

**UNIVERSITATEA DE MEDICINA SI FARMACIE  
VICTOR BABEȘ TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ GENERALĂ  
DEPARTMENTUL DE NEFROLOGIE**

**BALINT P. LAVINIA**



# **TEZA DE DOCTORAT**

**IDENTIFICAREA ȘI CARACTERIZAREA METABOLIȚILOR DERIVAȚI  
DIN MICROBIOMUL INTESTINAL ÎN BOALA CRONICĂ DE RINICHİ  
DIABETICĂ ȘI RELAȚIA ACESTORA CU BIOMARKERI  
PODOCITARI, TUBULARI ȘI ENDOTELIALI CEREBRO-VASCULARI.  
STUDIU REALIZAT PRIN METODE BAZATE PE SPECTROMETRIE  
DE MASĂ DE ÎNALTĂ PERFORMANȚĂ CU CROMATOGRAFIE  
LICHIDĂ**

## **R E Z U M A T**

Coordonator științific  
**PROF. UNIV. DR. HABIL LIGIA PETRICA**

**Timișoara  
2023**

## INTRODUCERE

Diabetul zaharat tip 2 (DZ2) determina leziuni renale și cerebrale prin disfuncție endotelială. Boala renală diabetică (BCRD) și microangiopatia cerebrală (MPC) sunt complicații concomitente și severe ale DZ2 care pot determina demență și rate ridicate de mortalitate prin apariția bolii renale în stadiu final (BCRF). Metodele actuale de diagnosticare se bazează pe determinarea creatininei serice și a raportului albumină-creatinină urinară, dar prevalența tot mai mare a BCRF, atribuită DZ2, evidențiază insuficiența acestor markeri pentru detectarea precoce a bolii.

În acest mediu sofisticat, creat de DZ2, identificarea unor noi biomarkeri de diagnostic pentru BCRD incipientă și pentru MPC, devine imperativă. Astfel, studiul microbiotei intestinale este din ce în ce mai apreciat, deoarece din aceasta derivă o vastă colecție de metaboliți. Tehnicile metabolomice au apărut ca metode extrem de versatile utilizate pentru profilarea fluxului metabolic al unui anumit individ, oferind informații cruciale despre căile metabolice și homeostazia perturbată, care apar în diverse scenarii legate de boală. Evaluarea metaboliților proveniți din microbiota intestinală cu ajutorul acestor tehnici ar putea fi fundamentală pentru identificarea în timp util și dezvoltarea de tratamente individualizate pentru pacienții care suferă de DZ2 și de complicațiile asociate – BCRD și MPC.

## INTROSPECȚIE ASUPRA DATELOR RECENTE DIN LITERATURA DE SPECIALITATE

### 1. CONCEPTUL DE DIABET ZAHARAT DE TIP 2 ȘI COMPLICAȚIILE ASOCIATE: BOALA RENALĂ DIABETICĂ ȘI BOALA VASCULARĂ CEREBRALĂ

Diabetul zaharat (DZ) este o boală complexă și adesea diagnosticată tardiv, reprezentând între 90% și 95% dintre toate cazurile de la nivel mondial. DZ2 este prima cauză a bolii cronice de rinichi (BCR), provocând 10% din decese prin evoluția către BCRF. Diagnosticul acestei afecțiuni poate fi determinat prin identificarea de: valori ale glicemiei de peste 200 mg/dl în orice moment al zilei și/sau valori care depășesc 126 mg/dl preprandial, sau valoarea hemoglobinei glicozilate A1c (HbA1c) de peste 6,5%.

Așa cum este propus de către ghidurile practice clinice pentru evaluarea și managementul BCR - The Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO), BCR este diagnosticată fie prin prezența unei leziuni renale structurale (RAC care depășește 30 mg/g, modificări ale sedimentului urinar cu prezența hematuriei, tulburări tubulare renale și modificări histopatologice), fie prin prezența unui declin renal funcțional (eGFR de 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> sau mai puțin).

BCRD este o complicație dominantă, microvasculară, care apare la 20% până la 40% dintre pacienții care suferă de DZ2. După cum a propus grupul de lucru KDIGO, la un pacient cu DZ2, albuminuria moderat crescută și/sau declinul RFG sub 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>, pe o perioadă persistentă de 90 de zile, la determinări repetate, reprezintă indicatorii principali ai apariției BCRD.

CSVD nu este pe deplin considerată ca fiind o complicație microvasculară a DZ, însă studiul fiziopatologiei sale poate oferi răspunsuri, deoarece vasele mici din creier au caracteristici similare cu arterele juxtamedulare renale. Vasele mici cerebrale mențin structura barierei hemato-encefalice (BHE), autoreglarea tensiunii arteriale și cuplarea

neurovasculară. Prin autoreglarea redusă și decuplarea neurovasculară, mediul hiperglicemic perturbă integritatea BHE și determină apariția MPC. Diagnosticul MPC este posibil în prezent doar cu ajutorul imagisticii prin rezonanță magnetică (RMN) sau al ultrasonografiei Doppler cerebrovasculare, dar aceste tehnici nu detectează boala incipientă.

