

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ  
DEPARTAMENTUL VI - CARDIOLOGIE

ALEXANDRU APOSTU



# TEZĂ DE DOCTORAT

## IMPLICAȚII CARDIOVASCULARE ȘI DIGESTIVE ALE METFORMINEI ȘI DIABETULUI ZĂHARAT DE TIP 2

REZUMAT

Conducător Științific  
**PROF. UNIV. DR. DAN GAITA**

Timișoara  
2023

## INTRODUCERE

**Scurt istoric:** Medicii au început să observe relația dintre alimentație și diabet în secolul al XIX-lea, când a apărut diabetul zaharat de tip 2. Prima sursă de informații provine din papyrusul egiptean Ebers din anul 1550 î.Hr., care descrie simptome precum setea excesivă și urinarea frecventă.

În jurul anilor 1920, s-a descoperit că pancreasul secretă o substanță numită insulină, care ajută la reglarea nivelurilor de zahăr din sânge. Această descoperire a deschis noi căi de tratament pentru diabetul cu insulină. Mai târziu, în anii 1950, diabetul zaharat de tip 2 a fost descris ca o variantă diferită de diabetul de tip 1, care apare atunci când celulele producătoare de insulină din pancreas sunt complet distruse. Diabetul de tip 1 are alte caracteristici și are loc atunci când celulele producătoare de insulină din pancreas sunt complet distruse.

**Problematică:** Deoarece este asociat atât cu bolile cardiovasculare, cât și cu boala hepatică grasă non-alcoolică, diabetul zaharat de tip 2 este o parte importantă a sindromului metabolic, care pune în pericol funcția și integritatea sistemului cardiovascular, precum și sistemul digestiv ca urmare a tratamentului cronic pe care îl primesc pacienții. Rezistența la insulină și hiperglicemia cronică sunt factori decisivi pentru bolile cardiovasculare, cum ar fi bolile coronariene, hipertensiunea arterială și accidentele vasculare cerebrale. Disfuncția endotelială, inflamația cronică și modificările funcționale și structurale la nivel visceral cresc riscul de ateroscleroză și evenimente cardiovasculare. Este important de notat că metforminul poate duce la simptome digestive inconfortabile, cum ar fi disconfort, greață și diaree. Cu toate acestea, unele efecte secundare sunt de obicei minore și trecătoare și nu devin persistente, problemele pot apărea atunci când se aplică un tratament cronic cu afectare la nivel hepatic sau la pacienții care au deja probleme la nivel digestiv.

**Perspective:** O mai bună înțelegere a efectelor metforminei și diabetului zaharat de tip 2 asupra sistemelor cardiovasculare și gastrointestinale poate ajuta la descoperirea potențialelor complicații. Din punct de vedere farmacologic, vom examina mecanismele moleculare presupuse implicate în efectul pe care metformina îl are asupra hepatocitelor umane - HepaRG, precum și în HT -29 și HCT-116, două linii celulare de cancer colorectal și o linie celulară sănătoasă de colon, CCD-841 CoN. Va fi examinată din punct de vedere clinic relația dintre efectele asupra sistemului cardiovascular și nivelurile diferite de fibroză hepatică la pacienții cu diabet zaharat de tip 2 și steatoza hepatică non-alcoolică.

# PARTEA GENERALĂ

## 1. GENERALITĂȚI ALE DIABETULUI ZAHARAT DE TIP 2

### 1.1. SCURTA ISTORIE A DIABETULUI

Diabetul de tip 2 (DT2) este o afecțiune medicală cronică caracterizată prin rezistența organismului la insulina produsă de pancreas și prin niveluri ridicate de glucoză în sânge. Această afecțiune a fost descrisă pentru prima dată în secolul al 2-lea î.Hr. în Egiptul Antic(1).

În secolul al 17-lea, medicul englez Thomas Willis a descris simptomele diabetului și a observat prezența zahărului în urină, dând astfel numele de diabet zaharat. În secolul al 19-lea, cercetătorii au început să studieze pancreasul și rolul său în reglarea glicemiei. Astăzi, DT2 este o afecțiune medicală răspândită în întreaga lume, afectând milioane de oameni. Tratamentul pentru DT2 implică de obicei modificări ale stilului de viață, cum ar fi alimentația sănătoasă și exercițiile fizice regulate, împreună cu medicamente care ajută la reducerea nivelurilor de glucoză din sânge. Cercetările continuă să ofere noi perspective asupra cauzelor și tratamentului DT2, cu scopul de a îmbunătăți calitatea vieții pacienților și a reduce complicațiile asociate cu această boală(2).

Tratamentul DT2 în zilele noastre a devenit tot mai la îndemână, fiind o boala comună, dar care are efecte devastatoare asupra întregului organism pe o perioadă îndelungată de timp și în cele din urmă duce la complicații macroangiopate și microangiopate.

Tratamentul DT2 poate implica schimbări ale stilului de viață, cum ar fi pierderea în greutate, alimentația sănătoasă și exercițiile fizice regulate. Medicamentele, inclusiv insulina, pot fi, de asemenea, utilizate pentru a controla nivelul de zahăr din sânge. Este important ca pacienții cu DT2 să își monitorizeze nivelul glicemic și să efectueze controale regulate cu medicul lor pentru a preveni complicațiile pe termen lung ale bolii, cum ar fi afecțiuni ale sistemului renal, ocular și cardiovascular.

### 1.2. DIABETUL ZAHARAT: DEFINIȚIE, CLASIFICARE ȘI DIAGNOSTIC

Definiție: diabetul zaharat este o afecțiune medicală cronică caracterizată de niveluri ridicate de glucoză în sânge, cunoscută sub denumirea de hiperglicemie. Hiperglicemia severă poate cauza simptome precum poliurie (urinare frecventă), polidipsie (sete excesivă), scădere în greutate inexplicabilă, tulburări vizuale și susceptibilitate la infecții. În cazurile grave, hiperglicemia poate duce la complicații precum cetoacidoza sau sindromul hiperosmolar non-cetoacidotic, care pot duce la risc de deces.

Diabetul zaharat este o afecțiune caracterizată prin patru tipuri principale: diabetul de tip 1, diabetul de tip 2, diabetul gestațional și diabetul asociat altor afecțiuni(3).

Hiperglicemia cronică poate afecta și diferite țesuturi și organe ale corpului, cum ar fi ochii, rinichii, nervii, inima și vasele de sânge, cauzând leziuni și disfuncții pe termen lung. DT2 poate fi cauzat de tulburări ale secreției sau acțiunii insulinei, sau poate fi asociat cu factori de risc precum stilul de viață sedentar, obezitatea și factorii genetici. Tratamentul diabetului zaharat implică de obicei modificări ale stilului de viață, medicamente și monitorizarea regulată a nivelului de glucoză din sânge(3).

