
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Monitorizarea variabilității factorilor de risc cardiometabolic la pacienții cu diabet zaharat

Student doctorand **Dana-Mihaela Bîrsan (Ciobanu)**

Coordinator Științific Prof.dr. **Petru-Adrian Mircea**

Cuprins

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Factorii de risc cardiometabolic	19
1.1. Diabetul zaharat de tip 2	19
1.2. Hipertensiunea arterială	23
1.3. Obezitatea de tip central	28
1.4. Dislipidemia	29
1.5. Alți factori de risc cardiometabolic	30
1.5.1 Vârsta	30
1.5.2 Sexul	31
1.5.3 Statusul de fumător	32
2. Markerii inflamației în diabetul zaharat și hipertensiunea arterială	33
2.1. Proteina C-reactivă înalt sensibilă	33
2.2. Moleculele de adeziune intercelulară-1 (ICAM-1) și adeziune vasculară-1 (VCAM-1)	34
2.3. Relația dintre monitorizarea ambulatorie a tensiunii arteriale pe durata a 24 de ore și markerii inflamației cronice	34
3. Fluoroforii: produșii de glicare avansată și nicotinamida adenin dinucleotida hidrogen (NADH) în diabetul zaharat	35
3.1. Produșii de glicare avansată	35
3.1.1. Date generale	35
3.1.2. Implicațiile produșilor de glicare avansată în diabet zaharat	36
3.2 NADH	37
3.2.1. Date generale	37
3.2.2. Implicațiile NADH în diabet zaharat	38
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru și obiective	41
1.1. Ipoteza de lucru	41
1.2. Obiective generale	41
2. Metodologia generală	43
2.1. Designul studiilor	43
2.2. Selecția și descrierea populației de studiu	43
2.2.1. Criteriile de includere	43
2.2.2. Criteriile de excludere	43
2.2.3. Grupul control	43
2.2.4. Aprobarea cercetării de către comisia de etică	43

2.3. Metodele	44
2.3.1. Chestionar	44
2.3.2. Măsurătorile antropometrice	44
2.3.3. Determinările biochimice	44
2.3.4. Măsurarea tensiunii arteriale	45
2.3.5. Protocolul monitorizării ambulatorii a tensiunii arteriale pe durata a 24 de ore	45
2.3.6. Analiza statistică	49
3. Studiul 1 – Rolul monitorizării ambulatorii a tensiunii arteriale pe durata a 24 de ore în evaluarea subiecților cu diabet zaharat de tip 2. Profilul de tip dipper și medicația anti-hipertensivă administrată în cursul seriei	51
3.1. Introducere	51
3.2. Obiective	51
3.3. Material și metode	51
3.4. Rezultate	52
3.5. Discuții	56
3.6. Concluzii	58
4. Studiul 2 – Monitorizarea ambulatorie a tensiunii arteriale pe durata a 24 de ore, hsCRP, ICAM-1 și VCAM-1 la subiecții cu diabet zaharat de tip 2 și control	59
4.1. Introducere	59
4.2. Obiective	59
4.3. Material și metode	60
4.4. Rezultate	60
4.5. Discuții	70
4.6. Concluzii	72
4.7. Sub-Studiul studiului 2. Monitorizarea ambulatorie a tensiunii arteriale, hsCRP și boala cronică de rinichi la subiecții cu diabet zaharat de tip 2 și control.	74
4.7.1. Introducere	74
4.7.2. Obiective	74
4.7.3. Material și metode	74
4.7.4. Rezultate	74
4.7.5. Discuții	77
4.7.6. Concluzii	78
5. Studiul 3 – Analiza spectrofluorometrică a AGEs și a NADH la subiecții cu diabet zaharat de tip 2 și control	81

5.1. Introducere	81
5.2. Obiective	81
5.3. Material și metode	81
5.4. Rezultate	83
5.5. Discuții	92
5.6. Concluzii	95
7. Concluzii generale	97
8. Originalitate	99
REFERINȚE	101

Cuvinte cheie: factori de risc cardiometabolic; diabet zaharat de tip 2; hipertensiune arterială; monitorizare ambulatorie a tensiunii arteriale pe durata a 24 de ore; variabilitatea tensiunii arteriale; profil de tip dipper; proteina C-reactivă înalt sensibilă; molecula de adeziune intercelulară-1; molecula de adeziune celular-vasculară-1; produși de glicare avansată; nicotinamida adenin dinucleotida hidrogen; spectroscopia de fluorescență.

Referințe: 288

INTRODUCERE

Diabetul zaharat reprezintă una dintre cele mai studiate patologii dat fiind impactul negativ al complicațiilor cronice ale acestuia asupra calității vieții persoanelor afectate. Deși factorii de risc cardiometabolic sunt prezenți la diagnosticul diabetului zaharat de tip 2, modul în care aceștia variază influențează decisiv debutului și evoluția complicațiilor cronice ale diabetului zaharat. Hipertensiunea arterială este un important și controlabil factor de risc cardiometabolic. Cu toate că hipertensiunea arterială nocturnă este mai frecventă la persoanele cu diabet zaharat tip 2 comparativ cu populația generală, administrarea medicației anti-hipertensive în cursul dimineții este preferată administrării în cursul serii. Evidențe provenite din trialuri clinice controlate au demonstrat beneficiile administrării medicației anti-hipertensive asupra profilului normal de dipper în ce privește reducerea ratei evenimentelor cardiovasculare. Variabilitatea tensiunii arteriale a fost asociată cu risc crescut de evenimente cardiovasculare, independent de prezența hipertensiunii arteriale. Deși variațiile tensiunii arteriale sunt ușor de estimat folosind monitorizarea ambulatorie a tensiunii arteriale pe durata a 24 de ore, acestea sunt rareori utilizate în practica clinică. Markerii serici ai inflamației, proteina C-reactivă înalt sensibilă (hsCRP), moleculele de adeziune intercelulară-1 (ICAM-1) și celular-vasculară-1 (VCAM-1) au valori mai crescute la persoanele cu diabet zaharat tip 2 și hipertensiune arterială comparativ cu subiecții sănătoși. De asemenea, a fost descrisă asocierea dintre inflamația sistemică cronică, controlul și variabilitatea tensiunii arteriale. Evidențele medicale indică

faptul că hsCRP joacă un rol activ în dezvoltarea timpurie a plăcii de ateroscleroză prin stimularea expresiei celulelor de adeziune moleculară, reflectând disfuncția endotelială.

