

## ARTICOL DE CERCETARE

## Importanța stresului oxidativ în neuropatia autonomă cardiacă

Cristina Rizov<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Catedra de endocrinologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.*

**Autor corespondent:**

*Cristina Rizov, asistent universitar*

*Catedra de endocrinologie*

*Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”*

*bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004*

*e-mail: christina\_med@yahoo.com*

## RESEARCH ARTICLE

## The importance of oxidative stress in cardiac autonomic neuropathy

Cristina Rizov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Chair of endocrinology, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova.*

**Corresponding author:**

*Cristina Rizov, assistant professor*

*Chair of endocrinology*

*Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy*

*165, Stefan cel Mare si Sfant ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004*

*e-mail: christina\_med@yahoo.com*

**Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat**

În ultimii ani, pe lângă importanța hiperglicemiei ca un mecanism potențial în dezvoltarea și progresarea complicațiilor diabetice microvasculare, tot mai mult se acordă atenție stresului oxidativ.

**Ipoteza de cercetare**

Evaluarea importanței stresului oxidativ în neuropatia autonomă cardiacă la pacienții cu diabet zaharat tip 1.

**Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu**

A fost apreciată importanța stresului oxidativ, apariția și progresarea neuropatiei autonome cardiace. De asemenea, s-a evidențiat implicarea stresului oxidativ în complicațiile cronice microvasculare ale diabetului zaharat tip 1.

**What is not known yet, about the topic**

In recent years, besides the importance of hyperglycemia as a potential mechanism in the development and progression of diabetic microvascular complications, there is much more interest rising regarding oxidative stress.

**Research hypothesis**

Significant evaluation of oxidative stress in cardiac autonomic neuropathy in patients with type 1 diabetes mellitus.

**Article's added novelty on this scientific topic**

It was appreciated the importance of oxidative stress in occurrence and progression of cardiac autonomic neuropathy. It has been also revealed the involvement of oxidative stress in chronic microvascular complications of type 1 diabetes.

**Rezumat**

**Introducere.** În acest studiu de cohortă, au fost incluse 2 loturi, la care s-au apreciat particularitățile clinice, paraclinice ale neuropatiei autonome cardiace (NAC) și implicarea stresului oxidativ în patogenia acesteia.

**Material și metode.** Pentru realizarea scopului studiului au fost selectați 60 de pacienți (39 de femei și 21 de bărbați cu vârsta medie ( $\pm$ SD) de 28,7 $\pm$ 9,1 ani și durata DZ de 11,8 $\pm$ 9,3 ani, cu diagnosticul confirmat de diabet zaharat tip 1. În baza rezultatelor testelor funcției vegetative cardiace, eșantionul de studiu a fost divizat în două loturi: I lot, de control (NAC absentă) și al II-lea lot, NAC prezentă. Studiul s-a desfășurat în Clinica de endocrinologie a Spitalului Clinic Republican (mun. Chișinău) în perioada anilor 2014-2015. Criterii de includere în studiu: pacienți cu DZ tip 1 confirmat, cu durată >1 an; vârstă >18 ani. Criterii de excludere din studiu: anemie severă; in-

**Abstract**

**Introduction.** In this descriptive study they were included 2 groups that were assessed clinically, laboratory features of cardiac autonomic neuropathy (CAN) and involvement of oxidative stress in its pathogenesis.

**Materials and methods.** To achieve the aim of the study there were selected 60 patients (39 women and 21 men with an average age ( $\pm$ SD) 28.7 $\pm$ 9.1 years old and the average duration of diabetes mellitus (DM) 11.8 $\pm$ 9.3 years, with a diagnosis of type 1 diabetes mellitus (T1DM). Based on cardiac autonomic function tests, the study group was divided into two groups: the first group of control (CAN absent) and second group (CAN present). The study was held in the Republican Clinical Hospital, Chisinau, Republic of Moldova (Department of Endocrinology) during the period of 2014-2015. Inclusion criteria in the study: patients with T1DM

suficiență poliorganică (hepatică, renală, cardiacă) severă; alte patologii endocrine (feocromocitom, hipopituitarism, boală Addison); patologie cardiacă congenitală; sarcină; lactație; dezacordul pacienților. Pacienții incluși în studiu au fost evaluați conform: metodelor clinice: anchetarea; antropometria; TA, FCC și testelor de laborator: glicemia *a jeun* (GAJ), glicemia postprandială (GPP), HbA1c, colesterol, HDL, LDL, trigliceride, microalbuminuria, *15-Isoprostan*  $F_{2t}$  (kit ELISA Oxford Biomedical Research).

**Rezultate.** Au fost determinate nivelele de *15-Isoprostan*  $F_{2t}$ , un marker al stresului oxidativ, la pacienții cu diabet zaharat tip 1, cu și fără NAC. S-au constatat nivele sporite de izoprostan în lotul cu NAC vs. fără NAC și o corelare pozitivă cu severitatea afectării nervoase autonome. A fost apreciată valoarea diagnostică a *15-Isoprostan*  $F_{2t}$  prin prisma curbei ROC.