**Tabel 1 Criterii de diagnostic diferențial între diabetul de tip 1 și de tip 2**

<b>Criterii de diagnostic diferențial între diabetul de tip 1 și de tip 2</b>		
Caracteristici	Diabet tip 1	Diabet tip 2
Cauze	Prezența Human Leucocyte Antigenen (HLA)	Defect în secreția de insulină
Prevalența în cazul populației diabetice	5%-10%	90%
Varsta debutului	Sub 30 de ani	Peste 40 de ani
Istoric familial	Asociere slabă cu apariția bolii	Asociere puternică cu apariția bolii
Obezitate	Rar	Frecvent (60-90%)
Cetoacidoza	Frecventă	Rar
Secreția de insulină	Absentă	Canități diferite de insulină
Simptome	<ul style="list-style-type: none"> <li>• poliurie</li> <li>• fatigabilitate</li> <li>• polidipsie</li> <li>• scădere în greutate</li> <li>• cetoacidoza</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• poliurie moderată</li> <li>• fatigabilitate</li> <li>• diagnosticat frecvent la examene uzuale</li> </ul>

### 1.3. TIPURI DE TRATAMENT ÎN DIABETUL ZAHARAT DE TIP 2

Complexitatea tratamentului diabetului a crescut în ultimii ani, odată cu introducerea de noi agenți hipoglicemianți. Metformina rămâne prima alegere de monoterapie în majoritatea cazurilor, dar există mai multe opțiuni pentru terapia combinată multiplă(4). În plus, combinațiile de trei agenți hipoglicemianți orali sunt utilizate frecvent. Terapia cu insulină este de obicei începută cu o dozare o dată pe zi cu insulină cu acțiune îndelungată. În cazul în care insulina bazală nu mai este suficientă, tratamentul poate fi intensificat cu adăugarea de insulină cu acțiune scurtă în timpul meselor sau combinarea insulinei bazale cu agenți hipoglicemianți pe cale orală reducători de glucoză pe cale orală sau analogi ai peptidei asemănătoare glucagonului (GLP)-1(5). Alegerea celui mai bun medicament hipoglicemiant necesită luarea în considerare nu numai a eficacității sale în reducerea nivelului de glucoză din sânge, ci și a unor aspecte, prin profilul de eficacitate al fiecărui medicament și factorii economici ar trebui, de asemenea, să fie luați în considerare: tratamentul modern pentru diabetul de tip 2 ar trebui să aibă ca scop controlul nivelurilor de glucoză din sânge aproape de normal.

## 2. GENERALITĂȚI CU PRIVIRE LA UTILIZAREA METFORMINEI

### 2.1 METFORMINA, SCURTĂ ISTORIE, UTILIZARE, INTERACȚIUNI

Metformina (dimetilbiguanidă) a devenit cel mai utilizat medicament oral de scădere a glicemiei la nivel mondial fiind indicate de primă linie și preferat pentru gestionarea diabetului de tip 2(23). Metformina fiind foarte eficientă în scăderea HbA1c și cu un efect de pierdere în greutate, fără să crească riscul de hipoglicemie. Prima apariție a fost în anul 1918 fiind un medicament tradițional pe baza de plante cunoscută ca și liliacul francez sau ruta caprei, pe denumirea științifică - Galega officinalis care s-a dovedit bogat în guanidina(4). Derivații de guanidina, metformina nefiind inclusă, au fost sintetizați, iar unii au fost utilizați pentru a trata diabetul între anii 1920 și 1930, fiind întreruși din cauza toxicității

dar si a disponibilității crescute a insulinei. Redescoperită în anii 1940 în căutarea unui medicament antimalaric, metformina s-a dovedit utilă în tratarea gripei cand reușea să scadă uneori glicemia. Această proprietate a fost urmărită de medicul francez Jean Sterne, care a raportat pentru prima dată utilizarea metforminei în tratamentul diabetului zaharat în 1957.

Metformina poate fi descrisă mai exact ca antihiperglicemiant, mai degrabă decât hipoglicemic, spre deosebire de sulfoniluree, metformina nu provoacă hipoglicemie clinică, chiar și atunci când este administrată în doze mari. Aceasta este de foarte multe ori administrată în combinație cu o sulfoniluree la pacienții care nu reușesc să atingă un control glicemic bun. Terapia combinată de metformina cu sulfoniluree s-a dovedit că scade glicemia bazală cu concentrații de până la 20% mai mult decât o terapie singulară cu sulfoniluree. Obiectivul cheie în aproape toate programele de tratament este ameliorarea hiperglicemiei, care în realitate este doar o un simptom al metabolismului afectat al glucozei în țesuturile sensibile la insulina, împreună cu supraproducția de glucoză realizată de ficat, deși tratamentul ar trebui personalizat și adaptat pentru a se potrivi nevoilor individuale, există anumite obiective primare, care stau la baza tratamentului tuturor pacienților cu diabet zaharat de tip 2. După cum este descris în raportul European NIDDM Policy Group (EURNIDDM-PG), aceste obiective sunt(27):

- ameliorarea simptomelor
- prevenirea și ameliorarea complicațiilor acute
- prevenirea și ameliorarea complicațiilor cronice
- evitarea factorilor care predispun la mortalitate
- controlul oricăror tulburări însoțitoare
- îmbunătățirea calității vieții

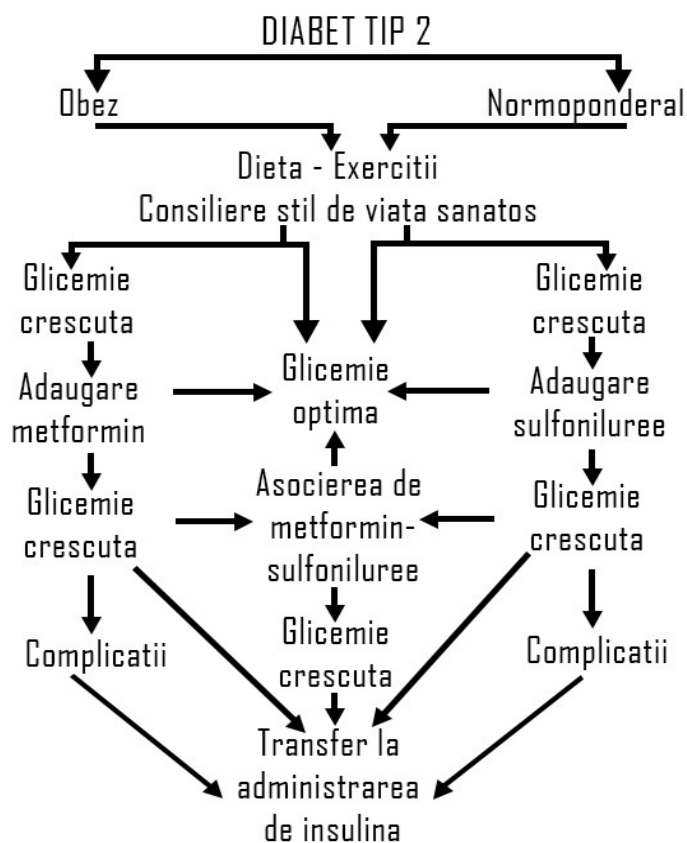


Figura 1. Căi de abordare în tratamentul diabetului zaharat de tip 2

## **2.2. UTILIZAREA TERAPEUTICA A METFORMINEI IN PREDIABET ȘI PREVENIREA DIABETULUI**

Metformina este un medicament frecvent utilizat pentru tratarea diabetului de tip 2, dar poate fi folosit și pentru a preveni diabetul la persoanele cu prediabet. Prediabetul este o afecțiune în care nivelul glicemiei este mai mare decât cel normal, dar nu suficient de ridicat pentru a fi diagnosticat ca diabet.

Metformina acționează prin reducerea producției de glucoză în ficat și prin creșterea sensibilității celulelor organismului la insulină care este un hormon utilizat pentru a muta glucoza din sânge în celule și a o utiliza ca sursă de energie. Aceste acțiuni ajută la controlul nivelului de glucoză din sânge și la prevenirea diabetului.

Defecte ale metabolizării glucozei care stau la baza tipului 2 diabetul încep cu mulți ani înainte de diagnosticarea diabetului. Secreția crescută de insulină compensează inițial prezența rezistenței la insulină, totuși, o pierdere progresivă a masei celulelor  $\beta$  și a limitelor funcției celulelor  $\beta$  prin capacitatea pancreasului de a menține o glicemie normală prin creșterea secreției de insulină. Manifestările precoce ale disglucemiei prediabetice reprezintă unul sau ambele dintre :

- toleranță redusă la glucoză , în care controlul glicemiei postprandial este afectat, dar glicemia a jeun este normală;
- alterarea glicemiei a jeun, este o creștere cronică care apare în absența unei deteriorări a controlului postprandial al glucozei.