Noi markeri biologici au apărut pentru evaluarea riscului cardiometabolic. Între aceștia, produșii de glicare avansată și nicotinamida adenin dinucleotida hidrogen (NADH) pot fi mășurați printr-o tehnică inovatoare, spectroscopia de fluorescență. Produșii de glicare avansată sunt implicați în disfuncția endotelială și au o strânsă legătură cu diabetul zaharat, bolile cardiovasculare și boala cronică de rinichi. NADH oxidazele au rol determinant în funcționarea celulelor vasculare și au fost identificate în stări patologice ce implică inflamația necontrolată precum boala cardiovasculară, diabetul zaharat tip 2 și hipertensiunea arterială.

Teza de față este alcătuită din două secțiuni: stadiul actual al cunoașterii și cercetarea personală. Prima secțiune cuprinde informații preluate din literatura medicală actuală, necesare abordării ipotezelor cercetării personale: monitorizarea variabilității factorilor de risc cardiometabolic în diabetul zaharat. Contribuția personală conține trei studii. În primul studiu, autoarea a demonstrat ca persoanele cu diabet zaharat tip 2 care au primit medicația anti-hipertensivă în cursul seriei au avut prevalență mai mare a profilului de tip dipper comparativ cu cele care au primit medicația anti-hipertensivă în cursul zilei sau erau fără medicație. În al doilea studiu, autoarea a arătat că persoanele cu diabet zaharat tip 2 și hipertensiune arterială necontrolată au avut cea mai mare variabilitate a tensiunii arteriale și cele mai mari valori ale markerilor inflamației cronice; și, variabilitatea tensiunii arteriale a fost predictor al markerilor inflamației determinați. În al treilea studiu, autoarea a demonstrat că subiecții cu diabet zaharat tip 2 au avut niveluri mai crescute ale raportului produșilor de glicare avansată/NADH, iar raportul a fost predictiv pentru prezența bolii cardiovasculare și a bolii renale cronice.

Această cercetare a fost efectuată sub îndrumarea dlui Prof.dr. Petru-Adrian Mircea. Cercetarea a fost parțial finanțată prin Fondul Social European, Programul Operațional Sectorial Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013, contract nr. POSDRU /159/1.5/S/138776.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul 1. Rolul monitorizării ambulatorii a tensiunii arteriale pe durata a 24 de ore în evaluarea persoanelor cu diabet zaharat tip 2. Profilul de tip dipper și medicația anti-hipertensivă administrată în cursul seriei.

Obiective. Profilul normal de dipper a fost asociat cu risc mai redus de evenimente cardiovasculare. Efectul momentului zilei când se administreză medicația anti-hipertensivă asupra pattern-ului circadian a tensiunii arteriale a fost adusă recent în atenție ca factor important ce influențează scăderea tensiunii arteriale în cursul nopții. Deoarece hipertensiunea arterială în cursul nopții este mai frecventă la persoanele cu diabet zaharat tip 2 decât în populația generală, iar terapia convențională cu medicație anti-hipertensivă administrată în cursul dimineții este preferată comparativ cu administrarea în cursul seriei, este de mare interes evaluarea efectului momentului zilei

când se administrează medicația anti-hipertensivă asupra monitorizării ambulatorii a tensiunii arteriale și a pattern-ului de dipper.

Material și metode. Studiul observațional a înrolat persoane cu diabet zaharat tip 2 și hipertensiune arterială (n=144) conform criteriilor de includere și de excludere. În funcție de momentul zilei cand subiecții își administrau medicația anti-hipertensivă, au fost împărțiți în trei grupuri: subiecții care nu primeau medicație anti-hipertensivă (n=28), subiecții care își administrau cel puțin o clasă de medicație anti-hipertensivă în cursul serii (n=60) și subiecții care își administrau toată medicația anti-hipertensivă în cursul dimineții (n=56).

Rezultate. Nu s-au observat diferențe semnificative statistic între cele trei grupuri în ce privește vârsta, sexul, statusul de fumător, durata diabetului zaharat tip 2, parametrii antropometrici, tensiunea arterială sistolică și diastolică măsurată în clinică. Inhibitorii de enzimă de conversie și blocanții receptorilor de angiotensinogen II au fost clasele de medicație anti-hipertensivă cele mai utilizate. Blocanții canalelor de calciu și beta-blocantele au fost mai frecvent utilizați de către cei care își administrau cel puțin o clasă de medicație anti-hipertensivă în cursul serii comparativ cu cei care își administrau toată medicația anti-hipertensivă în cursul dimineții. Nu s-au observat diferențe semnificative statistic în ce privește media și variabilitatea tensiunii arteriale sistolică și diastolică în cursul zilei, nopții și pe durata a 24 de ore între cele trei grupuri. Pattern-ul de tip dipper a fost mai frecvent observat în grupul subiecților care își administrau cel puțin o clasă de medicație anti-hipertensivă în cursul serii comparativ cu celelalte două grupuri. În populația de studiu, administrarea a cel puțin unei clase de medicație anti-hipertensivă în cursul serii a fost direct și semnificativ statistic asociată cu durata hipertensiunii arteriale, prezența bolii cardiovasculare și profilul de dipper. În timp ce, administrarea a cel puțin unei clase de medicație anti-hipertensivă în cursul serii a fost invers și semnificativ statistic asociată cu variabilitatea tensiunii arteriale diastolice în cursul zilei și rata de filtrare glomerulară estimată. Profilul de tip dipper a fost invers și semnificativ statistic asociat cu durata diabetului zaharat tip 2. În plus, profilul de tip dipper a fost direct și semnificativ statistic asociat cu variabilitatea tensiunii arteriale sistolică și diastolică pe durata a 24 de ore, precum și cu variabilitatea tensiunii arteriale diastolică în cursul nopții. Când profilul de dipper a fost prezis în regresie multivariată, autoarea a observat că administrarea a cel puțin a unei clase de medicație anti-hipertensivă în cursul serii și durata diabetului zaharat au fost predictori independenți, chiar și după ajustare pentru factorii de confuzie.

