

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

*IMPACTUL CARDIOVASCULAR AL  
VISFATIN-UN BIOMARKER  
PREDICTOR AL INFLAMAȚIEI ÎN  
SINDROAMELE CARDIO-  
METABOLICE*

---

Doctorand Larisa Diana Hognogi (Mocan-Hognogi)

---

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Adriana Muresan**

---

## CUPRINS

|                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCERE                                                                                                                                                                      | 14 |
| STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII                                                                                                                                                    | 16 |
| 1. Sindromul metabolic                                                                                                                                                           | 18 |
| 1.1 Introducere                                                                                                                                                                  | 18 |
| 1.2 Definiție                                                                                                                                                                    | 18 |
| 1.3 Dislipidemia și rezistența la insulină                                                                                                                                       | 19 |
| 1.4 Obezitatea                                                                                                                                                                   | 20 |
| 1.4.1 Țesutul adipos-organ endocrin activ secretant                                                                                                                              | 20 |
| 1.5 Diabetul zaharat tip II- implicațiile stress-ului oxidativ în complicațiile acestuia                                                                                         | 21 |
| 2. Rolul Visfatin/NAMPT                                                                                                                                                          | 24 |
| 2.1 Rolul NAMPT în sindromul metabolic și la nivel cardiovascular                                                                                                                | 26 |
| 2.1.1 SIRT1 și NAMPT în homeostazia glucozei                                                                                                                                     | 26 |
| 2.1.2 Activitatea visfatin la nivel cardiovascular                                                                                                                               | 27 |
| 2.1.2.1 Proliferarea celulară și angiogeneza                                                                                                                                     | 27 |
| 2.1.2.2 Visfatin/NAMPT și inflamația                                                                                                                                             | 28 |
| 2.1.2.3 Supraviețuirea celulară și apoptoza                                                                                                                                      | 30 |
| 2.1.2.4 Implicarea visfatin în tonusul vascular                                                                                                                                  | 30 |
| 2.1.3 Visfatin/NAMPT obezitatea și profilul lipidic                                                                                                                              | 31 |
| 2.1.4 Hipertensiunea arterială și Visfatin/NAMPT                                                                                                                                 | 32 |
| CONTRIBUȚIA PERSONALĂ                                                                                                                                                            | 38 |
| 1. Ipoteza de lucru/obiective                                                                                                                                                    | 40 |
| 2. Metodologie generală                                                                                                                                                          | 42 |
| 3. Studiu 1. Evaluarea relației între nivelul seric al visfatin și parametri ecografici de tipul grăsimea epicardică și grosimea intima-medie, la pacienții cu sindrom metabolic | 44 |
| 3.1. Introducere                                                                                                                                                                 | 44 |
| 3.2. Ipoteza de lucru                                                                                                                                                            | 45 |
| 3.3. Material și metodă                                                                                                                                                          | 45 |
| 3.4. Rezultate                                                                                                                                                                   | 48 |

|                                                                                                                                                                                                                              |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.4.1 Caracteristicile lotului de pacienți                                                                                                                                                                                   | 48  |
| 3.5. Discuții                                                                                                                                                                                                                | 53  |
| 3.6. Concluzii                                                                                                                                                                                                               | 56  |
| 4. Studiu 2. Nivele serice modificate ale visfatin/nampt<br>la pacientele cu preeclampsie                                                                                                                                    | 60  |
| 4.1. Introducere                                                                                                                                                                                                             | 60  |
| 4.2. Ipoteza de lucru                                                                                                                                                                                                        | 61  |
| 4.3. Material și metodă                                                                                                                                                                                                      | 61  |
| 4.3.1. Grupuri                                                                                                                                                                                                               | 61  |
| 4.3.2 Investigații. Tehnica dozării Visfatin/NAMPT                                                                                                                                                                           | 62  |
| 4.4. Rezultate                                                                                                                                                                                                               | 63  |
| 4.5. Discuții                                                                                                                                                                                                                | 69  |
| 4.6. Concluzii                                                                                                                                                                                                               | 70  |
| 5. Studiu 3. Studiul relației dintre nivelul seric al visfatin, parametri<br>antropometrici, profilul lipidic și al glicemiei la pacienții cu sindrom metabolic<br>vs pacienți cu sindrom metabolic și diabet zaharat tip ii | 72  |
| 5.1. Introducere                                                                                                                                                                                                             | 72  |
| 5.2. Ipoteza de lucru                                                                                                                                                                                                        | 73  |
| 5.3. Material și metodă                                                                                                                                                                                                      | 73  |
| 5.4. Rezultate                                                                                                                                                                                                               | 75  |
| 5.5. Discuții                                                                                                                                                                                                                | 90  |
| 5.6 Concluzii                                                                                                                                                                                                                | 91  |
| 6. Discuții generale                                                                                                                                                                                                         | 94  |
| 7. Concluzii generale                                                                                                                                                                                                        | 96  |
| 8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei                                                                                                                                                                       | 98  |
| REFERINȚE                                                                                                                                                                                                                    | 100 |
| ANEXE                                                                                                                                                                                                                        | 117 |

**CUVINTE CHEIE:** sindrom metabolic, diabet zaharat tip II, hipertensiune arteriala esentiala, inflamatie, ateroscleroza, biomarkeri, Visfatin.

