61,94$), leucocite 7,03*10⁹/L ($\pm 2,13$). Estimarea riscului de boli cardiovasculare fatale pe o perioadă de 10 ani a fost moderat la 41,46% și foarte crescut la 2,44% dintre pacienți.

La compararea lotului în funcție de repartiția pe sexe a pacienților nu s-au observat diferențe semnificative ale vârstei, duratei de evoluție a diabetului, HbA1c, indicelui de masă corporală, chitotriozidază ori ADMA dar nici în ceea ce privește prezența complicațiilor microvasculare. La nivelul întregului lot există o diferență semnificativă statistic între valorile serice ale CHIT1 la pacienții care prezintă neuropatie și retinopatie dar această diferență dispăre la cei cu microalbuminurie prezentă indiferent de stadiu. În ceea ce privește nivelul seric al dimetilargininei asimetrică (ADMA), nu s-au obținut rezultate semnificative statistic pentru niciuna din complicațiile cronice prezente. Dimetilarginina asimetrică a avut variații însă ne semnificative statistic la pacienții cu sau fără neuropatie, la fel și pentru pacienții cu sau fără retinopatie și nu a variat semnificativ în funcție de stadializarea microalbuminuriei. Dintre cei doi biomarkeri, chitotriozidaza se corelează pozitiv, direct proporțional cu durata de evoluție a diabetului zaharat și vârsta dar ADMA nu atinge pragul semnificației statistice în relația cu parametrii urmăriți. Nu s-au observat diferențe semnificative statistice între valorile serice ale ADMA în funcție de riscul cardiovascular asociat pacienților înrolați în studiu. Cu toate că între valorile serice ale ADMA nu s-au observat diferențe semnificative statistice, se poate observa tendința ascendentă a acestui biomarker în relație cu declinul filtrării glomerulare.

Concluzii: Studiul de față nu a reușit să demonstreze o legătură clară între inhibitorul endogen al sintetazei oxidului nitric (ADMA) și prezența complicațiilor microvasculare ori factorii de risc cardiovasculari la pacienții cu diabet zaharat tip 1. Valorile ADMA au fost ușor mai crescute la pacienții cu complicații cronice prezente dar pentru a putea trage o concluzie fermă, studii prospective privind evoluția acestui biomarker sunt necesare.

4. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Diabetul zaharat reprezintă una dintre cele mai importante probleme de sănătate publică, cu implicații atât pe plan social cât și economic. Această condiție supune pacientul unui risc crescut de morbiditate, mortalitate și invaliditate. Implicațiile socio-economice sunt cu atât mai importante cu cât presiunea asupra sistemului sanitar este foarte ridicată. Spitalizările, asistența ambulatorie și tratamentul sunt principalele cauze ale costurilor ridicate din această patologie.

Complicațiile microvasculare specifice își fac apariția la un moment dat în evoluția bolii indiferent de tipul de diabet. De aceea este foarte importantă depistarea

precoce a complicațiilor atât pentru creșterea calității vieții pacientului cât și pentru întârzierea exprimării clinice a acestora.

În prezenta lucrare a fost evidențiată durata de timp scursă între momentul diagnosticului și apariția complicațiilor microvasculare. În cazul diabetului zaharat tip 1 am demonstrat faptul că la pacienții cu nefropatie, exprimarea clinică a acestei complicații a fost mai precoce decât la pacienții cu diabet zaharat tip 2. Având în vedere această evoluție, metode noi de diagnostic sunt necesare.

Chitotriozidaza și neopterina sunt doi biomarkeri ai activării macrofagelor care joacă un rol important în activarea imunologică și a statusului inflamator. Valorile serice ale celor doi biomarkeri s-au dovedit a fi crescute printre alte patologii și la persoanele cu diabet. Până la momentul scrierii tezei niciun studiu nu a evaluat activitatea chitotriozidazei la pacienții adulți cu diabet zaharat tip 1.