Concluzii. Rezultatele acestui studiu completează cu informații valoroase evidențele medicale care promovează administrarea a cel puțin a unei clase de medicație anti-hipertensivă în cursul serii pentru tratamentul hipertensiunii arteriale la subiecții cu diabet zaharat tip 2, și recomandă evaluarea persoanelor cu diabet zaharat tip 2 utilizând monitorizarea ambulatorie a tensiunii arteriale pe durata a 24 de ore în vederea cuantificării riscului cardiovascular.

Studiul 2. Monitorizarea ambulatorie a tensiunii arteriale pe durata a 24 de ore, hsCRP, ICAM-1 și VCAM-1 la subiecții cu diabet zaharat tip 2 și control

Obiective. Asocierea diabetului zaharat tip 2 și a hipertensiunii arteriale cu inflamația subclinică a fost descrisă în literatura medicală, însă posibila influență a variabilității tensiunii arteriale monitorizate ambulator pe durata a 24 de ore asupra hsCRP, ICAM-1 și VCAM-1 este în curs de investigare. Măsurarea simultană a acestor parametri ar putea oferi o mai bună înțelegere a modului în care tensiunea arterială monitorizată ambulator influențează inflamația vasculară. De aceea, în acest studiu observațional, autoarea a investigat asocierea dintre media și variabilitatea tensiunii arteriale monitorizată ambulator pe durata a 24 de ore și hsCRP, ICAM-1, VCAM-1, la subiecții cu diabet zaharat tip 2 și control.

Material și metode. Studiul a inclus un număr de 86 de subiecți; grupurile subiecților cu diabet zaharat tip 2 (n=75) și control (n=11) au fost selectați conform criteriilor de includere și de excludere. În funcție de monitorizarea ambulatorie a tensiunii arteriale pe durata a 24 de ore și diagnosticul anterior de hipertensiune arterială, subiecții cu diabet zaharat tip 2 au fost împărțiți în trei grupuri: grupul cu tensiune arterială normală (n=9), grupul cu hipertensiune arterială controlată (n=46) și grupul cu hipertensiune arterială necontrolată (n=20).

Rezultate. Cele mai mari valori ale hsCRP și ICAM-1 a fost observate în grupul cu hipertensiune arterială necontrolată și au fost semnificativ mai mari decât în grupul control și cel cu tensiune arterială normală. Deși valoarea VCAM-1 a fost cea mai ridicată în grupul cu hipertensiune arterială necontrolată, diferența față de celelalte grupuri nu a atins semnificația statistică. Când a analizat parametrii monitorizării tensiunii arteriale pe durata a 24 de ore, autoarea a observat că au existat diferențe semnificative statistic în ce privește variabilitatea tensiunii arteriale sistolică în cursul zilei și pe durata a 24 de ore, și a tensiunii arteriale diastolică în cursul zilei între cele patru grupuri. În plus, grupul cu hipertensiune arterială necontrolată a avut cele mai ridicate valori ale variabilității tensiunii arteriale sistolică și diastolică. Variabilitatea tensiunii arteriale sistolică și diastolică în cursul zilei a fost semnificativ mai mare în grupul cu hipertensiune arterială necontrolată comparativ cu grupul control. Variabilitatea tensiunii arteriale sistolică în cursul zilei și pe durata a 24 de ore a fost semnificativ mai mare în grupul cu hipertensiune arterială necontrolată comparativ cu grupul cu hipertensiune arterială controlată. HsCRP a fost corelată cu tensiunea arterială sistolică medie în cursul zilei, variabilitatea tensiunii arteriale sistolică și diastolică în cursul zilei și pe durata a 24 de ore. ICAM-1 a fost corelat cu variabilitatea tensiunii arteriale sistolică și diastolică în cursul zilei și pe durata a 24 de ore, vârsta și tensiunea arterială sistolică măsurată în clinică. VCAM-1 a fost corelată cu vârsta. Când hsCRP a fost prezisă utilizând regresia multivariată, autoarea a observat că variabilitatea tensiunii arteriale în cursul zilei și pe durata a 24 de ore au fost predictorii semnificativi în două modele diferite, chiar și după ajustare pentru factorii de confuzie: parametrii antropometrici, vârsta, durata diabetului zaharat și hemoglobina glicată.

Concluzii. Autoarea a demonstrat că hsCRP și ICAM-1 s-au corelat cu variabilitatea tensiunii arteriale monitorizată ambulator. În plus, grupul cu hipertensiune arterială necontrolată a avut cele mai mari valori ale hsCRP, ICAM-1 și VCAM-1. Variabilitatea tensiunii arteriale diastolică în cursul zilei și pe durata a 24 de ore a fost predictor independent ale hsCRP, în timp ce variabilitatea tensiunii arteriale diastolice în cursul zilei a fost predictor al ICAM-1. Evaluarea ambulatorie a variabilității tensiunii arteriale, precum și a markerilor inflamației cronice oferă o mai bună înțelegere a mecanismelor care generează disfuncția endotelială în hipertensiunea arterială și ar putea contribui la stratificarea riscului cardiovascular al persoanelor cu diabet zaharat tip 2. Markerii inflamației evaluați ar putea fi utilizați în practica clinică, însă, spre deosebire de monitorizarea ambulatorie a tensiunii arteriale, aceștia ridică probleme în ce privește costurile și procedura de determinare.

Sub-studiul Studiului 2. Controlul tensiunii arteriale monitorizată ambulator, hsCRP și boala renală cronică la subiecții cu diabet zaharat tip 2 și control.

Obiective. A fost raportat că hsCRP este implicată în apariția bolii renale cronice la persoanele cu diabet zaharat tip 2. Monitorizarea ambulatorie a tensiunii arteriale a fost dovedit că este superioară măsurătorii tensiunii arteriale în clinică la persoanele cu boală renală cronică, și că este predictor mai bun al deteriorării funcției renale, independent de factorii de confuzie. De asemenea, scăderea insuficientă a tensiunii arteriale în cursul nopții a fost corelată cu prezența bolii renale cronice. Scopul studiului a fost investigarea asocierii dintre controlul tensiunii arteriale evaluate ambulator pe durata a 24 de ore, hsCRP și prezența bolii renale cronice la subiecții cu diabet zaharat tip 2 și control.

Material și metode. Studiul observațional a înrolat un număr de 60 subiecți, conform criteriilor de includere și de excludere. În funcție de rata de filtrare glomerulară estimată, subiecții cu diabet zaharat tip 2 (n=49) au fost împărțiți în grupul cu funcție renală normală (n=27) și grupul cu boală renală cronică (n=22). Grupul control (n=11) a fost alcătuit din subiecți cu vârstă și distribuție a sexelor similară cu primele două grupuri.