## INTRODUCERE

Obezitatea reprezintă o problema de sanatate publică intrucât are o prevalență în creștere, datorată, în principal varietății crescute ale resurselor de alimentație, creșterii muncii sedentare prin informatizarea extensiva si promovarii in mod insuficient a activității fizice.

În acest sens, prevalența bolilor cardiovasculare a crescut considerabil, deoarece obezitatea este în strânsă legătură cu inflamația sistemică, prin intermediul citokinelor proinflamatorii secretate de celulele adipoase. Secolul XXI a însemnat o evoluție remarcabilă în ceea ce privește definirea conceptelor patofiziologice privind ateroscleroza. Prin urmare, actualmente, este o certitudine ca țesutul adipos este cel mai mare și activ organ endocrin care secretă o gamă variată de hormoni numiți adipokine. Acestea influențează metabolismul și răspunsul inflamator, în mod particular la indivizii cu adipozitate de tip central.

În acest sens, sindromul metabolic înglobează o multitudine de factori de risc pentru boala cardiovasculara iar în centrul său găsim ca o condiție „*sine-qua-non*”, prezența adipozității de tip central măsurată prin circumferința abdominală. Studiile recente au aratat că aceasta se corelează cu adipozitatea periviscerala motiv pentru care detectarea acesteia joacă un rol important în stratificarea riscului, în sindromul metabolic. Procesele aterosclerotice se accelerează masiv în prezența sindromului metabolic și mai ales a diabetului zaharat, motiv pentru care înțelegerea mecanismelor care promovează aceste procese este esențială. Studiile au demonstrat că țesutul adipos perivascular este diferit de cel subcutanat prin aceea că are un număr mare de adipocite nediferențiate care secretă citokine proinflamatorii de tipul IL6, IL8, MCP-1. De asemenea țesutul adipos epicardic a fost demonstrat a fi direct proporțional cu severitatea bolii coronariene la pacienții cu fracție de ejeție prezervată. Există o cantitate crescută de macrofage, limfocite T și mastocite la acest nivel, la pacienții cu boala coronariană ischemică iar la ora actuală, grăsimea epicardică este marker de prezență a grăsimii periviscerale și de risc cardiovascular crescut.

Adipokinele sunt molecule eliberate de către adipocite și macrofage prin intermediul cărora se stabilesc legăturile între țesutul adipos și celelalte sisteme cum sunt sistemul nervos central și periferic astfel încât să se controleze nivelul apetitului, al energiei, imunitatea, sensibilitatea la insulină, angiogeneza, tensiunea arterială, metabolismul lipidic, homeostazia.

Visfatin este cunoscut în literatură și ca NAMPT- nicotinamide fosforibozil transferază precum și ca pre-beta cellenacing factor (PBEF), adică o citokina cu rol în maturarea celulelor pre beta. În structura Visfatin lipsește molecula semnalizatoare care în mod normal este necesară pentru secreție, însă în ciuda acestui fapt, Visfatin circulă liber în plasma și are efect de tip citokina. Având în vedere că inițial, sursa acestei adipokine a fost crezută a fi exclusiv grăsimea viscerală ( visceral fat) denumirea a fost aleasă „Visfatin”. Ulterior cercetările au pus în evidență prezența ei și la nivelul țesutului celular subcutanat, grăsimii epicardice și perivascularare. Obezitatea și diabetul zaharat

tip II reprezintă factori independenți de risc pentru boala aterosclerotică, iar în acest context, studiile au scos în evidență nivele serice crescute ale Visfatin, însă nu puțini sunt autorii care au demonstrat valori scăzute sau nemodificate comparativ cu subiecții control ceea ce subliniază necesitatea continuării investigațiilor în acest domeniu.

## **CONTRIBUTIA PERSONALA**

Obezitatea, rezistența la insulină, diabetul zaharat tip II și bolile cardiovasculare au o prevalență extrem de mare și sunt probleme de sănătate publică și chiar socio-economică a căror impact este global. . Conform ghidului european de prevenție a bolilor cardiovasculare, acestea determină decesul a peste 4 milioane de oameni/an doar în Europa, iar prevalența obezității și a diabetului zaharat este în creștere. De aceea este nevoie să se descopere noi markeri, de o specificitate și sensibilitate crescută pentru ca stratificarea riscului de boală cardiovasculară să fie mai precisă și astfel acțiunea terapeutică să aibă efectele scontate. Studiile recente au demonstrat că inflamația este un pion principal în progresia aterosclerozei iar țesutul adipos, prin varietatea largă de adipokine secretate contribuie, în mod decisiv la menținerea și progresia ei. Dintre toate adipokinele, ne-am îndreptat atenția spre Visfatin, pentru că există o multitudine de celule care o secretă, de situsuri și procese unde acționează. Având în vedere toate acestea, am considerat de interes includerea unor noi aspecte care să contureze rolul său în prezent, controversat.

Scopul cercetării noastre a fost să observăm dacă Visfatin/NAMPT este un factor de impact pentru complicațiile cardiovasculare la bolnavii cu sindrom metabolic sau factori metabolici de risc. Dintre obiective menționăm evaluarea legăturii între nivelul seric al Visfatin și determinanți paraclinici de tipul grasimii epicardice și grosimii intima-medie precum și cu indicatorii antropometrici ( IMC și circumferința abdominală), alături de parametri metabolismului lipid. În plus am dorit să demonstrăm rolul diabetului zaharat în accelerarea progresiei bolii aterosclerotice și mai mult, faptul că Visfatin joacă rolul unui semnalizator precoce al dezvoltării diabetului zaharat. Obiectivele generale ale tezei au fost:

- ❖ Demonstrarea existenței unei corelații între nivelul seric al Visfatin/NAMPT și unele dintre componentele sindromului metabolic hipertensiunea arterială sau diabetul zaharat de tip II, precum și a complicațiilor lor.