Tabelul 2 prezintă criteriile de diagnostic acceptate de obicei pentru diagnosticul prediabetului pe baza măsurătorilor indicelui glicemic. Un simplu test de sânge este suficient pentru a diagnostica alterarea glicemiei a jeun, în timp ce un test oral de toleranță la glucoză de 75 g (TTGO) este necesar pentru diagnosticul de scadere a toleranței la glucoză.

## **2.4. ACTIUNI CELULARE SI MOLECULARE ALE METFORMINEI**

Metformina este solubilă în apă și este disponibilă sub formă de clorhidrat de metformină, care este forma sa utilizată în mod obișnuit în medicamente. Formula chimică a clorhidratului de metformină este  $C_4H_{11}N_5 \cdot HCl$ .

Metformina este în prezent medicamentul de primă linie pentru tratarea diabetului de tip 2 și este prescris la cel puțin 120 de milioane de oameni din întreaga lume. Este considerat un agent anti-hiperglicemiant deoarece scade concentrația de glucoză din sânge în diabetul zaharat de tip 2 fără a provoca hipoglicemie severă. Metformina este, de asemenea, descrisă frecvent ca un sensibilizant la insulină, ceea ce duce la o reducere a rezistenței la insulină și la o scădere semnificativă a nivelurilor de insulină plasmatică postprandială. Îmbunătățirea sensibilității la insulină de către metformină ar putea fi atribuită efectelor sale pozitive asupra expresiei receptorului de insulină și activității tirozin kinazei. În plus, metformina își poate exercita parțial acțiunile metabolice benefice prin modularea mai multor componente ale axei incretinei. Dovezile din studiile clinice și modelele animale sugerează că principala funcție a metforminei este de a scădea producția hepatică de glucoză, în principal prin inhibarea gluconeogenezei. Au fost propuse mai multe mecanisme pentru a explica această acțiune inhibitorie, inclusiv modificări ale activităților enzimactice sau o reducere a captării hepatice a substraturilor gluconeogenice. Acțiunea preferențială a metforminei în hepatocite se datorează predominanței expresiei transportorului de cation organic 1 (OCT1), care s-a dovedit că facilitează absorbția celulară a metforminei. Mai mult,

s-a constatat că acumularea de metformină în ficat este mai mare decât în alte țesuturi, atingând concentrații micromolare mari în zona periportală(34)

Metformina inhibă gluconeogeneza hepatică și îmbunătățește sensibilitatea la insulină prin activarea AMPK. Este important de menționat că metformina a demonstrat inhibarea gluconeogenezei hepatice în absența AMPK. Schimbările de stare redox și microbiota intestinală, precum și secreția de GLP-1 de către metformină, au fost implicate în mecanismele independente de AMPK pentru reducerea nivelului de glucoză. AMPK: kinaza activată de AMP, GLP-1: peptide asemănătoare glucagonului tip(35). Această proprietate unică a metforminei determină o scădere a oxidării NADH, pomparea protonilor în membrana mitocondrială interioară și rata consumului de oxigen. În cele din urmă, acest lucru duce la o reducere a gradientului de protoni și o scădere a sintezei de ATP condusă de protoni din ADP și Pi(36).

# PARTEA SPECIALĂ

## 4. STUDIUL EXPERIMENTAL

### 4.1. INTRODUCERE – CONTEXT EXPERIMENTAL

Diabetul zaharat de tip 2 se caracterizează prin hiperglicemie și dislipidemie ca urmare a incapacității celulelor  $\beta$  din insule de a secreta insulină. Această patologie a devenit o povară pentru societatea modernă din cauza exploziei numărului de cazuri la nivel mondial și a leziunilor multiviscerale(45). Observațiile clinice au arătat că speranța de viață scăzută a pacienților diabetici nu este legată doar de complicațiile vasculare și de afecțiunile renale, ci și de afectarea hepatică. Cele mai frecvente complicații hepatice asociate cu diabetul sunt ciroza hepatică și carcinomul hepatocelular(46).

În aceleași timp partea de afectare hepatică poate fi asociată cu sindromul metabolic care reprezintă o asociere de anomalii metabolice care determină creșterea riscului de apariție și a evenimentelor de tip cardiovascular. Prevalența sindromului metabolic la pacienții cu hipertensiune arterială este foarte mare.

Studiile in vitro și in vivo au scos la iveală potențialele efecte antitumorale ale metforminei, iar medicamentul este în prezent testat într-o serie de studii clinice (52).

Cancerul colorectal (CCR) are una dintre cele mai mari incidențe în rândul cancerului, ocupând locul trei la nivel global. Cu 950.000 de decese estimate în 2020 de către studiul GLOBOCAN, CCR se situează pe locul al doilea în ceea ce privește mortalitatea prin cancer (53).

### 4.2. OBIECTIVELE CERCETĂRII

Obiectivele principale ale acestei teze, au fost să determinăm complicațiile diabetului și a metforminei asupra sistemului cardiac și cel digestiv. Acțiunea asupra sistemului digestiv am încercat să o observăm prin studii in vitro și anume acțiunea metforminei în cele mai discutate zone și anume asupra liniei celulare de hepatocite dar și acțiunea acestuia asupra celulelor canceroase de colon și o linie celulară de colon sănătos, pentru a înțelege mai bine efectele biologice ale acesteia, au fost examinate atât morfologia celulară, cât și impactul acesteia asupra nucleelor. În cazul efectului asupra liniei celulare de hepatocite a fost de a evalua efectul in vitro și in ovo al metforminei folosind cinci concentrații (0,5, 1, 1,5, 2 și 2,5 mM). Astfel, in vitro, efectul exercitat de metformin asupra liniei celulare de hepatocite - HepaRG, a fost evaluat în ceea ce privește viabilitatea, morfologia celulară, influența asupra structurilor și numărului de nucleu și mitocondrii și asupra capacității de migrare celulară. In ovo, biocompatibilitatea și potențialul iritant și antiiritant al metforminei au fost evaluate prin utilizarea testului cu membrana corioalantoidă de pui (HET-CAM).

Am efectuat experimente la nivel celular pentru a evalua modul în care metformina acționează. În continuare, am dorit să investigăm impactul diabetului asupra dezvoltării sistemului cardiovascular, așa că am efectuat studii pe un grup de pacienți. Obiectivul nostru a fost să examinăm dacă există o legătură între disfuncția subclinică cardiacă stângă, diferitele grade de boală hepatică grasă non-alcoolică (NAFLD) și prezența sindromului metabolic la pacienții diagnosticați cu diabet zaharat de tip 2.



### **4.3. MATERIALE ȘI METODE**

#### **4.3.1. EFECTUL METFORMINEI ASUPRA LINIEI CELULARE DE HEPATOCITE**

##### **4.3.1.1. Reactivi**

Clorhidrat de metformină, soluție de tripsină-EDTA, tampon fosfat salin (PBS), dimetilsulfoxid (DMSO), ser fetal de vițel (FCS), penicilină/streptomicină, insulină din pancreasul bovin, hidroclorid 21-hemisuccinat de sodiu și reactivul MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu bromură] au fost achiziționate de la Sigma Aldrich, Merck KGaA (Darmstadt, Germania). Mediile de cultură celulară, William's E Medium (Gibco™; 12551032) au fost achiziționate de la Gibco, Waltham, Massachusetts, SUA). Toți reactivii au fost analitic puri și adecvați pentru utilizarea în culturi celulare.