Originalitatea acestei lucrări este oferită și de studiul care a demonstrat existența unei legături între amploarea statusului inflamator, cuantificată prin activitatea enzimatică a chitotriozidazei serice și apariția complicațiilor microvasculare, în special neuropatia și retinopatia. Evoluția în timp a noului biomarker a avut un traiect ascendent la pacienții cu complicații microvasculare prezente. Mai mult, acest biomarker sensibil scoate în evidență substratul inflamator la pacienții nefumători. La pacienții fumători din cauza existenței unui status cronic inflamator indus de tabagism, expresia crescută a biomarkerului se pierde. Acest lucru fiind luat în considerare, complicațiile microvasculare nu pot fi depistate precoce din cauza perturbării statusului inflamator iar perioada de timp până la apariția acestora este mult mai scurtă. Un alt biomarker de mare interes abordat în prezenta lucrare, care aduce un plus de originalitate este inhibitorul endogen al sintetazei oxidului nitric. Cu ajutorul acestui biomarker am dorit să verificăm ipoteza declanșării apoptozei celulare induse de hipo-oxigenarea tisulară produsă de microinflamația din diabetul zaharat. Cu toate că valorile acestui marker au fost crescute, nu a putut fi stabilită o relație între prezența complicațiilor microvasculare la pacienții cu diabet zaharat tip 1 și acest biomarker.

Contribuția inovativă a tezei constă în creșterea vizibilității acestor biomarkeri, în special al chitotriozidazei care ar putea fi utilizat în practica clinică curentă pentru stratificarea riscului pacienților, depistarea precoce a complicațiilor microvasculare și implicit implementarea unei atitudini terapeutice adecvate.

ABSTRACT OF THE PhD THESIS

Evolution in time of type 1 diabetes mellitus using macrophage activation biomarkers

PhD Student **Ancuța Cutaș**

PhD Supervisor **Prof.dr. Andrei Achimaș-Cadariu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	11
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Diabetes mellitus a major health problem	15
1.1. Epidemiology	15
1.2. Definition	16
1.3. Classification of diabetes mellitus	16
2. Diabetes mellitus type 1	17
2.1. Definition	17
2.2. Epidemiology of type 1 diabetes mellitus	17
2.3. Risk factors	18
2.4. Specific antibodies	19
2.5. Patogenesis	19
3. Diabetes mellitus type 2	23
3.1. Definition	23
3.2. Epidemiology of type 2 diabetes mellitus	23
3.3. Risk factors	23
3.4. Patogenesis	24
4. Diabetes mellitus complications	27
4.1. Acute complications of diabetes mellitus	27
4.2. Chronic complications of diabetes mellitus	27
4.3. Peripheral neuropathy	29
4.4. Diabetic nephropathy	30
4.5. Diabetic retinopathy	31
5. Inflammatory status	33
5.1. Definition	33
5.2. Inflammation biomarkers	33
5.3. Chronic inflammations biomarkers	37
5.3.1 Chitotriosidase	37
5.3.2 Neopterin	40
5.4. Other usefull markers-ADMA	42
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis	47
2. General Methodology	48
3. Study 1 - Inflammatory response and timeline of chronic complications in patients with type 1 and 2 diabetes mellitus	49

3.1. Introduction	49
3.2. Working hypothesis	50
3.3. Material and method	50
3.4. Results	51
3.5. Discussion	61
3.6. Conclusions	64
4. Study 2 - Evaluation of Chitotriosidase and Neopterin as Biomarkers of Microvascular Complications in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus	65
4.1. Introduction	65
4.2. Working hypothesis	67
4.3. Material and method	67
4.4. Results	68
4.5. Discussion	90
4.6. Conclusions	92
5. Study 3 - Activity of ADMA in patients with type 1 diabetes mellitus and chronic microvascular complications	95
5.1. Introduction	95
5.2. Working hypothesis	96
5.3. Material and method	96
5.4. Results	97
5.5. Discussion	104
5.6. Conclusions	105
7. General conclusions	107
8. Originality and innovative contributions	109
REFERENCES	111

Keywords: diabetes mellitus, inflammation, microvascular complications, chitotriosidase, neopterin, asymmetric dimethylarginine

1. INTRODUCTION

Diabetes is one of the most important public health problems, with both social and economic implications. This pathology is spreading globally at a higher rate annually. Chronic hyperglycemia contributes to the occurrence of complications causing an increase in morbidity and mortality associated with this pathology. In the evolution of diabetes, chronic complications affect various systems and organs through complex pathophysiological mechanisms. The chronic inflammatory status specific to this pathology is involved in the complex pathophysiological mechanisms preceding the occurrence of chronic diabetic complications. Chytotriosidase and neopterin are two biomarkers of macrophage activation that play an important role in

immunological activation and inflammatory status. Asymmetric dimethylarginine is an endogenous inhibitor of nitric oxide synthetase and an important marker of endothelial dysfunction.

The present research aimed to determine these biomarkers in patients with type 1 diabetes and their contribution to the occurrence and evolution of chronic microvascular complications.

2. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

There are currently 463 million people living with diabetes globally. It is estimated that by 2045 there will be 700 million people living with diabetes. . In Europe, there was a substantial increase compared to the estimates from 2000, reaching in 2019 a number of 59.3 million people with diabetes. Among the most affected areas, with a prevalence of over 8.8% and a proportion of 20.7% of undiagnosed patients is Romania. The PREDATORR study (National Study on Diabetes, Prediabetes, Overweight, Obesity, Dyslipidemia, Hyperuricemia and the Prevalence of Chronic Kidney Disease in Romania) showed a total prevalence of diabetes among the adult population aged 20 to 79 years, of 11.6%, of which 2.4% were not previously diagnosed. Diabetes mellitus (DM) is a metabolic pathology with multiple etiologies. It is a heterogeneous syndrome characterized by chronic hyperglycemia (basal and/or postprandial), which can be associated with changes in lipid, protein, hydroelectrolytic and energy metabolism. In the course of diabetes, the hyperglycemic status resulting from inadequate control can lead to two types of complications: acute complications and chronic complications. Chronic complications of diabetes affect various organs and systems and are responsible for most of the morbidity and mortality associated with the disease. They can be classified into vascular and non-vascular complications. The microvascular complications are represented by neuropathy, retinopathy and nephropathy and the macrovascular ones are represented by coronary heart disease, arteriopathy, cerebrovascular disease. Non-vascular complications include gastroparesis, infections and dermatological manifestations. The risk of chronic complications is directly proportional to the increased blood glucose level. Screening for chronic complications is done depending on the type of diabetes. In patients with type 1 diabetes, screening is recommended 5 years after diagnosis and in those with type 2 diabetes, immediately after diagnosis. Inflammation is a pathological process, a defense reaction of the body, characterized by damage or destruction of tissues caused by a variety of cytological and chemical reactions to harmful stimuli. It can be acute or chronic. Acute inflammation is characterized by a prompt response of the body and chronic inflammation is considered to be the result of persistent involvement of the innate and acquired immune system, morphopathologically defined by the presence of lymphocytes, macrophages and plasma cells in tissues. In the pathophysiology of chronic complications, inflammatory status plays an important role in patients with diabetes. Chytotriosidase and neopterin are two biomarkers of macrophage activation capable of detecting undetectable inflammation through markers used in current clinical practice. Asymmetric dimethyl arginine is a biomarker of endothelial dysfunction, known as a predictor of cardiovascular risk.

3. PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1. Inflammatory response and timeline of chronic complications in patients with type 1 and 2 diabetes mellitus

The results of this study were reported in the International Journal of Diabetes in Developing Countries.

Working hypothesis: Our study aimed to assess the association between inflammatory status, reflected by C-reactive protein (CRP) values and the evolution of type 1 and 2 DM patients, evaluated by glycosylated hemoglobin (HbA1c) levels, the length of disease duration, the average time until the onset of microvascular complications and their risk of occurrence.

Material and method: We conducted a retrospective observational study, involving 192 patients with DM, diagnosed and followed up at the Centre for Diabetes Mellitus, Nutrition and Metabolic Diseases, Cluj-Napoca, Romania, between January 2018 and February 2019. Among them, 138 had type 1 and 54 had type 2 DM. Data collection was performed using patient medical records. Statistical analysis was performed with the IBM SPSS V25 program. The normality of distribution of quantitative variables was tested using the Kolmogorov-Smirnov test.