## **2. AXUL CEREBRAL-INTESTINAL-RENAL ÎN CONTEXTUL COMPLEX AL BOLII RENALE DIABETICE**

Tractul gastrointestinal uman găzduiește trilioane de bacterii care acționează în mod simbiotic cu gazda, deoarece acestea mențin integritatea intestinală și furnizează nutrienți locali. Hiperglicemia prelungită perturbă homeostazia microbiotei, determină o permeabilitate intestinală crescută și o stare inflamatorie cronică și, în cele din urmă, inițiază procesul de disbioză intestinală. Disbioza intestinală în DZ2 este caracterizată de număr redus al bacteriilor care produc butirat.

Într-un mediu hiperglicemic, celulele endoteliale renale devin saturate cu glucoză. Procesul de glicoliză este deviat către căile poliului și hexosaminei, ceea ce duce la producția de produși finali de glicozilare avansată (AGE) și de specii reactive de oxigen (ROS). Acestea determină un stres oxidativ crescut, producția de factori proinflamatori și pro-trombotici și culminează cu disfuncția endotelială. Reducerea sintezei de heparan sulfat determină angiogeneza defectuoasă, clivarea glicocalixului, mărirea fenestrațiilor și creșterea permeabilității vasculare care determină pierderi urinare de albumină. DZ2 este caracterizat de apoptoza podocitelor, producția excesivă de matrice extracelulară (ECM) de către celulele mezangiale și îngroșarea membranei bazale glomerulare (GBM). Celulele tubulare proximale exprimă disfuncție mitocondrială, activitate metabolică crescută și livrare redusă de oxigen, ceea ce duce la apoptoză celulară, cu atrofie tubulară ulterioară și fibroză interstițială.

Axul cerebral-renal, în cadrul BCRD, se caracterizează prin glicoliză defectuoasă, stres oxidativ crescut și disfuncție a celulelor endoteliale. Disfuncția celulelor endoteliale se traduce prin întreruperea integrității BHE și printr-un pasaj crescut al neurotoxinelor în compartimentul extravascular. Axul renal-intestinal contribuie la progresia BCRD prin creșterea permeabilității intestinale și prin pasajul crescut al toxinelor uremice în torrentul sanguin, afectând toate structurile renale (podocite, celule endoteliale, tubulare și mezangiale). Intestinul are o legătură complexă cu creierul prin producția de diverși neurotransmițători, în timp ce creierul influențează metabolismul microbial sau colonizarea intestinală, prin diverși produși chimici. Astfel, există posibilitatea ca disbioza intestinală să fie un determinat al debutului bolii cerebrovasculare.

## **3. BIOMARKERI TRADIȚIONALI DE DIAGNOSTICARE PRECOCE A BOLII RENALE DIABETICE**

În ceea ce privește disfuncția endotelială, s-au efectuat anterior investigații axate pe molecule vasoactive (endotelina-1, prostaciclina-2 și NO), markeri inflamatori (interleukina (IL)  $\beta$ 1, IL-6 și factorul de necroză tumorală  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) și mediatori ai stresului oxidativ (AGE și ROS). Ulterior, atenția a fost redirecționată către examinarea moleculelor eliberate de celulele endoteliale ca răspuns la diverse leziuni, inclusiv proteina chemoattractantă a monocitelor (MCP-1) și molecula de adeziune intercelulară 1 (ICAM-1).

Cei mai studiați markeri ai leziunilor podocitare au fost: nefrina, care modulează structura diafragmei de filtrare; podocalixina (PDX), care controlează permeabilitatea

glomerulară; și sinaptopodina (STP), care modulează contractilitatea citoscheletului de actină.

Markerii de leziune tubulară proximală asociați cu BCRD au fost următorii: molecula de leziune renală 1 (KIM-1) care este eliberată în contextul leziunilor tubulare proximale chiar înainte de apariția albuminuriei; N-acetil- $\beta$ -D-glucozaminidaza (NAG) reflectă activitatea lizozomală și este un factor predictiv al apariției albuminuriei; iar lipocalina asociată cu gelatinaza neutrofilă (NGAL) este un biomarker eliberat rapid în contextul unor leziuni tubulare severe.

#### **4. NOI PERSPECTIVE ASUPRA METODELOR DE DESCOPERIRE A BIOMARKERILOR**

Caracterul progresiv al BCRD rămâne o problemă majoră, în ciuda eforturilor susținute ale cercetătorilor de a stabili metode mai precise de detectare precoce ale acestei boli. Științele omice sunt utilizate în medicina sistemelor pentru a investiga căile metabolice și fluxul de metaboliți în diferite scenarii de boală. Acestea pot conduce la dezvoltarea unor noi strategii terapeutice, pentru a limita progresia diverselor afecțiuni.