- ❖ Demonstrarea legăturii între nivelul seric al Visfatin/NAMPT și extensia bolii aterosclerotice, obiectivată prin măsurarea grosimii intima-medie și a grăsimii epicardice la pacienții încadrați în categoriile de mai sus

- ❖ Având în vedere că asociază factorii de risc din sindromul metabolic și inflamația, am evaluat profilul seric al Visfatin/NAMPT la pacientele cu preeclampsie în vederea demonstrării unei legături cu acesta ca exponent principal în patogeneza acestei condiții.

Lucrarea de față s-a bazat pe efectuarea a 3 studii pe două loturi de pacienți, după cum urmează:

❖ Lotul 1: realizat utilizând serurile unor pacienți internați în Spitalul Județean de Urgență Cluj-Napoca, secția Cardiologie 1, în perioada octombrie 2016-martie 2017

❖ Lotul 2: efectuat prin analiza serurilor unor paciente cu preeclampsie, consultate în Clinica de Obstetrica-Ginecologie "Dominic Stanca" cât și într-un ambulatoriu privat.

În studiu 1 și 3 am inclus 30 de pacienți cu sindrom metabolic, diferența între grupuri fiind prezența/absența diabetului zaharat tip II.

Studiul 2 a inclus în total 56 de paciente:

- 40 diagnosticate cu preeclampsie, în formă medie (30 paciente) și severă (10 paciente),
- 16 subiecți control- reprezentați de gravide sănătoase, sângele fiind recoltat după săptămâna 20 de gestație

În cazul fiecărei paciente din studii a fost completat un consimțământ informat, după care s-a realizat o fișă de lucru, sub forma unui buletin standardizat, fișă de lucru pe care s-au înregistrat datele antropometrice, antecedentele personale patologice, istoricul bolii actuale, date cu privire la tratamentul bolii actuale, examenul clinic general și rezultatele examinărilor ecografice

### **Studiu 1. Evaluarea relației între nivelul seric al Visfatin și parametri ecografici de tipul grăsimea epicardică și grosimea intima-medie, la pacienții cu sindrom metabolic**

Scopul acestui studiu a fost să identificăm noi markeri de prognostic al riscului cardiovascular la pacienții cu sindrom metabolic, întrucât mortalitatea și morbiditatea la acești pacienți este mai crescută și mai frecventă prin asocierea aterosclerozei. De asemenea am pornit și de la faptul că disfuncția endotelială stă la baza dezvoltării aterosclerozei accelerate și ea este un declanșator al evenimentelor cardiovasculare negative. În această direcție, am dorit să identificăm markeri de disfuncție endotelială care să atenționeze din timp asupra iminenței dezvoltării aterosclerozei și a efectelor acesteia, la pacienții cu multipli factori de risc cardiovascular

Lotul luat în studiu a inclus 30 de pacienți, dintre care 18 femei, 12 bărbați. Toți pacienții au fost diagnosticați cu sindrom metabolic conform criteriilor IDF (International Diabetes Federation).

La acești pacienți s-a efectuat măsurarea parametrilor pe baza cărora se pune diagnosticul de sindrom metabolic. În plus, s-au efectuat măsurători ecografice în ceea ce privește prezența/absența grăsimii epicardice și grosimea intimă-medie la nivelul arterei carotide comune, arterei carotide interne sau externe. Având în vedere faptul că toți pacienții au HTA, comparațiile s-au făcut pe baza prezenței sau absenței diabetului zaharat. În cazul variabilelor calitative și ordinale s-au calculat frecvențele absolute și relative. Comparațiile s-au făcut utilizând testul Hi-pătrat (cu coeficientul de contingență atașat) în cazul variabilelor calitative și coeficienții Somer și Kendall

(varianta tau-b) în cazul celor ordinale. S-au calculat riscul relativ și odds ratio, împreună cu intervalele de încredere, pentru a evalua influența factorilor asupra probabilităților de apariție a unui anumit aspect.

Variabilele cantitative au fost evaluate din punct de vedere al normalității. Statisticile descriptive au fost prezentate sub forma media  $\pm$  abaterea standard sau mediana (Q1 – Q3). Comparările au fost rulate diferit, în funcție de forma distribuției. Astfel, în cazul variabilelor cu o distribuție normală s-au aplicat teste parametrice (testul Student – t, în diverse forme, inclusiv analiza varianțelor ANOVA). Pentru variabilele cu distribuție ne-normală, au fost aplicate teste non-parametrice: Mann-Whitney, Wilcoxon, Kruskal – Wallis, etc. Coeficientul lui Pearson a fost calculat pentru evaluarea corelațiilor.

Am demonstrat ca prezența grăsimii epicardice se corelează cu prezența diabetului zaharat și crește probabilitatea existenței diabetului zaharat tip II, de peste 5 ori. În plus, grosimea intima-medie crescută se asociază cu nivele serice crescute ale Visfatin. Apoi, am aratat ca evaluarea prin ecocardiografie a grăsimii epicardice este o metodă simplă, reproductibilă, necostisitoare care poate fi aplicată la toți pacienții cu sindrom metabolic în vederea identificării mai precoce a factorilor de risc pentru diabetul zaharat și boala cardiovasculară.