Rezultate. Rata de filtrare glomerulară estimată a fost semnificativ mai mare în grupul control comparativ cu grupul cu diabet zaharat tip 2. Un procent de 67% dintre subiecții cu boală renală cronică au avut albuminurie. HsCRP a fost mai crescută în grupul subiecților cu diabet zaharat tip 2 și boală renală cronică comparativ cu celelalte două grupuri. Analiza complicațiilor diabetului zaharat tip 2 a indicat că subiecții cu boală renală cronică au avut semnificativ mai frecvent neuropatie și retinopatie diabetică decât subiecții fără boală renală cronică. Deși grupul subiecților cu diabet zaharat tip 2 și boală renală cronică au avut valori mai mari ale mediei și variabilității tensiunii arteriale în cursul zilei, a nopții și pe durata a 24 de ore, nu s-a atins semnificația statistică. În populația de studiu, prezența bolii renale cronice a fost direct asociată cu ksCRP, glicemia a-jeun, durata hipertensiunii arteriale și a diabetului zaharat tip 2, media tensiunii arteriale în cursul zilei, a nopții și pe durata a 24 de ore, prezența neuropatiei și a retinopatiei diabetice.

Concluzii. Pe lângă parametrii tradiționali care evaluează diabetul zaharat tip 2 și tensiunea arterială, markerii inflamației cronice trebuie considerați. Rezultatele acestui studiu confirmă asocierea dintre prezența bolii renale cronice și media tensiunii arteriale monitorizate ambulator. Autoarea propune utilizarea combinată a hsCRP și a parametrilor derivați din monitorizarea ambulatorie a tensiunii arteriale pentru detecția precoce și evaluarea progresiei bolii renale cronice, în particular la subiecții cu diabet zaharat tip 2 și durata lungă de evoluție a hipertensiunii arteriale.

Studiul 3. Analiza produșilor de glicare avansată, a NADH și a raportului acestora folosind spectroscopia de fluorescență la subiecții cu diabet zaharat tip 2 și control.

Obiective. Autoarea și-a propus să evalueze contribuția produșilor de glicare avansată, a NADH și a raportului acestora la fluorescența totală a serului la subiecții cu diabet zaharat tip 2 și control. În plus, a fost evaluată utilitatea celor doi biomarkeri pentru predicția prezenței diabetului zaharat tip 2, a hipertensiunii arteriale, a bolii cardiovasculare și a bolii renale cronice.

Material și metode. Studiul a inclus un număr de 63 subiecți cu diabet zaharat tip 2 și 25 subiecți control, conform cu criteriile de includere și de excludere. Analiza spectroscopică a fost realizată în departamentul de biofizică din cadrul Universității de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca. Probele de ser uman diluate au fost excitate la lungimea de undă de 370 nm, iar emisia a fost măsurată la ≈ 435 nm (produși de glicare avansată) and ≈ 460 nm (NADH). Datele obținute au fost analizate folosind programul Origin Pro versiunea 8.

Rezultate. Autoarea a observat valori ușor mai crescute ale produșilor de glicare avansată la subiecții cu diabet zaharat tip 2 comparativ cu control, în timp ce valorile NADH a fost semnificativ mai mici. Aceasta a rezultat în valori semnificative mai mari ale raportului produșilor de glicare avansată/NADH la subiecții cu diabet zaharat tip 2 comparativ cu control. Analiza monitorizării continue a tensiunii arteriale pe durata a 24 de ore a indicat diferențe semnificative statistic în ce privește media tensiunii arteriale sistolică, dar nu și diastolică, între cele două grupuri. NADH a fost corelat semnificativ și negativ cu trigliceridele serice, glicemia a-jeun, tensiunea arterială sistolică și diastolică măsurată în clinică, circumferința abdominală, colesterolul total și prezența dislipidemieii. Raportul produșilor de glicare avansată/NADH a fost semnificativ și direct asociat cu trigliceridele, glicemia a-jeun, colesterolul total, tensiune arterială sistolică și diastolică măsurate în clinică, prezența dislipidemieii, a bolii cardiovasculare și a bolii renale cronice. În plus, raportul produșilor de glicare avansată/NADH a fost semnificativ și invers asociat cu colesterolul HDL și rata de filtrare glomerulară estimată. Niciunul dintre parametrii monitorizării ambulatorii ale tensiunii arteriale nu s-au corelat cu raportul produșilor de glicare avansată/NADH. Când NADH și raportul produșilor de glicare avansată/NADH au fost incluși în modele separate de regresie multivariată ca variabile dependente, autoarea a observat că prezența diabetului zaharat tip 2 și trigliceridele au fost predictorii semnificativi; rezultatele au fost ajustate pentru vârstă, sex, statusul de fumător, indicele

de masă corporală, rata de filtrare glomerulară estimată și prezența bolii cardiovasculare. În plus, rezultatele de predicție a NADH au fost ajustate pentru durata diabetului zaharat tip 2, a hipertensiunii arteriale, tensiunea arterială sistolică măsurată în clinică și glicemia a-jeun. Curbele ROC au sugerat predicția prezenței bolii renale cronice și a bolii cardiovasculare pe baza raportul produșilor de glicare avansată/NADH. De asemenea, raportul a avut valoare predictivă pentru prezența hipertensiunii arteriale și a diabetului zaharat tip 2.

Concluzii. Raportul contribuțiilor produșilor de glicare avansată/NADH la fluorescența totală a serului a fost semnificativ mai mare în grupul subiecților cu diabet zaharat tip 2 comparativ cu grupul control, și s-a asociat cu trigliceridele, glicemia a-jeun, HDL-colesterol și rata de filtrare glomerulară estimată. Rezultatele studiului sugerează că raportul fluoroforilor produși de glicare avansată/NADH ar putea fi un marker pentru detecția și predicția bolii cardiovasculare și renale la persoanele cu diabet zaharat tip 2 și control.