**Concluzii.** (1) S-a apreciat un nivel crescut de *15-Isoprostan*  $F_{2t}$  în lotul cu neuropatie autonomă cardiacă, comparativ cu lotul de control. (2) S-a evidențiat creșterea nivelului de *15-Isoprostan*  $F_{2t}$ , odată cu progresarea severității neuropatiei autonome cardiace la pacienții cu diabet zaharat tip 1. (3) Valori crescute de *15-Isoprostan*  $F_{2t}$  au fost apreciate la pacienții cu complicații cronice microvasculare (retinopatie, nefropatie, neuropatie) ale diabetului zaharat tip 1, *15-Isoprostan*  $F_{2t}$ .

**Cuvinte cheie:** stres oxidativ, neuropatia autonomă cardiacă, diabet zaharat tip 1.

## Introducere

În prezent, rolul stresului oxidativ în patologia DZ nu este precizat, dar este cunoscut faptul că DZ este însoțit de stres oxidativ [1]. Studiile precedente au demonstrat o corelație dintre stresul oxidativ și hiperglicemie [2]. De asemenea, este cunoscut faptul că stresul oxidativ contribuie la accelerarea aterosclerozei, formarea cataractei, apariția leziunilor renale, retinopatiei și neuropatiei diabetice [2]. F2-izoprostanii, utilizați în calitate de markeri ai stresului oxidativ (markeri ai peroxidării lipidice) la pacienții diabetici, constau dintr-o serie de compuși tip prostaglandină F2, formați în timpul peroxidării acidului arahidonic printr-un mecanism independent de calea ciclooxigenazei [2]. Mai mult, a fost dovedit faptul, că producția căii isoprostanului exercită acțiune biologică și pot fi mediatori patofiziologici ai unor patologii. Studiile precedente au arătat valori plasmatice crescute de *8-epi-PGF* $_{2\alpha}$  (*15-Isoprostan*  $F_{2t}$ ) la pacienții cu DZ tip 1 și tip 2 vs. persoane sănătoase și valori crescute urinare de *8-epi-PGF* $_{2\alpha}$  statistic semnificative, la pacienții cu cetoacidoză diabetică [2, 3]. Am optat pentru F2-isoprostani deoarece sunt chimic stabili, formați *in vivo*, pot fi apreciați atât în ser cât și în urină și nu sunt afectați de nivelul lipidelor.

## Material și metode

Pentru realizarea scopului studiului, au fost selectați 60 de pacienți (39 de femei și 21 de bărbați cu vârsta medie ( $\pm$ SD)

confirmat and duration >1 year; patient's age >18 years old. Exclusion criteria were: severe anemia; severe organ failure (liver, kidney, heart); other endocrine pathologies (pheochromocytoma, hypopituitarism, Addison's disease); congenital cardiac pathology; pregnancy, lactation; patient disagreement. Patients included in the study were evaluated according to: clinical methods: investigation; anthropometry; BP, HR and laboratory tests: fasting plasma glucose (FPG), post meal glucose (PG), HbA1c, cholesterol, HDL, LDL, triglycerides, microalbuminuria, *15-isoprostane*  $F_{2t}$  (Oxford Biomedical Research ELISA kit).

**Results.** During the study there was assessed increased level of *15-isoprostane*  $F_{2t}$ , an oxidative stress marker, in patients with T1DM, with and without CAN. It has been noticed increased *15-isoprostane*  $F_{2t}$  levels in CAN positive group vs. CAN negative group, and positive correlation with the progression of cardiac autonomic neuropathy severity. Diagnostic value of *15-isoprostane*  $F_{2t}$  was appreciated through the ROC curve.

**Conclusions.** (1) During the study there was assessed increased level of *15-isoprostane*  $F_{2t}$  in the group with cardiac autonomic neuropathy compared to the control group. (2) It has been noticed the increased *15-isoprostane*  $F_{2t}$  once the progression of cardiac autonomic neuropathy severity in patients with type 1 diabetes. (3) Elevated *15-isoprostane*  $F_{2t}$  levels were observed in patients with chronic microvascular complications (retinopathy, nephropathy, neuropathy) of type 1 diabetes mellitus, *15-isoprostane*  $F_{2t}$ .

**Key words:** oxidative stress, cardiac autonomic neuropathy, type 1 diabetes mellitus.

## Introduction

Currently, the role of oxidative stress in diabetic pathology is not clear, but it is known that diabetes is accompanied by oxidative stress [1]. Previous studies have shown a correlation between hyperglycemia and oxidative stress [2]. It is also known that oxidative stress contributes to the acceleration of atherosclerosis, cataracts, kidney lesions, diabetic retinopathy and neuropathy [2]. F2-isoprostanes are used as markers of oxidative stress (a marker of lipid peroxidation) in diabetic patients, consist of a range of compounds of type prostaglandin F2 formed during the peroxidation of arachidonic acid through independent mechanism from the cyclooxygenase pathway [2]. Moreover, it was proven that products of isoprostane pathway exerts biological activity and may be pathophysiological mediators of certain pathologies. Previous studies have shown raising plasma levels of *8-epi-PGF* $_{2\alpha}$  (*15-isoprostane*  $F_{2t}$ ) in patients with type 1 and type 2 diabetes versus healthy individuals and elevated urinary *8-epi-PGF* $_{2\alpha}$  statistically significant in patients with diabetic ketoacidosis [2, 3]. We opted for F2-isoprostanes because they are chemically stable, formed *in vivo*, can be appreciated in both serum and urine and are not affected by lipid levels.