Results: Of the 192 patients included in our study, 138 (71.90%) had type 1 and 54 (28.10%) had type 2 DM. Their average age at the time of enrolment was 22.41 (\pm 9.75) years for those with type 1 DM and 64.22 (\pm 8.92) years for those with type 2 DM. The mean duration of disease progression was 9.95 (\pm 8.52) years in patients with type 1 DM and 14.37 (\pm 8.35) years in patients with type 2 DM. The median value of HbA1c was 7.85% in type 1 and 8.74% in type 2 DM. Median CRP values were 1.34 mg/dL and 1.44 mg/dL in patients with type 1 and 2 DM, respectively. We noticed significant differences between the two groups regarding the age of patients, the duration of disease and the percentage of HbA1c ($p < 0.01$, Mann-Whitney U test). There were no statistically significant differences between serum CRP values among the two groups. In type 1 DM patients included in our study, we found statistically significant differences between HbA1c values and the presence of nephropathy, retinopathy and neuropathy. Regarding serum CRP levels in patients with type 1 DM, statistically significant differences were observed for the association with nephropathy, retinopathy and arterial hypertension, but not with neuropathy. In the group of patients with type 2 DM, the differences between HbA1c and CRP values associated with either microvascular complications, or arterial hypertension, did not reach statistical significance. Statistically significant differences were noted between the two groups of diabetic patients concerning HbA1c levels in patients with stage I diabetic nephropathy, and CRP values in patients with retinopathy. On the other hand, the occurrence of diabetic neuropathy did not induce any statistically significant differences in either HbA1c, or CRP levels, between the two patient groups. Our results indicate a higher relative risk of chronic complications in patients with type 2, compared to those with type 1 DM. The relative risk of occurrence of nephropathy was 1.87 (1.58–1.98) times higher in type 2, than in type 1 DM. For retinopathy, the relative risk of occurrence was 2.38 (1.42– 3.93) times higher in type 2, whereas for neuropathy, it was 3.66 (2.98–3.82) times higher in type 2, compared with type 1 DM. In patients with type 1 DM, we noticed a statistically significant difference between disease duration until the occurrence of either of the chronic microvascular complications (nephropathy, neuropathy, and retinopathy). In patients with type 2 DM, a statistical significance was reached only between disease duration until the occurrence of diabetic retinopathy. A significant positive correlation between the values of biological parameters (HbA1c and CRP) and the duration of disease

progression was noted for type 1 DM patients. This positive correlation was also observed for the whole patient cohort, comprising both types of DM patients, but not for type 2 diabetic patients.

Conclusions: This study demonstrated the existence of a direct link between systemic inflammation, reflected by C-reactive protein values, and the timely progression of type 1 DM. In these patients, higher levels of HbA1c were indicative of more advanced nephropathy, retinopathy and peripheral neuropathy, while elevated CRP concentrations predisposed to more severe nephropathy and retinopathy. In patients with type 2 DM, no statistical significance was found between the studied biomarkers and the occurrence of microvascular complications, although diabetic retinopathy was more common in subjects with a longer disease evolution. Diabetic nephropathy was shown to appear sooner in patients with type 1 DM, whereas retinopathy and peripheral neuropathy had a similar pattern of timely occurrence for the two types of diabetic patients.

Study 2. Evaluation of Chitotriosidase and Neopterin as Biomarkers of Microvascular Complications in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus

The results of this study were reported in the *Diagnosics Journal*.

Working hypothesis: Our study aimed to evaluate a possible association between the inflammatory status (reflected by serum chitotriosidase and neopterin) and the timely evolution and occurrence of chronic microvascular complications in patients with type 1 DM.

Material and method: This observational cross-sectional study included 82 patients with type 1 DM, consecutively selected from the Centre for Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases, Cluj-Napoca, Romania, between January 2018 and November 2019. Data collection was performed using patient observation sheets and by collecting 2ml of blood for dosing biomarkers. Statistical analysis of the data was performed using IBM SPSS V25. To test the normality of the distribution of the statistical series we used the Kolmogorov-Smirnov test, and then we performed the statistical analysis using non-parametric tests (Mann-Whitney U Test, Kruskal-Wallis).

Results: Our study comprised 82 patients with type 1 DM, of whom 44 (53.66%) were men. Neuropathy was present in 58.54% and retinopathy in 60.98% of patients. Microalbuminuria was present as follows: 75.61% had stage A1, 19.51% stage A2 and 4.88% stage A3. Only seven (15.9%) male and eight (21.05%) female patients received treatment with insulin by continuous subcutaneous infusion (insulin pump), the others being treated with insulin in basal-bolus regimen. The mean age of the patients was 44 years (± 13.39), with a body mass index (BMI) of 25.65 kg/m² (± 4.37). The mean value of HbA1c was 8.85% (± 1.78), and the mean duration of diabetes was 20 years (Q1=13; Q3=31). The mean glomerular filtration rate was 97.27 mL/min/1.73m² (± 20.68), the median UACR was 10.86 mg/g (Q1=5.03; Q3=28.68), the mean fasting glycaemia at diagnosis was 173 mg/dL (Q1=124; Q3=219), the mean insulin dose per kilogram body weight was 0.71 IU/kg (± 0.26), and the mean value of LDL cholesterol was 107.49 mg/dL (± 33.33). The median value of serum chitotriosidase activity was 147.5 nmol/mL/h (Q1= 80; Q2=240), and that of neopterin was 9.31 ng/mL (Q1=6.18; Q2= 16.03). Full blood count showed a mean haemoglobin value of 14.27 g/dL (± 1.8), a number of 262.4×10^9 platelets/L (± 61.94) and a number of 7.03×10^9 leukocytes/L (± 2.13). Smoking status was found in 12 (14.63%) male patients and in 10 (12.20%) female patients. Among the associated pathologies, chronic inflammatory diseases