Lipidomica aduce contribuții substanțiale în detectarea dezvoltării precoce a BCRD. De exemplu, amplexarea sialilării glicosfingolipidelor a fost identificată ca fiind corelată cu severitatea BCRD, chiar și în stadii inițiale. Prin proteomică, a fost descoperită o rețea de 273 de peptide denumite CKD273, menite să funcționeze ca o „biopsie lichidă” pentru detectarea timpurie a BCRD. Prin transcriptomică, s-a descoperit că acidul ribonucleic cu necodare lungă (lncRNA) este implicat în stadiile incipiente ale BCRD prin modularea expresiei acizilor micro ribonucleici (miRNA). Metabolomica este caracterizată prin evaluarea calitativă și cantitativă a unui feedback metabolic multidimensional la stresori fiziopatologici sau epigenetici, pentru a construi un profil personalizat care să corespundă exclusivității unei amprente digitale a fiecărui fiecare individ. Această tehnică a evoluat de la rezonanța magnetică nucleară (NMR) la cromatografia lichidă de ultra-înaltă performanță (UHPLC) împreună cu spectrometria de masă (MS), care are o sensibilitate mai mare pentru descoperirea biomarkerilor. Tehnica UHPLC-MS constă în două etape majore, cum ar fi: analiza nețintită (calitativă), multivariată și univariată, precum și analiza țintită (cantitativă) a metaboliților cu potențial biomarker dovedit.

#### **5. CLASE DE METABOLIȚI CU POTENȚIAL DE BIOMARKER ÎN BOALA RENALĂ DIABETICĂ ȘI ÎN MICROANGIOPATIA CEREBRALĂ**

Aminoacizii liberi (AA) derivă din compuși proteici, iar homeostazia lor este reglementată îndeaproape de intestin și rinichi. L-arginina este un precursor al NO și dimetilargininelor. S-a constatat că în BCRD, ADMA are nivel crescut iar L-arginina are nivel scăzut. De asemenea, L-arginina a fost indentificată ca fiind asociată cu gradul de disfuncție endotelială cerebrovasculară. Fenilalanina este un AA aromatic și un precursor al multor metaboliți (tirozină, catecolamine, etc.). Tirozina este un AA semi-aromatic și un substrat pentru producerea toxinelor uremice. La om, fenilalanina și tirozina au fost asociate cu complicațiile macrovasculare și microvasculare ale BCRD. Metabolismul triptofanului urmează trei căi principale: kynurenina, serotonina și indolul. Nivelurile crescute de kynurenină s-au dovedit a fi protectoare împotriva tulburărilor cognitive legate de DZ2; creșterea serotoninei plasmatică poate reflecta leziunile renale incipiente; și o cale dereglată a indolului afectează metabolismul glucozei și crește stresul oxidativ. Astfel, studiul metabolismului AA poate aduce perspective noi în ceea ce privește dezvoltarea BCRD.

Microbii intestinale prin degradarea AA, produc toxine uremice. Datorită permeabilității crescute intestinale, acestea se absorb în sânge și sunt sulfatate în ficat. Secreția tubulară renală a toxinelor uremice prin receptorii de anioni organici (OAT) sugerează rolul lor în tulburările renale. De exemplu, s-a constatat că acidul hipuric este scăzut în serul pacienților care suferă de BCRD și BCR. În BHE, acidul hipuric blochează OATs și determină acumularea altor toxine uremice, cum ar fi sulfatul de indoxil. S-a constatat că acesta generează disfuncție endotelială renală prin intermediul receptorilor aril hidrocarbon (AhR), determină apoptoza celulelor endoteliale cerebrovasculare și induce stresul oxidativ în microgii și astrocite. Fenil-sulfatul determină disfuncția mitocondrială și stres oxidativ în podocite și în celulele tubulare proximale, în timp ce sulfatul de p-cresil induce fibroza renală.

Acilcarnitinele sunt mediatori ai transportului acizilor grași (FA) în mitocondrii, care rezultă în ATP prin  $\beta$ -oxidare. O creștere a acestor molecule indică o  $\beta$ -oxidare mitocondrială deficitară a FA și disfuncție mitocondrială în tubului proximal în BCRD. În paralel, FA neesterificați au fost asociați cu DZ și BCRD. În BCRD, metabolismul carbohidraților este alterat, trecând de la procesul normal de glicoliză la căile polioliului și hexosaminei. Aceste reacții sunt cruciale deoarece produsele lor finale exercită efecte dăunătoare asupra celulelor endoteliale, provocând astfel leziuni ale filtrului renal sau ale BHE, sau deoarece imprimă disfuncționalități podocitelor și celulelor tubulare. Prin urmare, ele merită o atenție specială în ceea ce privește dezvoltarea DKD.

Având în vedere faptul că BCRD este caracterizată de o stare pro-oxidativă, studiul antioxidantilor în acest context a furnizat date interesante. De exemplu, acidul ascorbic și  $\alpha$ -tocoferolul sunt capabili să scadă nivelul creatininei serice în BCRD. Mai mult, calea de semnalizare a acidului retinoic pare a fi extrem de importantă în BCRD. S-a constatat că administrarea de acid retinoic all-trans (ATRA) inhibă inflamația glomerulară și tubulară. Mai mult, administrarea de ATRA a demonstrat efecte pozitive asupra prognosticului post-infarct cerebral, reducerea dimensiunii infarctului și ameliorarea permeabilității BHE. Aceste studii sugerează implicarea potențială a ATRA în patogeniza BCRD și MPC. Cu toate acestea, este imperios necesar să se valideze aceste constatări care au fost obținute în urma experimentelor pe animale prin efectuarea de investigații clinice.