## Material and methods

In order to achieve the aim of the study, there were selected 60 patients (39 women and 21 men with the average

de 28,7±9,1 ani și durată medie a DZ de 11,8±9,3 ani), cu diagnosticul confirmat de diabet zaharat tip 1. În baza rezultatelor testelor funcției vegetative cardiace, eșantionul de studiu a fost divizat în două loturi: I lot, de control (NAC absentă) și al II-lea lot, NAC prezentă. Studiul s-a desfășurat în Clinica de endocrinologie a Spitalului Clinic Republican (mun. Chișinău) în perioada anilor 2014-2015.

Criteriile de includere în studiu au fost: pacienții cu DZ tip 1 confirmat, cu durată >1 an; vârsta >18 ani. Drept criterii de excludere din studiu, au servit: anemia severă; insuficiența poliorganică (hepatică, renală, cardiacă) severă; alte patologii endocrine (feocromocitom, hipopituitarism, boală Addison); patologia cardiacă congenitală; sarcina; lactația; dezacordul pacienților.

Pacienții incluși în studiu au fost evaluați conform metodelor clinice – anchetarea; antropometria; TA, FCC și testelor de laborator – glicemia *a jeun* (GAJ), glicemia postprandială (GPP), HbA1c, colesterol, HDL, LDL, trigliceride, microalbuminuria, 15-Isoprostan  $F_{2t}$  (kit ELISA Oxford Biomedical Research).

Diagnosticul neuropatiei autonome cardiace a fost stabilit în baza rezultatelor testării funcției vegetative cardiace, bateria lui Ewing [4]: (1) Variația frecvenței cardiace la manevra Valsalva; (2) Variația frecvenței cardiace la hiperpnee; (3) Răspunsul frecvenței cardiace la trecerea în ortostatism; (4) Răspunsul tensiunii arteriale la ortostatism; (5) Răspunsul tensiunii arteriale la contracția izometrică a mâinii.

Scorul total de severitate al neuropatiei autonome cardiace (Scor Ewing) reprezintă suma scorurilor individuale, obținute la testele reflexe cardiovasculare (Ewing, 1994) [4]. Pentru testele Ewing, a fost utilizat următorul scor: anormal (2 puncte), limită [borderline] (1 punct), normal (0 puncte). După scorul total de severitate al neuropatiei autonome cardiace, pacienții au fost divizați în 3 grupuri, corespunzător: I grup (2-3 puncte) – corespunde neuropatiei autonome cardiace ușoare; II grup (4-6) puncte – corespunde neuropatiei autonome cardiace moderate; III grup (7-10 puncte), – corespunde neuropatiei autonome cardiace severe.

Prezența retinopatiei diabetice (RD) a fost apreciată cu ajutorul oftalmoscopiei. Diagnosticul nefropatiei diabetice (ND) a fost stabilit în baza valorii TA, ratei filtrației glomerulare și microalbuminuriei. Scorul Toronto a permis diagnosticarea neuropatiei diabetice periferice (NDP).

Datele sunt prezentate sub formă de valori absolute și relative (%) sau medie și deviere standard. Seriile de date de tip continuu au fost analizate cu ajutorul testului t-Student. Sensibilitatea și specificitatea valorii diagnostice a 15-Isoprostan  $F_{2t}$  a fost exprimată prin intermediul curbei ROC. Un  $p < 0,05$  a fost considerat statistic semnificativ.

## Rezultate

În I lot (de control), vârsta medie a constituit 24,0±1,4 ani, iar durată DZ – 3,7±1,7 ani. În al II-lea lot (NAC prezentă), vârsta medie a fost 31,7±2,4 ani ( $p < 0,001$ ) și durată DZ – de 15,2±2,2 ani ( $p < 0,001$ ).

age ( $\pm$ SD) 28.7±9.1 years and the average duration of DM 11.8±9.3 years) with a diagnosis of T1DM. Based on cardiac autonomic function tests the study group was divided into two groups: the first group of control (CAN absent) and second group (CAN present). The study was conducted in the Department of Endocrinology of the Republican Clinical Hospital (Chisinau), during the period of 2014-2015.

Inclusion criteria in the study: patients with T1DM confirmed and duration >1 year; patient's age >18 years. Exclusion criteria were: severe anemia; severe organ failure (liver, kidney, heart); other endocrine pathologies (pheochromocytoma, hypopituitarism, Addison's disease); congenital cardiac pathology; pregnancy, lactation; patient disagreement.

Patients included in the study were evaluated according to: clinical methods: investigation; anthropometry; BP, HR and laboratory tests: fasting plasma glucose (FPG), post meal glucose (PG), HbA1c, cholesterol, HDL, LDL, triglycerides, microalbuminuria, 15-isoprostan  $F_{2t}$  (Oxford Biomedical Research ELISA kit).

Cardiac autonomic neuropathy diagnosis was established based on results of cardiovascular autonomic function test, Ewing's battery [4]: (1) HR variation on Valsalva maneuver; (2) Heart rate response to hyperventilation; (3) Heart rate response to standing up; 4) Blood pressure response to standing up; 5) BP response to a sustained hand-grip.