##### **4.3.1.2. Cultura celulară**

Efectul Metforminei asupra hepatocitelor a fost studiat în linia celulară HepaRG furnizată de Gibco sub formă de flacoane congelate - HepaRG™ Cells (număr de catalog: HPRGC10). Linia celulară a fost cultivată în mediu specific de cultură, reprezentat de mediul E al lui William care conține 4 μg/mL insulină din pancreasul bovin, 5 μM Hidroclorid 21-hemisuccinat de sodiu, 10% FCS și amestec de 1% penicilină (100 U/mL)-streptomicină (100 μg/mL). În timpul experimentului, celulele au fost menținute la o temperatură standard (37°C) și 5% CO<sub>2</sub>.

##### **4.3.1.3. Evaluarea viabilității celulare**

Metoda MTT a fost utilizată pentru a determina viabilitatea celulară. În acest scop, celulele au fost cultivate în plăci cu 96 de godeuri, într-un număr de 1x10<sup>4</sup> celule / gode. După ce au atins o confluență de aproximativ 90%, celulele au fost stimulate cu cinci concentrații diferite de Metformin (0,5, 1, 1,5, 2 și 2,5 mM) pentru două intervale de timp, de 24 și 72h. Concentrațiile de testare ale clorhidratului de metformin au fost preparate în mediul de cultură. După aceste intervale de timp, mediul de stimulare a fost îndepărtat și înlocuit cu mediu proaspăt (100 μL/poci). În fiecare gode s-au adăugat 10 μL de reactiv MTT, iar plăcile au fost plasate într-un incubator la 37 °C timp de 3 ore.

După acest timp, s-a adăugat soluția de solubilizare într-un volum de 100 μL/put, iar plăcile au fost incubate timp de 30 de minute la temperatura camerei, ferite de lumină. Ulterior, măsurarea absorbantelor la două lungimi de undă de 570 și 630 nm a fost efectuată cu ajutorul Cytation 5 (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SUA).

##### **4.3.1.4 Morfologia celulară**

Pentru a determina posibilele efecte induse de Met în ceea ce privește morfologia și confluența celulelor HepaRG, s-a efectuat o evaluare microscopică prin fotografierea celulelor sub iluminare în câmp luminos după intervalul de timp de 24 și 72 de ore. Imaginile au fost analizate cu ajutorul software-ului Gen5™ Microplate Data Collection and Analysis Software (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, SUA).

##### **4.3.1.5 Imunofluorescență**

Pentru vizualizarea prin imunofluorescență a componentelor celulare, HepaRG a fost cultivată în plăci de 12 godeuri, în număr de 1x10<sup>5</sup> celule/godeu, iar după ce a atins o confluență corespunzătoare, de aproximativ 90%, a fost stimulată timp de 72 h cu Metformin (0,5, 1, 1,5, 2 și 2,5 mM).

După 24 h, celulele au fost spălate cu PBS rece ca gheața, apoi au fost fixate cu paraformaldehidă 4% prin menținerea la temperatura camerei timp de o oră. Permeabilizarea celulelor a fost realizată cu Triton X 2% în PBS.

Apoi, s-a folosit o soluție de 30% FBS în 0,01% Triton X timp de o oră pentru a bloca acțiunea Triton X 2%. Celulele au fost incubate la 4 °C peste noapte cu anticorpii Anti-COX IV marker mitocondrial (ab33985) la o diluție de 1: 500 pentru vizualizarea mitocondriilor.

A doua zi, anticorpii primari au fost spălați cu soluție de Triton X 0,01% în PBS și s-a adăugat anticorpii secundari specifici pentru markerul mitocondrial COX IV - Donkey Anti-Goat IgG H&L (Alexa Fluor® 488 - ab150129), iar placa a fost păstrată timp de 2 ore la temperatura camerei și protejată de lumină. După acest timp, s-a adăugat colorarea cu 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) pentru a vizualiza nucleeele. Imaginile au fost apoi realizate cu Cytation 1 și prelucrate cu ajutorul software-ului Gen5™ Micro-plate Data Collection and Analysis Software (BioTek® Instruments Inc., Winooski, VT, SUA).

#### **4.3.1.6 Testul de vindecare a rănilor**

Testul de vindecare a rănilor (scratch) a fost utilizat pentru a evalua efectul metforminei asupra migrării celulelor. În acest scop, celulele au fost cultivate în plăci Corning cu 24 de godeuri (1x105 celule/ gode) și s-a făcut o zgârietură automată în mijlocul fiecărei gode cu ajutorul instrumentului AutoScratch™ Wound Making Tool furnizat de BioTek® Instruments Inc., Winooski, VT, SUA, conform recomandărilor producătorului. Celulele au fost apoi stimulate cu cele cinci concentrații de Metformin (0,5, 1, 1,5, 2 și 2,5 mM) pentru un interval de 24 de ore. Fotografiile (mărire 4x) au fost realizate atât la începutul experimentului (0h), cât și după finalizarea stimulării (24h) cu ajutorul Cytation 1 și au fost procesate cu ajutorul Gen5™ Microplate Data Collection and Analysis Software (BioTek® Instruments Inc., Winooski, VT, SUA). Efectul metforminei asupra migrării celulelor a fost cuantificat prin calcularea ratei de migrare, exprimată în procente, folosind formula descrisă mai sus (71).

#### **4.3.1.7 Testul membranei corioalantoide (CAM)**

Ouăle de găină (*Gallus gallus domesticus*) obținute de la un fermier local au fost utilizate pentru a evalua efectul metforminei asupra plexului vascular. Acestea au fost dezinfectate cu alcool 70% (V/V) și, după ce s-a notat data pe ele, au fost introduse în incubator, în condiții standard de temperatură (37°C) și umiditate, în poziție orizontală. Ouăle au fost apoi pregătite pentru experiment, după cum urmează:

În a 4-a zi de incubație, la nivelul cochiliei s-a făcut o perforație prin care s-a extras un volum de 7 ml de albumen, pentru a favoriza desprinderea membranei de coaja internă a oului; în a 5-a zi, s-a tăiat o fereastră la nivelul superior al oului, pentru a permite vizualizarea membranei corioalantoice. Fereastra decupată a fost apoi acoperită cu bandă adezivă, iar ouăle au fost plasate în incubator până în ziua în care a început experimentul.

#### **4.3.1.8 Testul ouălor de găină - membrana corioalantoidă (HET-CAM)**

S-a aplicat metoda Testul ouălor de găină (HET-CAM) pentru a evalua biocompatibilitatea și potențialul iritant la nivel vascular. Experimentul a fost efectuat în a 9-a zi de incubație.

În acest scop, Metformin a fost testată la 2 mM, la care s-au observat anterior cele mai benefice efecte in vitro.

În paralel, au fost utilizate un martor negativ - H<sub>2</sub>O și un martor pozitiv - 1% dodecilsulfat de sodiu (SDS). Atât proba de testare, cât și cele două controale au fost aplicate pe membrana corioalantoidă într-un volum de 600 μL, astfel încât să fie acoperită

întreaga suprafață a membranei. Modificările observate la nivel vascular au fost: liză vasculară (L), coagulare (C) și hemoragie (H). Aceste modificări au fost observate pentru o perioadă de 5 minute după aplicarea probelor, cu ajutorul unui stereomicroscop (stereomicroscop Discovery 8, Zeiss, Göttingen, Germania), iar imaginile au fost realizate (Axio CAM 105 color, Zeiss) înainte și după 5 minute de la aplicarea probelor.

Pentru a cuantifica potențialul efect iritant, s-a calculat scorul de iritație (IS) cu ajutorul formulei (71):

$$IS = 5 \times \frac{301 - H}{300} + 7 \times \frac{301 - L}{300} + 9 \times \frac{301 - C}{300}$$

unde H reprezintă hemoragia, L reprezintă liza vasculară, iar C reprezintă coagularea intravasculară.

În funcție de valoarea scorului de iritare, substanțele pot fi clasificate în trei categorii, după cum urmează:

Neiritant (IS = 0 - 0,9);

Iritant (IS = 1 - 8,9)

Iritant sever (IS = 9 - 21) (97).