## **Studiu 2. Nivele serice modificate ale Visfatin/Nampt la pacientele cu preeclampsie**

Preeclampsia este reprezentată de prezența hipertensiunii arteriale în sarcină, după săptămâna 20, fiind asociată cu un risc cardiovascular crescut ulterior nașterii. Ea determină, de asemenea, o mortalitate și o morbiditate foarte ridicată atât maternă cât și fetală. După cum a mai fost menționat, preeclampsia înglobează factorii care stau la baza definirii sindromului metabolic și anume: inflamația subclinică, rezistența la insulină, obezitatea. Prin acest studiu ne-am propus să observăm dacă nivelele serice ale Visfatin sunt modificate la pacientele cu preeclampsie în comparație cu lotul control și dacă acesta influențează în mod semnificativ una din complicațiile acestei patologii și anume greutatea la naștere a fetoilor. De asemenea am dorit să vedem legătura între Visfatin-emie și severitatea formei preeclampsiei precum și dacă aceasta adipocitokină contribuie în mod decisiv la progresia acesteia.

Studiul de față s-a realizat pe un număr de 56 de paciente gravide, astfel: 40 diagnosticate cu preeclampsie, în formă medie (30 paciente) și severă (10 paciente) precum și 16 subiecți control- reprezentați de gravide sănătoase, sângele fiind recoltat după săptămâna 20 de gestație.

Definirea grupurilor s-a efectuat în funcție de criteriile definite de către Societatea Internațională de Studiu al Hipertensiunii în Sarcină (International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy -ISSHP)

S-a efectuat măsuratoarea tensiunii arteriale și s-a dozat Visfatin seric, prin tehnica ELISA.

Ulterior s-a efectuat analiza statistică, datele fiind inițial, analizate în mod calitativ. Frecvențele și procentele au fost calculate pentru datele nominale și ordinale.

Datele descriptive au fost prezentate sub forma mediei +/- deviația standard sau mediană ( IQR de tipul Q1-Q3). Deoarece variabilele noastre nu au fost normal distribuite, s-au făcut comparații utilizând teste non-parametrice: testul Mann-Whitney, testul Wilcoxon, testul Kruskal-Wallis, Kolmogorov-Smirnov. Analiza de tip regresie a fost efectuată în logica binară și în forma ordinală. S-a efectuat transformarea variabilelor prin logaritmare pentru a se realiza o standardizare a lor.

În acest studiu am găsit nivele serice ale Visfatin mai scăzute la pacienții cu preeclampsie în comparație cu lotul control, dar diferențele nu au fost semnificative statistic. Cele mai scăzute valori s-au înregistrat la pacienții cu cele mai severe forme de preeclampsie. Concentrațiile plasmatice ale Visfatin nu au fost semnificativ diferite între pacienții cu preeclampsie care au născut feți cu greutate normală comparativ cu cei care au născut feți cu greutate mică.

### **Studiu 3. Studiul relației dintre nivelul seric al Visfatin, parametri antropometrici, profilul lipidic și al glicemiei la pacienții cu sindrom metabolic vs pacienți cu sindrom metabolic și diabet zaharat tip II.**

Acest studiu a fost pornit de la premiza ca afecțiunile cardiovasculare sunt cauze principale de morbi/mortalitate iar prevalența diabetului zaharat tip II și a obezității este în creștere. Desigur prevenția trebuie efectuată și la nivel populațional, însă la nivel individual trebuie notați și corecți acei factori care predispun la boala cardiovasculară.

Am pornit, în principal, de la faptul că disfuncția endotelială stă la baza dezvoltării aterosclerozei accelerate și ea este un declanșator al evenimentelor cardiovasculare negative. În această direcție, am dorit să identificăm markeri de disfuncție endotelială, având în vedere că, în studiile ultimilor ani, Visfatin a fost propus să fie un biomarker de ateroscleroză avansată la pacienții cu diabet zaharat tip II.

Lotul luat în studiu a inclus 30 de pacienți, dintre care 18 femei, 12 bărbați. Toți pacienții au fost diagnosticați cu sindrom metabolic, conform criteriilor recomandate de IDF ( International Diabetes Federation). La acești pacienți s-a efectuat măsurarea indicilor antropometrici și a parametrilor pe baza cărora se pune diagnosticul de sindrom metabolic.

Probele de laborator au fost recoltate a-jeun. S-a determinat profilul lipidic, glicemia și determinarea Visfatin prin metoda ELISA. Am efectuat analiza statistică prin utilizarea parametrilor descriși la în cadrul primului studiu.

Există deosebiri semnificative statistic între grupul pacienților cu sindrom metabolic diabetici și non-diabetici, în ceea ce privește indicii de masă corporală atât luat individual cât și grupat, cât și în ceea ce privește valoarea HDL-col. Pacienții cu greutate corporală mai mare erau mai frecvenți și diabetici. Nivelul Visfatin însă nu a fost statistic diferit între cele două grupuri.