Total score of severity of cardiac autonomic neuropathy (Ewing Score) is the sum of the individual scores obtained on cardiovascular reflex tests (Ewing, 1994) [4]. For Ewing tests the following scores were used: abnormal (2 points), borderline (1 point) and normal (0 points). After the total score of severity of cardiac autonomic neuropathy, patients were divided into 3 groups accordingly: I group, 2-3 points – corresponds to mild cardiac autonomic neuropathy; group II, 4-6 points – corresponds to moderate cardiac autonomic neuropathy; group III, 7-10 points – corresponds to severe cardiac autonomic neuropathy.

The presence of diabetic retinopathy (DR) was estimated using ophthalmoscope. The diagnosis of diabetic nephropathy (DN) was established under the BP value, glomerular filtration rate and microalbuminuria. Toronto score allowed diagnosis of diabetic peripheral neuropathy (DPN).

Data is presented in absolute and relative values (%) or mean and standard deviations. Continuous series data were analyzed by t-Student test. Sensibility and specificity of the diagnostic value of 15-isoprostan  $F_{2t}$  was shown by means of ROC curve. A  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

In the first group (control group) mean age was 24.0±1.4 years and the duration of DM 3.7±1.7 years. In second group (CAN present) mean age was 31.7±2.4 years ( $p < 0.001$ ) and duration of diabetes – 15.2±2.2 years ( $p < 0.001$ ).

**Tabelul 1.** Parametrii de comparație, în funcție de loturi.

Parametrul	Lot I (NAC [-]) (n=30)	Lot II (NAC [+]) (n=30)	p
TAs, mmHg	115±2,6	125,5±3,6	<0,001
Tad, mmHg	73,7±2,4	78,5±1,7	<0,05
FCC, bpm	81,5±6,3	92,4±3,4	<0,001
HbA1c, %	9,8±0,8	10,7±0,5	<0,0001
GAJ, mmol/l	9,6±1,1	11,1±1,2	<0,05
GPP, mmol/l	8,8±1,1	12,2±1,5	<0,001
Colesterol, mmol/l	4,7±0,4	5,4±0,5	<0,001
HDL-c, mmol/l	1,4±0,1	1,4±0,1	>0,05
LDL-c, mmol/l	3,2±0,4	3,4±0,2	>0,05
Trigliceride, mmol/l	1,2±0,3	1,4±0,2	>0,05
Microalbuminurie, mg/24 ore	19,5±14,5	254,3±68,5	<0,0001

Astfel, în lotul de control, s-au apreciat valori medii ale TAs de 115,0±2,6 mmHg și ale TAd de 73,7±2,4 mmHg vs. 125,5±3,6 mmHg și 78,5±1,7 mmHg, respectiv, în lotul cu NAC, având semnificație statistică atât pentru TAs ( $p<0,001$ ), cât și pentru TAd ( $p<0,05$ ).

S-au apreciat diferite valori ale HbA1c în ambele loturi ( $p<0,0001$ ). Atât în lotul cu NAC (10,7±0,5%), cât și fără (9,8±0,8%); valorile medii ale HbA1c au fost mult crescute peste cele normale, fiind caracteristice unui DZ tip 1 decompensat. Referitor la mediile GAJ și GPP, s-au evidențiat nivele mai mari în lotul cu NAC. Astfel, în lotul de control, GAJ a constituit 9,6±1,1 mmol/l, iar GPP – 8,8±1,1 mmol/l vs. 11,1±1,2 mmol/l ( $p<0,05$ ) și 12,2±1,5 ( $p<0,001$ ) mmol/l, respectiv, în lotul II.

La persoanele fără NAC, nivelul plasmatic al colesterolului s-a dovedit a fi mai redus (4,7±0,4 mmol/l), comparativ cu cel al pacienților cu NAC (5,4±0,5 mmol/l) ( $p<0,001$ ). Nu s-au obținut diferențe statistice între nivelul HDL-c, LDL-c și cel al trigliceridelor între cele două loturi.

S-a determinat un nivel crescut al microalbuminuriei în lotul II – 254,3±68,5 mg/24 ore vs. 19,5±14,5 mg/24 ore din lotul de control, diferență statistic semnificativă ( $p<0,0001$ ).

Ulterior, au fost analizate valorile plasmatiche de 15-Isoprostan  $F_{2t}$ . Nivelul valorilor medii de 15-Isoprostan  $F_{2t}$  au fost crescute, cu semnificație statistică ( $p<0,001$ ), în lotul II – 1,2±2,1 ng/ml versus lotul I – 0,4±0,9 ng/ml. 15-Isoprostan  $F_{2t}$  a atins valori maxime de 8,02 ng/ml și minime, de 0,005 mg/ml, în lotul de cercetare vs. 2,4 ng/ml și 0,0005 ng/ml, în lotul de control. În funcție de severitatea NAC, valorile medii de 15-Isoprostan  $F_{2t}$  s-au repartizat în felul următor: în NAC ușoară – 0,07±0,05 ng/ml, în NAC moderată – 0,5±0,3 ng/ml și în NAC severă – 2,3±1,2 ng/ml.

Reieșind din datele Figurii 1, valoarea ariei de sub curba ROC (AUC) a constituit 0,706 (95% CI 0,504 – 0,861,  $p<0,05$ ), iar pragul de diagnostic  $>0,005$ , pentru care sensibilitatea a fost de 55,6% și specificitatea – de 80%, cu valoare predictivă pozitivă de 2,8 și o valoare predictivă negativă de 0,6.