## CONTRIBUȚII ȘI CERCETARE PERSONALĂ

Progresia DZ2 prezintă în permanență provocări din cauza dezvoltării BCRF și a abordărilor terapeutice limitate. Studiile moleculare au explorat mecanismele care contribuie la dezvoltarea BCRD. Metabolomica este un instrument puternic pentru înțelegerea condițiilor medicale și a interacțiunilor medicamentoase. Cu toate acestea, analiza metaboliților, în sine, nu stabilește o relație de cauzalitate și trebuie corelată cu alți markeri. Tehnica ELISA este o metodă de imuno-analiză, utilizată pe scară largă, pentru identificarea anticorpilor și antigenelor. Ecografia Doppler evaluează dinamica cerebrovasculară și fluxul sanguin și oferă date valoroase privind autoreglarea cerebrovasculară și remodelarea vasculară.

**Primul studiu** a avut ca scop identificarea căilor metabolite distinctive, din serul și urina pacienților cu BCRD, în comparație cu controlii, folosind metode multivariate nețintite. Analiza univariată nețintită a dezvăluit metaboliții distinctivi subgrupelor BCRD versus

controlu. Rezultatele au demonstrat implicarea căii de semnalizare a retinoizilor și căii metabolice a azotului în BCRD înainte de apariția albuminuriei.

**Al doilea studiu** a analizat metaboliții cu potențial de biomarker, din ser și urină, într-un mod țintit, în special cei găsiți semnificativi în primul studiu, acordând o atenție specială subgrupului cu normoalbuminurie. Rezultatele au arătat o corelație între arginină serică, dimetilarginină, acidul hipuric, sulfatul de indoxil, butenilcarnitină, sorbitol și nivelurile de p-cresil sulfat din urină și albuminurie. Nivelul acestor metaboliți a fost dereglat înainte de debutul albuminuriei.

**Al treilea studiu** a investigat corelația dintre metaboliții serici și indicatorii de deteriorare endotelială renală și cerebrovasculară, și corelația dintre metaboliții urinari cu disfuncția podocitară și deteriorarea tubului proximal. Rezultatele au indicat că, în ser: arginina, butenilcarnitina și sulfatul de indoxil sunt asociate cu disfuncția endotelială renală și remodelarea cerebrovasculară, în timp ce sorbitolul este un biomarker al disfuncției BHE. În urină, butenilcarnitina și sulfatul de indoxil au fost asociate cu podocitopatia în cursul BCRD, în timp ce p-cresil sulfatul este asociat cu disfuncția tubului proximal.

## **6. ANALIZA METABOLOMICĂ NEȚINTITĂ, MULTIVARIATĂ ȘI UNIVARIATĂ OFERĂ NOI DATE REFERITOARE LA AXUL INTESTINAL-RENAL-CEREBRAL LA PACIENȚII CU BCRD ȘI DZ2**

### **6.1. OBIECTIVE**

Obiectivele primului studiu au fost: identificarea de noi biomarkeri derivați din intestin care pot contribui la dezvoltarea timpurie a BCRD; precizarea căilor metabolice în care sunt implicați acești biomarkeri; evidențierea concomitenței proceselor de dezvoltare a BCRD și MPC, care includ căile metabolice modificate și relația lor cu disfuncția endotelială;

### **6.2. MATERIALE ȘI METODE**

#### **Selecția pacienților**

Acest studiu a fost unul pilot și transversal, și a inclus 110 participanți (90 de pacienți BCRD – grupul P; și 20 de controlu – grupul C), monitorizați periodic la Spitalul Clinic Județean de Urgență, Timisoara și la cabinetele medicilor de familie. Criteriile de includere au fost următoarele: durata DZ > 5 ani, HbA1c < 10%. Toți pacienții au fost tratați cu inhibitori ai enzimei de conversie a angiotensinei 2, blocați ai receptorilor angiotensinei 2, statine, antidiabetice orale și/sau insulină. Criteriile de excludere au fost: HbA1c > 10%, BCRF, infecție sistemică sau urinară activă, BCR non-diabetică, alte boli glomerulare, boli autoimune, neoplazii și tulburări psihice. Clasificarea pacienților a fost efectuată în conformitate cu ghidul KDIGO după cum urmează: P1 – albuminurie normală spre ușor crescută; P2 – albuminurie moderat crescută; P3 – albuminurie sever crescută.

Toți participanții au semnat consimțământul informat. Colectarea sângelui a fost realizată prin puncție venoasă, și a fost depozitată în vacutainere fără anticoagulant, în timp ce urina a fost colectată în flacoane sterile. Eșantioanele au fost etichetate cu coduri numerice confidențiale și păstrate la -80°C până la evaluare.