Normoponderalii au prezentat HDL-colesterol și nivel seric al Visfatin semnificativ mai mic în comparație cu pacienții obezi. Există o tendință de creștere ale nivelului seric al Visfatin la pacienții diabetici comparativ cu cei non-diabetici. Pacienții cu sindrom metabolic care au și diabet zaharat prezintă valori ale colesterolului total, LDL colesterol, și trigliceride mai mari comparativ cu subiecții cu sindrom metabolic și hipertensiune arterială. Pacienții cu sindrom metabolic și hipertensivi s-au apropiat

mai mult de valorile profilului lipidic recomandate de către Ghidului European de Prevenție în Bolile Cardio-Vasculare, decât cei care asociau și DZ tip II deși pacienții din ambele grupuri se aflau sub tratament cu statine, ceea ce arată că la aceștia din urmă există probabil și alte mecanisme care modifică metabolismul lipidic. Se observă că o creștere a circumferinței abdominale cu 1 unitate determină prezice creșterea nivelului seric al Visfatin cu 0,13 unități. Analiza întregului grup a arătat că, creșterea valorii serice a Visfatin scade probabilitatea de a găsi la acești bolnavi, valori crescute ale glicemiei

## **ORIGINALITATEA SI CONTRIBUTELE INOVATIVE**

Teza de față reprezintă o cercetare într-un domeniu de mare actualitate în clipa de față, din cauza prevalenței masive și mai ales în creștere a sindromului metabolic și a diabetului zaharat tip II cu atât mai mult cu cât vârsta medie de diagnostic al acestor afecțiuni scade vertiginos, ceea ce contribuie la o prevalență crescută a bolilor cardiovasculare la tineri. Tema acestei lucrări a fost aleasă și prin prisma actualității subiectului “inflamația în boala cardiovasculară” precum și a tratamentelor inovative cu efect imunosupresor care au arătat scăderea progresiei și apariției evenimentelor cardiovasculare noi la pacienții supuși unor astfel de terapii. În acest sens, este posibil ca rezultatele lucrării de față să contribuie la o mai bună înțelegere a mecanismelor de acțiune ale Visfatin și prin aceasta la elaborarea unor terapii inovative pentru prevenția și chiar tratamentul complicațiilor cardiometabolice. Un alt element cu caracter de noutate este evaluarea grăsimii epicardice ca factor risc cardiovascular și mai ales ca factor de risc pentru apariția diabetului zaharat tip II.

---

ABSTRACT OF DOCTORAL THESIS

*THE CARDIOVASCULAR IMPACT  
OF VISFATIN – A PREDICTOR  
BIOMARKER OF INFLAMMATION  
IN CARDIO-METABOLIC  
SYNDROMES*

---

PhD candidate Larisa Diana Hognogi (Mocan-Hognogi)

---

PhD coordinator **Prof. Dr. Adriana Mureșan**

---



## TABLE OF CONTENTS

|                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUCTION                                                                                                                                                                                                | 14 |
| CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE                                                                                                                                                                                  | 16 |
| 1. Metabolic syndrome                                                                                                                                                                                       | 18 |
| 1.1 Introduction                                                                                                                                                                                            | 18 |
| 1.2 Definition                                                                                                                                                                                              | 18 |
| 1.3 Dyslipidemia and insulin resistance                                                                                                                                                                     | 19 |
| 1.4 Obesity                                                                                                                                                                                                 | 20 |
| 1.4.1 The adipose tissue-an active endocrine organ                                                                                                                                                          | 20 |
| 1.5 Type II Diabetes Mellitus-involvement of oxidative stress in its complications                                                                                                                          | 21 |
| 2. The role of Visfatin/NAMPT                                                                                                                                                                               | 24 |
| 2.1 The role of NAMPT in metabolic syndrome and in cardiovascular disease                                                                                                                                   | 26 |
| 2.1.1 SIRT 1 and NAMPT involvement in glucose Homeostasis                                                                                                                                                   | 26 |
| 2.1.2 Visfatin activity at cardiovascular level                                                                                                                                                             | 27 |
| 2.1.2.1 Cell proliferation and angiogenesis                                                                                                                                                                 | 27 |
| 2.1.2.2 Visfatin/NAMPT and the inflammation                                                                                                                                                                 | 28 |
| 2.1.2.3 Cell survival and apoptosis                                                                                                                                                                         | 30 |
| 2.1.2.4 Visfatin involvement in the vascular tone                                                                                                                                                           | 30 |
| 2.1.3 Visfatin/NAMPT- obesity and lipid profile                                                                                                                                                             | 30 |
| 2.1.4 Arterial hypertension and Visfatin/NAMPT                                                                                                                                                              | 32 |
| PERSONAL CONTRIBUTION                                                                                                                                                                                       | 38 |
| 1. Work hypothesis and objectives                                                                                                                                                                           | 40 |
| 2. General methodology                                                                                                                                                                                      | 42 |
| 3. 1 <sup>st</sup> study. Evaluating the relationship between the serum level of Visfatin and echographic parameters such as epicardial fat and intima-media thickness, in patients with metabolic syndrome | 44 |
| 3.1. Introduction                                                                                                                                                                                           | 44 |
| 3.2. Work hypothesis                                                                                                                                                                                        | 45 |
| 3.3. Materials and methods                                                                                                                                                                                  | 45 |
| 3.4. Results                                                                                                                                                                                                | 48 |
| 3.4.1 Characteristics of the patients                                                                                                                                                                       | 48 |
| 3.5. Discussions                                                                                                                                                                                            | 53 |