Originalitate și contribuții inovatoare

Deși factorii de risc cardiometabolic au fost abordați și descriși în multe studii publicate anterior, autoarea acestei teze își propune să descrie noi factori implicați în creșterea riscului cardiometabolic la persoanele cu diabetul zaharat. Caracterizarea acestor noi factori ar putea ajuta la înțelegerea, și posibil, la rezolvarea problemelor rezultate din implicarea acestora în dezvoltarea complicațiilor cronice ale diabetului zaharat, între care boala cardiovasculară și boala renală cronică ocupă un loc important. Monitorizarea variabilității factorilor de risc cardiovascular reprezintă o provocare în evaluarea subiecților cu diabet zaharat tip 2, dar în același timp, este esențială pentru individualizarea și optimizarea managementului diabetului zaharat tip 2. Înainte de a dezvolta intervenții țintite pentru prevenția și tratarea complicațiilor diabetului zaharat tip 2, este importantă înțelegerea căilor metabolice activate de factorii de risc cardiometabolic.

Studiul care a evaluat rolul monitorizării ambulatorii a tensiunii arteriale pe durata a 24 de ore a subiecților cu diabet zaharat tip 2 a deschis calea altor două studii clinice. Acest prim studiu și-a propus descrierea evaluării clinice optime a subiecților anterior diagnosticați cu diabet zaharat tip 2 și hipertensiune arterială, dat fiind complexitatea acestor boli și implicarea lor în apariția și progresia complicațiilor cronice ale diabetului zaharat tip 2. Prevalența crescută a profilului de tip dipper observată în grupul subiecților cu diabet zaharat tip 2 care își administrau cel puțin o clasă de medicație anti-hipertensivă în cursul serii comparativ cu celelalte două grupuri ar putea deschide drumul spre noi strategii de tratament care să reducă cu succes riscul cardiovascular.

Modificările la nivelul endoteliului vascular cauzate de inflamația sistemică subclinică ar putea determina creșterea variabilității tensiunii arteriale și deteriorarea controlului tensiunii arteriale, dar, în același timp, prezența hipertensiunii arteriale ar putea crește riscul cardiovascular prin stimularea apariției disfuncției endoteliale. În

studiul realizat, variabilitatea tensiunii arteriale monitorizate ambulator s-a asociat cu markerii inflamației subclinice evaluate prin hsCRP, ICAM-1 și VCAM-1. În plus, valorile hsCRP și ICAM-1 au fost prezise de către variabilitatea tensiunii arteriale măsurată ambulator în cursul zilei. Atât markerii inflamației subclinice cât și variabilitatea tensiunii arteriale măsurată ambulator ar trebui utilizate în practica clinică pentru evaluarea subiecților cu diabet zaharat tip 2 și hipertensiune arterială.

Datele din literatură cu privire la relația dintre metaboliții serici umani măsurați prin spectroscopie de fluorescență, produșii de glicare avansată și NADH, și factorii de risc cardiometabolic la subiecții cu diabet zaharat tip 2 sunt limitate. Rezultatele studiului realizat indică faptul că raportul fluoroforilor produșii de glicare avansată și NADH ar putea fi un nou biomarker ce poate fi utilizat pentru detecția și predicția bolii cardiovasculare și a bolii renale cronice la persoanele cu diabet zaharat tip 2. Următorul pas este investigarea în studii prospective relația cauzală dintre raport nou descris și complicațiile cronice ale diabetului zaharat tip 2.

Posibila aplicabilitate a rezultatelor acestei cercetări originale în practica clinică curentă reprezintă o parte importantă a contribuției inovatoare a tezei doctorale. Autoarea își propune continuarea investigării în studii clinice viitoare a acestor factori noi descriși cu scopul de a valida și consolida observațiile punctate în cadrul acestei cercetări.

SUMMARY OF PhD THESIS

Cardiometabolic risk factors variability monitoring in diabetes mellitus subjects

PhD student **Dana-Mihaela Bîrsan (Ciobanu)**

PhD Scientific Coordinator Prof.dr. **Petru-Adrian Mircea**

CLUJ-NAPOCA, 2016



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Table of content

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF THE ART	
1. Cardiometabolic risk factors	19
1.1. Type 2 diabetes	19
1.2. Arterial Hypertension	23
1.3. Central obesity	28
1.4. Dyslipidemia	29
1.5. Other cardiometabolic risk factors	30
1.5.1 Age	30
1.5.2 Sex	31
1.5.3 Smoking status	32
2. Inflammatory markers in diabetes mellitus and hypertension	33
2.1. High-sensitivity C-reactive protein (hsCRP)	33
2.2. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)	34
2.3. Relationship of 24-hour ambulatory blood pressure with chronic inflammation markers	34
3. Fluorophores advanced glycation end products (AGEs) and nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen (NADH) in diabetes mellitus	35
3.1. AGEs	35
3.1.1. General data	35
3.1.2. AGEs implications in diabetes mellitus	36
3.2 NADH	37
3.2.1. General data	37
3.2.2. NADH implications in diabetes mellitus	38
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Work hypothesis and objectives	41
1.1. Work hypothesis	41
1.2. General objectives	41
2. General methodology	43
2.1. Studies design	43
2.2. Selection and description of the study population	43
2.2.1. Inclusion criteria	43
2.2.2. Exclusion criteria	43

2.2.3. Control group	43
2.2.4. Ethical approval of research	43
2.3. Methods	44
2.3.1. Questioner	44
2.3.2. Anthropometric measurements	44
2.3.3. Biochemical measurements	44
2.3.4. Blood pressure measurement	45
2.3.5. Protocol of 24-hour ambulatory blood pressure monitoring	45
2.3.6. Statistical analysis	49
3. Study 1 – The role of 24-hour ambulatory blood pressure monitoring in evaluating type 2 diabetes subjects. Dipper pattern and bedtime hypertension medication	51
3.1. Introduction	51
3.2. Objectives	51
3.3. Materials and methods	51
3.4. Results	52
3.5. Discussions	56
3.6. Conclusions	58
4. Study 2 – The 24-hour ambulatory blood pressure, hsCRP, ICAM-1, VCAM-1 in type 2 diabetes and control subjects	59
4.1. Introduction	59
4.2. Objectives	59
4.3. Materials and methods	60
4.4. Results	60
4.5. Discussions	70
4.6. Conclusions	72
4.7. Sub-Study of Study 2. Ambulatory blood pressure control, hsCRP and chronic kidney disease in type 2 diabetes and control subjects.	74
4.7.1. Introduction	74
4.7.2. Objectives	74
4.7.3. Material and methods	74
4.7.4. Results	74
4.7.5. Discussions	77
4.7.6. Conclusions	78
5. Study 3 – Spectrofluorometric analysis of AGEs and NADH in type 2 diabetes and control subjects	81

5.1. Introduction	81
5.2. Objectives	81
5.3. Materials and methods	81
5.4. Results	83
5.5. Discussions	92
5.6. Conclusions	95
7. General conclusions	97
8. Originality	99
REFERENCES	101

Keywords: cardiometabolic risk factors; type 2 diabetes; arterial hypertension; 24-hour ambulatory blood pressure monitoring; blood pressure variability; dipper pattern; high-sensitivity C-reactive protein; intercellular adhesion molecule-1; vascular cell adhesion molecule-1; advanced glycation end products; nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen; fluorescence spectroscopy.