#### 4.3.1.9 Determinarea potențialului antiiritant

Pentru a determina potențialul efect antiiritant, ouăle au fost pregătite așa cum s-a descris anterior, iar metoda aplicată a fost cea descrisă mai sus (71) și adaptată la condițiile noastre de laborator. Astfel, pentru a determina potențialul antiiritant, a fost testată metformin la o concentrație de 2 mM, testată anterior în testul HET-CAM, împreună cu controlul negativ reprezentat de H<sub>2</sub>O. Probele au fost aplicate pe membrana corioalantoică într-un volum de 600 μL, iar apoi ouăle au fost plasate în incubator pentru o perioadă de 3 ore, astfel încât soluțiile să fie absorbite de membrană. După acest timp, ouăle au fost tratate cu 300 μL de dodecil sulfat de sodiu (SDS) 1%, iar plexul vascular a fost examinat pentru a se observa modificări similare celor observate anterior prin metoda HET-CAM (liză, stază și hemoragie). Modificările au fost observate pentru o perioadă de 5 minute, fiind realizate fotografii înainte și după aplicarea probelor. S-au urmărit aceiași parametri din testul HET-CAM (H, L și C), calculându-se în final următorii parametri:

$H_{AI} = \frac{H}{H_{SDS}}$ ; (timpul de hemoragie după pretratarea cu Met 2 mM și adăugarea de 1% SDS / timpul de hemoragie fără pretratarea cu Met 2 mM);

$L_{AI} = \frac{L}{L_{SDS}}$ ; (timpul de liză vasculară după pretratarea cu Met 2 mM și adăugarea de 1% SDS / timpul de liză vasculară fără pretratarea cu Met 2 mM);

$C_{AI} = \frac{C}{C_{SDS}}$ ; (timpul de coagulare vasculară după pretratarea cu Met 2 mM și adăugarea de 1% SDS / timpul de coagulare vasculară fără pretratarea cu Met 2 mM).

### 4.3.2. EFECTUL METFORMINEI ASUPRA CELULELOR CANCEROASE DE COLON ȘI O LINIE CELULARĂ DE COLON SĂNĂTOS

#### 4.3.2.1. Reactivi

Clorhidratul de metformină pur din punct de vedere analitic, soluția de tripsină - EDTA, tamponul fosfat salin (PBS), di-metilsulfoxidul (DMSO), serul fetal de vițel (FCS), penicilina/streptomicina, MTT [bromura de 3 -(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazoliu] au fost achiziționate de la Sigma Aldrich, Merck KgaA (Darmstadt, Germania). Eagle's Minimum

Essential Medium (EMEM, ATCC® 30- 2003™) și McCoy's 5a Medium Modified (ATCC® 30- 2007™) au fost achiziționate de la ATCC (American Type Culture Collection).

#### **4.3.2.2. Cultura de celule**

Linia celulară normală de colon CCD 841 CoN (CRL - 1790™) și liniile celulare canceroase HCT 116 (CCL- 247™) și HT-29 (HTB-38™) au fost achiziționate de la ATCC. Celulele CCD 841 CoN au fost cultivate în EMEM suplimentat cu 10% FCS și 1% penicilină (100 U/ml) - amestec de streptomycină (100 µg/mL), în timp ce celulele HCT 116 și HT-29 au fost cultivate în mediu modificat 5a al lui McCoy suplimentat cu 10% FCS și 1% penicilină (100 U/ml) - amestec de streptomycină (100 µg/mL). Toate liniile celulare au fost menținute în condiții standard într-un incubator, la 37°C și 5% CO<sub>2</sub>.

#### **4.3.2.3. Evaluarea viabilității celulare**

Pentru a determina viabilitatea celulară a CCD 841 CoN, HCT 116 și HT-29, s-a efectuat testul MTT la 72 h după tratamentul cu Met, conform următorului protocol [2, 3]. Pe scurt, s-au însămânțat plăci cu 96 de godeuri cu  $1 \times 10^4$  /200 µL de celule/gaiță și, după ce au ajuns la o confluență de 90 %, s-au adăugat soluțiile de testare a metforminului. S-a preparat o soluție stoc de metforminului prin dizolvarea în apă pentru injecție, urmată de prepararea a cinci concentrații diferite în medii de cultură: 5, 10, 25, 50, 75 mM. După 72 de ore, soluțiile de testare au fost înlocuite cu 100 µL de mediu de cultură proaspăt, etapă urmată de adăugarea a 10 µL de reactiv MTT. Plăcile au fost lăsate într-un incubator la 37°C timp de 3 h. După timpul de incubație, s-au adăugat 100 µL de soluție de solubilizare și plăcile au fost lăsate la temperatura camerei, la adăpost de lumină. Absorbanța a fost citită la 570 și 630 nm cu ajutorul instrumentului Cytation 5 (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, Statele Unite). A doua lungime de undă a fost utilizată în cazul semnalelor de fond.

Datele obținute au fost exprimate ca procent (%) de celule viabile normalizate la celulele de control.

#### **4.3.2.4. Morfologia celulară**

S-a efectuat o analiză microscopică pentru a identifica impactul pe care metformina l-a avut asupra liniei celulare normale de colon CCD 841 CoN și asupra liniilor celulare de cancer colorectal, HCT 116 și HT-29. După același interval de timp, celulele au fost examinate sub iluminare în câmp luminos cu ajutorul Cytation 1 (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, Statele Unite).

Pentru procesarea imaginilor realizate s-a utilizat Gen5™ Microplate Data Collection and Analysis Software (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, Statele Unite).

#### **4.3.2.5 Colorația prin imunofluorescență**

Celulele au fost supuse imunomarcajului pentru a obține noi informații despre mecanismul prin care metformina își exercită efectul. În acest sens, s-a folosit Dapi pentru a vizualiza nucleele celulelor (72).

Analiza a fost efectuată într-o manieră similară cu cea descrisă anterior (73). Celulele CCD 841 CoN, HCT 116 și HT-29 au fost însămânțate la o densitate de  $1 \times 10^5$  celule/puț în plăci cu 12 puțuri și, după ce au atins o confluență de 90%, au fost tratate cu 5 și 75 mM Met timp de 72 h.

După timpul de tratament dorit, celulele au fost spălate cu PBS rece și fixate cu paraformaldehidă 4%. După ce au fost lăsate 30 de minute la 4°C, acestea au fost spălate din nou cu PBS.

Permeabilizarea a fost realizată cu o soluție de TritonX 2%, placa a fost lăsată 30 min la temperatura camerei, după care s-a folosit TritonX 0,01% pentru spălarea celulelor înainte de adăugarea soluției de blocare. Cu soluția de blocare, celulele au fost lăsate la 4°C timp de 30 de minute, după care au fost spălate din nou cu TritonX 0,01%. Etapele finale

constau în adăugarea a 300 µL/poci de colorant Dapi, menținând placa timp de 15 minute la 4°C. După spălarea celulelor cu PBS, imaginile au fost capturate cu microscopul inversat Olympus IX73 (Olympus, Tokyo, Japonia) și analizate cu software-ul cellSens Dimensions v.17 (Olympus, Tokyo, Japonia).

#### **4.3.2.6 Analiza statistică**

Rezultatele sunt exprimate ca medii  $\pm$  SD (deviație standard), fiind aplicat testul ANOVA cu o singură cale, urmat de post-testul de comparație multiplă Dunett's. Software-ul utilizat pentru analiza statistică a fost Graph - Pad Prism versiunea 9.4.0 pentru Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, SUA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Diferențele semnificative din punct de vedere statistic între date sunt marcate cu \* (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001).