Cu toate că valorile medii ale 15-Isoprostan  $F_{2t}$  diferă în cele

**Table 1.** Comparison parameters according to groups.

Parameter	Group I (CAN [-]) (n=30)	Group II (CAN [+]) (n=30)	p
SysBP, mmHg	115±2.6	125.5±3.6	<0.001
DiaBP, mmHg	73.7±2.4	78.5±1.7	<0.05
HR, bpm	81.5±6.3	92.4±3.4	<0.001
HbA1c, %	9.8±0.8	10.7±0.5	<0.0001
FPG, mmol/l	9.6±1.1	11.1±1.2	<0.05
PG, mmol/l	8.8±1.1	12.2±1.5	<0.001
Cholesterol, mmol/l	4.7±0.4	5.4±0.5	<0.001
HDL-c, mmol/l	1.4±0.1	1.4±0.1	>0.05
LDL-c, mmol/l	3.2±0.4	3.4±0.2	>0.05
Triglycerides, mmol/l	1.2±0.3	1.4±0.2	>0.05
Microalbuminuria, mg/24 h	19.5±14.5	254.3±68.5	<0.0001

Thus, in the control group, average values of systolic BP were 115±2.6 mmHg and diastolic BP 73.7±2.4 mmHg vs. 125.5±3.6 mmHg and 78.5±1.7 mmHg, respectively in CAN group, with statistical significance for both systolic BP ( $p<0.001$ ) as well as diastolic BP ( $p<0.05$ ).

There were appreciated different values of HbA1c in both groups ( $p<0.0001$ ). Both in the CAN group (10.7±0.5%) and CAN absent group (9.8±0.8%) the average HbA1c were more elevated than normal, being characteristic for decompensated T1DM. Regarding FPG and PG higher levels were found in the group with CAN. Thus, in the control group FPG was 9.6±1.1 mmol/l and PG 8.8±1.1 mmol/l vs. 11.1±1.2 mmol/l ( $p<0.05$ ) and 12.2±1.5 ( $p<0.001$ ) mmol/l respectively in the second group.

In patients without CAN, plasma level of cholesterol has been shown to be reduced (4.7±0.4 mmol/l) compared to patients with CAN (5.4±0.5 mmol/l) ( $p<0.001$ ). No statistical differences were obtained between the HDL, LDL and triglycerides levels between the two groups.

High levels of microalbuminuria were found in the second group – 254.3±68.5 mg/24h vs. 19.5±14.5 mg/24h in the control group, statistically significant difference ( $p<0.0001$ ).

Subsequently, plasma levels of 15-isoprostane  $F_{2t}$  were analyzed. The mean values of 15-isoprostane  $F_{2t}$  were increased, with statistical significance ( $p<0.001$ ), in group II – 1.2±2.1 ng/ml vs. group I – 0.4±0.9 ng/ml. Maximum levels of 15-isoprostane  $F_{2t}$  of 8.02 ng/ml and minimum levels of 0.005 mg/ml were reached in the research group vs. 2.4 ng/ml and 0.0005 ng/ml in the control group. Depending on the CAN severity, average values of 15-isoprostane  $F_{2t}$  were distributed as follows: 0.07±0.05 ng/ml in mild CAN, in moderate CAN – 0.5±0.3 ng/ml and severe CAN – 2.3±1.2 ng/ml.

Based on the data of the Figure 1, the area under the ROC curve (AUC) was 0.706 (95% CI 0.504 to 0.861,  $p<0.05$ ) and the diagnostic threshold  $>0.005$  for which the sensitivity was 55.6% and specificity of 80%, positive predictive value of 2.8 and negative predictive value of 0.6.

Although, average values of 15-isoprostane  $F_{2t}$  were different in the two studied groups, after a thorough analysis it was

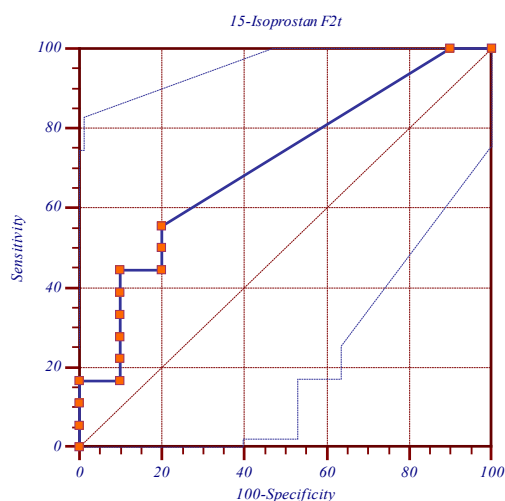


Fig. 1 Curba ROC pentru 15-Isoprostan  $F_{2t}$ .