References: 288

INTRODUCTION

Diabetes mellitus represents one of the most studied diseases given the negative impact of the chronic diabetes complications on the life quality of the affected persons. Although the cardiometabolic risk factors are present at type 2 diabetes diagnosis, their variable influences play an important role in the onset of chronic diabetes complications. Hypertension is an important controllable cardiometabolic risk factor. Although nocturnal hypertension is more frequent in type 2 diabetes subjects than in general population, morning blood pressure lowering medication is preferred over bedtime administration. Evidences from controlled trials showed the benefit of the bedtime hypertension treatment on dipper pattern and in reducing the cardiovascular outcomes in hypertensive subjects. Increased blood pressure variability has been associated with increased risk for cardiovascular events, regardless the presence of hypertension. Although blood pressure variations are easy to estimate using the 24-hours ambulatory blood pressure monitoring, they are rarely used as a routine in the clinic. Previous studies described the relationship between chronic systemic inflammation and blood pressure control and variability. The serum inflammatory markers, high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and circulating adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), are elevated in subjects with type 2 diabetes and hypertension compared to their healthy peers. Existing medical evidence indicate that hsCRP plays an active role in in early atherosclerotic plaques development by enhancing the expression of adhesion molecules, thus reflecting endothelial dysfunction.

Newer serum biomarkers have lately emerged for the evaluation of cardiometabolic risk. Among them, advanced glycation end products (AGEs) and nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen (NADH) can be measured using an innovative technique, fluorescence spectroscopy. AGEs are implicated in enhancing endothelial dysfunction and have a strong relation with diabetes mellitus, cardiovascular disease and chronic kidney disease. NADH oxidases are critical determinants of the redox state in vascular cells and were linked to pathological states correlated with uncontrolled inflammation, such as cardiovascular disease, type 2 diabetes and hypertension.

The present thesis is composed of two sections: the concise review of the current state of the art and the personal contribution. The first section details the information from the medical literature necessary to approach the research hypotheses: monitoring of the cardiometabolic risk factors variability in diabetes mellitus. The personal contribution consists of three studies. In the first study, the author found that type 2 diabetes subjects administering bedtime hypertensive medication had the highest prevalence of dipper pattern. In the second study, the author demonstrated that type 2 diabetes subjects with uncontrolled hypertension had the highest blood pressure variability and serum inflammatory markers; and, ambulatory blood pressure variability was independent predictor for the studied inflammatory markers. In the third study, the author found that type 2 diabetes subjects had higher AGEs-to-NADH ratio, and the ratio had predictive value for cardiovascular and diabetic chronic kidney disease. The research was carried out under the supervision of Prof.dr. Petru-Adrian Mircea. The research was partially supported by European Social Found, Human Resources Development Operational Programme 2007-2013, project number POSDRU/159/1.5/138776.

PERSONAL CONTRIBUTION

Study 1. The role of 24-hour ambulatory blood pressure monitoring in evaluating type 2 diabetes subjects. Dipper pattern and bedtime hypertension medication.

Objectives. Normal dipper pattern was associated with lower risk of cardiovascular events. The influence of the time of the day administration of hypertension medication on circadian blood pressure pattern has lately emerged as an important factor for the normal day-to-night blood pressure fall. Since nocturnal hypertension is more frequent in diabetic patients compared to the general population, and conventional blood pressure lowering medication upon awakening is preferred over bedtime administration, it will be of great interest to evaluate the effect of the time of day hypertensive medication on the 24-hour ambulatory blood pressure control and dipper pattern.

Material and methods. The observational study enrolled type 2 diabetes subjects with hypertension (n=144) according to inclusion and exclusion criteria. Depending on the time of the day when ingesting blood pressure lowering medication, the subjects were divided in three groups: subjects not taking hypertension medication (n=28), subjects

taking at least one hypertension medication at bedtime (n=60) and subjects taking all hypertension medication in the morning (n=56).

Results. There were no statistically significant differences in age, sex, smoking status, type 2 diabetes duration, body mass index, abdominal circumference, office systolic and office diastolic blood pressure between the three study groups. Angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers were the most used hypertension medication classes. Calcium channel blockers and adrenergic β blockers were significantly more used by subjects taking at least one hypertension medication at bedtime than those taking all hypertension medications in the morning. There were no significant differences in mean systolic and diastolic blood pressure or systolic and diastolic blood pressure variability during daytime, nighttime and 24-hour between the three groups. The dipper pattern was more frequent in the type 2 diabetes subjects taking at least one hypertension medication at bedtime compared to type 2 diabetes subjects not taking hypertension medication and taking all hypertension medication in the morning. In the study population, the administration of at least one hypertension medication at bedtime was directly and significantly associated with the hypertension duration, the presence of cardiovascular disease and the dipper pattern. While, the administration of at least one hypertension medication at bedtime was inversely associated with daytime diastolic blood pressure variability and estimated glomerular filtration rate. The dipper pattern was significantly and inversely associated with type 2 diabetes duration. In addition, dipper pattern was significantly and directly associated with 24-hour systolic blood pressure variability, 24-hour diastolic blood pressure variability and nighttime diastolic blood pressure variability. When the dipper pattern was included in multivariate regression analysis as dependent variable, the author observed that the ingesting of at least one hypertension medication at bedtime and the type 2 diabetes duration were independent predictors, even after adjustment for confounding factors.

Conclusions. The findings of this study add valuable information to the medical evidence that promotes the administration of bedtime hypertension medication for the treatment of type 2 diabetes subjects with hypertension, and recommends that diabetic subjects should be evaluated using 24-hour ambulatory blood pressure monitoring for proper cardiovascular disease risk assessment.