#### **Evaluarea UHPLC-QTOF-ESI+-MS**

Un instrument ThermoFisher Scientific UHPLC Ultimate 3000 cu pompă quaternară, sistem de livrare Dionex și echipamente de detectare MS cu MaXis Impact (Daltonics de utilizator) au fost utilizate pentru a efectua profilarea metabolomică prin cromatografie lichidă

de înaltă performanță, combinată cu tehnici avansate de spectrometrie de masă (UHPLC-QTOF-ESI+-MS)

### **Analiza statistică**

Analiza UHPLC-QTOF-ESI+-MS a furnizat 420 de metaboliți în ser și 550 în urină. Unii dintre ei au fost excluși în funcție de timpul de reținere scăzut, valorile S/N, m/z și intensitățile maxime (PI). În cele din urmă, au rezultat 136 de molecule în ser și 196 în urină, care au fost adăugate pe platforma Metaboanalyst 5.0. Analiza multivariată neîntită a fost utilizată pentru a compara metaboliții serici și urinari din grupul BCRD (P) și grupul de control (C). Testul Fold Change, testul Volcano, analiza Pattern Hunter, analiza discriminantă parțială a celor mai mici pătrate (PLSDA), sparse PLSDA și scorurile VIP, au fost folosite pentru a analiza discriminarea grupului P de grupul C. În plus, s-au utilizat: testul de predicție bazat pe Random-Forest, iar valorile P au fost determinate folosind testul t al studentului. Pentru studiul univariat, au fost utilizate ca tehnici de analiză: One Way ANOVA, Fischer's LSD, analiza Pattern Hunter, PLSDA, sparse PLSDA, Random Forest și analiza biomarkerilor.

### **6.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII**

În acest studiu, s-au găsit cantități mai mici de fenilalanină și tirozină în serul și urina grupului P comparativ cu grupul C. Subgrupul cu normoalbuminurie prezintă cantități mai mari de fenilalanină atât în sânge, cât și în urină, conform comparației individuale a subgrupurilor P1 vs. P2 și P1 Vs. P3. Tirozina s-a comportat într-un mod similar cu cel al fenilalaninei. S-a demonstrat că fenilalanina scăzută și tirozina interacționează cu nefropatia diabetică. În DZ2 și în stadiile incipiente ale BCRD, atât fenilalanina, cât și tirozina exprimă anomalii în dinamica lor, după cum a demonstrat și acest studiu. Calea fenilalaninei poate fi implicată în procesul patogenetic timpuriu al dezvoltării DZ, iar aceste schimbări pot începe cu ani înainte de diagnosticul bolii.

Analiza multivariată a arătat că grupul P avea niveluri mai mari de sulfat de indoxil comparativ cu grupul C. În plus, s-a constatat că nivelurile de sulfat de indoxil sunt mai mari în urină decât în ser. Analiza serică univariată a arătat o creștere progresivă a nivelurilor de sulfat de indoxil, care a fost corelată cu progresia BCRD (P1, P2, P3). Prin analiza univariată a urinei, s-a observat că nivelurile de sulfat de indoxil pot distinge stadiile incipiente ale BCRD, în special atunci când se compară grupul normoalbuminuric cu alte subgrupuri. Sulfatul de indoxil poate fi un jucător cheie în leziunea tubulară proximală timpurie în BCRD, chiar înainte de apariția albuminuriei. Poate influența leziunea celulelor endoteliale prin creșterea formării de ROS. De asemenea, poate fi implicat în malfuncția BHE, un proces condus de citokine care declanșează inflamația prin receptori OAT. În ser, sulfatul de serotonină a exprimat niveluri crescute prin compararea subgrupului P1 cu subgrupurile C și P2, iar nivelurile au scăzut atunci când s-a comparat P1 și subgrupul P3. Analiza urinei a indicat niveluri crescute ale acestui metabolit în grupul P1 comparativ cu P2, P3, C. Sulfatul de serotonină poate fi implicat în procesele fibrotice renale incipiente. Această implicare moleculară, în disfuncția cerebrală și renală, nu a fost studiată pe scară largă, iar tendințele sale sunt interesante în ceea ce privește debutul BCRD, meritând astfel o atenție deosebită în studii ulterioare.

Rezultatele studiului nostru evidențiază potențiala implicare a căii de semnalizare a acidului retinoic ca factor contribuitor la dezvoltarea și progresia BCRD. Rezultatele indică o creștere progresivă a concentrației de ATRA în ser în subgrupurile C, P1, P2 și P3. Niveluri mai mari de ATRA au fost observate în grupul cu normoalbuminurici atunci când s-au comparat P1 cu C, P2 și P3, în urină. În grupul de normoalbuminurie, poate fi observată o creștere a nivelurilor ATRA în urină și ser. Acest grup de pacienți prezintă, de asemenea,

niveluri mai ridicate de ATRA în comparație cu celelalte grupuri (P2, P3 and C). Rolurile ATRA în DKD pot fi după cum urmează: poate stimula secreția pancreatică de insulină, contribuie la diferențierea celulelor progenitor renale în podocite, interferează cu procesul de fibroză renală în stadiile incipiente ale BCRD. ATRA poate, de asemenea, să declanșeze un mecanism de compensare pentru a induce proliferarea de celule endoteliale și pentru a restabili atât integritatea endotelială, cât și recuperarea neuronală.

### **RELEVANȚA CLINICĂ**

Aceste constatări pot fi utilizate pentru a dezvolta ținte medicamentoase personalizate împotriva metabolitilor derivați din calea metabolică a azotului sau a căii de semnalizare a acidului retinoic. De asemenea, ar trebui luată în considerare utilizarea probioticelor, prebioticelor și simbioticelor, pentru redirecționarea excreției metabolitilor dinspre ruta renală către ruta fecală.