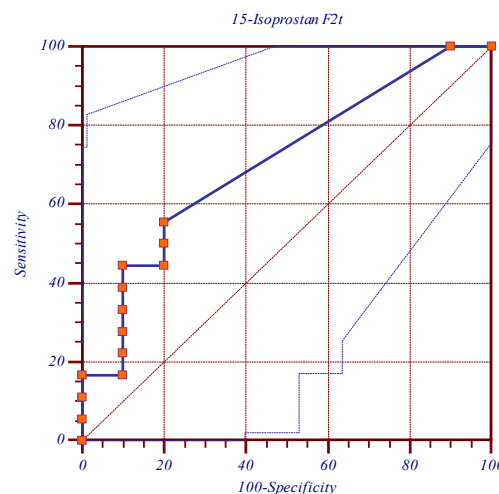


Fig. 1 ROC curve for 15-isoprostane  $F_{2t}$ .

două loturi studiate, s-a constatat că nivele crescute s-au înregistrat la pacienții cu RD și ND, însă nu și NAC. Astfel, luând în considerație importanța stresului oxidativ în accelerarea apariției complicațiilor microvasculare ale DZ, a fost apreciat nivelul de 15-Isoprostan  $F_{2t}$  în RD, ND și NDP (Figura 2).

Din Figura 2 prezentată, poate fi observat un nivel mai mare al 15-Isoprostan  $F_{2t}$  în cazul persoanelor cu DZ tip 1 și RD, ND și NDP. Astfel, media 15-Isoprostan  $F_{2t}$  în DZ tip 1 și RD a constituit  $1,2 \pm 0,5$  ng/ml (i.v. - 0,005-8,015 ng/ml) vs.  $0,01 \pm 0,008$  ng/ml (i.v. - 0,0005-0,05 ng/ml) în DZ tip 1 fără RD ( $p < 0,001$ ). În ceea ce privește ND, mediile s-au repartizat astfel:  $0,97 \pm 0,32$  ng/ml (i.v. - 0,005-4,03 ng/ml) în absența ND vs.  $1,01 \pm 1,0$  ng/ml (i.v. - 0,0005-8,017 ng/ml), în prezența ND, fără semnificație statistică ( $p > 0,05$ ). Un nivel mai mare de 15-Isoprostan  $F_{2t}$  s-a apreciat și în prezența NDP:  $1,18 \pm 0,4$  ng/ml (i.v. - 0,005-8,017 ng/ml) vs.  $0,01 \pm 0,01$  ng/ml (i.v. - 0,0005-0,05 ng/ml) în absența NDP, cu semnificație statistică ( $p < 0,001$ ).

În DZ tip 1 cu complicații microvasculare, nivelul de 15-Isoprostan  $F_{2t}$  este mai mare, probabil, datorită efectului vasoconstrictor, ceea ce încă o dată dovedește importanța stresului oxidativ în apariția și progresarea complicațiilor diabetice.

found that there were elevated in patients with DR and DN but without CAN. Thus, taking into consideration the importance of oxidative stress in accelerating the occurrence of microvascular complications of diabetes, 15-isoprostane  $F_{2t}$  level was assessed in DR, DN and DPN (Figure 2).

Figure 2 shows higher levels of 15-isoprostane  $F_{2t}$  in people with T1DM and DR, DN and DPN. Thus, the mean value of 15-isoprostane  $F_{2t}$  in T1DM and DR was  $1.2 \pm 0.5$  ng/ml (i.v. 0.005 to 8.015 ng/ml) vs.  $0.01 \pm 0.008$  ng/ml (i.v. from 0.0005 to 0.05 ng/ml) in T1DM without DR ( $p < 0.001$ ). Regarding DN averages were distributed as follows:  $0.97 \pm 0.32$  ng/ml (i.v. 0.005 to 4.03 ng/ml) in the absence of DN vs.  $1.01 \pm 1.0$  ng/ml (i.v. 0.0005 to 8.017 ng/ml) in the presence of DN without statistical significance ( $p > 0.05$ ). A higher level of 15-isoprostane  $F_{2t}$  were appreciated in the presence of DPN  $1.18 \pm 0.4$  ng/ml (i.v. 0.005 to 8.017 ng/ml) vs.  $0.01 \pm 0.01$  ng/ml (i.v. 0.0005 to 0.05 ng/ml) in the absence of DPN, statistically significant ( $p < 0.001$ ).

In type 1 diabetes with microvascular complications 15-isoprostane  $F_{2t}$  reaches higher levels, probably due to its vasoconstrictive effect, which once again, shows the importance of oxidative stress in the development and progression of diabetic complications.

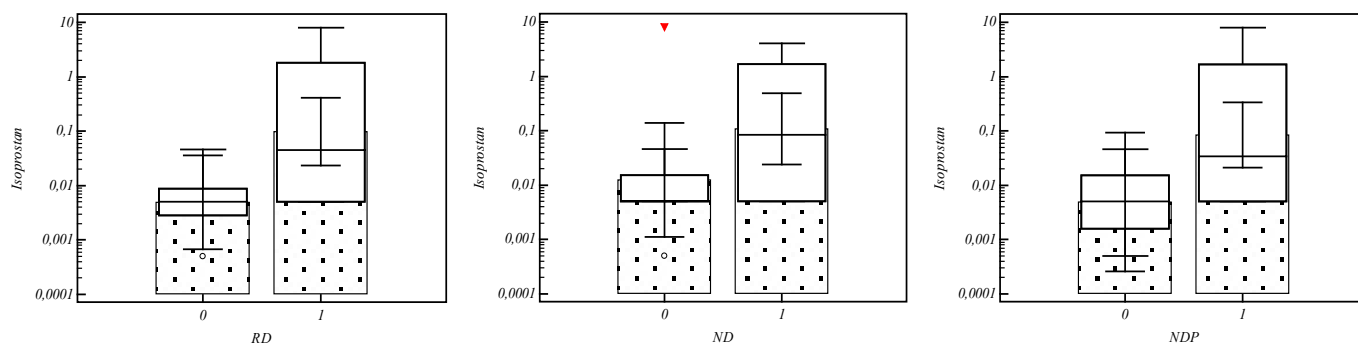


Fig. 2 Nivelul de 15-Isoprostan  $F_{2t}$  în complicațiile microvasculare ale DZ tip 1.