Study 2. The 24-hour ambulatory blood pressure monitoring, hsCRP, ICAM-1 and VCAM-1 in type 2 diabetes and control subjects.

Objectives. The association of type 2 diabetes and hypertension with chronic subclinical inflammation was previously described, but the possible influences of 24-hour ambulatory blood pressure variability on hsCRP, ICAM-1 and VCAM-1 levels are under investigation. Simultaneous measurement of these parameters might offer a better understanding of the extent of ambulatory blood pressure variability impact on vascular inflammation. Therefore, in this observational study, the author investigated the relationship between 24-hour ambulatory mean blood pressure and blood pressure variability, hsCRP, ICAM-1 and VCAM-1, in type 2 diabetes and control subjects.

Material and methods. The study population included a total number of 86 subjects; the group of type 2 diabetes patients (n=75) and the control group (n=11) were enrolled according to inclusion and exclusion criteria. According to 24-hour ambulatory blood pressure monitoring and previous hypertension diagnosis, the type 2 diabetes patients were divided into three groups: normal blood pressure group (n=9), controlled hypertension group (n=46) and uncontrolled hypertension (n=20).

Results. The highest hsCRP and ICAM-1 were observed in the uncontrolled hypertension type 2 diabetes group and were significantly higher than in the control group and normal blood pressure group. Although the VCAM-1 levels were the highest in the uncontrolled hypertension type 2 diabetes group compared to the controlled hypertension type 2 diabetes, normal blood pressure and control groups, the difference did not reach statistical significance. When analyzing ambulatory blood pressure monitoring, the author found that there were significant differences in daytime and 24-hour systolic blood pressure variability, and daytime diastolic blood pressure variability between the four groups. In addition, the uncontrolled hypertension type 2 diabetes group had the highest systolic blood pressure and diastolic blood pressure variability. Daytime systolic and diastolic blood pressure variability were significantly higher in the uncontrolled hypertension type 2 diabetes group compared to the control group. Daytime and 24-hour systolic blood pressure variability were significantly higher in the uncontrolled hypertension type 2 diabetes group compared to the normal blood pressure type 2 diabetes group. The control group had the highest frequency of normal dipper pattern compared to normal blood pressure, controlled hypertension and uncontrolled hypertension type 2 diabetes groups. HsCRP was significantly correlated with daytime mean systolic blood pressure, daytime and 24-hour systolic blood pressure variability and daytime and 24-hour diastolic blood pressure variability. ICAM-1 was significantly correlated with daytime and 24-hour diastolic blood pressure variability, daytime and 24-hour systolic blood pressure, age and office systolic blood pressure. VCAM-1 was significantly correlated with age. When hsCRP levels were predicted using multiple linear regression analysis, the author found that daytime diastolic blood pressure variability and 24-hour diastolic blood pressure variability were significant independent predictors in two separate models, even after adjustment for confounder factors: abdominal circumference, body mass index, age, type 2 diabetes duration and glycated hemoglobin. Also, the dependent variable ICAM-1 levels were significantly predicted by the independent variables: daytime diastolic blood pressure variability, hypertension duration and type 2 diabetes duration, even after adjustment for confounders.

Conclusions. The author demonstrated that hsCRP and ICAM-1 correlated with ambulatory blood pressure variability. In addition, the author found that type 2 diabetes subjects with uncontrolled hypertension had the highest hsCRP, ICAM-1 and VCAM-1 levels. Ambulatory daytime and 24-hour diastolic blood pressure variability were independent predictors for hsCRP levels, while, daytime diastolic blood pressure variability was independent predictor for ICAM-1 levels. The evaluation of ambulatory blood pressure variability and chronic inflammation markers, hsCRP, ICAM-1 and VCAM-1

might offer better understanding of the mechanisms generating endothelial dysfunction in hypertension and might contribute to cardiovascular risk stratification in type 2 diabetes subjects. Serum HsCRP and ICAM-1 could be utilized in the everyday clinic practice given the results of several studies, but unlike ambulatory blood pressure monitoring, chronic inflammation markers measurement is an expensive and time-consuming procedure.

Sub-Study of Study 2. Ambulatory blood pressure control, hsCRP and chronic kidney disease in type 2 diabetes and control subjects.

Objectives. HsCRP has been reported to be implicated in the development of chronic kidney disease in type 2 diabetes subjects. Ambulatory blood pressure monitoring was proven to be superior to office blood pressure in subjects with chronic kidney disease, and was a better predictor of renal end points, independently of confounders. In addition, the reduced nighttime blood pressure fall was associated with the presence of chronic kidney disease. The study aims to evaluate the associations between ambulatory blood pressure control, hsCRP levels and the presence of chronic kidney disease in type 2 diabetes and control subjects.

Material and methods. The observational study enrolled a number of 60 subjects, according to inclusion and exclusion criteria. The type 2 diabetes subjects (n=49) were divided into two groups: normal renal function (n=27) and in the chronic kidney disease group (n=22). The control subjects (n=11) were age and sex matched with the previous two groups.

Results. Estimated glomerular filtration rate was significantly higher in control group compared to the type 2 diabetes groups. Albuminuria was present only in type 2 diabetes group with chronic kidney disease in 67% of subjects. HsCRP was higher in type 2 diabetes with chronic kidney disease group compared to control and type 2 diabetes without chronic kidney disease groups. When analyzing type 2 diabetes complications, diabetic neuropathy and diabetic retinopathy were significantly more frequent in type 2 diabetes subjects with chronic kidney disease compared with type 2 diabetes without chronic kidney disease. Although the type 2 diabetes with chronic kidney disease had higher daytime, nighttime and 24-hour mean diastolic blood pressure, the difference did not reach statistical significance. Similarly, the highest blood pressure variability was observed in the type 2 diabetes with chronic kidney disease group, but the difference did not reach statistical significance. In the study population, the presence of chronic kidney disease was significantly and directly associated with hsCRP, fasting blood glucose, hypertension duration, type 2 diabetes duration, daytime, nighttime, 24-hour mean systolic blood pressure, diabetic neuropathy, and diabetic retinopathy.