### **6.4. CONCLUZIE**

În concluzie, acest studiu a identificat biomarkeri asociați cu metabolismul fenilalaninei, tirozinei, triptofanului și acidului retinoic la pacienții cu DZ2 și albuminurie normală spre ușor crescută. Acești biomarkeri conturează un profil metabolic distinct la pacienții cu BCRD precoce, și ar putea indica o cale patogenică comună renal-cerebrală. Biomarkerii pot exprima un rol cheie în podocit, tubul proximal și în disfuncția endotelială renală și cerebrovasculară.

## **7. CERCETAREA METABOLOMICĂ ȚINTITĂ A METABOLIȚILOR DERIVAȚI DIN INTESTIN DEZVĂLUIE UN MODEL SPECIFIC DEBUTULUI PRECOCE AL BCRD LA PACIENȚII CU DZ2**

### **7.1. OBIECTIVE**

Acest studiu este o extensie a cercetărilor anterioare care au implicat analize metabolomice multivariate și univariate nețintite, ale serului și urinei pacienților cu BCRD și DZ2. Scopul acestui studiu este de a oferi o analiză detaliată, prin cuantificarea metabolitilor specifici derivați din intestin care au prezentat un potențial semnificativ ca biomarkeri în studiul anterior.

### **7.2. MATERIALE ȘI METODE**

**Selecția pacienților, prelevarea probelor, analiza UHPLC-QTOF-ESI+-MS, analiza statistică și selecția metabolitilor.**

Structura celui de-al doilea studiu urmează aceeași metodologie ca și primul studiu. Al doilea studiu implică aceleași grupuri de pacienți și de controli. Durata studiului, criteriile de includere și excludere ale participanților, clasificarea subgrupelor și colectarea eșantioanelor au fost în concordanță cu descrierea furnizată în capitolul 6.2.

#### **Reactivi utilizați pentru cuantificarea metabolitilor**

Reactivii și substanțele chimice utilizate pentru această investigație au fost după cum urmează: acid formic de grad PLC, acidul formic HPLC/MS și acetonitril. Standardele pure utilizate au fost: clorhidrat de acetyl-L-carnitină, arginină, dimetil- L-arginină asimetrică, acid hipuric, sare de potasiu sulfat de indoxil, sorbitol, sulfat de p-cresil și creatinină. Instrumentele utilizate în acest studiu au fost un mixer vortex și o minicentrifugă Eppendorf.



### **Analiza țintită**

Pentru soluția de calibrare și pregătirea eșantionului QC au fost utilizate următoarele soluții standard: arginină, ADMA, L-acetilcarnitină, acid hipuric, sorbitol, sulfat de indoxil, sulfat de p-cresil și creatinină. Acești compuși au fost dizolvați în metanol și/sau apă ultra-pură. Pentru a servi drept standard intern, a fost preparată o soluție de DOXO, la o concentrație de 2 mg/mL. Soluțiile standard au fost supuse unui proces de diluție secvențială folosind un amestec de metanol și acetonitril într-un raport de 2:1. Acest proces a condus la generarea unor serii de soluții operaționale cu concentrații diferite, care au fost utilizate în scopuri de calibrare externă. Simultan, s-au suplimentat eșantioanele deproteinate de 0.3 mL QC cu volume diferite de soluții standard. Procesul de validare a cuprins evaluarea liniarității, specificității, preciziei, acurateței, precum și determinarea limitelor de detectare (LOD) și de cuantificare. (LOQ). Două curbe de calibrare au fost generate în acest studiu (curba standard externă și curba standard internă)

### **7.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII**

Nivelurile de arginină serică scad, în timp ce ADMA crește progresiv de la grupul C la subgrupurile P1, P2 și P3. Analiza statistică a arătat variații ale nivelurilor de arginină serică la compararea grupului C cu subgrupurile P, precum și între subgrupele P1 și P2. Nivelurile ADMA au demonstrat diferențe semnificative între toate subgrupurile. În urină, există o creștere constantă a nivelurilor de arginină și ADMA, cu excepția comparației P1 vs. P2, unde ambii metaboliți prezintă niveluri scăzute. Observația că arginina este redusă și ADMA este crescută în grupul P1, împreună cu variațiile observate între subgrupuri, sugerează că acești factori pot juca un rol subiacent în dezvoltarea BCRD. În special, acești metaboliți pot contribui la (1) afectarea dilatației microvasculare renale (2) dezechilibre în procesul de glicoliză și (3) generarea de ROS prin creșterea stresului oxidativ.

Nivelurile de acid hipuric din ser au fost reduse, de la subgrupul C la sub grupul P1-P3. În urină, nivelurile sale au crescut după același model. Analiza statistică a subgrupurilor indică faptul că hipuratul seric ar putea servi ca biomarker precoce pentru BCRD. În urină, nu diferențiază între subgrupurile C și P. Scăderea nivelurilor de hipurat din ser de la grupul C la P1, P2 și P3 ar putea fi atribuită activității mitocondriale afectate în celulele tubulare proximale sau datorită nivelului scăzut de fenilalanină, care este un precursor al hipuratului.