Fig. 2 Levels of 15-isoprostane  $F_{2t}$  in microvascular complications of type 1 DM.

## Discuții

Neuropatia autonomă cardiacă (NAC) este o complicație a DZ, care are un impact major asupra patologiei cardiovasculare, morbidității și mortalității pacienților cu DZ [5, 6]. Patogenia exactă a NAC rămâne neclară datorită complexității și mării variabilități a mecanismelor patogenice implicate. Majoritatea mecanismelor patogenice propuse se bazează pe modelul somatic și nu pe cel al neuropatiei autonome [7]. NAC este rezultatul unei interacțiuni complexe dintre gradul controlului glicemic, durata diabetului, afectarea neuronală, presiunea sistolică și diastolică [8, 9]. Studiul dat a analizat durata DZ, gradul de compensare glicemică, starea metabolismului lipidic, valorile TAs și TAd, dar și implicarea stresului oxidativ în NAC la pacienții cu DZ tip 1. La baza complicațiilor microvasculare ale DZ, stă hiperglicemia, care duce la alterarea funcției vasculare și, în rezultat – la un dezechilibru dintre biodisponibilitatea oxidului nitric și acumularea radicalilor liberi, ceea ce duce la disfuncție endotelială [10]. Principalii factori de risc pentru patologia cardiacă sunt: hipercolesterolemia, diabetul zaharat, fumatul, obezitatea [11]. S-a constatat că la persoanele cu factorii de risc enumerați, nivelul isoprostanului este crescut [11, 12]. Milne G. și colab. [12] au analizat nivelurile plasmatice de *8-epi-PGF2 $\alpha$*  (*15-Isoprostan F<sub>2t</sub>*) la pacienții cu DZ tip 2 și le-au comparat cu persoanele sănătoase. Astfel, la cei cu DZ, s-a apreciat un nivel mai mare (0,49-2,16 nM) decât în grupul de control (0,02-0,63 nM). Davi și colab., au apreciat nivelul urinar al *8-epi-PGF2 $\alpha$*  la pacienții cu DZ tip 1 [13]. La acești pacienți, nivelurile urinare ale *8-izo-PGF2 $\alpha$*  au fost, de asemenea, mai mari ( $n=23$ ,  $400\pm 146$  pg/mg creatinină), comparativ cu cele ale lotului de control ( $197\pm 69$  pg/mg creatinină,  $p=00001$ ). Keaney și colab., au descoperit o corelație puternică, pozitivă, dintre DZ și nivelul urinar *8-epi-PGF2 $\alpha$*  [14]. Davi și colab., sugerează că în DZ tip 1 la copii și adolescenți, se atestă un nivel crescut al isoprostanului la debutul bolii, care scade pe măsură ce diabetul progresează [15]. Datele studiului actual corespund cu cele din literatură. Nivelul majorat de *15-Isoprostan F<sub>2t</sub>* în lotul de control este, probabil, cauzat de gradul slab de compensare glicemică (media valorii HbA1c a fost crescută în ambele loturi). Studiile anterioare efectuate și care au vizat *15-Isoprostan F<sub>2t</sub>*, au apreciat importanța stresului oxidativ în DZ [11, 12, 13]. Studiul prezentat a evaluat implicarea stresului oxidativ în complicațiile diabetice cronice microvasculare. Pentru identificarea căilor patogenice ale NAC, sunt necesare studii suplimentare.

## Concluzii

- 1) Un nivel mai mare de *15-Isoprostan F<sub>2t</sub>* a fost determinat în lotul cu neuropatie autonomă cardiacă, comparativ cu lotul de control.
- 2) La pacienții cu diabet zaharat tip 1, s-a evidențiat creșterea nivelului de *15-Isoprostan F<sub>2t</sub>* odată cu progresarea severității neuropatiei autonome cardiace.
- 3) Valori crescute de *15-Isoprostan F<sub>2t</sub>* au fost detectate la pacienți cu complicații cronice microvasculare (retinopatie, nefropatie, neuropatie) ale diabetului zaharat tip 1.