were present in 23.17% of patients. No significant differences in age, disease duration, HbA1c, BMI, serum chitotriosidase or neopterin levels were noticed, according to neither gender distribution nor microvascular complications occurrence. enzymatic activity of chitotriosidase in patients with neuropathy and retinopathy, compared to those without these complications. However, no significant differences in chitotriosidase activity were observed among patients with microalbuminuria, regardless of its evolutionary stage. For the serum level of neopterin, no statistically significant results were obtained for any of the existing microvascular complications. For the entire patient cohort, a statistically significant difference between the enzymatic activity of chitotriosidase in smoking and non-smoking subjects was noticed. In the case of neopterin, the statistical significance was not maintained. Within the subgroup of patients with confounding factors, no statistically significant differences in chitotriosidase activity or neopterin levels were observed between the subjects with different types of chronic complications and those without complications. The enzymatic activity of chitotriosidase in non-smoking patients has reached the threshold of statistical significance for neuropathy and retinopathy, but not for microalbuminuria. For neopterin, no statistically significant differences were observed for any of the chronic complications. When comparing the two biomarkers in patients with neuropathy, the diagnostic accuracy of chitotriosidase was superior to that of neopterin, with an area under the curve (AUC) of 0.843 and an associated confidence interval between 0.727–0.959 ($p < 0.001$). Of the two biomarkers of macrophage activation, only chitotriosidase was positively correlated with the duration of DM. Neither of the two biomarkers reached statistical significance in terms of correlation with HbA1c or with the therapeutic insulin dose. A moderate, positive, statistically significant correlation was observed in both smoking and non-smoking patients between chitotriosidase enzymatic activity and disease duration. In non-smokers, both the age of the patients and the UACR were positively and significantly correlated with the inflammatory biomarker. Another correlation that reached statistical significance in non-smokers was a negative one, between chitotriosidase activity and the glomerular filtration rate (GFR).

Conclusions: To the best of our knowledge, this is the first evaluation of chitotriosidase as an inflammatory marker in patients with type 1 DM and microvascular complications. We

demonstrated a link between the extent of inflammatory status, quantified by the enzymatic activity of chitotriosidase, and the occurrence of neuropathy and retinopathy in type 1 DM. Circulating chitotriosidase showed an increased progression over time. In nonsmoking patients, its evolution was correlated with the aggravation of microalbuminuria and the decline of GFR, while in smokers, only a positive correlation between chitotriosidase activity and disease progression was observed. Moreover, according to our results, the length of disease evolution between the moment of diagnosis and the occurrence of microvascular complications was longer in non-smokers than in smokers, highlighting the impact of chronic inflammation on the progression of DM. In our study, circulating levels of neopterin were not associated with any of the microvascular complications in patients with type 1 diabetes.

Study 3. Activity of ADMA in patients with type 1 diabetes mellitus and chronic microvascular complications

Working hypothesis: The aim of this study was to evaluate the link between changes in the level of endogenous nitric oxide inhibitor (asymmetric dimethyl arginine) and microvascular complications in patients with type 1 diabetes.

Material and method: The present study was an observational, cross-sectional study in which 82 subjects with type 1 diabetes were included. The patients included in the study were selected between January 2018 and November 2019 from the Center for Diabetes, Nutrition and Metabolic Diseases, Cluj- Napoca.