S-a observat o creștere a concentrațiilor serice de sulfat de indoxil pe măsură ce albuminuria a progresat, cu o tendință similară observată în urină. Prin analize suplimentare, s-a constatat că sulfatul de indoxil seric prezintă potențial promițător ca un predictor al BCRD precoce. Creșterea sulfatului de indoxil facilitează inflamația, calcificarea sistemului vascular și formarea microtrombilor cu deteriorarea ulterioară a sistemului de filtrare glomerulară. De asemenea, poate provoca apoptoza celulelor tubulare proximale. Sulfatul de indoxil a fost identificat ca un potențial biomarker pentru BCRD în stadiul incipient, pe baza cercetărilor anterioare și a constatărilor personale.

Sulfatul de P-cresil, în urină, a prezentat o creștere constantă a nivelurilor sale, care s-au dovedit a fi foarte discriminatorii atunci când se evaluează C vs. P1 vs. P2 vs. P3 and P1 vs. P2. Aceste diferențe au fost semnificative din punct de vedere statistic, după cum indică valorile p. Studiul nostru indică faptul că p-cresil sulfat contribuie la dezvoltarea BCRD. Se consideră că, acesta provoacă leziuni similare în endoteliul renal și tubul proximal, precum sulfatul de indoxil, prin promovarea stresului oxidativ. Nivelurile ridicate de p-cresil sulfat în urină ale grupului nostru cu normoalbuminurie, indică faptul că excreția sa nu este influențată în întregime albuminurie și ar putea reflecta disfuncție tubulară proximală.

Nivelurile serice de L-acetilcarnitină au fost identificate ca fiind mai ridicate prin compararea P1 cu grupul C și subgrupurile P2, P3. Nivelurile acestui compus, în urină, tind

să crească treptat de la grupul C la subgrupul P3. Cercetările suplimentare au stabilit că L-acetilcarnitina nu poate fi considerată ca fiind un biomarker pentru BCRD.

Butenoil carnitina este un tip de carnitină cu lanț scurt, care prezintă o scădere a nivelului seric inițial din grupului C spre subgrupul P1, urmată de o creștere în subgrupurile P2 și P3. Analiza urinei indică concentrații reduse în grupul C și niveluri similare rezultate din compararea subgrupurilor cu BCRD. Clearance-ul crescut al butenoil carnitinei observat în subgrupul normoalbuminuric, indică disfuncție mitocondrială în celulele epiteliale tubulare.

Nivelurile de sorbitol, în subgrupul normoalbuminuric, s-au dovedit a fi reduse atunci când au fost examinate în raport cu grupul C, în prezentul studiu. Nivelurile de sorbitol tind să crească odată cu progresia albuminuriei, în special la persoanele cu albuminurie sever crescută. Acest fapt demonstrează o diferențiere notabilă între C, P1 și P2. Astfel, sorbitolul are capacitatea de a servi ca biomarker pentru debutul timpuriu al DKD prin activarea aberantă a căii poliol și a anomaliilor NADPH și NAD<sup>+</sup> care sunt implicate în producerea NO.

#### **7.4. CONCLUZIE**

Acest studiu evidențiază că, în ser, arginina, dimetilarginina, acidul hipuric, sulfatul de indoxil, butenoil carnitina și sorbitolul, și în urină p-cresil sulfatul sunt biomarkeri potențial asociați tulburărilor metabolice incipiente în BCRD. Determinarea cantitativă a metaboliților derivați din microbiota intestinală oferă noi perspective asupra metabolismului carnitinelor, aminoacizilor și toxinelor uremice. Aceste constatări ar putea fi utile pentru standardizarea și încorporarea metaboliților identificați în panouri biologice, de evaluare metabolică, personalizate, pentru diagnosticul precoce al DKD.

### **8. BIOMARKERI DERIVAȚI DIN MICROBIOMUL INTESTINAL ȘI LEGĂTURA ACESTORA CU DISFUNCTIA PODOCITARĂ, TUBULARĂ PROXIMALĂ ȘI ENDOTELIALĂ RENALĂ ȘI CEREbro-VASCULARĂ**

#### **8.1. OBIECTIVE**

Această investigație are ca scop evaluarea relației potențiale dintre metaboliții identificați anterior, remodelarea precoce a vaselor cerebrale și afectarea renală incipientă la nivel podocitar, tubular proximal și endotelial la pacienții care suferă de BCRD.

#### **8.2. MATERIALE ȘI METODE**

Selecția participanților și pregătirea eșantionanelor sunt identice cu cele descrise în primul studiu. În plus, în acest studiu au fost efectuate metode suplimentare de evaluare, cum ar fi tehnica ELISA și ultrasonografia Doppler cerebrovasculară. Tehnica ELISA a fost utilizată pentru a determina MCP-1, ICAM-1, KIM-1, NAG, PDX și STP. Prin ultrasonografie Doppler, au fost evaluate artera carotidă comună dreaptă (R-CCA) și artera carotidă medie dreaptă (R-MCA). S-au obținut următorii parametri: grosimea intimă-medie (IMT), indicii de pulsilitate (Pi) și de rezistență (Ri). În plus, ultrasonografia Doppler a evaluat reactivitatea cerebrovasculară (CVR), care reflectă capacitatea autoregulatorie a vascularizației cerebrale în urma expunerii la un stimul vasodilatator, cum ar fi hipercapnia, prin determinarea indicelui de menținere a respirației (BHI).