### **4.3.3. EXPLORAREA INTERCONECTĂRII DINTRE DISFUNCTIA CARDIACĂ STÂNGĂ SUBCLINICĂ ȘI RIGIDITATEA HEPATICĂ LA PACIENȚII CU SINDROM METABOLIC, DIABET ZAHARAT ȘI STEATOZĂ HEPATICĂ GRASĂ NON-ALCOOLICĂ**

#### **4.3.3.1. Selecția subiecților**

Departamentele de cardiologie și medicină internă de la Universitatea de Medicină și Farmacie Victor Babeș din Timișoara, centre de asistență medicală secundară, au realizat această cercetare observațională în perioada ianuarie 2021 - august 2022. Am recrutat succesiv pacienți adulți cu MetS și fracție de ejeție LV (EF)  $\geq$  50% care au fost de acord să li se efectueze elastografia hepatică ca parte a evaluării lor. Aceștia au fost împărțiți în două grupuri în funcție de faptul dacă aveau sau nu diabet zaharat. În plus față de 2D-tradițional și STE a atriului stâng și a ventriculului stâng, toți indivizii au fost supuși VCTE și CAP. Participanții trebuiau să aibă cel puțin 18 ani și să aibă MetS pentru a fi luați în considerare pentru includerea în studiu. Criteriile de excludere au inclus: boală coronariană cunoscută, boală arterială periferică, accident vascular cerebral, flutter/fibrilație atrială, IC cu FEVS redusă (30 g/zi la bărbați, >20 g/zi la femei), boli sistemice grave sau cancer.

Înainte de investigațiile cu ultrasunete cardiacă și hepatică, toți pacienții au fost supuși unei analize a istoricului clinic, unui examen fizic complet, unei electrocardiogramme de repaus cu 12 derivații și unor teste de laborator.

MetS a fost definit de parametrii IDF 2006 ca fiind obezitate centrală (circumferința taliei  $\geq$  80 cm la femei,  $\geq$ 94 la bărbați), împreună cu oricare două dintre următoarele cerințe: tensiune arterială sistolică de cel puțin 130 mmHg sau tensiune arterială diastolică de cel puțin 85 mmHg, sau tratament pentru hipertensiune arterială (74), glucoză plasmatică la jeun  $\geq$ 100 mg/dL sau tratament pentru diabet zaharat; nivel de trigliceride  $\geq$  150 mg/dL sau tratament pentru această tulburare lipidică; nivel de colesterol cu lipoproteine cu densitate mare < 40/50 mg/dL (bărbați/femei)(74).

Diabetul a fost diagnosticat atunci când glucoza plasmatică la jeun a depășit 126 g/mL, de două ori în două zile neconsecutive, când hemoglobina glicată (HbA1c) a fost  $\geq$ 6,5% sau când pacientul primea un medicament hipoglicemiant oral și/sau insulină. La 4 din 15 pacienții cu prediabet (glucoză plasmatică la post 100-126 g/mL și HbA1c 5,7-6,4%) au fost incluși în grupul non-diabeticilor (74).

Hipertensiunea a fost diagnosticată atunci când tensiunea arterială a fost  $\geq$ 140/90 mmHg și/sau pacientul a luat medicamente pentru hipertensiune (75).

#### **4.3.3.2. Elastografia tranzitorie controlată prin vibrații (VCTE) și determinarea parametrilor de atenuare controlată (CAP)**

Același investigator a efectuat VCTE după un post mai mare de 4 ore folosind un instrument Fi-broScan® (EchoSens, Paris, Franța). Sonda de 3,5 MHz sau 2,5 MHz a fost utilizată în conformitate cu standardele europene(76). Cut-off-urile PAC utilizate pentru a diferenția gradele de steatoză au fost următoarele: - CAP: S1 (ușoară)-274 dB/m, S2 (moderată)-290 dB/m și S3 (severă)-302 dB/m (76). La fiecare pacient, examinatorul a efectuat 10 măsurători ale rigidității hepatice (LSM), iar valoarea mediană a fost calculată. Au fost considerate valide măsurătorile cu o valoare mediană și un raport inter- val/mediană cu interval intercuartil < 30%(77). LSM a fost exprimată în kilopascali (kPa).

Pragurile VCTE utilizate pentru a separa gradele de fibroză au fost: VCTE: F2: 8,2 kPa, F3: 9,7 kPa și F4: 13,6 kPa (78). Același cercetător a utilizat un osciloscop cu ultrasunete VIVID 5S, G.E. phased array cu o sondă de 3,5 MHz pentru ecocardiografia convențională.

Diametrele și volumele camerelor cardiace au fost evaluate în conformitate cu recomandările Societății Americane de Ecocardiografie (79). Volumele LV și LA au fost calculate utilizând tehnica biplan Simpson din imaginile apicale cu 4 și 2 camere. Frația de ejeție a LV (FE) a fost determinată utilizând metoda Simpson. Funcția diastolică a LV a fost evaluată cu ajutorul ecografiei Doppler pulsat în imaginile apicale cu 4 și 2 camere, cu volumul de probă plasat la extremitatea valvelor mitrale.

La terminarea undei T, care precede deschiderea valvelor mitrale, volumul maxim al LA (LAVmax) a fost documentat în incidentele apicale cu 4 și 2 camere. Volumul minim al LA (LAVmin) a fost evaluat în stadiile timpurii ale diastolei ventriculare, după complexul QRS, imediat ce valvele mitrale s-au închis. Volumul cerebral total al LA (tLASV) a fost calculat ca diferență între LAVmax și LAVmin. Frația de ejeție a LA (EF, %) a fost estimată cu ajutorul formulei  $100 \times [LAVmax - LAVmin] / LAVmax$  (80).

#### **4.3.3.3. Ecografia de urmărire 2D (2D-STE)**

Studiul echocardiografic a fost efectuat utilizând software-ul Vivid Echo PAC 201 (GE Medical System) cu o rată de 60-90 cadre pe secundă. Pentru a obține imagini apicale cu 4 și 2 camere, au fost capturate cel puțin trei cicluri cardiace consecutive în timpul unei pauze respiratorii. Analiza video a fost realizată ulterior, offline. Endocardul și epicardul atrial au fost urmărite și ajustate mecanic de către examinator. Software-ul a împărțit atrialul în șase regiuni distincte. Tensiunea maximă a bazinului stâng al atrialului (LA-pool) a fost măsurată imediat înainte de deschiderea valvei mitrale, în timp ce tensiunea maximă a pompajului stâng al atrialului (LA-pompă) a fost măsurată chiar înainte de unda P (conform figurii 11). Rigiditatea atrialului stâng (LA) a fost estimată utilizând raportul E/A împărțit la tensiunea maximă a bazinului stâng al atrialului(81,82).

Pentru evaluarea deformării miocardului ventricular, software-ul Echo PAC 201 a fost setat la o frecvență de 70-80 cadre pe secundă (conform studiului 74). Programul a împărțit ventriculul în șase segmente distincte (conform figurii 12). Imaginile 2D-ST ale acestor șase segmente au fost examinate în incidente apicale cu 4, 3 și 2 camere. Media valorilor obținute din cele 18 segmente investigate a fost utilizată pentru a calcula tensiunea longitudinală globală maximă (GLS). Pacienții cu calitate scăzută a imaginilor ecocardiografice au fost excluși din analiză. Parametrii de referință pentru diagnosticarea disfuncției atrialului stâng au fost următorii: valoare < 0,8 pentru raportul E/A și durată IVRT (intervalul de timp între unda A și unda E) > 100 ms pentru disfuncția diastolică a ventriculului stâng (LV); fracțiunea de ejeție a ventriculului stâng (FEVS) < 50% și valoarea vârfului tensiunii longitudinale globale (GLS) < -18% pentru disfuncția sistolică a ventriculului stâng (LV) (83).