Results: The study included 82 people with type 1 diabetes. 53.66% were men, 46.34% were women. Microvascular complications were present in the group as follows: 58.54% had neuropathy, 60.98% retinopathy and 75.61% were already in stage I of chronic kidney disease (microalbuminuria <30 mg / g). Patients had on average 44 years old (± 13.39), 26% were active smokers, 78% had glycated hemoglobin $>7.5\%$, 35.37% had hypercholesterolemia, 62.2% had LDL-cholesterol >100 mg/dl, 34.15% were known to have high blood pressure and 23.7% suffered from other chronic inflammatory diseases. The glomerular filtration rate was 97.27 ml/min/ 1.73 m² (± 20.68), the median albuminuria/creatinine ratio was 10.86 mg/dl (q1=5.03; q3=28.68), the mean blood glucose at harvest was 173 mg/dl (q1=124; q3=219), the mean insulin administered per kilogram body weight was 0.71 IU / kgc (± 0.26). The patients blood count showed an average hemoglobin value of 14.27 mg/dl (± 1.8), platelets $262.4 \cdot 10^9$ /L (± 61.94), leukocytes $7.03 \cdot 10^9$ /L (± 2.13). The estimated risk of fatal cardiovascular disease over a 10-year period was moderate in 41.46% and very high in 2.44% of patients. When comparing the group according to the sex distribution of the patients, no significant differences were observed in age, duration of diabetes, HbA1c, body mass index, chitotriosidase or ADMA, but also in terms of the presence or absence of microvascular complications. At the level of the whole group, there is a statistically significant difference between the serum values of CHIT1 in patients with neuropathy and retinopathy, but this difference disappears in those with microalbuminuria present regardless of the stage. Regarding the serum level of asymmetric dimethylarginine (ADMA), no statistically significant results were obtained for any of the chronic complications present. Asymmetric dimethylarginine had statistically insignificant variations in patients with or without neuropathy, as well as in patients with or without retinopathy and did not vary significantly depending on the staging of micro-albuminuria. Of the two biomarkers, chitotriosidase correlates positively, directly proportional to the duration of diabetes and age, but ADMA does not reach the threshold of statistical significance in relation to the followed parameters. No statistically significant differences were observed between the serum values of ADMA depending on the cardiovascular risk associated with the patients enrolled in the study. Although no statistically significance was observed between serum ADMA values, the upward trend of this biomarker in relation to the decline of glomerular filtration can be observed.

Conclusions: The present study failed to demonstrate a clear link between endogenous nitric oxide synthase inhibitor (ADMA) and the presence of microvascular complications or cardiovascular risk factors in patients with type 1 diabetes. ADMA values were slightly higher in patients with chronic complications but in order to be able to draw a firm conclusion, prospective studies on the evolution of this biomarker are needed.

4. Originality and innovative contributions

Diabetes is one of the most important public health problems, with both social and economic implications. This condition puts the patient at increased risk of morbidity, mortality and disability. The socio-economic implications are all the more important as the pressure on the health system is very high. Hospitalizations, outpatient care and treatment are the main causes of the high costs of this pathology. Specific microvascular complications appear at some point in the evolution of the disease regardless of the type of diabetes. That is why it is very important to detect complications early, both to increase the patient's quality of life and to delay their clinical expression.

In this paper, the time elapsed between the moment of diagnosis and the occurrence of microvascular complications was highlighted. In the case of type 1 diabetes we have shown that in patients with nephropathy, the clinical expression of this complication was earlier than in patients with type 2 diabetes. Given this evolution, new diagnostic methods are needed.

Chytotriosidase and neopterin are two biomarkers of macrophage activation that play an important role in immunological activation and inflammatory status. The serum values of the two biomarkers have been shown to be increased among other pathologies, in people with diabetes. Until the time of writing, no study had evaluated the activity of chytotriosidase in adult patients with type 1 diabetes.

The originality of this paper is also provided by the study that demonstrated the existence of a link between the extent of inflammatory status, quantified by the enzymatic activity of serum chytotriosidase and the occurrence of microvascular complications, especially neuropathy and retinopathy. The evolution over time of the new biomarker had an upward trajectory in patients with present microvascular complications. Moreover, this sensitive biomarker highlights the inflammatory substrate in non-smoking patients. In smoking patients due to the existence of a chronic inflammatory status, the increased expression of the biomarker is lost. This being taken into account, microvascular complications cannot be detected early due to the disturbance of the inflammatory status and the time until their appearance is much shorter. Another biomarker of great interest addressed in this paper, which adds originality is the endogenous inhibitor of nitric oxide synthetase. With the help of this biomarker we wanted to test the hypothesis of triggering cellular apoptosis induced by tissue hypo-oxygenation caused by microinflammation in diabetes. Although the values of this marker were increased, a relationship could not be established between the presence of microvascular complications in patients with type 1 diabetes and this biomarker.

The innovative contribution of the thesis is to increase the visibility of these biomarkers, especially chytotriosidase that could be used in current clinical practice to stratify patients risk, early detection of microvascular complications and thus the implementation of an appropriate therapeutic attitude.