|                                                                                                                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.6. Conclusions                                                                                                                                                                                                                           | 56  |
| 4. Studiu 2. Modified seric levels of Visfatin/NAMPT in patients with preeclampsia                                                                                                                                                         | 60  |
| 4.1. Introduction                                                                                                                                                                                                                          | 60  |
| 4.2. Work hypothesis                                                                                                                                                                                                                       | 61  |
| 4.3. Materials and methods                                                                                                                                                                                                                 | 61  |
| 4.3.1. Study Groups                                                                                                                                                                                                                        | 61  |
| 4.3.2 Investigations. Visfatin/NAMPT dosage technique                                                                                                                                                                                      | 62  |
| 4.4. Rezults                                                                                                                                                                                                                               | 63  |
| 4.5. Discutions                                                                                                                                                                                                                            | 69  |
| 4.6. Concluzions                                                                                                                                                                                                                           | 70  |
| 5. Studiu 3. Study on the relationship between the seric levels of Visfatin, anthropometric parameters, lipid profile and glycaemia in patients with metabolic syndrome vs. patients with metabolic syndrome and type II diabetes mellitus | 72  |
| 5.1. Introduction                                                                                                                                                                                                                          | 72  |
| 5.2. Work hypothesis                                                                                                                                                                                                                       | 73  |
| 5.3. Materials and methods                                                                                                                                                                                                                 | 73  |
| 5.4. Rezults                                                                                                                                                                                                                               | 75  |
| 5.5. Discutions                                                                                                                                                                                                                            | 90  |
| 5.6 Conclusions                                                                                                                                                                                                                            | 91  |
| 6. General discutions                                                                                                                                                                                                                      | 94  |
| 7. Final Conclusions                                                                                                                                                                                                                       | 96  |
| 8. Originality and inovative contributions of the thesis                                                                                                                                                                                   | 98  |
| REFERENCES                                                                                                                                                                                                                                 | 100 |
| ANNEXES                                                                                                                                                                                                                                    | 117 |

**KEYWORDS:** metabolic syndrome, type II diabetes mellitus, essential arterial hypertension, inflammation, atherosclerosis, biomarkers, Visfatin.

## INTRODUCTION

Obesity is a public health problem because it has growing prevalence, chiefly due to the high variety of food resources, the increasingly sedentary work owing to extensive informatisation and the insufficient promotion of physical activity.

Hence, the prevalence of cardiovascular diseases has considerably amplified, since obesity is strictly connected to systemic inflammation, by means of the proinflammatory cytokines secreted by adipose cells. The 21<sup>st</sup> century has marked a considerable evolution in the definition of pathophysiological concepts regarding atherosclerosis. Therefore, at present, it is certain that adipose tissue is the largest and most active endocrine organ, which secretes a wide range of hormones called adipokines. The latter influence metabolism and an inflammatory response, notably in individuals with central adiposity.

Thus, metabolic syndrome encompasses various risk factors for cardiovascular disease and, at its core, there lies as a *sine-qua-non* condition the presence of central adiposity measured through abdominal girth. Recent studies have shown that this correlates with perivisceral adiposity, which is why its detection plays an important role in assessing risk in metabolic syndrome. Atherosclerotic processes are greatly accelerated in the presence of metabolic syndrome and, chiefly, of diabetes mellitus, so it becomes essential to comprehend the mechanisms that promote such processes. Studies have demonstrated that the perivascular adipose tissue is different from the subcutaneous one in that it contains a larger number of nondifferentiated adipocytes that secrete type II6, IL8, MCP-1 proinflammatory cytokines. Moreover, epicardial adipose tissue has been proven to be directly proportional to the severity of coronary disease in patients with preserved ejection fraction. There is a high concentration of macrophages, T lymphocytes and mastocytes at this level, in patients with ischemic coronary disease and, at present, epicardial fat is a presence marker of perivisceral fat and high cardiovascular risk.

Adipokines are molecules released by adipocytes and macrophages, by means of which links are established between the adipose tissue and the other systems, such as the central and peripheral nervous system, so as to control the level of appetite, energy, immunity, insulin sensitivity, angiogenesis, arterial blood pressure, lipid metabolism and homeostasis.

Visfatin is known in literature as NAMPT - Nicotinamide phosphoribosyltransferase, but also as pre-beta cell enhancing factor (PBEF), i.e. a cytokine involved in pre-beta cell maturation. The structure of Visfatin lacks the signalling molecule which is normally necessary for secretion, but in spite of this, Visfatin circulates freely in plasma and has a cytokine-type effect. Given that initially, the source of this adipokine was believed to be solely visceral fat, the name *Visfatin* was chosen. Later, research emphasised its presence also at the level of subcutaneous cell tissue, epicardial and perivascular fat. Obesity and type II diabetes mellitus are independent risk factors for atherosclerotic disease, and in this context, studies have revealed elevated seric levels of Visfatin. Nevertheless, various authors have found low

or unchanged values compared to control subjects, which underlines the need to continue investigations in this regard.

## PERSONAL CONTRIBUTION

Obesity, insulin resistance, type II diabetes mellitus and cardiovascular diseases have an extremely high occurrence and are public health and even socio-economic problems with a global impact. According to the European guidelines on cardiovascular disease prevention, the former are responsible for the deaths of over 4 million people per year in Europe alone, while the prevalence of obesity and diabetes mellitus is increasing. This is why there is a need for discovering new markers, with enhanced specificity and sensitivity, so that the risk assessment of cardiovascular disease would be more accurate and, thus, therapeutic action would have its intended effects. Recent studies have shown that inflammation is a principal factor in the progression of atherosclerosis, while adipose tissue, through its large variety of secreted adipokines, has a decisive contribution to its persistence and progression. Of all adipokines, we have focused on Visfatin, since there are a multitude of cells that secrete it, as well as of sites and processes where it is active. All this considered, we have deemed of interest to include several new aspects that would shape its controversial role at present.