## Discussion

Cardiac autonomic neuropathy (CAN) is a complication of diabetes, which has a major impact on the cardiovascular pathology, morbidity and mortality in patients with DM [5, 6]. The exact pathogenesis of CAN remains unclear due to the complexity and high variability of the involved pathogenic mechanism. Most pathogenic mechanisms proposed are based on the somatic and not on the autonomic neuropathy [7]. CAN is the result of complex interactions between the degree of glycemic control, diabetes duration, neuronal damage, systolic and diastolic blood pressure [8, 9]. This study analyzed the duration of diabetes, glycemic level of compensation, lipid metabolism status, systolic and diastolic BP values and the involvement of oxidative stress in patients with CAN and type 1 diabetes. On the basis of microvascular diabetes complications is hyperglycemia, which leads to impaired vascular function and resulting imbalance between nitric oxide bioavailability and accumulation of free radicals, leading to endothelial dysfunction [10]. The main risk factors for cardiac pathology are: high cholesterol, diabetes, smoking, obesity [11]. It has been found that in individuals with this risk factors, the isoprostane level is increased [11, 12]. Milne G. *et al.* [12] analyzed plasma levels of *8-epi-PGF2 $\alpha$*  (*15-isoprostane F<sub>2t</sub>*) in patients with type 2 diabetes and compared them to healthy individuals. Thus, patients with diabetes had higher level (0.49-2.16 nM) than in the control group (0.02-0.63 nM). Davi *et al.* assessed the level of urinary *8-epi-PGF2 $\alpha$*  in patients with type 1 diabetes [13]. Regarding these patients, urinary levels of *8-iso-PGF2 $\alpha$*  excretion were also higher ( $n=23$ ,  $400\pm 146$  pg/mg creatinine) compared to those of control group ( $197\pm 69$  pg/mg creatinine,  $p=0.0001$ ). Keaney *et al.* found a strong positive correlation of DM and *8-epi-PGF2 $\alpha$*  urinary level [14]. Davi *et al.* suggest that in children and adolescents with type 1 DM, increased levels of isoprostane are found on the onset of disease and these levels decreases as the diabetes progresses [15]. The survey data correspond to the literature. Increased levels of *15-isoprostane F<sub>2t</sub>* in control group is probably caused by poor glycemic compensation (mean HbA1c level is increased in both groups). Previous studies performed on *15-isoprostane F<sub>2t</sub>* appreciated the importance of oxidative stress in diabetes [11, 12, 13]. The present study evaluated the involvement of oxidative stress in chronic diabetic microvascular complications. In order to identify pathogenic pathways of CAN, further studies are needed.

## Conclusions

- 1) During the study, there was assessed increased levels of *15-isoprostane F<sub>2t</sub>* in the group with cardiac autonomic neuropathy compared to the control group.
- 2) It has been noticed increasing *15-isoprostane F<sub>2t</sub>* with the progression of cardiac autonomic neuropathy severity in patients with type 1 diabetes.
- 3) Elevated *15-isoprostane F<sub>2t</sub>* levels were observed in patients with chronic microvascular complications (retinopathy, nephropathy, neuropathy) of type 1 diabetes.

**Declarația de conflict de interes**

Nimic de declarat.

**Declaration of conflicting interests**

Nothing to declare.

**Referințe / references**

1. Pop-Busui R., Stevens M., Raffel D. *et al.* Effects of triple antioxidant therapy on measures of cardiovascular autonomic neuropathy and on myocardial blood flow in type 1 diabetes: a randomized controlled trial. *Diabetologia*, 2013; 56: 1835-1844.
2. Vîrgolici B, Rădoi V. Implicațiile inflamației și stresului oxidativ în diabetul zaharat. *Medicina modernă*, 2010, 17: 38-42.
3. Czerska M, Mikołajewska K, Zieliński M. *et al.* Today's oxidative stress markers. *Medycyna Pracy*, 2015; 66 (3): 393-405.
4. Casaccia M., Pimazoni-Netto A., Pires A. *et al.* Diabetes and cardiovascular disease: from evidence to clinical practice – position statement 2014 of Brazilian Diabetes Society. *Diabetol. Metab. Syndr.*, 2014; 6: 58.
5. Secrest A., Costacou T., Gutelius B. *et al.* Associations between socioeconomic status and major complications in type 1 diabetes: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complication (EDC) Study. *Annals of Epidemiology*, 2011; 21: 374-381.
6. Riguetto C., Takano C., Ribeiro M. *et al.* Clinical predictors of cardiac autonomic neuropathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 2015; 7: 6.
7. Pop-Busui R. Cardiac autonomic neuropathy in diabetes: a clinical perspective. *Diabetes Care*, 2010; 33: 434-441.
8. Witte D., Tesfaye S., Chaturvedi N. *et al.* EURODIAB Prospective Complications Study Group. Risk factors for cardiac autonomic neuropathy in type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 2005; 48: 164-171.
9. Peter S., Demetrius E., Raelene E. *et al.* Cardiac autonomic neuropathy (expiration and inspiration ratio) in type 1 diabetes. Incidence and predictors. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 2011; 27: 639-653.
10. Paneni F., Beckman J., Creager M. *et al.* Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *European heart journal*, 2013; 34: 1-12.
11. Czerska M., Zieliński M., Gromadzińska J. Isoprostanes – a novel major group of oxidative stress markers. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health*, 2016; 29 (2): 179-190.
12. Milne G., Musiek E., Morrow J. F2 -isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: an overview. *Biomarkers*, 2005; 10: S10-23
13. Davì G., Ciabattini G., Consoli A. *et al.* In vivo formation of 8-isoprostaglandin F2 $\alpha$  and platelet activation in diabetes mellitus: effect of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation*, 1999; 99: 224-229.
14. Keaney J., Larson Jr., Vasan R. *et al.* Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2003; 23: 434-439.
15. Davì G., Chiarelli F., Santilli F. *et al.* Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration. *Circulation*, 2003; 107: 3199-203.