#### **8.3. REZULTATE ȘI DISCUȚII**

În acest studiu, arginina serică prezintă o corelație inversă cu IMT și ICAM-1 într-un model predictiv. Nivelurile reduse de arginină pot sugera disfuncție endotelială datorită sintezei renale reduse. Corelația dintre IMT și arginină ar putea indica prezența disfuncției

endoteliale în arterele carotide comune. Corelația dintre arginină și ICAM-1 implică o disfuncție simultană a celulelor endoteliale renale. Prin urmare, arginina serică poate servi ca un biomarker fiabil pentru detectarea timpurie a aterosclerozei cerebrale și a disfuncției endoteliale renale la pacienții care suferă de BCRD cu normoalbuminurie.

S-a observat o corelație pozitivă între nivelurile de butenilcarnitină serică, IMT și MCP-1. Aceste rezultate sunt susținute și de prezența valorilor p semnificative din punct de vedere statistic. Prin urmare, acest studiu oferă dovezi care susțin afirmația cum că butenilcarnitina contribuie la dezvoltarea disfuncției endoteliale renale și a disfuncției cerebrovasculare. Includerea acestui metabolit cheie în paneluri biologice are potențialul de a aborda problema dezvoltării precoce a BCRD.

S-a observat o asociere pozitivă între sulfatul de indoxil și indicatorii de disfuncție endotelială, cum ar fi ICAM-1 și Pi R-ACI. În plus, am observat o distincție clară între subgrupul P1 în comparație cu ambele subgrupuri C și P2. Corelația dintre acest produs secundar și Ri R-ACI sugerează implicarea sa în procesul de remodelare a vaselor cerebrale, care este asociat cu deteriorarea precoce a celulelor endoteliale cerebrovasculare în stadiile inițiale ale BCRD. Legătura dintre sulfatul de indoxil și ICAM-1 indică implicarea potențială a acestui compus în procesele care stau la baza disfuncției endoteliale renale. În plus, sugerează că sulfatul de indoxil poate contribui la o deteriorare selectivă a celulelor tubulare renale prin promovarea expresiei ICAM-1 la acest nivel specific.

Concluziile cercetării noastre indică o asociere negativă între sorbitol seric și BHI, precum și o asociație pozitivă cu ICAM-1, atunci când se compară subgrupul P1 cu ambele subgrupuri, C și P2. MPC este o afecțiune care se caracterizează prin disfuncție endotelială la nivelul BHE și care poate fi identificată prin utilizarea RMN sau a ultrasonografiei Doppler cerebro-vasculare. Aceste metode identifică lacune cerebrale, microinfarcte, microhemoragii și hiperintensități ale materiei albe, sau pot sugera afectarea vasodilatației folosind tehnici neurosonologice avansate. Datorită limitărilor tehnicilor actuale de diagnosticare a leziunilor endoteliale timpurii, măsurarea nivelurilor de sorbitol ar putea fi potențial valoroasă pentru a analiza performanța BHE și CVR. În consecință, determinarea sorbitolului reprezintă o potențială țintă terapeutică.

În prezentul studiu, includerea L-acetilcarnitinei în urină ca biomarker al BCRD incipient, nu este justificată, deoarece nu a atins semnificația statistică. Prezența butenilcarnitinei în urină a demonstrat o corelație semnificativă cu nivelurile RAC și PDX. Această constatare sugerează că butenilcarnitina are potențialul de a servi ca un biomarker pentru evaluarea leziunii podocitelor în BCRD.

Nivelurile de sulfat de indoxil în urină prezintă o corelație pozitivă cu PDX și RAC. Această observație nu numai că indică prezența stresului oxidativ în celulele endoteliale, dar, de asemenea, sugerează deteriorarea care are loc la nivelul podocitelor. Sulfatul de indoxil urinar poate fi considerat un biomarker pentru evaluarea deteriorării podocitelor în BCRD, însă fără a reflecta boala incipientă. Rezultatele analizei multivariabile au indicat o corelație pozitivă între p-cresil sulfatul urinar, KIM-1 și RAC. Rezultatele studiului nostru sugerează că p-cresil sulfatul urinar poate servi ca un biomarker pentru deteriorarea tubulară proximală la pacienții cu diabet zaharat care se află în stadiile incipiente ale BCRD. În plus, detectarea timpurie a BCRD poate fi facilitată prin măsurarea p-cresil sulfatului urinar, oferind clinicienilor posibilitatea de a iniția rapid intervenții terapeutice specifice.

#### **8.4. CONCLUZII**

În concluzie, această ultimă cercetare subliniază faptul că persoanele afectate de BCRD în stadiu incipient, prezintă un profil distinct de metaboliți, care pot proveni din microbiota intestinală. Prin urmare, se poate concluziona că arginina serică, sulfatul de

indoxil din ser și butenoilcarnitina din ser servesc ca biomarkeri asociați cu disfuncția endotelială renală și cu ateroscleroza arterei carotide comune. În plus, sorbitolul din ser este un biomarker care indică deteriorarea BHE, și este strâns asociat cu dezvoltarea MPC. În același timp, analiza urinei indică faptul că butenoilcarnitina urinară servește ca un indicator al leziunii podocitelor, alături de sulfatul de indoxil urinar în BCRD. P-cresil sulfatul urinar a fost identificat ca fiind un biomarker al deteriorării tubulare proximale în timpul fazelor inițiale ale BCRD.