The purpose of our research has been to observe whether Visfatin/NAMPT is an impact factor in cardiovascular complications in patients with metabolic syndrome, or metabolic risk factors. Among our objectives we have included the evaluation of the link between the seric level of Visfatin and paraclinical determiners such as epicardial fat and intima-media thickness, as well as anthropometric indicators (IMC and abdominal girth), along with the parameters of lipid metabolism. Furthermore, we have aimed to demonstrate the role of diabetes mellitus in accelerating the progression of atherosclerotic disease, as well as the fact that Visfatin plays the role of an early indicator of the development of diabetes mellitus. The general objectives of the thesis have been:

❖ To demonstrate the existence of a correlation between the seric level of Visfatin/NAMPT and some components of metabolic syndrome, arterial hypertension or type II diabetes mellitus, as well as their complications.

❖ To demonstrate the connection between the seric level of Visfatin/NAMPT and the progression of atherosclerotic disease, rendered through the measurement of intima-media thickness and epicardial fat in patients included in the aforementioned categories.

❖ Given the fact that it associates risk factors with metabolic syndrome and inflammation, we have evaluated the serum profile of Visfatin/NAMPT in patients with preeclampsia, in order to prove a connection with the former, as a main exponent in the pathogenesis of this condition.

This thesis is based on three studies conducted on two groups of patients, as follows:

❖ Group 1: achieved using serums from patients admitted to the Emergency County Hospital of Cluj-Napoca, Cardiology 1 ward, in the period October 2016-March 2017

❖ Group 2: achieved through the analysis of serums from patients with preeclampsia, consulted at the “Dominic Stanca” Obstetrics-Gynaecology Clinic, as well as in a private clinic.

In studies 1 and 3 we have included 30 patients with metabolic syndrome, with the difference between the groups being the presence/absence of type II diabetes mellitus.

Study 2 has included a total of 56 patients:

- 40 diagnosed with preeclampsia, in a medium form (30 patients) and severe (10 patients),
- 16 control subjects – i.e. healthy pregnant women, with blood taken after week 20 of pregnancy.

Each patient in the study filled in an informed consent form, after which a worksheet was drafted, in the form of a standardised bulletin, to register anthropometric data, personal pathological history, current disease history, information on the treatment of such disease, the general clinical examination and the results of echographic examinations.

### **Study 1. Evaluating the relationship between the seric level of Visfatin and echographic parameters such as epicardial fat and intima-media thickness, in patients with metabolic syndrome**

The purpose of this study has been to identify new prognosis markers of cardiovascular risk in patients with metabolic syndrome, since death rates and morbidity in such patients are more elevated and more frequent, amid the association of atherosclerosis. Moreover, we have started from the fact that endothelial dysfunction lies at the basis of developing accelerated atherosclerosis and is a trigger of negative cardiovascular events. Thus, we have aimed to identify endothelial dysfunction markers which would provide a timely warning of the imminence of developing atherosclerosis and its effects, in patients with multiple cardiovascular risk factors.

The group included in the study comprised 30 patients, of whom 18 women and 12 men. All patients had been diagnosed with metabolic syndrome, in accordance with IDF (International Diabetes Federation) criteria.

In the case of these patients, it was conducted a measurement of the parameters on the basis of which the metabolic syndrome diagnosis is set. Furthermore, echographic measures were conducted to establish the presence/absence of epicardial fat and intima-media thickness at the level of the common carotid artery, the internal or external carotid artery. Since all patients had HTA, comparisons were made on the basis of the presence or absence of diabetes mellitus. In the case of qualitative and

ordinal variables, absolute and relative variables were calculated. Comparisons were made using the Chi-square test (with attached contingency coefficient), in the case of the qualitative variables, and the Somer and Kendall coefficients (tau-b statistic), in the case of the ordinal ones. The relative risk and odds ratio were calculated, together with confidence intervals, so as to evaluate the influence of the factors on the probability that a certain aspect would appear.

Quantitative variables were evaluated from the standpoint of normalcy. Descriptive statistics were presented in the form mean  $\pm$  standard deviation or median (Q1 – Q3). Comparisons were rolled differently, depending on the form of distribution. Hence, in the case of variables with a normal distribution, parametric tests were applied (the Student – t test, in different forms, including the analysis of ANOVA variations). For variables with non-normal distribution, non-parametric tests were applied: Mann-Whitney, Wilcoxon, Kruskal – Wallis etc. Pearson's coefficient was calculated to evaluate correlations.

We have demonstrated that the presence of epicardial fat correlates with the presence of diabetes mellitus and increases the likelihood of the existence of type II diabetes mellitus over five times. Furthermore, increased intima-media thickness is associated with elevated Visfatin seric levels. Next, we have shown that evaluating epicardial fat through echocardiography is a simple, reproducible and inexpensive method that can be applied to all patients with metabolic syndrome for a quicker identification of risk factors in diabetes mellitus and cardiovascular disease.