Conclusions. Besides the traditional parameters that evaluate diabetes and ambulatory blood pressure control, chronic inflammatory markers such as hsCRP must be considered. The results of this study confirm the association of chronic kidney disease with hsCRP and mean daytime, nighttime and 24-hour systolic blood pressure. The author proposes the combined use of hsCRP and parameters derived from 24-hour ambulatory blood pressure monitoring, additionally to other traditional factors for early detection and progression

monitoring of chronic kidney disease, particularly in type 2 diabetes subjects with long duration of uncontrolled hypertension.

Study 3. Spectrofluorometric analysis of AGEs and NADH in type 2 diabetes and control subjects.

Objectives. The author aimed to evaluate the serum levels of fluorophores AGEs, NADH and their ratio in type 2 diabetes and control subjects. In addition, the utility of AGEs and NADH as useful biomarkers for predicting the presence of type 2 diabetes, hypertension, cardiovascular and diabetic chronic kidney disease was investigated.

Material and methods. The study included type 2 diabetes subjects (n=63) and control subjects (n=25) selected according to inclusion and exclusion criteria. Spectrofluorometric measurement was performed in the department of Biophysics of the University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. The excitation wavelength was set at 370 nm and the emission was measured at ≈ 435 nm (AGEs) and ≈ 460 nm (NADH). All obtained data were processed using Origin Pro Ver. 8.

Results. The author found slightly higher serum AGEs levels in type 2 diabetes compared to control subjects. In addition, the type 2 diabetes had significantly lower NADH levels compared to control group. This resulted in significantly higher fluorophores AGEs-to-NADH ratio in the type 2 diabetes compared to the controls. When analyzing the 24-hour ambulatory blood pressure monitoring, the author found significant differences in mean systolic, but not diastolic, blood pressure between type 2 diabetes and control groups. Serum NADH was significantly and negatively associated with triglycerides, fasting blood glucose, office systolic blood pressure, office diastolic blood pressure, abdominal circumference, total cholesterol and the presence of dyslipidemia. The AGEs-to-NADH ratio was significantly and positively associated with triglycerides, fasting blood glucose, total cholesterol, office systolic blood pressure, office diastolic blood pressure, the presence of cardiovascular disease, diabetic chronic kidney disease and dyslipidemia. In addition, the AGEs-to-NADH ratio was significantly and inversely associated with HDL cholesterol and estimated glomerular filtration rate. None of the 24-hour ambulatory blood pressure monitoring parameters correlated with the AGEs-to-NADH ratio. When NADH and the AGEs-to-NADH ratio were separately included in the multivariate regression analysis as dependent variables, the author found that the presence of type 2 diabetes and triglycerides were independent predictors; the results were adjusted for age, sex, smoking status, body mass index, abdominal circumference, total cholesterol, office diastolic blood pressure, estimated glomerular filtration rate and the presence of cardiovascular disease. In addition, the results for NADH prediction was adjusted for type 2 diabetes duration, hypertension duration, office systolic blood pressure and fasting blood glucose. Receiver operating curves (ROC) suggested significantly moderate prediction value for the presence of cardiovascular and diabetic chronic kidney disease based on the AGEs-to-NADH ratio. The AGEs-to-NADH ratio also showed significant prediction value for the presence of hypertension and type 2 diabetes.

Conclusions. The serum fluorophores AGEs-to-NADH ratio was higher in type 2 diabetes compared with controls, and was correlated with triglycerides, fasting blood glucose, HDL-cholesterol and estimated glomerular filtration rate. The AGEs-to-NADH ratio was independently predicted by the presence of type 2 diabetes and triglycerides, and was predictor for the presence of diabetic cardiovascular and chronic kidney disease. The author suggests that the ratio of the studied human serum fluorescent metabolites AGEs and NADH might a suitable candidate for the detection and prediction of diabetic cardiovascular and chronic kidney disease in type 2 diabetes and control subjects.

Originality and innovative contributions

The clinical implications of the present thesis go beyond the selected population that participated in the presented studies. This research is important due to its ability to produce knowledge that is applicable outside of the research, having implications for future projects implementation. Currently, there are many studies published about the cardiometabolic risk factors in diabetes. However, this thesis aimed to describe new factors implicated in enhancing the cardiometabolic risk. Characterizing these new factors would help us better understand, and possibly solve the problems derived from the implication of the newly described factors in promoting cardiometabolic diseases. The evaluation of cardiovascular risk factors variability is still a challenge in the evaluation of type 2 diabetes subjects, but at the same time, essential for individualization and optimization of diabetes management. Before developing targeted interventions for preventing and treating diabetic complications, it is mandatory to understand the metabolic pathways that are activated by the cardiometabolic risk factors.

The study evaluating the 24-hour ambulatory blood pressure parameters in type 2 diabetes subjects opened the way for the other two clinical studies. This study aimed to describe the optimal clinical evaluation of a subject previously diagnosed with type 2 diabetes and hypertension, given the complexity of these diseases and their possible implications in the development and progression of chronic diabetes complications. In addition, the higher prevalence of normal dipper pattern observed in type 2 diabetes subjects taking at least one hypertension medication at bedtime compared with morning treatment of all hypertension medications could open the way to new treatment strategies for successfully reducing cardiovascular risk.

Inflammatory changes in the vascular wall may increase blood pressure variability and worsen hypertension control, but also, the presence of hypertension might enhance the cardiovascular risk by generating endothelial dysfunction. Further, ambulatory blood pressure variability proved to be correlated with chronic subclinical inflammation evaluated through hsCRP, ICAM-1 and VCAM-1. In addition, hsCRP and ICAM-1 were predicted by daytime diastolic blood pressure variability. Both subclinical inflammation biomarkers and ambulatory blood pressure variability should be utilized in the everyday clinical practice for evaluating subjects previously diagnosed with type 2 diabetes and hypertension.

Data from the literature are sparse in what concerns the relationship of human serum metabolites AGEs and NADH measured using fluorescence spectroscopy, with the cardiometabolic risk factors in type 2 diabetes. The results of the present research indicate that the fluorophores AGEs-to-NADH ratio might be a new biomarker suitable for the detection and prediction of diabetic chronic kidney disease and cardiovascular disease in type 2 diabetes and healthy subjects. The next step is to investigate in prospective studies the causal relationship between the serum fluorophores AGEs-to-NADH ratio and the development and progression of diabetic chronic kidney disease and cardiovascular disease.

The applicability of the original results in current clinical practice represents the innovative contributions of the present doctoral thesis. The author aims to expand her investigation in future studies in order to validate and consolidate the observations found in this research.