## **4.4. REZULTATE**

### **4.4.1. EXPLORAREA IMPACTULUI METFORMINEI ASUPRA VIABILITĂȚII CELULELOR HEPATOCITARE**

#### **4.4.1.1 Evaluarea viabilității celulare**

Pentru a investiga efectul hepatocitelor induse de Metformin, am evaluat viabilitatea celulelor HepaRG la intervale de 24 și 72 de ore după stimularea cu Metformin la diferite concentrații: 0,5, 1, 1,5, 2 și 2,5 mM.

Astfel, rezultatele noastre indică faptul că Metformin, la intervalul de timp de 24 de ore, nu determină o scădere a viabilității celulare; dimpotrivă, la concentrația de 2 mM, se observă o creștere semnificativă a viabilității celulare.

La intervalul de timp de 72 de ore, se observă aceeași tendință în ceea ce privește influența asupra viabilității celulare. Astfel, la primele patru concentrații testate (0,5, 1, 1,5 și 2 mM) se constată o creștere a viabilității celulare în funcție de concentrație, în timp ce la concentrația de 2,5 mM se observă o scădere a viabilității celulare, dar nu mai puțin decât a controlului, viabilitatea fiind de aproximativ 100% în acest caz. Cu toate acestea, cea mai mare valoare a viabilității celulare a fost înregistrată la o concentrație de 2 mM, fiind de aproximativ 171%.

Efectul Metforminei asupra morfologiei și confluenței celulelor HepaRG a fost evaluat și monitorizat prin fotografierea celulelor după două intervale de timp, 24h și 72h. După o stimulare de 24 de ore, morfologia celulară confirmă rezultatele obținute anterior la testul de viabilitate celulară.

În ceea ce privește intervalul de timp de 72 de ore, rezultatele obținute sunt similare cu cele observate în cazul testului de viabilitate celulară. Astfel, la primele patru concentrații testate, s-a observat o creștere dependentă de doză a confluenței și a numărului de celule, în timp ce la cea mai mare concentrație testată, 2,5 mM, s-a înregistrat o ușoară scădere a confluenței celulare.

#### **4.4.1.3 Imunofluorescență**

Pentru a evalua dacă metformina poate exercita efecte asupra morfologiei nucleului și mitocondriilor, s-a aplicat metoda imunofluorescenței. Astfel, în ceea ce privește structura nucleului, aceasta nu este influențată de niciuna dintre concentrațiile testate. Chiar și în cazul celei mai mari concentrații testate, nu se observă modificări semnificative, cum ar fi condensarea sau diminuarea numărului. În mod similar, în cazul mitocondriilor, tratamentul cu Metformin nu determină modificări în ceea ce privește distribuția și morfologia. Astfel, mitocondriile, în cazul primelor patru concentrații testate, prezintă o distribuție uniformă, fără semne de condensare sau scădere a numărului. În schimb, în cazul celei mai mari concentrații testate, se observă o ușoară condensare a mitocondriilor în jurul nucleelor.

Pe baza faptului că metformina nu provoacă iritații vasculare și că viabilitatea celulară este stimulată după tratamentul cu metformină, s-a decis să se evalueze efectele protectoare și antiiritante ale metforminei. Astfel, s-a efectuat un pretratament cu Metformin și H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, urmat de iritarea cu SDS 1%. Pretratarea cu H<sub>2</sub>O nu împiedică apariția efectelor iritante vasculare exercitate de SDS, deoarece se observă că sunt prezente atât zone cu liză vasculară, cât și zone cu hemoragie. Pe de altă parte, pretratamentul cu Met 2 mM exercită un efect protector și antiiritant, scorul de iritație obținut în acest caz (7,29) fiind semnificativ mai mic decât cel obținut în cazul aplicării SDS fără pretratament. În decurs de cinci minute, a fost evidentă prezența unor mici efecte iritante la nivel vascular, manifestate printr-o ușoară liză vasculară, urmată de coagulare intravasculară și de mici zone de microhemoragie.

#### **4.4.2. EVALUAREA POTENȚIALULUI CITOTOXIC AL METFORMINEI ASUPRA CELULELOR CANCEROASE COLO-RECTALE**

Studiul actual a evaluat activitatea citotoxică a metforminei în două linii celulare de cancer colorectal, HCT 116 și HT-29. De asemenea, a fost utilizată o linie celulară de colon sănătos pentru a testa efectele Met, și anume CCD 841 CoN.

Pentru a determina viabilitatea celulară în toate cele trei linii celulare utilizate, s-a efectuat testul MTT. După o analiză atentă a literaturii de specialitate, au fost alese pentru testare următoarele concentrații de Met: 5, 10, 25, 50, 75 mM (54,55,88).

În linia celulară de colon sănătos, tratamentul de 72 h cu Met nu a arătat niciun efect citotoxic. Concentrația de 5mM a crescut viabilitatea celulară la 101%, în timp ce concentrațiile raportate de la 10 mM la 75 mM au scăzut viabilitatea celulară într-o manieră dependentă de concentrație, dar niciuna dintre ele nu a fost mai mică de 79%

Standardul ISO 10993-5:2009 prevede că un compus exercită un efect citotoxic dacă determină o scădere a viabilității celulare cu mai mult de 30%. Prin urmare, metformina nu pare să exercite citotoxicitate asupra celulelor normale de colon uman. Linia celulară de adenocarcinom colorectal, HT -29, a arătat sensibilitate la tratament. Toate soluțiile de testare au scăzut viabilitatea celulară într-o manieră direct proporțională cu concentrațiile utilizate, dar s-a observat un efect citotoxic începând cu 25 mM , unde s-a obținut o viabilitate de 69%. 75 mM a afectat cel mai mult celulele, 56% din celule rămânând viabile după 72 h de stimulare. În cazul HCT 116, linia celulară de carcinom colorectal, răspunsul terapeutic a fost mai puternic decât în cazul celulelor HT-29. Din nou, s-a observat o pierdere a viabilității în funcție de concentrație, metformina determinând un efect citotoxic începând cu 10 mM (figura 24). La 75 mM, viabilitatea celulelor a scăzut la 39%.

Pentru studiul de față, am ales testul MTT, un test colorimetric care permite determinarea viabilității celulare prin determinarea funcției mitocondriale a celulelor. Enzima dehidrogenază din celulele viabile transformă bromura de 3-(4,5- dimetiltiazol2-il)-2,5-difeniltetrazoliu în cristale de formazan, care, după solubilizare, pot fi măsurate cantitativ prin spectrofotometrie la 570 nm [12]. Rezultate similare cu cele prezentate în studiul de față au fost raportate în literatura de specialitate. Într-un studiu realizat de Zheng și colegii săi, prin intermediul testului MTT, 20 mM metformina a fost demonstrat că scade viabilitatea celulară a două celule de cancer de colon într-o manieră dependentă de timp (55). Aceleași rezultate au fost obținute de Yip și colaboratorii care au testat diferite concentrații de metformina pe celulele canceroase de colon HT -29, SW480 și SW620 timp de 24, 48 și 72 h. Met a arătat o inhibiție dependentă de timp și de concentrație a proliferației celulare.

#### **4.4.3.INTERCONEXIUNEA EVIDENȚIATĂ ÎNTRE DISFUNȚIA CARDIACĂ STÂNGĂ SUBCLINICĂ ȘI RIGIDITATEA HEPATICĂ LA PACIENȚII CU SINDROM METABOLIC, DIABET ZAHARAT ȘI BOALĂ HEPATICĂ GRASĂ NON-ALCOOLICĂ**

Analizând datele obținute, nu am identificat diferențe semnificative între cele două grupuri în ceea ce privește distribuția pe criterii de vârstă, sex, prevalența hipertensiunii arteriale, circumferința taliei, indicele de masă corporală, statutul de fumător, numărul de componente ale sindromului metabolic și tratamentul medicamentos pentru tulburări lipidice și hipertensiune arterială.