## **Study 2. Modified seric levels of Visfatin/NAMPT in patients with preeclampsia**

Preeclampsia is represented by the presence of arterial hypertension during pregnancy, after week 20, and is associated with high cardiovascular risk following childbirth. It is also responsible for very elevated death rates and morbidity, both maternal and foetal. As it has been mentioned, preeclampsia encompasses factors that lie at the basis of defining metabolic syndrome, i.e.: subclinical inflammation, insulin resistance and obesity. Through this study, we have aimed to observe whether the seric levels of Visfatin are altered in patients with preeclampsia, compared to the control group, and whether they significantly affect one of the complications of this illness, namely birth weight. Also, we have intended to assess the connection between Visfatinemia and the severity of the form of preeclampsia, as well as whether this adipocytokine has a decisive contribution to its progression.

This study was conducted on a number of 56 pregnant patients, namely: 40 diagnosed with preeclampsia, in a medium form (30 patients) and severe (10 patients), along with 16 control subjects – i.e. healthy pregnant women, with blood taken after week 20 of pregnancy.

The definition of the groups was performed according to the criteria defined by the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy -ISSHP.

The measurement of arterial pressure was conducted and Visfatin serum was dosed, through the ELISA technique.

Then, the statistical analysis was performed, with the data initially analysed from a qualitative standpoint. Frequencies and percentages were calculated for

nominal and ordinal data. The descriptive data was presented in the form mean +/- standard deviation or median (Q1-Q3-type IQR). Since our variables were not distributed normally, comparisons were performed using non-parametric tests: the Mann-Whitney, Wilcoxon, Kruskal-Wallis and Kolmogorov-Smirnov tests. The regression analysis was performed in binary logistic and in ordinal form. The transformation of variables was conducted through logarithms, in order to create a standardisation of the former.

In this study we have identified lower seric levels of Visfatin in patients with preeclampsia, compared to the control group, albeit the differences were not statistically significant. The lowest values were encountered in patients exhibiting the most severe forms of preeclampsia. The plasmatic concentrations of Visfatin were not significantly different between the patients with preeclampsia who gave birth to normal-weight foetuses and those giving birth to low-weight foetuses.

### **Study 3. Study on the relationship between the serum levels of Visfatin, anthropometric parameters, lipid profile and glycaemia in patients with metabolic syndrome vs. patients with metabolic syndrome and type II diabetes mellitus.**

This study started from the premise that cardiovascular diseases are principal causes of morbidity/high death rates, and the prevalence of type II diabetes mellitus and obesity is increasing. Prevention must indeed be conducted at the level of the population, but at individual level those factors that predispose one to cardiovascular disease have to be noted and corrected.

We have relied on the fact that endothelial dysfunction lies at the basis of developing accelerated atherosclerosis and triggers negative cardiovascular events. Hence, we aimed to identify endothelial dysfunction markers, since in studies conducted over the last few years, Visfatin has been proposed as a biomarker of advanced atherosclerosis in patients with type II diabetes mellitus.

The group included in the study comprised 30 patients, of whom 18 women and 12 men. All patients had been diagnosed with metabolic syndrome, in accordance with the criteria recommended by the IDF (International Diabetes Federation). In the case of these patients, we proceeded to measuring anthropometric indicators and parameters on the basis of which the metabolic syndrome diagnosis is established.

Laboratory samples were taken a-jeun. The lipid profile, glycemia and Visfatin were determined through the ELISE method. The statistical analysis was conducted by using the parameters described in the first study.

There are statistically notable differences between the diabetic and non-diabetic groups of patients with metabolic syndrome, with regard to body mass index, taken both individually and collectively, as well as in terms of the value of HDL-col. Patients with greater body mass were more frequently diabetic. However, the Visfatin level was not statistically different between the two groups.

Normal weight patients exhibited significantly lower HDL-cholesterol and Visfatin serum levels compared to obese ones. There is a tendency to have increased Visfatin serum levels in diabetic patients, compared to non-diabetics. Patients with metabolic syndrome who also had diabetes mellitus exhibited higher values of total

cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides, compared to subjects suffering from metabolic syndrome and arterial hypertension. Patients with metabolic syndrome and hypertension were closer to the values of lipid profile recommended by the European guidelines on cardiovascular disease prevention than those also suffering from type II diabetes mellitus, albeit patients from both groups were being treated with statins, which means that in their case there were probably other mechanisms that altered lipid metabolism. As it became apparent, an increase in abdominal girth of 1 unit determines an increase in Visfatin serum levels of 0,13 units. The analysis of the entire group has shown that an increase in Visfatin serum levels lowers the probability of finding high levels of glycemia in these patients.

## **ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS**

This thesis conducts research in an area of considerable interest at this time, due to the massive prevalence and, especially, increase in metabolic syndrome and type II diabetes mellitus, all the more so because the average diagnostic age of such diseases has been rapidly decreasing. This contributes to a greater occurrence of cardiovascular diseases in young people. The theme of this paper has also been chosen in the light of the current importance of the subject “inflammation in cardiovascular disease”, as well as of the innovative treatments with an immunosuppressing effect that have yielded a decrease in the progression and occurrence of new cardiovascular events in patients subjected to such therapies. For this reason, it is likely that the results of this paper contribute to a better understanding of the action mechanisms of Visfatin and, thus, to the development of innovative therapies for the prevention and even treatment of cardiometabolic complications. Another novelty is the evaluation of epicardial fat as a cardiovascular risk factor and, chiefly, as a risk factor in the onset on type II diabetes mellitus.