Nu au existat diferențe considerabile în măsurătorile tradiționale ale funcției și structurii LV între cele două grupuri, cu excepția disfuncției diastolice LV, care a fost mai frecventă la subiecții cu diabet. De asemenea, nu am descoperit modificări ale diametrelor, volumelor sau fracțiilor de ejeție ale LA între pacienții cu MetS diabetici și non-diabetici.

2D-STE, pe de altă parte, a detectat disfuncții subtile sistolice ale LV și disfuncții subtile ale LA la pacienții diabetici, evidențiate prin tensiuni longitudinale globale semnificative mai mici ale LV, tensiuni mai mici ale rezervorului și ale pompei LA, precum și prin rigiditatea crescută a LA.



Disfuncția diastolică LV, identificată prin ecocardiografie tradițională, a fost găsită la 38 de pacienți diabetici (53%) și la 40 (51%) pacienți non-diabetici,  $p = 0,04$ . Disfuncția sistolică LV subtilă, definită prin  $GLS < 18\%$ , a fost găsită la 47 (65%) pacienți diabetici și la 34 (44%) subiecți non-diabetici  $p < 0,0001$ . Disfuncția subtilă a LA, identificată prin rigiditatea  $LA > 0,38$  a fost găsită la 29 (40%) pacienți diabetici MetS și la 15 (19%) pacienți non-diabetici,  $p = 0,03$ . Pacienții diabetici MetS au avut un risc de 1,5 ori mai mare de disfuncție sistolică LV (IC 95% 1,10 până la 2,02,  $p < 0,01$ ) și un risc de două ori mai mare de disfuncție LA (IC 95% 1,22 până la 3,57,  $p < 0,01$ ).

Atât în analiza de regresie logistică univariată, cât și în analiza de regresie logistică multivariată, fibroza hepatică  $\geq 2$  a fost un predictor independent al disfuncției subtile a LV și a disfuncției subtile a LA la pacienții diabetici MetS cu NAFLD.

Am găsit asocieri semnificative între fibroza hepatică  $\geq 2$  atât cu disfuncția sistolică subtilă a LV, cât și cu disfuncția subtilă a LA la pacienții diabetici cu MetS. Disfuncția sistolică subclinică a LV, evaluată prin tulpina longitudinală globală redusă (%), a fost semnificativ legată de rigiditatea hepatică (kPa),  $p < 0,001$  (Figura 31). Disfuncția LA, evaluată prin rigiditatea LA crescută (%), a fost, de asemenea asociată în mod semnificativ cu rigiditatea hepatică (kPa).

## 4.5. DISCUȚII

### 4.5.1. EVALUAREA ACȚIUNII METFORMINEI ASUPRA LINIEI CELULARE HEPATOCITARE: IMPLICAȚII ÎN PATOGENEZA SINDROMULUI METABOLIC ȘI NAFLD.

Rezultatele studiului de față au arătat că, in vitro, metformina stimulează proliferarea și migrația celulară, factori-cheie în procesul de reparare.

Pentru o imagine mai generală a efectului indus, studiul de față a evaluat acțiunea acestuia în vasele de sânge, atât în ceea ce privește biocompatibilitatea, cât și potențialul antiiritant, utilizând membrana corioalantoică a oului de găină.

Rezultatele obținute au arătat că Met nu induce efecte iritante la nivelul plexului vascular, având un scor de iritație de 0,7, ceea ce indică faptul că este o substanță fără efecte toxice. În plus, în ceea ce privește potențialul rol protector, pretratamentul a diminuat semnificativ efectele iritante induse de SDS la nivelul capilarelor.

Astfel, dacă în absența pretratamentului, scorul de iritație indus de SDS a fost de 19,68, în cazul pretratamentului, acesta a scăzut la 7,29. Aceste rezultate susțin constatările anterioare conform cărora aceasta crește viabilitatea celulară și stimulează migrația celulară cu un impact potențial asupra vindecării rănilor.

Din câte știm, metformina nu a fost testată anterior pentru efectul iritant și antiiritant prin metoda HET-CAM. Cu toate acestea, a fost aplicat anterior pe membrana corioallantoică pentru a evalua efectul potențial asupra angiogenezei. Astfel, Wang și colegii săi au utilizat metoda CAM pentru a evidenția efectul antiangiogenic al acestia în combinație cu Pemetrexed (115).

### 4.5.2. CORELAȚIA SEMNIFICATIVĂ ÎNTRE DISFUNCȚIA CARDIACĂ STÂNGĂ SUBCLINICĂ ȘI RIGIDITATEA HEPATICĂ ÎN CADRUL SINDROMULUI METABOLIC, DIABETULUI ZAHARAT ȘI BOLII HEPATICE GRASE NON-ALCOOLICE

Participanții la studiul nostru au fost examinați amănunțit utilizând VCTE hepatică și CAP pentru a identifica și cuantifica NALD, împreună cu ecografia convențională și cu speckle-tracking pentru a evalua structura și funcția cardiacă.

Steatoza hepatică de gradul S2 și S3 a fost semnificativ mai frecventă decât la pacienții MetS non-diabetici, așa cum se arată în tabelul 2, precum și fibroza hepatică F2 și F3.

Deși diametrele LA și LV, volumele și procente de ejeție nu au fost substanțial diferite între participanții la MetS cu și fără DM, 2D-STE a evidențiat caracteristici de deformare a LA și LV care au fost semnificativ mai rele în prezența DM, indicând disfuncție subclinică ( $p < 0,04$ ).

Conform cercetărilor anterioare, modelul de deformare miocardică este foarte legat de severitatea fibrozei miocardice determinată prin RMN cardiac sau prin probe histopatologice (122).

În ciuda dovezilor că pacienții cu NAFLD prezintă un risc de anomalii structurale cardiace, nu a fost demonstrată nicio legătură între fibroza miocardică și cea hepatică.

Acesta este primul studiu care arată această legătură folosind modelele de deformare a inimii stângi la diabeticii cu MetS.

## CONCLUZII ȘI CONTRIBUȚII PERSONALE

- Teza de față a avut scopul de a studia posibile implicații cardiovasculare și digestive ale metforminei și diabetului zaharat de tip 2
- În prezent, încă nu avem o abordare corectă și o urmărire totală a complicațiilor
- Constatările noastre evidențiază posibilul efect antitumoral pe care metformina îl exercită în unul dintre cele mai răspândite tipuri de cancer
- Metformina nu induce efecte toxice în hepatocite
- Metformina determină o stimulare a proliferării celulare hepatice
- Metformina nu induce modificarea morfologiei celulare și structurii, organizării și numărului de mitocondrii și nuclee
- Metformina stimulează migrația celulară, cu un posibil efect benefic în vindecarea rănilor toxice și iritante și că are efecte antiinflamatorii și protectoare împotriva iritației vasculare.
- Sunt necesare studii suplimentare pentru a determina posibilele mecanisme biologice care stau la baza acestei acțiuni terapeutice și elucidarea totală a acțiunii metforminei asupra sistemelor
- Rezultatele noastre subliniază importanța evaluării ficatului prin metode precum CAP și VCTE, precum și evaluarea funcției cardiace prin intermediul tehnicii de 2D-STE la pacienții diabetici cu sindrom metabolic
- Recomandăm ca evaluarea ficatului și a funcției cardiace să fie efectuate în mod constant la pacienții diabetici cu sindrom metabolic, deoarece aceste evaluări pot contribui la identificarea precoce a anomaliilor și la implementarea unui plan de tratament adecvat
- Studiile viitoare ar trebui să continue să investigheze această interconexiune complexă între ficat, inimă și afecțiunile metabolice pentru a îmbunătăți gestionarea și prevenirea complicațiilor cardiovasculare